HAL
open science

Etude de Pan A et de Pan B : deux protéines régulatrices du protéasome chez les archaea halophiles.

Hala Chamieh

To cite this version:

Hala Chamieh. Etude de Pan A et de Pan B : deux protéines régulatrices du protéasome chez les archaea halophiles.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011475

HAL Id: tel-00011475

https://theses.hal.science/tel-00011475

Submitted on 27 Jan 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
UFR DE BIOLOGIE

THESE
Soutenue publiquement le 15 décembre 2005

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline BIOLOGIE

Par

Hala CHAMIEH

ETUDE DE PAN A ET PAN B : DEUX PROTEINES REGULATRICES DU PROTEASOME CHEZ LES ARCHAEA HALOPHILES

Institut de Biologie Structurale
Jean-Pierre Ebel (CNRS-CEA-UJF)
Laboratoire de Biophysique moléculaire
Grenoble, France

Composition du Jury :

Dr. Bruno Franzetti	Directeur de Thèse
Dr Christine Ebel	Présidente
Dr. Hannu Myllykallio	Rapporteur
Pr. Pierre Carol	Rapporteur
Pr. Dominique Schneider	Examinateur

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

« Tout Arrive À Qui sait attendre . . . »

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Remerciements...

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Guiseppe ZACCAI, directeur du LBM, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire, soutenue et conseillée toujours avec une grande disponibilité.

Aussi, je voudrais sincèrement remercier mon directeur de thèse : Bruno FRANZETTI pour le regard qu'il a porté sur l'avancement de mes travaux au cours de ces trois années tout en me laissant la liberté de travailler, pour son aide, sa disponibilité au quotidien, ses lectures critiques et assidues de mon manuscrit et pour sa grande gentillesse.

JE voudrais remercier Monsieur Pierre CAROL et Monsieur Hannu MYLYKALLYo pour avoir accepté d'être rapporteurs et avoir eu la patience de lire mon manuscrit compte tenu du peu de temps accordé.

Je voudrais également remercier Mme Christine Ebel qui me fait l'honneur de présider ce jury , pour sa disponibilité et sa gentillesse au cours de ces trois années de thèse.

Je voudrais également remercier Monsieur Dominique Schneider d'avoir accepté être membre du jury.

Je n'oublie évidemment pas les membres de mon laboratoire (LBM) pour leur aide et leurs conseils; un merci tout particulier à toute l'équipe de PROTARC : Asun, Amédé, Eva, Stéphanie, Frauke et un grand merci particulier à Hugo et Vincent qui ont contribué à l'étude des Pans.

Un merci chaleureux aux autres collègues du laboratoire pour leur soutien moral et nos discussions de tout ordre, notamment à ma grande amie katy, à Dominique, à Jacques, à Martin et à Fred sans oublier tous les nouveaux et les anciens : Marion, Emmanuela, Moe, Benoit, Nicolas, Renata, Antoshka, Isabella, Evelyne et Wisha…….. Bon courage aux nouveaux thésards et je ne pourrai jamais remercier tout le monde pour leur soutien au cours de ces trois longues années.

Je ne pourrai pas oublier les autres personnes de l'IBS notamment Pascale et Maxime pour les nombreuses discussions passagères, Dominique pour son soutien depuis mon arrivée en DEA à Grenoble, et sans oublier Patricia, Florence et Olivier.

A Rana et Karim : Sans votre aide, cette thèse ne serait peut-être pas. Votre soutien au quotidien sans relâche dans les moments les plus difficiles sont dignes de ma plus sincère gratitude.

Un clin d'œil très affectueux à tous mes amis de Grenoble : Virginie, Jessica,Mario, Pascale, Momo et tous les autres ….. pour leur soutien, leurs encouragements, leur patience, les bons moments passés et à venir…

Enfin, quoique je puisse dire, je ne pourrai jamais remercier ma famille pour cette lumière au fond du tunnel : Sans vous, je ne serais pas là où je suis.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

À mes Parents . . .

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

LISTE DES FIGURES 7

ABBREVIATIONS 9

INTRODUCTION 10

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 14

I LES PROTEASES ATP-DEPENDANTES 16

I.1 Distribution 16

I.2 Caractéristiques 17

II LE SYSTEME PROTEASOME 19

II.1 Le protéasome 20 S 19
- II.1.1 Historique et Découverte 19
- II.1.2 Distribution 19
- II.1.3 Architecture du protéasome 20 S 20
- II.1.4 Activité du protéasome 20 S 22
- II.1.5 Rôle biologique du protéasome 20 S chez les archéobactéries 23

II.2 Les régulateurs du protéasome 24

III LES AAA+ REGULATEURS DE LA PROTEOLYSE 25

III.1 Caractéristiques de la superfamille des AAA+ 26

III.2 Mode d'action des AAA+ dans la protéolyse ATP-dépendante 28
- III.2.1 Oligomérisation des AAA + 29
- III.2.2 Liaison des AAA+ à leurs partenaires protéolytiques 30
- III.2.3 Reconnaissance et liaison du substrat 31
  - III.2.3.1 Signaux de dégradation 32
    - III.2.3.1.A Chez les bactéries 32
    - III.2.3.1.B Chez les eucaryotes 33
    - III.2.3.1.C Chez les archéobactéries 34
  - III.2.3.2 Sites de reconnaissance des substrats 34
- III.2.4 Dépliement et « translocation » dans la cavité protéolytique 35
  - III.2.4.1 Mécanisme de dépliement 35
- III.2.5 Hydrolyse et relâchement des produits 37

III.3 Fonction chaperonne des protéases ATP-dépendantes 37

IV LES ATPASES DU PROTEASOME EUCARYOTE : LES RPT 38

IV.1 Rôle et Fonction 39

IV.2 Interaction des sous-unités entre elles et avec d'autres protéines 40
IV.2.1 Interaction des sous-unités entre elles 40
IV.2.2 Interaction avec d'autres protéines 41

V LES ATPASES DU PROTEASOME ARCHEOBACTERIEN OU RPT-LIKE : PAN 41

V.1 Découverte de PAN 41

V.2 Distribution de PAN au sein des archéobactéries 42
V.2.1 VAT : homologue fonctionnel de PAN chez *Thermoplasma acidophilum* 42

V.3 Rôle et caractéristiques biochimiques de PAN 43

***VI* DESCRIPTION DU SYSTEME D'ETUDE : *HALOBACTERIUM SALINARIUM* 44**

VI.1 Taxonomie et Habitat 44

VI.2 Caractéristiques 45

VI.3 Organisation du génome 46

VI.4 Équipements de survie 47

VII OBJECTIFS DE LA THESE 48

***MATERIELS ET METHODES* 51**

I MATERIELS 52

I.1 Souches 52

I.2 Plasmides 52

II TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 53

II.1 Manipulation de l'ADN recombinant 53
II.1.1 Extraction de l'ADN génomique d'*Halobacterium salinarium* 53
II.1.2 Amplification par PCR 54
II.1.3 Précipitation de l'ADN 55
II.1.4 Séparation et purification des fragments d'ADN 55
II.1.5 Transformation 56
II.1.6 Préparation de l'ADN plasmidique 57

II.2 Manipulation de l'ARN 58
II.2.1 Extraction de l'ARNm d'*Halobacterium salinarium* 58
II.2.2 Northern Blot 58
II.2.3 Construction des sondes et marquage des sondes au ^{32}P radioactif 60
II.2.4 Transcription des sondes *in vitro* et marquage au 32 P radioactif 62
II.2.5 Hybridation et détection par autoradiographie 62

II.3 Ribonuclease Protection Assay 62
II.3.1 Extraction de l'ARNm d'intérêt 63
II.3.2 Construction, clonage de la sonde d'intérêt et transcription *in vitro* 63
II.3.3 Hybridation de l'ARN contre la sonde et digestion à la ribonucléase 64

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.4 Extension d'amorce ou Primer extension **65**

III TECHNIQUES DE BIOCHIMIE ET DE BIOLOGIE CELLULAIRE **67**

III.1 Culture et Expériences de stress **67**

III.2 Immunodétection **68**
III.2.1 Purification des anticorps sur colonne d'affinité 68
III.2.2 Préparation des extraits protéiques et détermination de la concentration protéique 69
III.2.3 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 70
III.2.4 Coloration des gels au bleu de Coomassie 71
III.2.5 Technique de Western Blot 72
III.2.5.1 Electrotransfert des protéines sur membrane 72
III.2.5.2 Coloration de la membrane de PVDF 72
III.2.5.3 Immunodétection des protéines sur la membrane 72

III.3 Immunoprécipitation **73**

III.4 Techniques de Purification **75**
III.4.1 Purification du complexe natif 75
III.4.1.1 Clarification des extraits 75
III.4.1.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe 75
III.4.1.3 Chromatographie échangeuse des ions 76
III.4.1.4 Hydroxylapatite 76
III.4.1.5 Chromatographie sur Gel-filtration 76
III.4.2 Expression et Purification des protéines PAN recombinantes 77
III.4.2.1 Clonage des protéines recombinantes 77
III.4.2.2 Expression des protéines recombinantes 78
III.4.2.3 Essais de Purification des protéines recombinantes 79

III.5 Séparation sur Gradient de sucrose **79**

III.6 Gels Bidimensionnels **80**
III.6.1 Extraction et solubilisation de l'échantillon protéique 81
III.6.2 Première dimension 81
III.6.3 Deuxième dimension 82
III.6.4 Coloration du gel au nitrate d'argent 83

- **OUTILS DE BIOINFORMATIQUE** **83**

CHAPITRE I : LES DEUX PANS D'*HALOBACTERIUM SALINARIUM* **86**

I ANALYSE DES SEQUENCES PROTEIQUES DES DEUX PANS D'*HALOBACTERIUM SALINARIUM* **88**

I.1 Comparaison des deux PANs au niveau de la séquence **88**

I.2 Comparaison des protéines PANs halophiles par rapport à leurs homologues **90**
I.2.1 Homologie des protéines PANs halophiles à leurs orthologues halophiles 90
I.2.2 Homologie des protéines PANs à leurs homologues archaéobactériens et eucaryotes 90

II LES DEUX PROTEINES PAN A ET PAN B SONT EXPRIMEES DANS *HALOBACTERIUM* ET EXISTENT SOUS DEUX FORMES DIFFERENTES **93**

II.1* Immunodétection des PANs dans les extraits totaux d'*Halobacterium salinarium **93**

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III LES DEUX PANS EXISTENT SOUS DEUX ISOFORMES DANS LES EXTRAITS D'*HALOBACTERIUM SALINARIUM* TRONQUEES DANS LEUR REGION N-TERMINALE 95

i. Gel bidimensionnel sur un extrait protéique partiellement purifié 96
ii. Immunoprécipitation 98
iii. Purification totale ou partielle des PANs et de leurs isoformes à partir d'extraits protéiques totaux d'Halobacterium 99

III.1 Mécanismes responsables de l'hétérogénéité en N-terminale chez les PANs 100
III.1.1 Utilisation alternée de deux départs de traduction 100
III.6.4.1 Deux départs de transcription des PANs 102

III.2 Discussion sur l'hétérogénéité N-terminale des protéines PANs 105

CHAPITRE II : OLIGOMERISATION ET INTERACTION DES PANS 108

I ETUDES DES PANS RECOMBINANTES *IN VITRO* 110

II TENTATIVES DE PURIFICATION DU (DES) COMPLEXE(S) PANS A PARTIR DES EXTRAITS D'*HALOBACTERIUM* 111

III OLIGOMERISATION ET INTERACTION DES PANS *IN VIVO* 114

III.1 Localisation cellulaire des PANs dans les cellules 114

III.2 Etat d'oligomérisation des PANs et association au protéasome 116

III.3 Les PANs sont capables d'interagir pour former un complexe hétérooligomérique 119

III.4 Discusssion sur l'oligomérisation et l'interaction des PANs 121

CHAPITRE III : ROLE CELLULAIRE DES PANS 122

I CO- REGULATION DES PANS AU COURS DE LA CROISSANCE 124

I.1 Introduction 124

I.2 Etude d'expression des PANs au cours de la croissance 125
I.2.1 Régulation au niveau transcriptionnel 126
I.2.2 Régulation au niveau protéique 128

I.3 Signification physiologique de la co-régulation des PANs en fonction de la croissance 129

II REGULATION DES PANS EN FONCTION DU STRESS 130

II.1 Introduction 130

II.2 Régulation du protéasome et des PANs après un choc thermique et salin 131
II.2.1 Réponse au niveau transcriptionnel 132
II.2.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel 133
II.2.3 Discussion sur la réponse des PANs au stress 134

II.3 Co-transcription de PAN B avec d'autres gènes en conditions de stress 136

II.4 Réponse cellulaire des archéobactéries halophiles dans l'adaptation à de faibles concentrations salines 139

III.5 Réponse cellulaire des archéobactéries halophiles après inhibition du protéasome par la drogue NLVS 141

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **145**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **148**

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Liste des Figures

Figure 1: Modèle schématique représentant le rôle des protéases ATP-dépendantes dans la cellule**.** **18**
Figure 2 : Comparaison entre la structure du protéasome 20 S archéobactérien de *Thermoplasma acidophilum* et celle du protéasome eucaryote de S. *cerevisiae.* **22**
Figure 3 : Le protéasome 26 S. **25**
Figure 4 : Classifications des membres de la famille AAA+ **26**
Figure 5 : Les différentes étapes de la protéolyse ATP-dépendante tel qu'il a été décrit pour le système protéolytique bactérien Clp **29**
Figure 6 : Vue Structurale de la protéase ATP-dépendante HslUV **31**
Figure 7 : Modèle schématique du mécanisme de dépliement d'un substrat étiqueté par une protéine AAA+. **36**
Figure 8 : Alignement structural des différentes sous-unités ATPasiques du protéasome 26S**.** **39**
Figure 9 : Taxonomie et Habitat *d'Halobacterium salinarium***.** **45**
Figure 10: Clonage des sondes dirigées contre PAN A, PAN B et la sous-unité alpha du protéasome dans le vecteur de transcription pCR II-TOPO. **61**
Figure 11 : Construction de la sonde pour la protection à la ribonucléase et clonage dans le vecteur PCRII-TOPO. **63**
Figure 12 : Amplification des gènes PAN A et PAN B et clonage dans le vecteur d'expression pET-11a**.** **78**
Figure 13: Alignement des séquences protéiques des deux PANs d''*Halobacterium salinarium*. **89**
Figure 14: Alignement des séquences protéiques des deux PANs d'*Halobacterium salinarium* avec les PANs *d'Haloferax volcanii*, de *Méthanococcus janaschii* et l'une des sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome eucaryote la rpt4. **92**
Figure 15: Immunodétection des extraits totaux d'*Halobacterium* avec des anticorps dirigés contre les régions C-terminaux de PAN A et de PAN B**.** **94**
Figure 16 : Immunodétection des protéines recombinantes et des extraits totaux avec les anticorps dirigés contre PAN A et PAN B. **95**
Figure 17 : Séparation bi-dimensionnelle des extraits totaux d'*Halobacterium salinarium*. **97**
Figure 18 : Immunoprécipitations de PAN A et de PAN B couplées à un gel bidimiensionnel**.** **99**
Figure 19 : Région N-terminale des protéines PANs**.** **102**
Figure 20: Cartographie de la région 5' des ARNm des PANs chez *Halobacterium salinarium par* extension d'amorce. **104**
Figure 21 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PAN**.** **112**
Figure 22 : Localisation cellulaire des PANs *d'Halobacterium salinarium***.** **115**
Figure 23 : Etude d'oligomérisation des protéines PANs sur un gradient de sucrose de 7-30%. **117**
Figure 24: Co-immunoprécipitation des protéines PAN A et PANB. **120**
Figure 25 : Courbe de croissance typique d'*Halobacterium salinarium***.** **126**
Figure 26: Variation des transcrits PAN A et PAN B et celle de la sous-unité alpha du protéasome au cours de la croissance. **127**
Figure 27 : Variation des niveaux protéiques de PAN A et de PAN B au cours de la croissance**.** **128**
Figure 28 : Etude de la régulation transcriptionnelle des PANs au cours du stress salin et thermique**.** **133**
Figure 29 : Varitation des niveaux protéiques de PAN A, PAN B et le thermosome au cours du stress thermique et salin. **134**
Figure 30 : Ribonuclease protection assay pour détecter la co-transcription entre *panB* et l'oligoendopeptidase**.** **138**
Figure 31 : Adaptation d'*Halobacterium salinarium* et d'*Haloarcula marismortui* à différentes concentrations de sel. **140**
Figure 32 : Réponse des archéobactéries halophiles après l'addition de la drogue inhibitrice du protéasome NLVS**.** **142**
Figure 33 : Variation des protéines TET, TF55 et PAN B après l'addition de la drogue NLVS inhibitrice du protéasome. **144**

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

ABBREVIATIONS

5' UTR	5'- Untranslated region
A	Adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique
ADP/ATP	adénosine di- ou tri- phosphate
BSA	Albumine sérique bovine
C	Cytidine
CTP	Cytosine tri-phosphate
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	DiméthylSulfoxyde
dNTP	Désoxy Nucléoside Tri-phosphate
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiotréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
G	Guanosine
GTP	guanosine tri-phosphate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthio-ß-D-galactoside
Kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
min	minute
nt	nucléotide
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
p.b	paire de base
PVDF	fluorure de plyvinyllidène
Qsp	quantité suffisante pour
rpm	Rotation ou revolution par mintue
SDS	Sodium dodécyl sulfate
T	Thymine
TEMED	N,N,N',N4 tétraméthlène diamine
TTP	Thymidine Triphosphate
tr	tours par minute
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U	Uracile
UTP	Uridine Tri-phosphate
UHP	système d'ultapurification de H20
UV	Ultraviolet

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Introduction

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Depuis la séparation du vivant en trois domaines distincts : Archaea, Bacteria, Eucarya, le nombre des archéobactéries découvertes jusqu'à présent ne cesse de croître et témoigne de la diversité de leur niche écologique des marais salants jusqu'aux profondeurs des océans. La place de ces microorganismes dans l'évolution reste controversée : pour certains auteurs, ce sont des organismes intermédiaires entre les eubactéries et les eucaryotes, alors que pour d'autres les trois domaines du vivant se sont différenciés à partir d'un même ancêtre commun. Beaucoup d'aspects de régulation des processus biologiques des archéobactéries sont de type eucaryote, ceci est le cas pour la protéolyse dans ces microorganismes. Ainsi le protéasome, un complexe supramoléculaire impliqué dans la dégradation ATP-dépendante des protéines dans les cellules eucaryotes, a été découvert dans le cytoplasme de ces microorganismes.

Cette thèse porte sur l'étude du complexe régulateur de l'activité du protéasome : **PAN** chez une archéobactérie halophile ***Halobacterium salinarium*** qui présente une homologie significative aux sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome eucaryote.

J'introduis mes travaux de recherche par une synthèse bibliographique qui présente d'une façon générale les protéases ATP-dépendantes dont le protéasome fait partie. Dans une deuxième partie, je présente le système protéasome qui comprend le protéasome 20 S ainsi que ses régulateurs. Je m'attarde dans une partie sur les mécansimes de régulation des protéases ATP-dépendantes via la présentation des protéines AAA+ impliquées dans la protéolyse. Une dernière partie est consacrée aux sous-unités régulatrices ATPasiques (rpt) eucaryotes afin de présenter la protéine PAN et le système d'étude *Halobacterium salinarium* qui ont fait l'objet de notre étude.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Rappels Bibliographiques

La protéolyse cellulaire ou dégradation des protéines est l'un des processus les plus essentiels à la survie de la cellule. Les protéines cellulaires sont continuellement dégradées en acides aminés et remplacées par des protéines néosynthétisées. Le processus est hautement sélectif et finement régulé, et la demie-vie d'une protéine donnée varie selon sa fonction de quelques minutes à quelques jours. En contrôlant le niveau de protéines-clefs dans la cellule, la protéolyse intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Hochstrasser, 1996 ; Hengge *et al.*, 2003) telle la progression du cycle cellulaire (Kirschner, 1999) ; l'oncogenèse (Mani *et al.*, 2005) ; la transcription (Ottosen *et al.*, 2002) ; le développement et la croissance (Zhang *et al.*, 2005) ; l'atrophie des muscles (Franch *et al.*, 2005) et la présentation de peptides antigéniques (Kloetzel, 2004). L'un des rôles les plus importants de la protéolyse est l'élimination des protéines anormales ou mal repliées dans la cellule (Pour revue, Goldberg, 2003). Les protéines anormales dans la cellule peuvent avoir des origines diverses : des erreurs de la machinerie de la traduction qui produisent des protéines défectueuses appelées également DRiPs (pour **D**eficient **R**ibosomal **P**roducts), des mutations qui génèrent des protéines incapables de se replier correctement. Les protéines anormales peuvent provenir également des stress environnementaux. Il existe un système de contrôle de la qualité des protéines dont le but est de prévenir l'accumulation des protéines défectueuses dans la cellule (Wickner *et al.*, 1999). Les chaperonnes fonctionnent étroitement avec les protéases pour éliminer les protéines défectueuses et forment ensemble le système de contrôle de qualité des protéines. Les protéines anormales sont éliminées par l'action des chaperonnes qui les aident à trouver leur conformation native, et par la machinerie protéolytique qui élimine définitivement les protéines défectueuses.

Les protéases représentent des constituants majeurs dans la cellule (3 à 10% des protéines de la cellule) et se répartissent en deux groupes selon leur besoin ou non en énergie. On distingue les protéases ATP-dépendantes et les protéases ATP-indépendantes.

Les protéases ATP-dépendantes interviennent essentiellement dans la dégradation des protéines dites régulatrices et dans l'élimination des protéines défectueuses. L'inhibition ou l'inactivation de la majorité des protéases ATP-dépendantes entraîne une sensibilité au stress, et l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme. La majorité de ces protéases sont induites en conditions de stress (Bush *et al.*, 1997 ; Chuang *et al.*, 1993 ; Etlinger et al., 1977 ; Goff *et al.*, 1984, Hecker *et al.*, 1996 ; Heinemeyer *et al.*, 1991 ; Jelinsky *et al.*,1999 ; Kroh *et al.*, 1990 ; Kruger *et al.*, 2000).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Les protéases indépendantes de l'énergie interviennent notamment dans les fonctions dites de « ménage ». Leur rôle est notamment de réaliser l'étape finale de la protéolyse *in vivo*, en ce sens elles sont chargées de dégrader les petits oligopeptides issus de la protéolyse dépendante de l'énergie en acides aminés réutilisables.

I Les protéases ATP-dépendantes

I.1 Distribution

Les protéases ATP-dépendantes ont été identifiées dans tous les organismes analysés et dans les trois domaines du vivant : Bacteria, Eucarya et Archaea (revue Schmidt *et al.*,1999). Elles ont été classées en quatre familles selon l'homologie de séquences de leurs sous-unités protéolytiques : la famille Lon, la famille Clp, la famille FtsH et la famille du protéasome (Tableau 1).

Protéase	Organisme/Localisation	Nombre de gènes	Mode de clivage
Protéasome	Eucaryote/Cytoplasme, Noyau	> 32	Ntn Hydrolase
Protéasome	Archéobactérie/cytoplasme	Entre 2 et 4	Ntn Hydrolase
HslUV	Bactérie/cytoplasme	2	Ntn Hydrolase
ClpAP	Bactérie/cytoplasme	2	Sérine endopeptidase
ClpXP	Bactérie/cytoplasme	2	Sérine endopeptidase
ClpCP	Bactérie/cytoplasme, Chloroplaste/stroma	2	Sérine endopeptidase
Lon (La)	Bactérie/cytoplasme	1	Métalloprotéase
Pim1 (Lon)	Mitochondrie/Matrice	1	Métalloprotéase
Lon	Archéobactérie/ membranaire ?	1	Métalloprotéase
FtsH	Bactérie/ membrane interne	1	Métalloprotéase
FtsH	Archéobactérie/cytoplasme	1	Métalloprotéase
i-AAA	Mitochondrie/membrane interne	1	Métalloprotéase
m-AAA	Mitochondrie/membrane interne	1	Métalloprotéase

Tableau 1 : Distribution des protéases ATP-dépendantes dans les différents organismes.

Les protéases ATP-dépendantes sont classées en quatre familles distinctes : la famille du protéasome, la famille des Clp, la famille des Lon et la famille des FtsH.
Les protéases sont codées par 1 gène (Lon, FtsH, Pim1, m-AAA), deux gènes dans le cas de Clp et du « protéasome-like bactérien » HslUV, deux à quatre dans le cas du protéasome des archaéobactéries. Le système protéasome chez les eucaryotes représente le système protéolytique le plus complexe connu jusqu'à présent; les protéines qui le constituent sont codées par plus que 32 gènes différents.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Chez les bactéries, il existe cinq classes de protéases ATP-dépendantes. Ces protéases incluent : le système ClpAP, le système ClpXP, la protéase Lon, la protéase membranaire FtsH et la protéase ClpYQ ou HslUV qui s'apparente au protéasome par son mode de clivage (pour revue : Gottesman, 2003).

Chez les eucaryotes, le protéasome est l'acteur principal de la protéolyse ATP-dépendante cytosolique des cellules eucaryotes. Le protéasome eucaryote constitue le système protéolytique le plus complexe découvert jusqu'à présent avec 32 gènes différents qui codent pour les sous-unités du complexe (pour revue : Coux *et al*., 1996, Glickman *et al.*, 2002)

Chez les archéobactéries qui présentent des caractéristiques de type eucaryote, le protéasome a été découvert dans leur cytoplasme (Dahlmann *et al.*, 1989). Ce protéasome représente une version plus simplifiée du protéasome eucaryote, et sera détaillé dans la partie suivante.

I.2 Caractéristiques

Bien que les protéases ATP-dépendantes ne présentent pas toutes une homologie significative au niveau de la séquence primaire, ni en ce qui concerne le mode de clivage des protéines, elles présentent plusieurs caractéristiques communes notamment leur assemblage en de larges complexes multimériques « compartimentés » formés par l'association d'un complexe protéolytique et d'un complexe régulateur de type ATPasique. Les sites actifs responsables de la protéolyse sont confinés au sein d'une chambre dont l'accès est contrôlé par les ATPases gardant les portes d'entrée de la chambre protéolytique. C'est cette architecture « compartimentée » qui confère à la protéolyse sa spécificité et sa dépendance à l'ATP pour la dégradation d'un substrat.

La ressemblance au niveau de l'architecture des protéases ATP-dépendantes a été soulignée pour la première fois en 1995 lorsque les données structurales du complexe protéolytique ClpP *d'E. coli* et du protéasome 20 S archéobactérien sont devenues disponibles (Lowe *et al*., 1995 ; Kessel *et al.*, 1995). En effet, ces deux protéases présentent la même structure quaternaire en tonneau : ClpP est formée par l'agencement de deux anneaux heptamériques, le protéasome 20 S est formé par l'agencement de quatre anneaux heptamériques. C'est une structure auto-compartimentée où les sites actifs sont confinés à l'intérieur d'une chambre dont l'ouverture ne dépasse pas les quelques nm de diamètre (DeMot *et al.*, 1999 ; Lupas *et al.*, 1997 b). L'accès aux cavités internes de ces protéases est en général réservé à de petits peptides ou de protéines complètement dénaturées qui peuvent passer à travers les pores. Le complexe protéolytique par lui-même a une activité peptidasique limitée et a besoin pour

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

dégrader des protéines natives d'interagir avec une autre machinerie capable de reconnaître les protéines, de les déplier afin qu'elles soient accessibles aux sites catalytiques. Ces machines se présentent sous forme de complexes ATPasiques qui s'associent aux complexes protéolytiques afin de réguler leur activité. Ces complexes peuvent être complètement formés de sous-unités ATPasiques (ClpA, ClpX, HslU, PAN) ou partiellement (le complexe régulateur 19 S du protéasome eucaryote). Dans le cas de FtsH et de Lon, l'activité ATPasique est liée à un domaine intégré dans le complexe lui-même (Chung *et al*., 1981 ; Stahlberg *et al*., 1999 , Suzuki *et al.*, 1997). Les domaines ou sous-unités ATPasiques sont les régulateurs de l'activité protéolytique portant des activités de type chaperonne moléculaire. Elles appartiennent à la large famille des AAA+ (**A**TPase **A**ssociated with various Cellular **A**ctivities) qui utilisent l'énergie de l'ATP pour conduire des fonctions de dépliement et de désassemblage (Neuwald *et al*., 1999 ; Lupas *et al*., 2002, Vale *et al*., 2000).

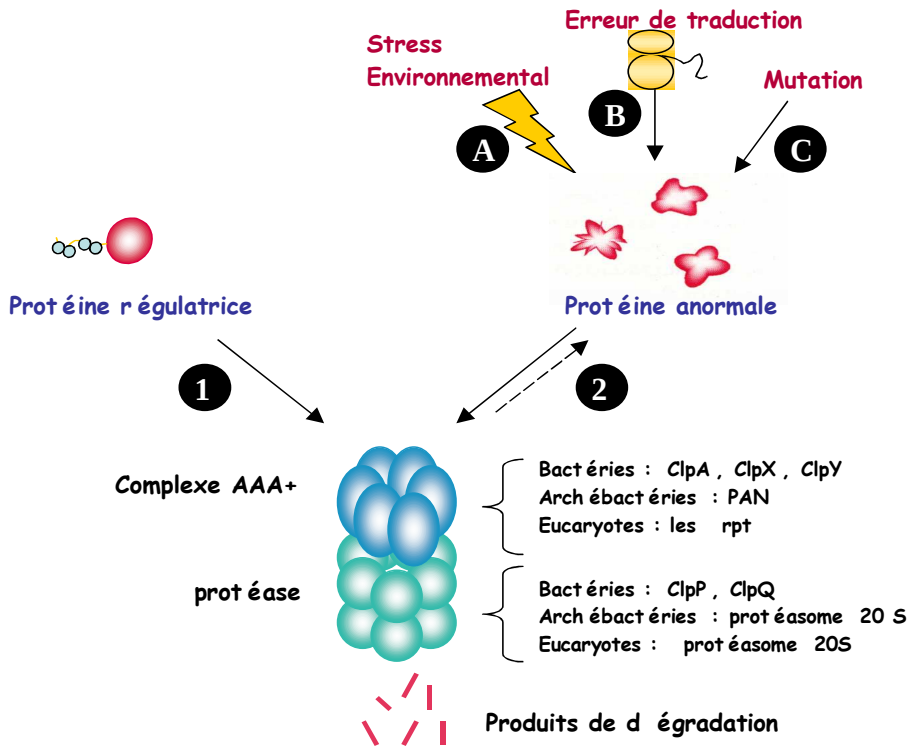


Figure 1: **Modèle schématique représentant le rôle des protéases ATP-dépendantes dans la cellule.**

Les protéases ATP-dépendantes sont formées par l'association d'un complexe peptidasique dont la structure se présente en tonneau (Vert) et d'un complexe ATPasique AAA+ hexamérique (Bleu). Elles participent à des fonctions essentielles dans la cellule en contrôlant la dégradation d'un grand nombre de protéines régulatrices (1) et en participant à l'élimination des protéines anormales dans la cellule (2) qui sont générées soit par des stress environnementaux (A), soit par des erreurs de la traduction (B), soit par des mutations (C)

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II Le système protéasome

II.1 Le protéasome 20 S

II.1.1 Historique et Découverte

C'est en 1980 que le protéasome fut décrit pour la première fois (Wilk *et al.*, 1980). Extrait de l'hypophyse bovine, ce complexe protéique de 700 kDa est constitué de sous-unités de poids moléculaires allant de 24 à 28 kDa et présente une activité peptidasique en C-terminal de résidus hydrophobes, acides et basiques (Edmunds *et al.*, 1982). Ce n'est qu'en 1988 qu'Arrigo *et al.* montre que ce complexe protéolytique, mis en évidence dans de nombreuses cellules eucaryotes, et le prosome, hypothétique facteur de transcription, correspondent en fait à une seule et même entité. Les deux complexes furent baptisés « protéasome » pour les activités protéasiques (Arrigo *et al.*, 1988).

II.1.2 Distribution

Le protéasome est donc un large complexe multicatalytique qui est présent sous diverses formes chez toutes les espèces vivantes allant des archéobactéries aux eucaryotes supérieurs. En 1989, l'existence d'un complexe fut établie chez l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* (Dahlmann *et al.*,1989). Le protéasome a été également découvert chez toutes les archéobactéries séquencées jusqu'à présent (revue Maupin-furlow *et al.*, 2000). Chez la bactérie *Escherichia coli*, un système protéolytique HslUV qui est homologue au protéasome eucaryote a été décrit (Bogyo *et al.*,1997 ; Rohrwild *et al.*,1996). Chez les cellules eucaryotes, les protéasomes se trouvent au niveau du cytoplasme, du noyau et également associés au réticulum endoplasmique et au cytosquelette (Arcangeletti *et al.*, 1997 ; Peters *et al.*, 1994 ; Rivett, A.J., 1998). Chez les procaryotes, la distribution cellulaire n'a pas été encore établie, mais les études biochimiques suggèrent que les protéasomes procaryotiques sont essentiellement cytoplasmiques ou légèrement associés aux membranes (Maupin-furlow *et al*,1998).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.1.3 Architecture du protéasome 20 S

L'architecture du protéasome 20S est conservée de la bactérie à l'homme. Les protéasomes 20S sont des particules cylindriques de 15 nm de longueur et de 11 à 12 nm de diamètre organisés en quatre anneaux autour d'un canal central tel le montre la figure 2. Le protéasome renferme des sites catalytiques confinés au sein de la structure qui constituent un niveau de régulation de l'activité du protéasome.

Le protéasome 20S de l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* constitue le prototype de la structure quaternaire du protéasome et de la topologie de l'enzyme. Il comporte 28 sous-unités qui représentent deux produits de gène homologues (alpha et bêta) arrangés en quatre anneaux heptamériques ($\alpha\beta\alpha\beta$) (Lowe *et al*, 1995). Les sous-unités alpha forment les anneaux extérieurs, alors que les sous-unités bêta forment les anneaux intérieurs qui renferment les sites catalytiques protéolytiques. Chez les eucaryotes supérieures, l'organisation du protéasome 20S est similaire à celle du protéasome archéobactérien avec la présence de quatre anneaux heptamériques, elle est complexée cependant par la différenciation des sous-unités alpha et bêta en 7 produits de gènes différents (Figure 2). La structure cristallographique du protéasome archéobactérien à 3,4 A° a suggéré que la chambre intérieure communique avec l'extérieur via un canal dont l'ouverture correspond à 13-A° formé par le centre des anneaux alpha. Cette ouverture ne permet que l'entrée de petits peptides ou une hélice alpha, d'où le besoin de co-facteurs ou d'enzymes additionnelles permettant ainsi le dépliement des protéines et leur translocation via ce canal. Plusieurs études supportent cette hypothèse notamment celles qui démontrent que la dénaturation des polypeptides, via le traitement par la chaleur (Mykles *et al.*, 1991) ou par des agents oxydants ou réducteurs (Fagan *et al*, 1986), entraîne leur dégradation par le protéasome 20S; alors que les protéines natives sont elles résistantes à l'hydrolyse (Wenzel *et al.*, 1993). De plus, l'attachement de particules de nanogold de 2 nm de diamètres à l'insuline dépliée empêche sa dégradation par le protéasome (Wenzel *et al.*, 1995). La petite ouverture du protéasome vers l'extérieur peut assurer un mécanisme de dégradation processive, en limitant la taille de ses produits de dégradation à de petits polypeptides (3 à 30 acides aminés) qui ont une structure secondaire très limitée (Akopian *et al*, 1997 ; Kisselev *et al.*,1998).

Plus tard, la résolution de la structure du protéasome de la levure a montré qu'à la différence du protéasome archéobactérien, les extrémités N-terminaux des sous-unités alpha et en particulier celle de la sous-unité alpha3 bloquent l'ouverture et l'accès à la chambre protéolytique (Groll *et al.*,1997). La structure du protéasome expliquerait alors la nécessité

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

d'activer le protéasome par une perturbation de sa structure par des agents dénaturants ou par sa liaison à des complexes régulateurs de type PA700 (19S) ou PA28 (Whitby *et al.*, 2001). Les propriétés biochimiques des protéasomes eucaryotes soutiennent également le modèle structural, car le protéasome purifié en présence de glycérol se trouve dans un état latent et nécessite pour son activation le chauffage, des agents chaotropiques ou des pressions (McGuire *et al.*,1989 ; Weitman *et al.*, 1992). D'autres expériences ont démontré que des protéines, naturellement instables de type p21 ou l'alpha-synucléine, peuvent par elles-mêmes provoquer la perturbation de la structure du protéasome 20S sans l'aide de complexes régulateurs, elles sont aussi sélectivement dégradées mêmes si elles se retrouvent à l'intérieur d'une séquence peptidique dont les extrémités sont bloquées (Liu *et al.*, 2004). Cependant la structure cristallographique ne pourrait pas refléter vraiment l'état du protéasome 20S *in vivo* puisque deux conformations, l'une ouverte et l'autre fermée ont été observées par microscopie de force atomique (Osmulski *et al.*, 2000).

Les protéasomes de la levure et celui de *T. acidophilum* contiennent trois cavités internes qui incluent deux antichambres et une chambre centrale. Les deux anti- chambres sont formées par les deux premiers anneaux alpha et bêta ou les deux derniers avec un volume de 59 nm^3 et un diamètre de 2,2 nm, alors que la chambre centrale formée par les deux anneaux bêta a un volume de 84 mm3 et renferme les sites catalytiques. La présence de ces deux antichambres n'est pas encore bien comprise, cependant ces antichambres peuvent jouer un rôle dans la limitation de l'entrée à la chambre centrale ou le stockage des chaînes polypeptidiques, sachant que ces antichambres sont complètement absentes dans d'autres protéases ATP-dépendantes apparentées HslV et ClpP et qui sont cependant fonctionnelles.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

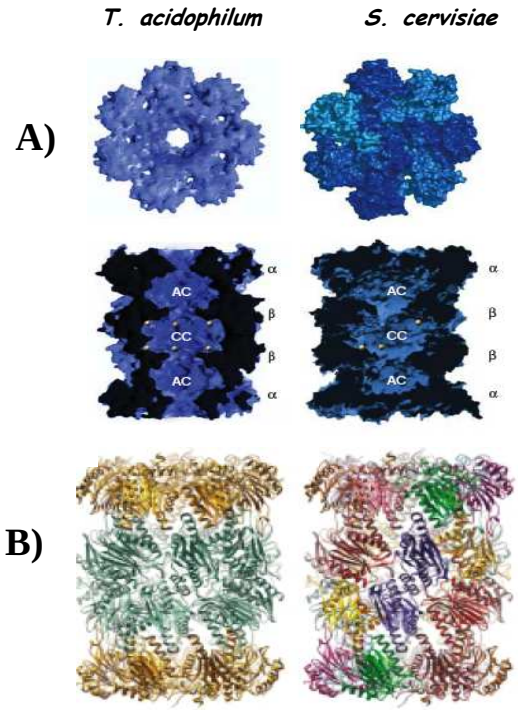


Figure 2 : Comparaison entre la structure du protéasome 20 S archéobactérien de *Thermoplasma acidophilum* et celle du protéasome eucaryote de *S. cerevisiae.*

Les deux protéasomes sont formés par l'agencement de quatre anneaux heptamériques délimitant une chambre ouverte chez le protéasome archéobactérien et fermée chez le protéasome eucaryote (A : vue axiale du complexe).
Les anneaux extérieurs sont formés par sept sous-unités alpha identiques pour le protéasome archéobactérien et différenciées pour le protéasome eucaryote. Les anneaux intérieurs sont formés par sept sous-unités bêta où résident les sites catalytiques. Elles sont identiques pour le protéasome archéobactérien et différenciées pour le protéasome eucaryote où trois d'entre elles uniquement portent des sites catalytiques (Les sites catalytiques sont représentés par les points blancs au niveau de A : coupe longitudinale du complexe).

A) Modèle de surface du protéasome de *Thermoplasma acidophilum* et du protéasome eucaryote de *S. cerevisiae* avec une vue axiale et une coupe longitudinale (Extrait de Pickart *et al*., 2004). B) Structure cristallographique du protéasome d'archéobactérie et du protéasome eucaryote (Extrait de Groll et al., 2000).

II.1.4 Activité du protéasome 20 S

Les protéasomes appartiennent à la famille des Ntn Hydrolases (N-terminal nucléophile hydrolase). Le clivage des liaisons peptidiques est assuré par une attaque nucléophile de la thréonine N-terminale des sous-unités bêta (Seemuller *et al.*, 1995). Pour étudier l'activité du protéasome de petits peptides synthétiques sont en général utilisés pour caractériser son activité biochimique. Les protéasomes eucaryotes possèdent en général trois types d'activité : trypsine-like, chymotrypsine-like et caspase-like (Cardozo *et al.*,1993 ; Rivett *et al.*, 1993 ;

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Orlowski *et al*,1993). Plusieurs protéasomes d'archéobactéries ont été caractérisés et la majorité d'entre eux possèdent une activité chymotrypsine-like notamment celui *d'Haloferax volcanii* et de *Thermoplasma acidophilum*, cependant les protéasomes 20 S des archéobactéries *Methanosarcina thermophila* et *Methanocaldococcus janaschii* ont montré des activités peptidasiques inhabituelles de type caspase-like et trypsin-like (Revue Maupin-furlow *et al.*, 2000).

Les protéasomes semblent dégrader les protéines d'une manière processive dans la cellule, c'est-à-dire qu'ils dégradent complètement une protéine substrat en oligopeptides avant d'attaquer une autre protéine. Cependant certaines protéines ne sont pas dégradées par le protéasome d'une façon processive, elles sont clivées en plusieurs fragments. C'est le cas des facteurs NF-kappaB p105 et Nf-kappaB p100 (Ciechanover *et al.*, 2001) et des facteurs d'initiation de la traduction (Baugh *et al.*, 2004).

II.1.5 Rôle biologique du protéasome 20 S chez les archéobactéries

Le rôle biologique exact du protéasome 20 S n'est pas bien connu chez les archéobactéries. Son rôle dans la dégradation des protéines n'a pas été encore démontré *in vivo*, et ses substrats protéiques ne sont pas encore connus. Son rôle dans la protéolyse régulatrice n'est pas encore démontré, d'autre part plusieurs indications suggèrent que le protéasome archéobactérien peut participer à la réponse au stress et au système de contrôle de qualité des protéines. La plupart des protéasomes purifiés des archéobactéries sont en effet extrêmement stables et actifs dans des conditions non favorables à d'autres protéines issues du même organisme. Ainsi le protéasome halophile 20 S d'*Haloarcula marismortui* est toujours stable et actif à des concentrations en sel pouvant atteindre les 0,5M qui constituent des conditions dénaturantes pour d'autres protéines halophiles notamment la malate déshydrogénase qui se déplie à bas sel (Franzetti *et al.*, 2002). De même que le protéasome d'autres archéobactéries résiste à des agents oxydants, et à des températures qui sont supérieures à l'optimum de croissance des microorganismes (Wilson *et al.*,1999). D'autre part, Shockley *et al* ont montré une régulation transcriptionnelle positive des sous-unités bêta du protéasome au cours d'un stress thermique chez *Pyrococcus furiosus* (Shockley *et al.*, 2003). Une autre étude montre que l'inhibition partielle du protéasome (80% de sous-unités bêta bloquées par l'action de l'inhibiteur) résulte en une incapacité des cellules à surmonter un stress thermique (Ruepp *et al.*, 1998).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.2 Les régulateurs du protéasome

Dans les cellules eucaryotes, plusieurs complexes régulateurs peuvent s'associer au protéasome 20S afin de réguler son activité. Ces complexes comprennent le 19S cap, PA28, et les complexes inhibiteurs 300-Kda et le PI31. Cette diversité reflète le rôle central joué par le protéasome dans de nombreux processus cellulaires. L'un de ces complexes, le « 19 S cap », s'associe au protéasome 20 S pour former le protéasome 26 S un complexe supramoléculaire de 2,6 MDa qui est impliqué dans la dégradation de protéines natives repliées marquées à la dégradation en général par l'ubiquitine (Figure 3). La liaison du 19 S au complexe 20 S est Mg-ATP dépendante (Eytan *et al.*,1989) et le complexe 19 S est capable de lier le protéasome de l'une ou des deux extrémités (Walz *et al*., 1998). De nombreuses études génétiques, biochimiques et couplées à la microscopie électronique ont permis la séparation du complexe 19 S, composé de 20 sous-unités différentes, en deux entités structurales différentes ou sous-complexes : « le lid » la plus distale du complexe 20 S qui est proche dans sa composition du COP9 signalosome : un complexe régulateur possédant des activités kinases chez les mammifères et les plantes et qui est impliqué dans la transduction du signal, et la « base » en contact avec le 20S. La base est formée de six sous-unités ATPasiques régulatrices ou Rpt (Regulatory proteasome Triple A-ATPase :1-6) et de deux larges sous-unités la Rpn1 et la Rpn2 (Glickman *et al*., 1998).

Chez les archéobactéries, la recherche des complexes susceptibles de réguler l'activité du protéasome a conduit à la découverte de **PAN** pour **P**roteasome **A**ctivating **N**ucleotidase. La protéine présentant de forte homologie avec les sous-unités ATPasiques du protéasome eucaryote ou rpt est capable de stimuler la dégradation des protéines par le protéasome. Aucune protéine apparentée aux sous-unités du « Lid » n'a été retrouvée chez les archéobactéries (Zwickl et al., 1999).

Avant de présenter la protéine PAN qui a fait l'objet de notre étude et les protéines apparentées rpt dans une nouvelle partie, il est important de détailler la famille des AAA+ à laquelle appartient PAN et les rpt eucaryotes ainsi que les modes d'action de ces protéines AAA+ dans la régulation de la protéolyse.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

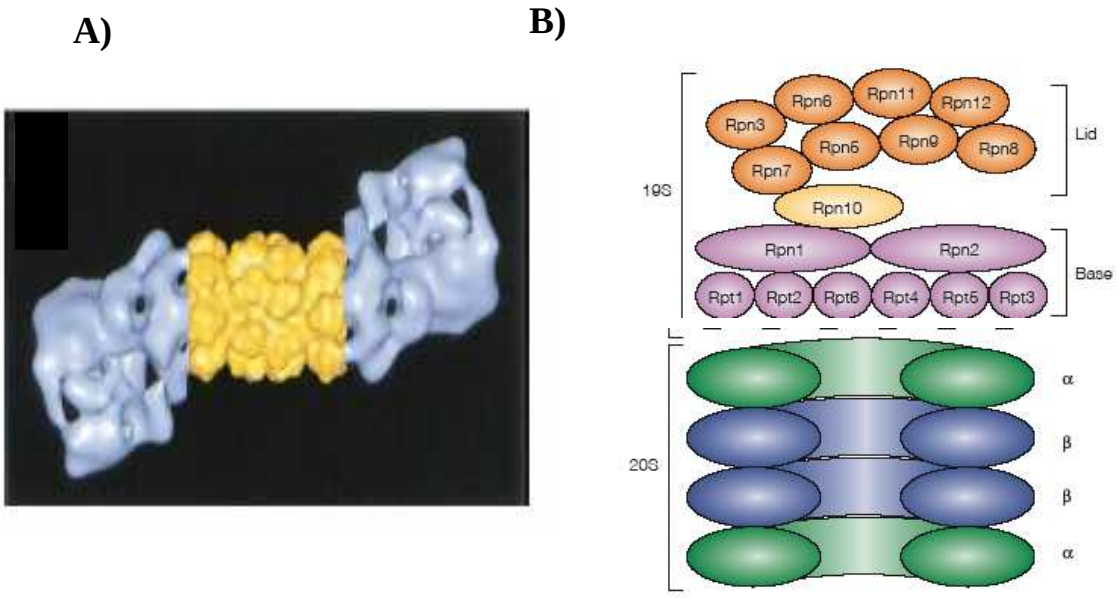


Figure 3 : Le protéasome 26 S.

A) Reconstruction tridimensionnelle du protéasome 26 S à partir des données structurales par microscopie électronique. Le protéasome 20 S (jaune) lie le complexe 19 S (en bleu.) (Extrait de Baumeister *et al*., 1998).

B) Modèle schématique de la composition du protéasome 26S.
Le protéasome 20 S formé par l'agencement de quatre anneaux heptamériques : deux anneaux intérieurs bêta (bleu) et deux anneaux extérieurs alpha (vert) lient le complexe 19 S. Le complexe 19 S se divise en deux sous-complexes : la base (rose) formée par l'association de six sous-unités ATPasiques AAA+ nommées rpt 1-6 (**R**egulatory **P**article **T**riple A) qui sont en contact direct avec le protéasome, et de deux larges sous-unités la rpn1 et la rpn2. le lid ou couvercle en jaune orangé est formé par des sous-unités régulatrices Non Atpasiques ou Rpn de 3 à 12 (**R**egulatory **P**article **N**on ATpase) (Extrait de Pickart *et al*., 2004).

III Les AAA+ régulateurs de la protéolyse

Les sous-unités ATPasiques de la base du complexe 19 S ainsi que la protéine PAN appartiennent à la famille des AAA+ qui regroupent aussi les protéases ATP-dépendantes Lon, FtsH et les sous-unités ATPasiques du système Clp (Figure 4).

La famille des AAA+ (**A**TPase **A**ssoicated with Various Cellular **A**ctivities) regroupe un grand nombre de protéines impliquées dans de diverses fonctions biologiques dans la cellule comme la réparation et la réplication de l'ADN (Hishida *et al*., 2001),la biogenèse des membranes (Babst *et al*., 1998), le trafic membranaire (Meyer *et al*., 2005), la régulation de la transcription (Lee *et al*., 2003), et le système de contrôle de qualité des protéines (Schirmer *et al*., 1996). La particularité de ces protéines est qu'elles utilisent l'énergie de l'ATP comme

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

source d'énergie pour remodeler des protéines ou des complexes protéiques ou ADN-protéine. Elles s'assemblent en de complexes oligomériques -en général des anneaux hexamériques formant un pore central- qui leur permettent d'exercer leur fonction biologique (Revue Lupas *et al*., 2002 ; Vale *et al*., 2000).

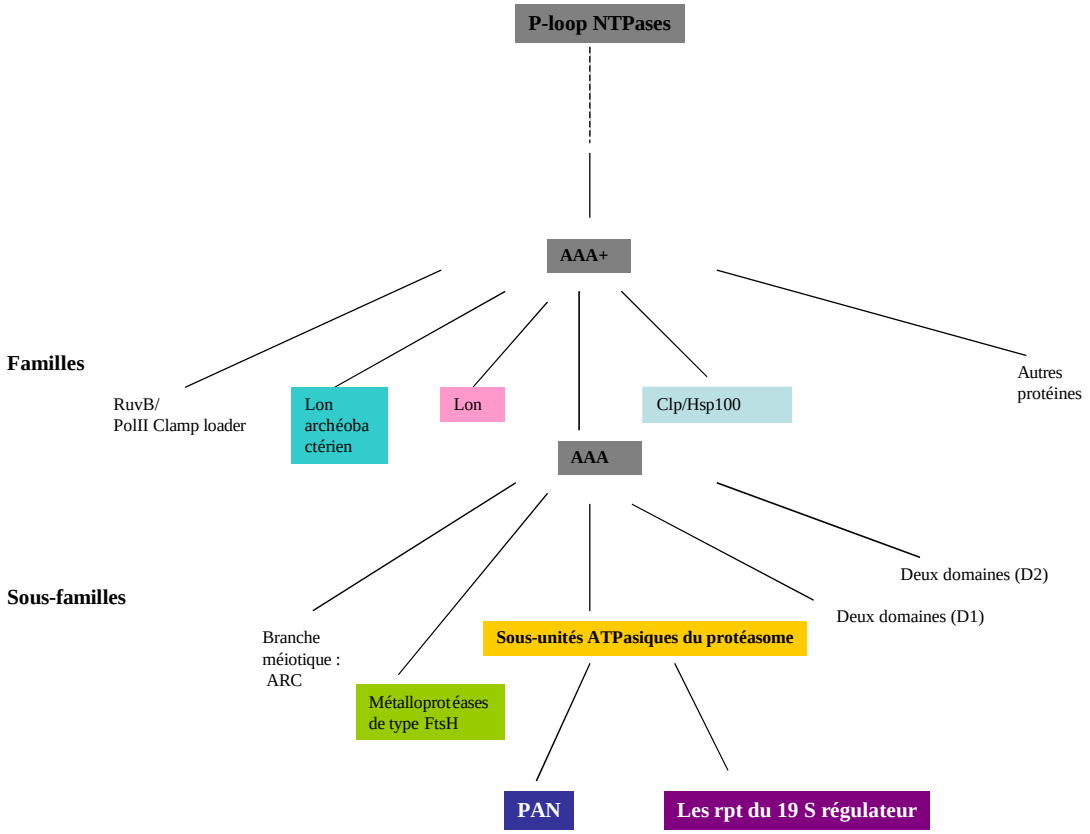


Figure 4 : Classifications des membres de la famille AAA+.

La classification se base essentiellement sur des données structurales notamment celles concernant le domaine central ATPasique. Les membres de la famille AAA+ impliqués dans la protéolyse sont encadrés. On distingue : les protéases Lon (vert et rose), les protéines Clp (bleu) qui interviennent dans la régulation de la protéolyse chez les bactéries. Les protéases FtsH (vert) et les sous-unités ATPasiques du protéasome (jaune) appartiennent eux à la famille plus classique AAA qui se caractérise par la présence d'une région très conservée à l'intérieur du domaine ATPasique nommée la région SRH. Les sous-unités ATPasiques du protéasome incluent les rpt eucaryotes (violet) et les rpt-like archéobactérien ou PAN (bleu foncé) (Extrait de Lupas *et al*., 2000).

III.1 Caractéristiques de la superfamille des AAA+

Les membres de la superfamille AAA+ sont distribués dans les trois domaines du vivant : *Archaea, Bacteria et Eucarya*. La signature de la famille des AAA+ est un domaine central ATPasique de 250 acides aminés qui peut être présent en une ou deux copies et qu'on appelle le module AAA (Koonin *et al*., 1993 ; Patel et latterich, 1998, Swaffield *et al*., 1995).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Ce domaine est formé de deux sous-domaines : le premier du côté N-terminal nommé P-loop et un autre du côté C-terminal nommé Sensor domain ou SSD (Figure 5).

Le sous-domaine P-loop inclut le motif Walker A (GX_2GXGKT où X est n'importe quel acide aminé) impliqué dans la liaison au cofacteur Mg++ et la formation des liaisons hydrogène avec les nucléotides, et le motif Walker B ou « DEXD box » qui serait aussi impliqué dans la liaison au Mg++ et l'hydrolyse des nucléotides (Confalonieri *et al.*,1995). Le sous-domaine C-terminal est riche en hélices alpha nommé aussi comme SSD pour « sensor and discrimination domain » dont le rôle n'est pas encore bien connu. Ce sous-domaine permet la classification de la superfamille des AAA+ en plusieurs familles comprenant les protéines Clp/Hsp100, la famille des protéases Lon et la famille plus classique nommée AAA. Cette famille inclut les sous-unités ATPasiques du protéasome, et la protéase membranaire FtsH. Les membres de la famille partagent une région très conservée nommée SRH caractérisée par la séquence suivante [(T/S)-(N/S)-X_5-DXA-X_2-R-X_2-RX-(D/E). X n'importe quel acide aminé].

Les AAA+ contiennent d'autres domaines très variables dans leurs régions N-terminales et C-terminales dont la composition dépend de la fonction de la protéine. Ces domaines peuvent être des domaines protéolytiques : exemple du domaine C-terminal de Lon et FtsH (Stahlberg *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*,1997), des domaines de liaison aux complexes protéolytiques exemple de la la région C-terminale de ClpA, HslU (Seong *et al.*, 2002). Les domaines N-terminals peuvent constituer des domaines d'interaction avec d'autres protéines ou de liaisons de substrats (Dougan *et al.*, 2002 ; Gorbea *et al.*, 2000).

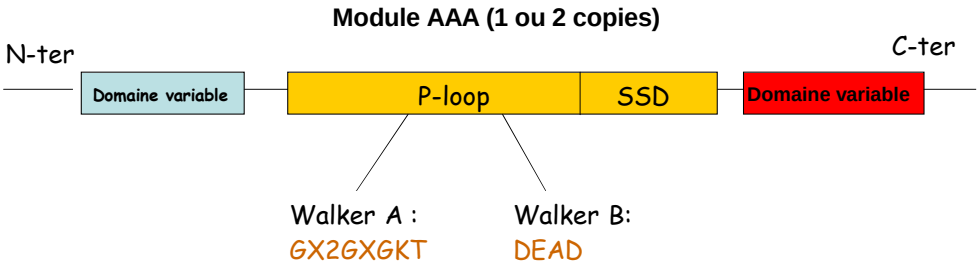


Figure 5 : Représentation schématique de différents domaines structuraux d'une protéine AAA+.

Toute protéine AAA+ possède un module AAA (en jaune) qui constitue la signature de la famille des AAA+. Ce module inclut un sous-domaine nommé **P-loop** qui comprend deux motifs : le walker A et le walker B impliqués dans la liaison et l'hydrolyse des nucléotides. Un autre sous-domaine nommé **SSD** qui est riche en hélices alpha dont le rôle n'est pas bien connu. Les protéines AAA+ comprennent deux domaines (bleu et rouge) qui varient selon la fonction de chaque famille des protéines AAA+.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.2 Mode d'action des AAA+ dans la protéolyse ATP-dépendante

La structure quaternaire des protéases ATP-dépendante propose un enfouissement des sites catalytiques qui ne sont pas exposés à l'extérieur. Elle forme une chambre protéolytique dont l'ouverture ne permet le passage que de petits peptides. Ce sont donc les protéines AAA+ partenaires des complexes protéolytiques qui sont responsables de la reconnaissance du substrat, et de son dépliement afin qu'il puisse rentrer dans la chambre protéolytique où résident les sites actifs. Ce sont également ces complexes qui sont responsables du caractère ATP-dépendant de la protéolyse en plus du système ubiquitine qui confère la spécificité du substrat chez les eucaryotes.

Les données structurales et biochimiques provenant des systèmes procaryotes notamment le système Clp (ClpAP, ClpXP) et le système HslUV (HslU: complexe AAA+ - HslV : complexe protéolytique) ont permis de comprendre le mode d'action des complexes AAA+ dans la protéolyse ATP-dépendante notamment comment ces machines moléculaires utilisent l'énergie de l'ATP afin de déplier ou remodeler le substrat pour le présenter au substrat protéolytique.

Le modèle proposé pour un cycle protéolytique (Figure 5) comprend plusieurs étapes qui commencent par l'oligomérisation des AAA+ en un anneau hexamérique (1), leur association à leur partenaire protéolytique (2), la reconnaissance et la liaison du substrat (3), le dépliement et la « translocation du substrat » dans la cavité protéolytique (4) et enfin la dégradation du substrat dans la cavité protéolytique (5). Le schéma proposé est une simplification d'un processus beaucoup plus compliqué et dynamique dans la cellule (Babbit *et al*., 2005, Hoskins *et al*., 2000); A ce sujet il existe peu de données qui permettent de conclure le mode d'action de ces AAA+ *in vivo* . Néanmoins, différentes études *in vitro* ont reconstitué plusieurs étapes de ce cycle ce qui laisse penser que ces étapes seront fonctionnellement séparées *in vivo*. Les différentes étapes de la protéolyse ATP-dépendante telles qu'elles ont été étudiées à travers le système Clp et HslUV sont résumées ci-dessous.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

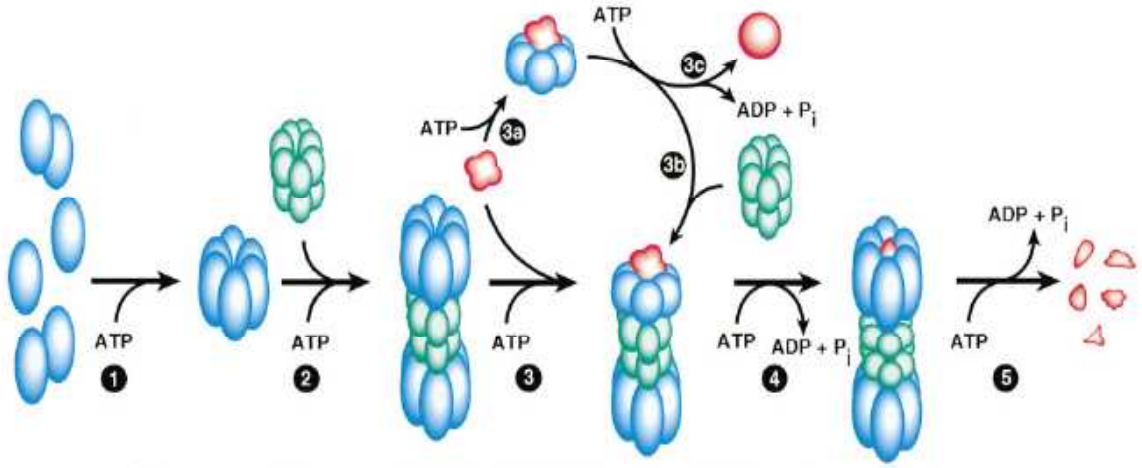


Figure 5 : Les différentes étapes de la protéolyse ATP-dépendante tel qu'il a été décrit pour le système protéolytique bactérien Clp

1) Les régulateurs ATPasiques doivent s'assembler en un complexe oligomérique fonctionnel. Cette étape nécessite la liaison de l'ATP et pas son hydrolyse.
2) Une fois assemblé, le complexe AAA+ s'associe à son partenaire protéasique. Cette étape nécessite la liaison de l'ATP et non son hydrolyse.
3) La reconnaissance et la liaison aux substrats.
   a. Liaison du substrat aux complexes AAA+
   b. Liaison du complexe (AAA+ - substrat) au complexe protéolytique.
   c. Fonction chaperonne du complexe AAA+ requiert l'hydrolyse de l'ATP .
4) Dépliement du substrat et séquestration dans la chambre protéolytique
5) L'hydrolyse et le relâchement des produits.

(Extrait de Gottesman *et al.*, 1997).

III.2.1 Oligomérisation des AAA +

La capacité des protéines AAA+ à conduire des activités biologiques dépend de leur capacité de former de complexes multimériques notamment des hexamères, cette étape est ATP-dépendante et requiert la liaison de l'ATP (Vale *et al.*, 2000). Plusieurs protéines AAA+ cristallisent sous une forme hexamérique et la résolution de leur structure a révélé comment les sous-unités parviennent à communiquer au sein du même hexamère (Kim *et al.*, 2003 ; Li

et al., 2002). Les structures cristallographiques ont révélé que le site de liaison à l'ATP est localisé à l'interface entre deux sous-unités voisines, le site contient des résidus importants du protomère adjacent. Ceci suggère que la liaison de l'ATP ou son hydrolyse contrôle la conformation de l'enzyme et probablement son activité (Vale *et al*., 2000 ; Hanson *et al*., 2005). La plupart des enzymes AAA+ passent par un cycle de liaison de l'ATP, l'hydrolyse et le relâchement du produit de l'hydrolyse. Ce cycle de réaction est responsable d'une série de changements conformationnels au niveau des AAA+ et de mouvements mécaniques qui permettent d'exercer leur activité (Sauer *et al*., 2004).

III.2.2 Liaison des AAA+ à leurs partenaires protéolytiques

La deuxième étape d'un cycle protéolytique c'est la liaison des ATPases à leur partenaire protéolytique. Les complexes ATPasiques lient le complexe protéolytique sous forme hexamérique à l'une ou aux deux extrémités (Figure 6); et les deux complexes communiquent alors via un canal central comme l'ont montré les images par microscopie électronique du complexe ClpA-ClpP et la structure cristallographique du complexe HslU - HslV (Ortega *et al*., 2000 ; Sousa *et al*., 2000, Botchler *et al*., 2001). La liaison des protéases aux complexes ATPases est un processus dynamique et requiert la présence de Mg-ATP (Babbit *et al*., 2005 ; Botchler *et al*., 2000 ; Hoskins *et al*., 2000,Eytan *et al.*, 1989, DeMartino *et al*., 1994 ;Hoffman *et al*., 1994). L'affinité du complexe ATPasique pour son partenaire protéolytique augmente en cas où le complexe ATPasique est déjà lié à son substrat (Joshi *et al.*, 2004 ; Azim *et al*., 2005). Les domaines impliqués dans l'interaction entre le complexe ATPasique et son partenaire protéolytique ne sont pas encore bien connus, mais certaines études cristallographiques et biochimiques pointent sur la région C-terminale du complexe ATPasique (Seong et al., 2002 ; Song *et al*., 2000, Yoo *et al*., 1998).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

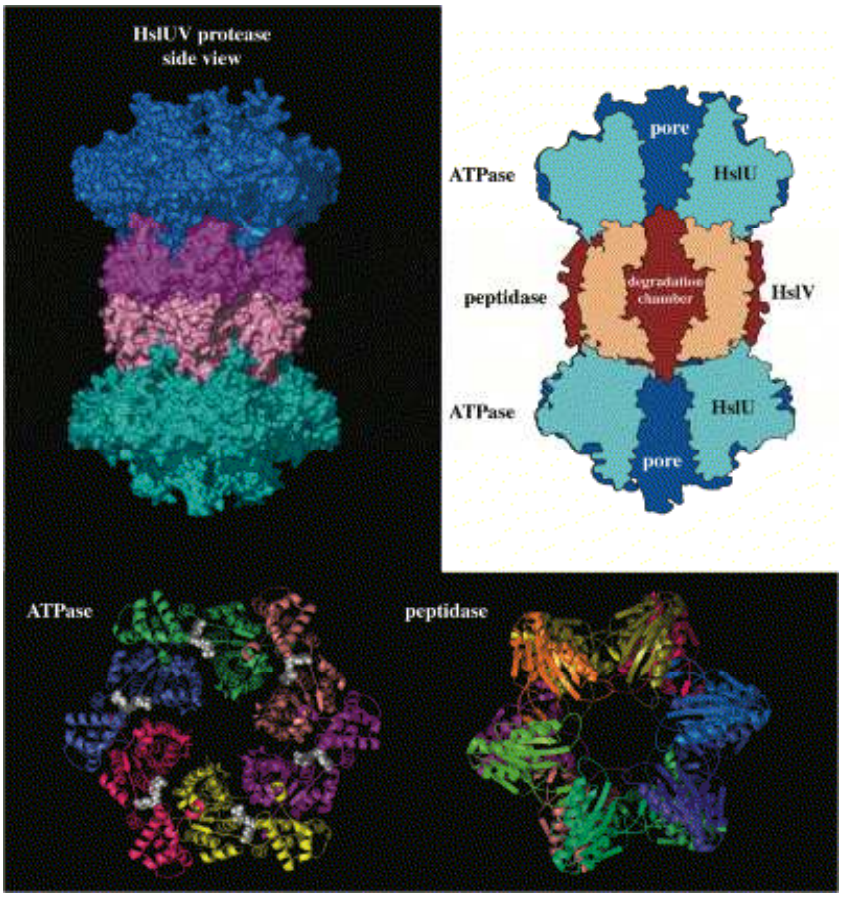


Figure 6 : Vue Structurale de la protéase ATP-dépendante HslUV

La figure montre la structure cristallographique résolue de HslU-HslV. Le panneau en haut à gauche montre le modèle de surface de HslUV : HslU le complexe ATPasique coloré en bleu/vert et HslV coloré en rose/pourpre. En haut à droite, une coupe longitudinale montrant l'ouverture du complexe à l'extérieur par le pore du complexe ATPasique HslU et la chambre protéolytique de HslV. Les panneaux du bas montrent une vue axiale de l'ATPase HslU et de la protéase HslV. Les molécules d'ATP sont colorés en blanc (Extrait de Sauer *et al.*, 2004).

III.2.3 Reconnaissance et liaison du substrat

Les protéases ne dégradent pas n'importe quelle protéine. La dégradation est spécifique et cette spécificité est assurée par les signaux de dégradation. Ainsi, les protéases ATP-dépendantes identifient leur cible par l'intermédiaire de leurs partenaires AAA+ grâce à des signaux de dégradation appelés degrons contenus dans les protéines.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Les signaux de dégradation se classent en deux catégories : les signaux de dégradation primaires qui sont essentiellement situés au sein de la structure elle-même. Ce sont généralement des régions hydrophobes non structurées ou des motifs de quelques acides aminés localisés en N-terminal ou en C-terminal ou dans des localisations variables à l'intérieur de la séquence (Varshavsky *et al*., 2005).

Les signaux de dégradation secondaires sont apportés en *trans* sur les protéines. Ce sont des modifications post-traductionnelles qui peuvent être des phosphorylations ou l'addition co-traductionnelle de signaux peptidiques. Ces modifications permettent la régulation fine et spécifique de l'activité de la protéolyse.

III.2.3.1 Signaux de dégradation

III.2.3.1.A Chez les bactéries

Le mécanisme d'adressage des protéines à la destruction chez les bactéries commence à être élucidé, et révèle des éléments à la fois simples et complexes. L'adressage des protéines à la destruction chez les bactéries se fait par l'intermédiaire d'un ensemble très divers de signaux peptidiques non structurés. L'existence d'un nombre variable de signaux de dégradation permet de réguler différentiellement les substrats selon le besoin physiologique. La plupart des substrats du système Clp sont des protéines clefs impliquées dans de processus régulateurs dans la cellule, le rôle du système protéolytique Clp serait de réajuster la composition du protéome (Hengge *et al*., 2003 ; Gottesman *et al*., 2003).

L'exemple le mieux étudié d'adressage des protéines à la protéolyse chez les bactéries est le système ssrA qui cible les polypeptides issus d'une traduction défectueuse vers la protéolyse (Keiler *et al.*, 1996). Les protéines défectueuses au niveau des ribosomes sont reconnues par les protéases grâce à une séquence peptide AAANDENYALAA dans leur région C-terminale qui est codée par un tmARN stable (10S RNA) ou *ssrA*.

D'autres motifs impliqués dans la dégradation des protéines chez les bactéries ont été identifiés par une expérience élégante du laboratoire de Baker (Flynn *et al.*, 2003). L'utilisation d'un mutant ClpXP inactif, agissant comme une cage pour piéger les protéines substrats, a montré l'existence de cinq classes de signaux de dégradation au niveau des 60 protéines piégées par le complexe. Ces protéines qui incluent des facteurs de transcription, des enzymes métaboliques et des protéines de stress possèdent des signaux de dégradation qui sont localisés aux extrémités de la protéine soit dans la région N-terminale, soit dans le C-terminal de la protéine et sont riches en résidus hydrophobes et basiques. Les signaux de

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

dégradation en C-terminal se rapprochent de leur composition du peptide ssrA avec la présence d'une séquence LAA en C-terminale, alors que les peptides en N-terminal sont plus riches en résidus basiques.

La présence des signaux de dégradation n'est pas limitée aux extrémités N-terminale de la protéine, car d'autres motifs de dégradation sont situés à l'intérieur de la séquence. Ainsi le répresseur de la transcription LexA qui régule la réponse SOS aux endommagements de l'ADN chez les bactéries possède un signal de dégradation à l'intérieur de la séquence qui n'est exposé que lors d'une réponse aux endommagements d'ADN (Neher *et al*., 2003).

Certains substrats nécessitent pour leur interaction avec les complexes AAA+ la présence d'autres protéines nommées protéines adaptatrices (Dougan *et al.*, 2002 ; Mogk *et al*., 2004). Les protéines adaptatrices forment une nouvelle classe de protéines qui ont pour fonction de moduler la liaison du substrat à la protéine AAA+, mais elles sont capables aussi de moduler l'activité des protéines AAA+. Les protéines adaptatrices ont été découvertes chez un grand nombre d'organismes jusqu'à présent. Les mieux caractérisés sont les protéines adaptatrices du système Clp : ClpS, RssB, SspB, UmuD, MecA (Dougan *et al*., 2002), mais il existe aussi d'autres protéines adaptatrices qui fonctionnent avec d'autres protéines AAA+ qui ne sont pas des partenaires de protéases. L'exemple de la protéine adaptatrice p47 qui interagit avec la protéine AAA+ p97 et est impliquée dans la fusion homotypique des membranes (Hetzer *et al*., 2001). Les protéines adaptatrices découvertes jusqu'à présent ne s'apparentent ni par la séquence, ni par la structure, et leur taille est variable mais ce sont en général de protéines de petit poids moléculaire. Le seul point commun est qu'elles utilisent le même site de liaison au niveau des AAA+ qui est le domaine N-terminal (Zeth *et al.*, 2002). Ainsi la protéine adaptatrice ClpS lie ClpA via son domaine N-terminal, de même que la liaison de la protéine adaptatrice SspB à ClpX se fait via le domaine N-terminal (Wojtyra *et al.*, 2003).

III.2.3.1.B Chez les eucaryotes

L'un des mécanismes les plus élégants d'adressage des protéines eucaryotes à la protéolyse est l'attachement de multiples chaînes d'ubiquitine. L'ubiquitine est une chaîne de 76 résidus qui est ajoutée *en trans* sur les résidus lysines de substrats protéiques dans une réaction énergie dépendante (Hershko *et al.*,1988).La réaction d'ubiquitination est médiée par une série d'enzymes qui comprennent les E1 ou les enzymes d'activation de l'ubiquitine responsables de la formation d'une liaison thioester avec l'ubiquitine en présence de l'ATP. L'ubiquitine est ensuite transférée par les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine ou E2 via une réaction de transthiolation. Les E2 sont souvent liées à des ubiquitines ligases ou E3, les

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

enzymes clefs dans la sélection des substrats pour l'ubiquitination. Les E3s peuvent aussi faciliter l'interaction directe du complexe E3 substrat avec le protéasome 26S (Xie *et al.*, 2000).

L'ubiquitination ne constitue pas le seul moyen d'adressage des protéines à la protéolyse par le protéasome 26S. Il existe à cette date un nombre d'exemples des protéines dont la dégradation se passe indépendamment de l'ubiquitination comme l'ornithine décarboxylase impliquée dans la synthèse des polyamines (Coffino *et al.*, 2004) et la protéine p21 inhibitrice des cyclines kinases dépendant (Chen *et al.*, 2004).

III.2.3.1.C Chez les archéobactéries

Pour l'instant, les signaux de dégradation n'ont pas été encore identifiés chez les archéobactéries. Les archéobactéries sont des procaryotes qui possèdent des protéasomes de type eucaryote. Aucune protéine apparentée à l'ubiquitine n'a été retrouvée dans les génomes séquencés jusqu'à présent, ni un système homologue à la ssrA. Le mécanisme pour la reconnaissance des substrats se rapproche plus probablement des mécanismes retrouvés chez les procaryotes, via des régions ou des peptides non structurées dans les substrats destinés à être dégradés.

III.2.3.2 Sites de reconnaissance des substrats

Quels sont les domaines au niveau des complexes AAA+ qui assurent la reconnaissance du substrat pour sa dégradation. Les données à ce sujet sont assez contradictoires et proviennent essentiellement des études faites sur les systèmes procaryotiques Clp à cause de la simplicité de leur organisation.

Les détails moléculaires concernant la reconnaissance du substrat par les AAA+ ne sont pas encore bien définis. Certaines publications évoquent le rôle du domaine N-terminal dans la liaison au substrat ou aux adaptateurs (Guo *et al.*, 2002 ; Kim and Kim, 2003 ; Pak *et al.*, 1999 ; Rockel *et al.*, 1999). Le domaine N-terminal comporte des motifs coiled-coil qui sont supposés agir comme des sites primaires de reconnaissance de substrat. Ces motifs coiled-coil occupent en général une position distale par rapport au pore du complexe ATPasique. Dans certaines ATPases, ces motifs coiled-coil sont en position axiale par rapport à l'anneau hexamérique, c'est le cas de HslU (Botchler *et al.*, 2000). Dans d'autres cas, les motifs coiled-coil sont en position équatorielle par rapport à l'anneau hexamérique cas de p97

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

et de Clp/Hsp100 (Dreveney *et al*., 2004 ; Li *et al*., 2002). Les protéines AAA+ sont comparées à ce sujet à d'autres chaperonnes notamment les chaperonnes de la famille des Hsp60 qui possèdent les mêmes motifs en coiled-coil et agissent dans la reconnaissance du substrat (Martin *et al*., 2004). Cependant, dans la plupart des cas, la délétion de la région N-terminale n'avait pas d'effet ni sur la liaison au substrat, ni sur l'activité de l'enzyme (Babst *et al.*, 1998 ; Beinker *et al.*, 2002, Zhang *et al*., 2004). Certaines des protéines de la famille Clp notamment ClpA et ClpB ont une forme délétée *in vivo* dans la région N-terminale provenant de l'utilisation d'un deuxième site Shine-Dalgarno. Cette forme est toujours active et capable d'exercer les mêmes fonctions que la protéine entière (Park *et al*., 1993 ; Zolkiewski *et al*., 1999). D'autres publications évoquent le rôle du domaine C-terminal ou SSD comme important pour la liaison au substrat (Hoskins *et al.*, 2000) ou dans l'engagement initial du substrat (Joshi *et al.*, 2003).

III.2.4 Dépliement et « translocation » dans la cavité protéolytique

L'une des fonctions des protéases ATP-dépendantes est de détruire sélectivement des protéines régulatrices, la plupart de ces protéines sont des protéines fonctionnelles, donc ce sont des protéines bien repliées. Ces protéines doivent être préalablement dépliées avant qu'elles ne soient dégradées pour qu'elles puissent rentrer dans le pore communiquant avec le pore du complexe protéolytique .

III.2.4.1 Mécanisme de dépliement

L'activité de dépliement ou « unfolding » a été en premier décrite pour le système Clp (Weber-ban *et al.*,1999). L'expérience très élégante se sert des caractéristiques de la GFP : une protéine globulaire très stable dont la fluorescence intrinsèque disparaît lorsque la protéine n'est pas correctement repliée. Il est donc facile de suivre le dépliement de la protéine en mesurant sa fluorescence. Lorsque la protéine GFP est étiquetée en C-terminal avec la ssrA, elle devient particulièrement sensible à l'action de ClpA qui catalyse dès lors son dépliement, et une perte de fluorescence est observée. Le dépliement requiert de l'ATP et du Mg^{++}.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

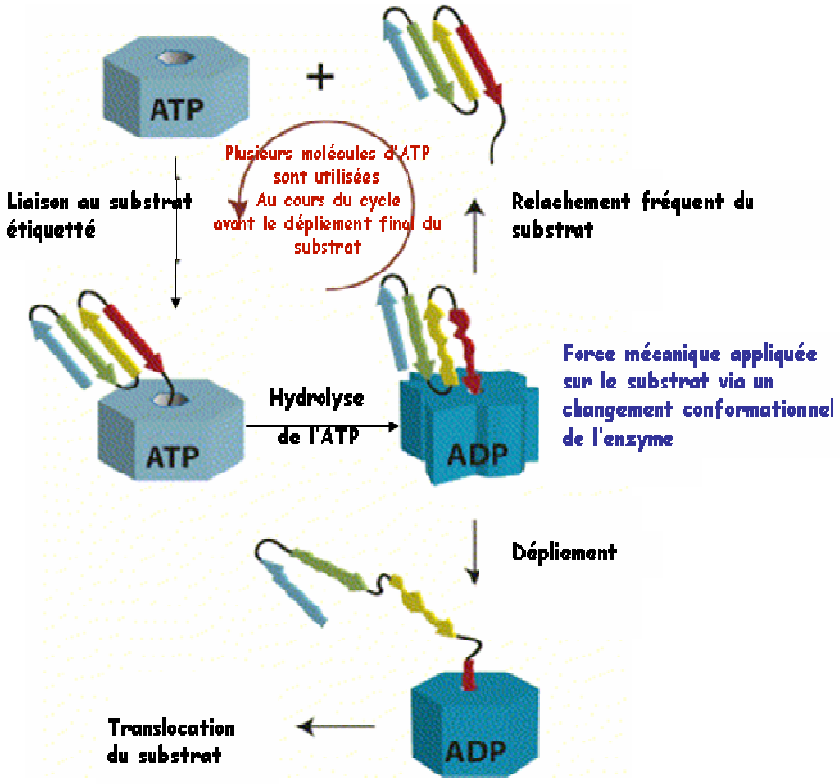


Figure 7 : Modèle schématique du mécanisme de dépliement d'un substrat étiqueté par une protéine AAA+.

Les complexes AAA+ en présence d'ATP lient le substrat étiqueté au niveau du peptide signal. L'hydrolyse de l'ATP provoque un changement conformationnel au niveau de l'enzyme qui induit une force mécanique. Cette force mécanique pousse le substrat dans le pore de l'enzyme provoquant des perturbations au niveau de sa structure.
La capacité de l'enzyme à déplier le substrat dépend des structures adjacentes au signal. À ce point, le substrat peut soit se dissocier de l'enzyme, soit il est efficacement conduit dans le pore de l'enzyme et transmis à la cavité protéolytique communiquante. Plusieurs cycles d'ATP peuvent être utilisés avant le dépliement final du substrat (Extrait de Sauer *et al.*, 2004).

Les unfoldases sont donc des enzymes qui utilisent des forces mécaniques sur le substrat lié afin de le déplier (Figure 7). La quantité d'ATP requise pour le dépliement dépend largement du degré de structuration du terminus de la protéine (Burton *et al.*, 2001 ; Kenniston *et al.*, 2003 ; 2004 ; 2005, Lee *et al.*, 2001). Les études postérieures avec d'autres protéines modèles ont révélé que les AAA+ induisent le dépliement des substrats en les débarrassant de leur signal (Lee *et al.*, 2001). Le dépliement commence au niveau du signal et la structure du substrat est alors perturbée grâce à l'utilisation de l'énergie de l'ATP, les

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

chaînes polypeptidiques sont alors tirées afin d'exposer les domaines natifs et le substrat est poussé dans le pore du complexe régulateur qui communique avec le pore du complexe protéolytique. Des résidus importants au niveau du pore du complexe semblent jouer un rôle important dans le mécanisme de dépliement tel l'a montré des expériences de mutagenèse dirigé contre ces résidus (Park *et al.*, 2005). Le mécanisme de dépliement rappelle celui qui a lieu lors de l'import des protéines au niveau de la mitochondrie (Matouschek *et al.*, 2003). Les mécanismes de dépliement par le protéasome 26 S ont été analysés via des expériences similaires à celle de l'import mitochondrial. Les protéines substrats notamment la Barnase et la DHFR sont efficacement dégradées lorsqu'elles sont adressées au protéasome et au système Clp. Cependant, l'addition de ligands stabilisateurs empêche la dégradation de la DHFR et non de la Barnase qui possèdent des structures intrinsèques en feuillet bêta, ce qui implique que la susceptibilité des ATPases de déplier leur substrat dépend aussi de la structure locale adjacente au signal (Lee *et al.*, 2001).

III.2.5 Hydrolyse et relâchement des produits

Une fois que le substrat est déplié et séquestré dans la chambre protéolytique, il est alors exposé aux sites catalytiques des protéases. Cette étape est ATP-indépendante, et les protéases libèrent des produits dont la taille varie de 3 à 30 acides aminés.

III.3 Fonction chaperonne des protéases ATP-dépendantes

Plusieurs études montrent que l'activité chaperonne est une propriété commune et universelle des protéases ATP-dépendantes. Il a été démontré que plusieurs protéases ATP-dépendantes participent via leurs protéines AAA+ au remodelage des substrats. L'activité chaperonne semble être contradictoire avec l'activité prédite de ces complexes dans le dépliement et l'élimination définitive d'un substrat, cependant les mécanismes qui gouvernent les deux activités semblent être similaires. Dans les deux types d'activité, les complexes AAA+ utilisent l'énergie de l'ATP pour provoquer des changements conformationnels au niveau de leur substrat qui peut être une protéine ou un complexe protéique. Les complexes AAA+ se situent entre la vie et la mort d'une protéine (Zwickl *et al*., 1999), et les mécanismes qui permettent aux AAA+ de décider entre le repliement d'une protéine, son remodelage ou sa destruction ne sont pas encore connus.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

L'idée que les protéines AAA+ peuvent porter des fonctions de type chaperonne est venue d'une homologie entre les complexes AAA+ bactériens ClpX et ClpA avec d'autres protéines chaperonnes notamment la protéine Hsp104 de la levure et une autre protéine ClpB, qui elle ne s'associe pas à de complexes protéolytiques (Pak *et al*., 1999). L'implication des protéines ClpX et ClpA dans une fonction chaperonne a été démontrée dans leur participation en deux processus : la transposition du phage Mu (Mhammedi-Alaoui *et al.*, 1994 ; Levchneko *et al.*, 1995), et la réplication du phage P1 (Wickner *et al.*, 1994).
D'autres études plus récentes *in vitro* chez les eucaryotes ont montré une activité chaperonne des protéases ATP-dépendantes; notamment la protéase mitochondriale i-AAA/Yme1 (Leonhard *et al.*,1999) et le protéasome eucaryote (Braun *et al.*, 1999 ; Strickland *et al.*, 2000). Dans le cas du protéasome, l'activité chaperonne est localisée dans la base du complexe régulateur 19S qui est capable de lier et replier la citrate synthase dénaturée et non ubiquitinylée dans une réaction ATP-dépendante.

IV Les ATPases du protéasome eucaryote : les rpt

L'activité du complexe protéolytique 20 S dans les cellules eucaryotes est régulée par son association au complexe 19S pour former le complexe macromoléculaire de 2,7 MDa. ou 26 S (Peters *et al.*,1994 ; DeMartino *et al.*,1994 , Armon *et al.*,1990 ; Hoffman *et al.*,1994). Le complexe 19 S contient six sous-unités ATPasiques nommées rpt (**R**egulatory **P**article **T**riple A protein) qui sont en contact direct avec le protéasome 20 S tels qu'ils ont montré les images par microscopie électronique (Glickman *et al*., 1998 ; Gray *et al*., 1994 ; Walz *et al*., 1998).

Plusieurs rôles ont été attribués à ces sous-unités ATPasiques notamment via leur capacité à utiliser l'énergie de l'ATP pour induire des changements conformationnels. Il a été proposé que ces ATPases puissent utiliser le même mode d'action des autres AAA+ notamment en ce qui concerne leur oligomérisation en un complexe hexamérique (Glickman et al., 1998), la liaison au protéasome 20 S (Peters *et al.*,1994 ; DeMartino *et al.*,1994 , Armon *et al.*,1990 ; Hoffman *et al.*,1997), la reconnaissance et la liaison des substrats (Pickart, 1997 ; Beal *et al.*, 1998, Fu *et al.*, 1999 ; Young *et al.*,1998) et leur dépliement des substrats (Braun et al., 1999 ; Strickland et al., 2000). Les rpt peuvent assister dans la translocation de substrats protéiques dépliés dans la chambre centrale catalytique du protéasome (Larsen *et al.*, 1997). Les ATPases peuvent utiliser l'énergie de l'ATP pour induire un changement conformationnel

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

au niveau de l'ouverture de la chambre protéolytique qui est complètement fermée chez la levure (Groll *et al.*,1997) et y contrôler l'accès.

Les sous-unités ATPasiques sont distribuées dans toutes les cellules eucaryotes : levure, mammifères, plantes (Glickman *et al.*, 1998 ; Fu *et al.*, 1999). Les sous-unités ATPasiques présentent toutes des homologies entre elles, et elles sont plus proches de leurs homologues d'une autre espèce qu'au sein d'une même espèce. Il est possible de les classer en 6 groupes : rpt 1 à 6 (Finley *et al.*, 1998).

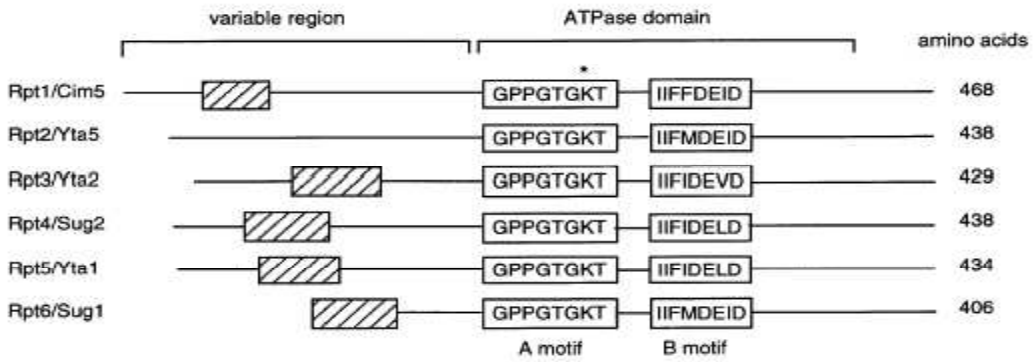


Figure 8 : Alignement structural des différentes sous-unités ATPasiques du protéasome 26S.

Les protéines rpt sont composées d'un domaine ATPasique qui contient les deux motifs Walker A et Walker B. Ils contiennent aussi dans leur région N-terminale une région variable qui peut contenir des motifs coiled-coil : boite hachurée (Extrait de Glickman *et al.*, 1998).

Les différentes rpt se ressemblent essentiellement au niveau de leur domaine central ATPasique formés par le motif Walker A et le Walker B. Elles présentent une divergence au niveau de leur région N-terminale (Figure 8). Il existe cependant un domaine coiled-coil chez toutes les rpt à l'exception de la rpt2 qui présente un « stretch inhabituel » de lysine auquel on a attribué un signal d'adressage au noyau (Glickman *et al.*, 1998). La région N-terminale est importante pour la liaison des sous-unités entre elles et avec les substrats (Gorbea *et al.*, 2000 ; Richmond *et al*, 1997).

IV.1 Rôle et Fonction

Les rpt constituent des gènes essentiels comme l'a montré la délétion des gènes chez la levure (Gordon *et al.*,1993 ; Russell *et al.*,1996 ; Swaffield *et al.*, 1992 ; Ghislain *et al.*,1993 ; Schnall *et al.*,1994). Les mutants sont létaux et ne sont pas restaurés par la surexpression par les autres ATPases. Les sous-unités ATPasiques semblent exercer des fonctions non

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

redondantes dans la cellule (Rubin *et al.*, 1998 ; Russell *et al*., 2001) car des mutations au niveau du domaine ATPasique chez les différentes sous-unités ATPasiques entraîne des phénotypes différents . Il existe cependant une coopérativité dans les sous-unités ATPasiques du 19 S pour la dégradation des substrats, car la dégradation d'un substrat spécifique peut être inhibée par des mutations au niveau des différentes 19 S ATPases (Rubin *et al*., 1998).
L'activité peptidasique du protéasome 20 S est stimulée lorsqu'il s'associe à son complexe régulateur indiquant que même les peptides qui n'ont pas besoin d'être dépliés sont aussii régulés par le complexe 19 S et une seule mutation provoque une inhibition de l'activité peptidasique (Rubin *et al*., 1998). La mutation au niveau du domaine ATPasique de rpt2 a montré une inhibition dramatique dans l'activité peptidasique du protéasome, ce qui suggère que cette sous-unité se situe sur la porte d'entrée de la cavité centrale protéolytique (Kohler *et al.*, 2001).

IV.2 Interaction des sous-unités entre elles et avec d'autres protéines

IV.2.1 Interaction des sous-unités entre elles

Des études biochimiques et génétiques détaillées dans différents organismes ont montré des interactions spécifiques entre les différentes ATPases. Ces différentes études suggèrent que ces sous-unités ATPasiques s'associent probablement en un complexe hexamérique typique des membres de la famille des AAA-Atpases (Glickman *et al*., 1998). Les études biochimiques et génétiques ont indiqué que l'interaction protéine-protéine entre les différentes ATPases se passe via la région N-terminale qui porte des domaines coiled-coils. L'interaction se fait par paire : la rpt2 lie la rpt1, et la rpt3 lie la rpt6 et la rpt 5 lie la Rpt4. (Richmond *et al.*, 1997 ; Gorbea *et al.*,2000)

Il n'existe pas pour l'instant de preuve directe par quelle sous-unité ou domaine se fait la liaison avec le protéasome. Une étude génétique montre une interaction entre l'une des sous ATPasiques la rpt6 et l'une des sous-unité alpha du protéasome alpha 1 (Gerlinger *et al.*, 1997). Une autre étude chez la drosophile montre que les ATPases sont susceptibles à la dégradation protéolytique lorsqu'elles sont sous forme de 19S non associé, mais elles sont protégées de la dégradation lorsqu'elles sont associées au complexe 20 S (Haracska *et al.*,1996).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

IV.2.2 Interaction avec d'autres protéines

D'une facon générale chez la levure, il existe un grand nombre de protéines qui sont faiblement associés avec le complexe 19S dans la cellule (Verma *et al*., 2000). La recherche de protéines susceptibles d'interagir avec les sous-unités ATPasiques du protéasome a été effectuée par plusieurs types d'études génétiques, le système double hybride et le « pull-down » assays. Les rptases sont capables d'interagir avec un grand nombre de protéines cellulaires, ce sont essentiellement des activateurs transcriptionnels, des protéines virales, et des récepteurs hormonaux (revue Kerrel *et al.*, 2000, Verma *et al*., 2000).

La liaison des sous-unités ATPasiques à la transcription n'est pas encore bien comprise, il a été proposé que les sous-unités ATPasiques du complexe 19 S puissent former un complexe indépendant au niveau de la protéolyse (nommé APIS pour **A**AA **P**roteins **I**ndependent of 20 **S**) (Ottosen *et al*., 2002). Ce complexe est recruté au niveau de promoteurs de gènes activés, et participe à la régulation de la transcription dont le mécanisme reste encore à définir (Ferdous *et al.*, 2002). Le complexe semble jouer un rôle indépendant de la protéolyse dans le nucléotide excision repair L'inactivation sélective des sous-unités ATPasiques de la base du 19 S et non l'inhibition du protéasome entraîne une sensibilité aux irradiations par les rayons UltraViolets et affecte la réparation de l'ADN par le nucleotide excision repair (Russell *et al*., 2001).

V Les ATPases du protéasome archéobactérien ou rpt-like : PAN

V.1 Découverte de PAN

La plupart des données structurales et fonctionnelles sur les protéasomes proviennent des études faites sur les protéasomes des archéobactéries en vue de leur simplicité. La recherche de complexes ATPasiques susceptibles de réguler la protéolyse chez les archéobactéries a révélé l'existence chez *Méthanocaldococcus janaschii* d'une AAA-ATPase homologue aux sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome eucaryote. La protéine de 50 kda partage une homologie autour de 40% avec les six sous-unités ATPasiques de la base du complexe régulateur du protéasome. Lorsque PAN de *Méthanocaldococcus janaschii* est cloné et surexprimé dans *E. coli* forme un complexe oligomérique de haut poids moléculaire (550- 650 Kda). Il n'existe pas de données claires sur la nature du complexe et son mode d'assemblage, mais ce complexe résulte probablement de la formation d'un double hexamère

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

en anneau (Zwickl *et al.*, 1999). *In vitro*, le complexe est capable de catalyser une gamme assez large de nucléotides d'ATP, de CTP et à un degré moindre le GTP et l'UTP (Zwickl *et al*., 1999). Lorsque le complexe est incubé avec le protéasome de *Thermoplasma acidophilum* et en présence de l'ATP, il est capable de stimuler la dégradation des protéines, mais non pas celle de tétrapeptides qui peuvent diffuser librement à travers le pore du protéasome, ce qui suggère que PAN agit pour réguler l'hydrolyse des protéines et non pas celle des peptides. Le complexe a été nommé PAN pour **P**roteasome **A**ctivating **N**ucleotidase (Zwickl *et al*., 1999). PAN a été proposé comme étant le précurseur évolutif des ATPases de la base du complexe régulateur le 19S.

V.2 Distribution de PAN au sein des archéobactéries

Le séquençage des génomes d'archéobactéries séquencés jusqu'à présent a révélé la présence de 23 protéines homologues et annotées comme étant des sous-unités atpasiques régulatrices du protéasome. PAN est complètement absent du génome de certaines archéobactéries telles les thermoplasmales et les ferroplasmales. Et Parmi les archéobactéries, seules les archéobactéries halophiles et les méthanosarcinacées possèdent deux PANs.

V.2.1 VAT : homologue fonctionnel de PAN chez *Thermoplasma acidophilum*

PAN n'est pas présent dans les génomes de toutes les archéobactéries notamment chez *Thermoplasma acidophilum* ou chez *Pyrobaculum aerophilum*. Il a été proposé qu'une autre AAA-ATPase archéobactérienne de la famille des AAA homologue à la protéine cdc48 nommée (VAT ou VCP ou p97) pourrait faciliter la dégradation des protéines par le protéasome. Les protéines cdc48 sont des protéines AAA à deux domaines ATPasiques fonctionnels qui sont répartis dans les trois domaines du vivant. Les protéines cdc48 se présentent sous forme d'un double hexamère (Rockel *et al*., 1999) et possèdent aussi une activité chaperone-like (Golbik *et al*., 1999).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

V.3 Rôle et caractéristiques biochimiques de PAN

PAN étant capable de réguler l'activité du protéasome *in vitro* sur des substrats protéiques telle la caséine, il était intéressant de tester si PAN tout comme les sous-unités ATPasiques du système Clp pouvait agir comme une « unfoldase » qui déplie les protéines en vue de leur dégradation. Pour tester l'activité de dépliement de PAN *in vitro*, PAN a été incubé avec le substrat de ClpA, la GFP-ssrA. Même si la ssrA n'est pas identifiée au niveau des génomes des archéobactéries, PAN a catalysé rapidement la perte de la fluorescence de la GFP-ssrA et cette réaction nécessitait l'hydrolyse de l'ATP (Benaroudj *et al.*,2000).

PAN peut aussi agir comme une chaperonne moléculaire. Son action comme une chaperonne moléculaire a été démontrée par son action à réduire la formation des agrégats, de même qu'à aider les protéines dépliées à retrouver leur conformation native (Benaroudj *et al*., 2000). En effet, PAN réduit significativement l'agrégation des protéines dépliées par la température ou par des traitements chimiques. PAN a la capacité aussi de promouvoir le repliement de protéines dénaturées. Ainsi, PAN facilite le repliement de la glucose déshydrogénase dénaturée par la guanidine. La liaison de PAN aux nucléotides affecte sa capacité à réduire les agrégats, cependant elle n'affecte pas sa stimulation de l'aide au repliement des protéines (Benaroudj *et al*., 2000).

Du fait de sa facilité d'expression et sa capacité à réguler le protéasome *in vitro*, le complexe PAN a permis la compréhension de certains aspects des mécanismes de régulation du protéasome eucaryote et du protéasome archéobactérien (Benaroudj *et al*., 2003 ; Navon et al., 2001 ; Ogura *et al*., 2003). Le complexe PAN est capable de réguler l'activité du protéasome d'une manière très similaire à celle de l'action des protéines Clp/hsp100. Le mécanisme comporte les mêmes grandes lignes notamment la reconnaissance du substrat, son dépliement et la séquestration du substrat dans la chambre protéolytique (Navon *et al.*, 2001 ; Ogura *et al*., 2003). Et dans le cas du protéasome eucaryote, PAN est capable de provoquer l'ouverture de la porte d'entrée dans la chambre protéolytique qui est fermée par les extrémités N-terminaux des sous-unités alpha.

À la différence du système Clp et du protéasome 26 S où les images par microscopie électronique ont montré une interaction évidente entre le complexe protéolytique et son complexe régulateur ; aucune interaction stable n'a été démontrée à l'heure actuelle entre le protéasome et PAN. Ceci pourrait être lié au fait que cette interaction est très rapide et

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

transitoire, ou à l'incapacité de moyens biophysiques actuels à étudier des interactions entre des complexes hyperthermophiles à de hautes températures.

Il a été proposé via des études biochimiques que le complexe PAN lie le protéasome via son domaine C-terminal (Forster *et al.,* 2005) par un mécanisme qui ressemble à la liaison du protéasome à son activateur le PA28 (Whitby *et al*., 2000). En effet, la délétion d'un seul résidu arginine au niveau de la région C-terminale du complexe PAN bloque la dégradation des protéines en abolissant son interaction avec le protéasome.

VI Description du système d'étude : *Halobacterium salinarium*

VI.1 Taxonomie et Habitat

Un microorganisme est halophile (du grec Halos = sel, phile = aime) si celui-ci requiert du sel pour sa croissance. Les microorganismes halophiles sont répartis dans les trois domaines du vivant. Ainsi on retrouve des bactéries halophiles (*Salinibacter ruber*), des eucaryotes halophiles (l'algue halophile *Dunaliella*) et des archéobactéries halophiles. Les espèces halophiles se retrouvent dans plusieurs familles d'archéobactéries dans le règne des *Euryarchaea*. La famille des *Halobactériacées* regroupe uniquement des espèces halophiles, alors que les familles des méthanospirilacées et des méthanosarcinacées regroupent aussi bien des espèces halophiles que des espèces non halophiles (Oren, 2000).

Halobacterium salinarium est une espèce halophile appartenant à la famille des *Halobactériacées* dans le phylum des *Euryarcheota* (Figure 9 A). Elle a pour niche écologique les lacs très salés dont la concentration en sel dépasse 10 fois celle de la concentration en sel marine (30 % concentration en sel). Les lacs salés renferment essentiellement des archéobactéries halophiles et la plupart d'entre eux contiennent des pigments caroténoïdes qui donnent à l'eau une couleur rose, orangée ou pourpre caractéristique (Figure 9B). La famille des *Halobactériacées* regroupe d'autres espèces bien étudiées comme *Haloferax volcanii* et *Haloarcula marismortui* . La plupart des membres de cette famille sont des halophiles extrêmes et ont besoin d'une concentration minimale de 1.5 M de sel pour leur concentration optimale.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

VI.2 Caractéristiques

Du fait de leur ressemblance aux eucaryotes par les mécanismes de codage de l'information comme la transcription, la traduction, la réplication et la protéolyse, les archéobactéries ont constitué des organismes modèles pour étudier ces processus en général plus simplifiés.

A) **B)**

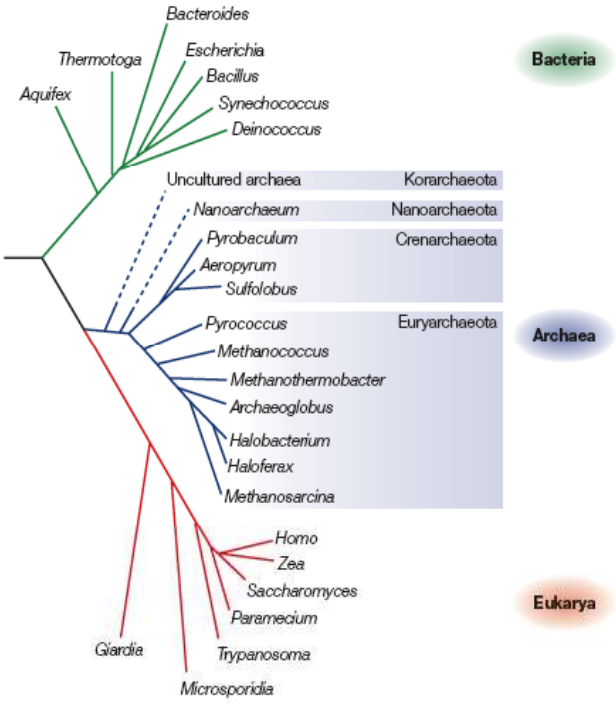


Figure 9 : Taxonomie et Habitat *d'Halobacterium salinarium*.

A) Les trois domaines du vivant : *Bacteria, Archaea, Eukarya* selon la classification de Woese basé sur les ARN Ribosomiques (Woese *et al.*,1990). Les archéobactéries forment un groupe à part dans le domaine du vivant tel qu'ils sont présentés par l'arbre phylogénétique ci-dessus. Les archéobactéries regroupent quatre phyla : les *Crenarchaeota*, les *Euryarchaeota* et les *Nanoarchaeota et les Korarchaeota.* Les espèces halophiles extrêmes sont représentées sur l'arbre par *Halobacterium* et par *Haloferax*. (Figure extraite de Thorens *et al*., 2005)

B) Photographie du lac salé KangooLake en Australie. La couleur rose du lac provient des pigments caroténoides synthétisés par les archéobactéries halophiles qui colonisent le lac. La photo a été tirée du site du laboratoire de Michael DyallSmith .http://microbiol.unimelb.edu.au/people/dyallsmith/salt_lakes/Lakes.html.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Les systèmes archéobactériens halophiles ont constitué d'excellents systèmes pour les études structurales et biochimiques. Leur facilité de culture parmi les autres archéobactéries extrêmophiles (agitation à 37°C, 4M KCl) les rendent beaucoup plus adaptées à de telles études notamment la possibilité de purifier les complexes protéiques de leur contexte natif. De plus, il est possible à de hautes concentrations de sel d'étudier les interactions entre deux complexes protéiques qui n'est pas le cas pour les complexes hypethermophiles.

Cependant, l'accumulation de données structurales et biochimiques en provenance de ces archéobactéries s'accompagnait d'une quasi absence de données génétiques sur ces archéobactéries. L'absence des outils génétiques appropriés notamment les méthodes de transformation, et de sélection limitait ce genre d'études. De plus, les halophiles extrêmes présentent un génome assez dynamique plein d'éléments d'insertion ce qui complique de telles études génétiques (Ng *et al.*, 2000). De récents développements dans le choix de vecteurs et dans les méthodes de transformation vont permettre l'éclosion de ce genre d'études notamment chez *Haloferax volcanii* dont le génome est le plus stable parmi les autres archéobactéries (Thorens *et al.*,2005)

VI.3 Organisation du génome

Le premier génome complètement séquencé fut celui *d'Halobacterium salinarium* publié en 2000 (Ng *et al.*, 2000 ; Oesterhelt *et al.*, Unpublished). Le génome est disponible via deux sites celui de l'université biotechnologique de Maryland (http://halo.umbi.umd.edu/), et celui de l'institut Max Planck de Biochimie à Martinsreid (http://halolex.mpg.de), suivi ensuite par le séquençage du génome *d'Haloarcula marismortui* en 2004 disponible sur le site de Institute of Genomic Research localisé à Seattle aux Etats-Unis (Baliga *et al*., 2004). Le génome d'*Haloferax volcanii* est partiellement séquencé et disponible via le site du TIGRE. *Halobacterium salinarium* possède un chromosome circulaire dont la taille de 2,57 Mpb et deux minichromosomes pNRC200 et pNRC100 de taille respective 350 et 200 Kpb. Leur génome est très riche en GC (68%). Il code pour 2630 protéines dont 36% sont de nouvelles protéines qui ne présentent aucune homologie avec des protéines connues. Le séquençage du génome a révélé la présence d'un grand nombre de protéines homologues à des protéines eucaryotes notamment les facteurs de transcription (TFIIIB…) , les facteurs de réplication (cdc6,ORC, MCM) et les protéines impliquées dans la protéolyse (sous-unités du protéasome : apha et bêta et régulateur ATPasique ou rpt-like : PAN). Le séquençage du

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

génome a aussi révélé que la majorité des protéines halophiles présentent un contenu élevé en résidus acides tels l'acide glutamique et l'acide aspartique et ont tous en majorité leur point isoélectrique aux alentours de 4,2. Ceci constitue l'un des mécanismes d'adaptation à de fortes concentrations en sel dans leur cytoplasme.

VI.4 Équipements de survie

Pour s'adapter à des conditions extrêmes de salinité et de déshydratation, les halophiles extrêmes ont développé une stratégie de protection contre la pression osmotique exercée par la forte concentration en sel à l'extérieur. Les halobactéries accumulent dans leur cytoplasme de fortes concentrations en sel pouvant atteindre les 3 M KCl. Cependant cela ne fait que déplacer le problème du niveau cellulaire au niveau moléculaire, car, à l'intérieur de la cellule, les protéines et les autres biomolécules vont se trouver en concurrence avec le sel pour s'approprier l'eau indispensable à leur solvatation.

La résolution de la structure cristallographique de plusieurs enzymes halophiles notamment dans notre laboratoire et dans d'autres laboratoires a permis de mieux comprendre l'adaptation des protéines halophiles à de fortes concentrations en sel (revue Madern *et al.*, 2000). En effet, les structures cristallographiques ont montré que ces protéines sont enveloppées d'un manteau d'acides aminés dont les chaînes latérales sont acides, c'est-à-dire qu'elles portent chacune une charge négative dans un milieu neutre. C'est grâce à cette densité de charge exceptionnellement élevée que la surface de la protéine est bien plus efficace pour attirer les molécules d'eau évitant ainsi la déshydratation causée par la très forte salinité du milieu. Grâce aux répulsions entre charges négatives, ces protéines sont moins sujettes à l'agrégation. En revanche, dès que la concentration en sel diminue, la structure de la protéine est détruite à cause du manque de contre-ions positifs pour équilibrer les charges négatives. C'est la raison pour laquelle les protéines halophiles peuvent être inactivées et même dépliées par un appauvrissement de la salinité du milieu.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

VII Objectifs de la thèse

Il existe peu de données actuelles sur le rôle de la protéolyse cellulaire et sa contribution à la régulation de phénomènes physiologiques chez les archéobactéries en général et sur les archéobactéries halophiles en particulier. Des expériences de pulse-chase avec l'acide aminé leucine marqué radioactivement avec le ^{14}C montrent que le turn-over des protéines est lent chez les archéobactéries halophiles, la majorité des protéines d'*Halobacterium* ont une longue demie-vie (Kamekura *et al.*, 1986). D'autre part, la contribution de mécanismes de contrôle post-transcriptionnels à la régulation de la physiologie globale d'*Halobacterium* est déjà évoquée. À ce sujet, une approche globale de transcriptomique et de protéomique a montré qu'il n'existe pas de corrélation entre le changement observé au niveau transcriptionnel et celui observé au niveau protéique, la protéolyse pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de nombreux processus chez ces microorganismes (Baliga *et al*., 2002).

Le protéasome 20 S a été déjà purifié à partir d'extraits d'*Halobacterium* (Franzetti *et al*., 2001 ; Wilson *et al*., 1999). Le protéasome 20S ne présente pas la même composition chez toutes les espèces halophiles. Alors que chez *Halobacterium salinarium*, il existe uniquement deux gènes qui codent pour les sous-unités du protéasome : une alpha et une bêta, chez d'autres espèces halophiles du même groupe, le protéasome peut contenir deux sous-unités alpha chez *Haloferax volcanii* ou quatre sous-unités : deux alpha et deux bêta chez *Haloarcula marismortui* (Maupin-furlow *et al.*, 2000). Il n'est pas encore bien clair quelle serait la signification biologique d'avoir plusieurs gènes codant pour les sous-unités du protéasome. Kaczowka *et al*. ont montré que les deux sous-unités (alpha 1 *et al*pha2) d'*Haloferax volcanii* sont capables de s'incorporer et former des complexes fonctionnels, la formation des différents complexes de protéasome dépend de la phase de croissance avec un complexe protéasome alpha2 bêta abondant en phase stationnaire (Kaczowka *et al*.,1999). Le séquençage du génome d'*Halobacterium salinarium* a révélé l'existence de deux gènes codant pour des régulateurs du protéasome potentiels : PAN qui sont très homologues aux sous-unités ATPasiques du protéasome eucaryote.

Les études biochimiques et structurales portées sur le protéasome 20 S des archéobactéries ont permis de suggérer que PAN et VAT sont des régulateurs potentiels de la protéolyse ATP-dépendante qui possèdent des caractéristiques biochimiques communes avec les AAA-ATPases des bactéries (ClpA,HslU, ….). *In vitro*, PAN est capable de stimuler la dégradation des protéines par le protéasome archéobactérien (Zwickl *et al.*, 1999) et le protéasome eucaryote (Benaroudj *et al*., 2003). PAN agit selon les mêmes modes d'action des autres

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

AAA+ : il reconnaît les protéines étiquetées, utilise l'énergie de l'ATP pour les remodeler et les présente au protéasome sous forme dépliée (Benaroudj *et al*., 2001). PAN possède une activité chaperonne, il est capable de solubiliser les agrégats et d'aider au repliement des protéines. Toutefois, il n'y a pas à l'heure actuelle d'études portant sur le rôle physiologique que joue le protéasome ou ses régulateurs PANs dans ces microorganismes.

La thèse porte essentiellement sur la régulation des protéines PANs *in vivo* en conditions normales et en conditions de stress, leur état d'oligomérisation et d'association avec le protéasome chez *Halobacterium salinarium*.
La thèse se concentre sur trois axes de recherche principale :

- **Identification des produits de gènes PANs**

La première étape de la thèse consistait à identifier les produits des gènes PANs et regarder si les deux PANs sont effectivement synthétisés dans les extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium*. Lors de notre identification des produits des gènes PANs chez *Halobacterium salinarium*, nous avons observé une accumulation de deux isoformes de chaque protéine *in cellulo*. Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes qui sont responsables de la génération des deux formes de chaque protéine. Cette partie sera présentée dans le chapitre I de la thèse.

- **Oligomérisation et interaction des protéines PANs entre elles et avec le protéasome**

La régulation de la protéolyse par les protéines AAA+ dépend en grande partie sur leur capacité à s'oligomériser en de complexes hexamériques capables de lier leurs partenaires protéolytiques. À l'instant actuel, il n'existe pas de données claires sur les propriétés physiques du complexe PAN et aucune interaction stable n'a été démontrée entre PAN et le protéasome 20 S. Notre étude a porté sur l'état d'oligomérisation des PANs et leur association avec le protéasome. La présence de deux PANs était particulièrement intéressante, nous avons donc étudié si les PANs sont capables de s'associer en un complexe hétérooligomérique dans la cellule ou en deux complexes homooligomériques différents. L'état d'oligomérisation et d'interaction des protéines PANs feront l'objet du chapitre II de la thèse.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

- **Rôle cellulaire des PANs et leur participation à la réponse cellulaire aux stress**

La participation du protéasome et de ses régulateurs au système de contrôle de qualité des protéines a été évoquée sans qu'elle soit réellement démontrée. *In vitro*, les protéines PANs présentent des activités chaperonnes et sont capables d'aider au repliement de protéines dépliées et de dissocier les agrégats protéiques (Benaroudj *et al*., 2000). Le protéasome 20 S, purifié à partir des extraits d'*Halobacterium*, est stable et actif à de très basses concentrations en sel, il est capable de dégrader des protéines halophiles en voie de dépliement et non des protéines déjà dénaturées sans l'aide de complexes ATPasiques de type PAN (Franzetti *et al*., 2002). Nous avons étudié la régulation des protéines PANs et du protéasome en conditions du stress qui seront présentés dans le chapitre III de la thèse.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Matériels et Méthodes

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I Matériels

I.1 Souches

Les deux espèces halophiles *Halobacterium salinarium* (NRC-sp) fournie par D. Oesterhlet et *Haloarcula marismortui* fournie par A. Oren ont été utilisées au cours de nos études.

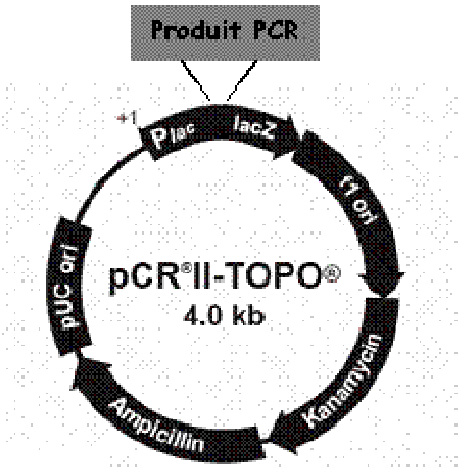
Les souches d'*Escherichia coli* DH5α, Top10F (Invitrogen) ont été utilisées pour les clonages. Les souches d' *Escherichia coli* BL21(DE3), BL21(Codon plus RIL) de Novagen et BL21 Top10F (Invitrogen) ont été utilisées pour l'expression hétérologue des protéines recombinantes.

I.2 Plasmides

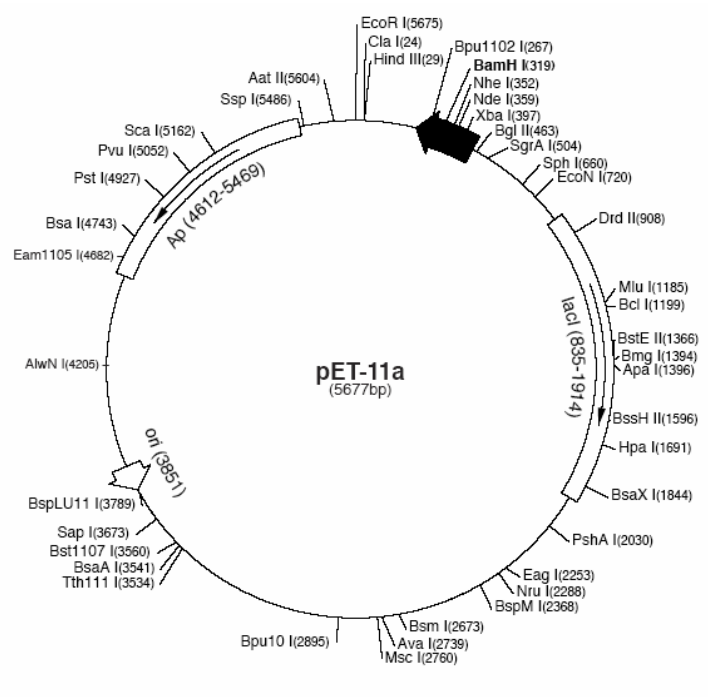
- Le vecteur **pCRII-TOPO** (4 Kb) : Le vecteur pCRII-TOPO confère la résistance à la kanamycine et à l'ampicilline. Il possède deux promoteurs permettant la transcription du fragment cloné : le promoteur Sp6 et le promoteur T7. Le vecteur pCRII-TOPO est commercialisé par *Invitrogen* sous une forme linéarisée et lié de manière covalente à l'enzyme Topoisomérase I permettant le clonage direct du produit d'amplification PCR sans passage par une étape de ligation (Shuman, 1994).

Carte du vecteur pCRII-TOPO. Le vecteur de taille de 4 kb permet le clonage direct des produits PCR.

Le vecteur contient une origine de réplication, de gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine permettant la sélection des transformants.



- Le vecteur **pET-11a** (5,667 kb) **:** Le vecteur pET-11a est un vecteur d'expression permettant un haut niveau d'expression (Novagen). Il confère la résistance à l'ampicilline à la souche, et contient en amont des sites de clonage le promoteur ϕ10 de l'ARN polymérase du phage T7 (Studier *et al*., 1990). Celui-ci permet l'expression de protéines dans les souches dérivant de BL21(DE3) qui expriment l'ARN polymérase du phage T7 dont le gène, placé sous le contrôle du promoteur lacUV-5, est réprimé par le répresseur $LacI^q$ et induit par l'IPTG.



Carte topographique du vecteur pET-11a.
Le vecteur (5,6 Kb) est un vecteur d'expression des protéines hétérologues dans *E. coli*. Le vecteur contient plusieurs sites de clonage qui permettent l'insertion d'un gène sous le contrôle du promoteur inductible LacZ. Le plasmide confère aux souches transformées une résistance à l'ampicilline.

II Techniques de Biologie Moléculaire

II.1 Manipulation de l'ADN recombinant

Toutes les manipulations de l'ADN recombinant ont été réalisées selon les méthodes proposées par Sambrook *et coll*. (Sambrook *et al*., 1989).

II.1.1 Extraction de l'ADN génomique d'*Halobacterium salinarium*

Pour extraire l'ADN chromosomique total d'*Halobacterium*, 200 µl de cellules en phase stationnaire sont centrifugés à 10000 g pendant 2 min. Les cellules sont lysées par choc osmotique dans 200 µl d'eau. Après homogénéisation du lysat, l'ajout de 200 µl de phénol saturé (pH= 8) suivie d'une incubation à 65°C et d'une centrifugation (10000 rpm, 5 min,

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Température ambiante) permettent la séparation entre la phase organique et la phase aqueuse. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube. L'ADN de la phase aqueuse est précipité par l'addition de 400 µl d'acétone froid (100%) suivie d'une incubation pendant 10 min sur glace. Après une étape de centrifugation (10000 rpm, 5 min), de lavage à l'éthanol 70% et de séchage, l'ADN précipité est repris dans 200 µl d'eau. 1 à 5 µl de l'ADN chromosomique total sont utilisés pour les réactions d'amplification par PCR.

II.1.2 Amplification par PCR

Les régions d'intérêt ont été amplifiées dans un mélange réactionnel de volume total de 100 µl renfermant 5 µg d'ADN génomique d'*Halobacterium salinarium* (1 à 5 µl) , 0,5 µM d'amorces de synthèse « sens » et « anti-sens », 200 µM de chacun des 4 dNTP, et 10 Unités de la *Taq* ADN polymérase (Amersham). Le mélange réactionnel contenait aussi 2 % DMSO. Le DMSO est utilisé comme un additif dans le cas des séquences riches en GC car il diminue la température de dénaturation de la matrice d'ADN facilitant ainsi la dénaturation du brin d'ADN. Le mélange est recouvert de l'huile pour empêcher l'évaporation. La réaction effectuée sur un bloc thermique commence par une étape de préchauffage de 5 min à 95°C. Le cycle de la réaction dépendait de la température de fusion des oligonucléotides :

- Si les oligonucléotides servant comme amorce de synthèse présentaient des températures de fusion basses (entre 68°C et 88°C), nous avons utilisé un cycle de PCR « normal » de 30 répétitions avec une étape de dénaturation :1 min à 95°C, une étape d'hybridation d'1 min et de température variant de 55°C à 65°C selon la température de fusion des oligonucléotides et une étape d'élongation : 2 min à 72°C. Ce programme a été utilisé pour l'amplification des sondes de détection en Northern Blot et pour la RPA.

- Si les températures de fusion des oligonculéotides sont hautes (88°C jusqu'à 102°), nous omettions l'étape d'hybridation et nous utilisions uniquement la deuxième étape d'élongation (2 min à 72°C) qui servira à la fois pour l'hybridation et pour l'élongation. Ce programme a été utilisé pour l'amplification des gènes *PAN*s A et *PAN*s B.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Le tableau suivant résume les différents fragments d'ADN amplifiés, leur taille, ainsi que les séquences des oligonucléotides servant d'amorce pour la synthèse.

Fragment d'ADN amplifié et taille	*Séquences des amorces de synthèse*
Sonde PAN A (747 p.b)	5'-GTCGCGTAGCCCCTCATT – 3'(Sens). 5'-AAGATGATCGCGGGGTCT-3' (Anti-sens):
Sonde PAN B (637 p.b)	5'-ACCCGAAGCCTCTTATGAA –3' (sens) 5'- CTTCGCCATCAGCGTCTT-3' (Anti-sens)
Sonde protéasome Sous-unité alpha (524 p.b.)	5'-CGGGCTGGTATCAAGTGGT-3' (Sens): 5'-TGTACTCCTGTTCGAGCACA-3' (Anti-sens)
Expression PAN A (1218 p.b.)	5'-GGAATTCCAT ATGACCGATACCGTCGAGGA-3' (sens) 5'-CGGGATCCCGC TACGCGAACGTCCGGGAGAC-3' (Anti-sens)
Expression PAN B (1236 p.b)	5'-GGAATTCCAT ATGTCGCGTAGCCCCTCATTG-3' (sens) 5'-CGGGATCCCGTTACTGAATGTAGCTCGGGT-3' (Anti-sens)

Tableau 2 : Résumé des différentes réactions d'amplification de fragments d'intérêt utilisé au cours de notre étude.

II.1.3 Précipitation de l'ADN

Pour la précipitation d'un échantillon d'ADN (volume V), 1/10 V de sodium acétate (3M pH = 4,8) et 3V d'éthanol 95% sont ajoutés, et le mélange est incubé 10 à 30 min à –20°C ou à température ambiante. Après une centrifugation de 10 min à 4°C, le précipité est lavé à l'éthanol 70% et séché à température ambiante. Le culot est ensuite repris dans le volume V d'eau.

II.1.4 Séparation et purification des fragments d'ADN

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet, suivant la réticulation du gel, de séparer des fragments d'ADN de taille comprise entre 0,2 et 30 Kpb. La suspension d'agarose à 0,8% ou 1% (p/v) dans le tampon TAE est homogénéisée en la portant à ébullition puis coulée dans

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

un appareil d'électrophorèse à gel horizontal. Une fois gélifié, le gel est immergé dans le tampon TAE. L'échantillon de volume V, contenant 0,02 à 0,5 µg d'ADN et V/6 du tampon de dépôt est déposé dans une piste du gel ; l'électrophorèse est conduite sous intensité de 100 mA. Lorsque le bleu de bromophénol atteint le 3/4 du gel, l'électrophorèse est arrêtée, le gel est immergé dans une solution renfermant 1 µg/ml de bromure d'éhidium (BET) puis rincé à l'eau avant l'examen de l'ADN sous les UV.

Les bandes d'ADN sont découpées et l'ADN est purifié par solubilisation de l'agarose et purification de l'ADN sur des colonnes spécifiques selon les recommandations du kit de Qiagen (Qiaquick Gel Extraction Kit)

Tampon TAE (10X)

Composants	*Concentration*
Tris-base	400 mM
Acétate de sodium	50 mM
Na_2EDTA	10 mM
Acide Acétique	q.s.p. pH 7,9

Tampon de dépôt (6X)

Composants	*Concentration*
Ficoll	15%
Bleu de Bromophénol	0,25%

II.1.5 Transformation

La transformation des souches compétentes d'*E. coli* s'est faite principalement par transformation chimique. 100 µl de souches compétentes (DH5α, Top10F ou BL21) sont décongelées lentement sur glace. La suspension bactérienne est incubée avec 10 µl de la réaction de ligation renfermant (50 à 1 µg du plasmide ligaturé) pendant 5 à 10 min sur glace. Les cellules sont ensuite soumises à un choc thermique pendant 30 s par transfert dans un bain-marie à 42°C. Après incubation sur glace pendant 2 min, les cellules sont reprises dans 250 µl du milieu SOC et incubées à 37°C pendant une heure avec agitation.

Les cellules sont ensuite ensemencées sur des boîtes de pétri LB agar qui contiennent l'antibiotique approprié nécessaire pour la sélection des transformants.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Milieu LB (Luria Broth)

	Milieu Solide	*Milieu Liquide*
Composants	Quantité (Pour 1 litre)	
Bacto-tryptone	10 g	10 g
Extrait de levure	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Bacto-agar	15 g	-

Milieu SOC

Composants	*Quantité (pour 1 litre)*
Bacto-tryptone	20 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	0,5 g
Glucose	20 mM
Q.S.P à 950 ml et Ajouter 10 ml d'une solution de KCl 250 mM	
Ajuster le pH à 7 avec 0,2 ml de NaOH 5 N	
Autoclaver à 120 °C sous une pression de 1,2 bars durant 20 min	
Ajouter 5 ml d'une solution de 2M $MgCl_2$	

Antibiotique de sélection

Composants	*Concentration*
Ampicilline	Solution stock à 50 mg/ml gardés à –20°C et utilisée à 50 µg/ml

II.1.6 Préparation de l'ADN plasmidique

À petite échelle, l'ADN plasmidique des différents clones testés est préparé selon la méthode de lyse alcaline sur 1 ml de culture d'*E. coli* recombinantes selon les protocoles fournies par Qiagen (QiaPrep Spin Miniprep Kit).

Pour des maxi-préparations d'ADN, 250 ml de culture d'*E. coli* recombinantes sont traités selon le protocole et avec les produits et colonnes du Kit Qiagen (QiaPrep Spin Maxiprep Kit).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.2 Manipulation de l'ARN

II.2.1 Extraction de l'ARNm d'*Halobacterium salinarium*

Les ARN messagers *d'Halobacterium salinarium* ont été extraits selon la méthode suivante : 1 ml de cellules aliquotées de différentes phases de la croissance, ou des expériences de stress ont été repris dans 500 µl du tampon de lyse et d'extraction d'ARN : RNAwiz (proposé par Ambion). Les cellules ont été bien homogénéisées par une seringue et incubées pendant 5 min en présence du RNAwiz. Cette étape d'incubation est indispensable pour dissocier les acides nucléiques des nucléoprotéines. 100 µl de chloroforme est ajouté au lysat, le lysat est bien mélangé et incubé 10 min à température ambiante. Une étape de centrifugation (10000 g pendant 15 min à 4°C) permet ensuite la séparation du lysat en trois phases : phase aqueuse renfermant l'ARN, phase organique renfermant les protéines et les lipides et l'interface renfermant l'ADN génomique. La phase aqueuse renfermant l'ARN est ensuite récupérée avec précaution de ne pas toucher la phase organique. 250 µl d'H20 et 500 µl d'isopropanol sont ensuite ajoutés au surnageant pour précipiter les ARNm. Après une incubation de 10 min à température ambiante et une centrifugation de 10 min à 4°C, une étape de lavage à l'éthanol 70% suivie d'une centrifugation de 5 min à 4°C permet la récupération des ARNm sous forme précipitée. Les précipitats d'ARNm sont ensuite séchés à température ambiante et resuspendus dans de l'H20 traitée au *DEPC* selon le volume approprié (en général entre 10 µl et 20 µl). Le tampon de dépôt (Ambion) contenant de formaldéhyde a été ajouté ensuite permettant ainsi le dépôt des échantillons sur un gel d'agarose/ formaldéhyde.

II.2.2 Northern Blot

Les échantillons d'ARNm d'*Halobacterium salinarium* sont resuspendus dans le tampon de dépôt et sont chauffés à 65°C pendant 15 min permettant ainsi la dénaturation des structures secondaires de l'ARN.

Ils sont ensuite déposés sur un gel agarose / formaldéhyde préparé dans du 1 x MOPS avec les compositions suivantes : 1% (p/v) agarose, 17 % (v/v) formaldéhyde : 1 g d'agarose est repris dans 73 ml du tampon 1 x MOPS et le mélange est ensuite porté à ébullition pour une homogénéisation. Après refroidissement du gel jusqu'à 55°C, 17 ml de formaldéhyde sont ensuite ajoutés et le gel est coulé dans un appareil d'électrophorèse à gel horizontal. Une fois polymérisé, le gel est immergé dans le tampon 1x MOPS. La migration se fait dans un

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

appareil d'électrophorèse à 80 V pendant deux heures et est arrêtée lorsque le niveau du bleu de bromophénol atteint le 3/4 du gel. Le dépôt des échantillons et la présence des ARN ribosomiques 23S et 16 S sont vérifiés par une coloration du gel au bromure d'éthidium ou par l'ajout d'une solution de BET à une concentration finale de 10 µg/ml directement aux échantillons.

Tampon MOPS (10X)

Composants	*Concentration*
MOPS ou [N-Morpholino]-propane-sulphonic acid	200 mM pH= 7
Acétate de sodium	50 mM
Na_2EDTA	10 mM

Pour détecter la présence spécifique des ARN messagers, le gel est transféré sur une membrane hybond–N+ (Amersham). Le transfert se fait par capillarité dans du tampon 20 x SSC sur la nuit. Une fois le transfert terminé, la membrane est rincé rapidement dans du 1x MOPS et les ARNm sont fxés sur la membrane d'une façon covalente par un cross-link aux rayons UV (Stratalinker, Amersham). La membrane est gardée à température ambiante, et la présence de l'ARNm est détectée par une sonde anti-ARNm spécifique au gène d'intérêt.
Nous avons choisi cette stratégie après avoir utilisé plusieurs techniques (sondes ADN froides et chaudes) qui n'ont pas abouti.

Tampon SSC (20X)

Composants	*Concentration*
NaCl	3 M
Na_3citrate	0,3 M

Tampon SSPE (20X)

Composants	*Concentration*
NaCl	3,6 M
Sodium Phosphate	0,2 M
EDTA	0,02 M

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

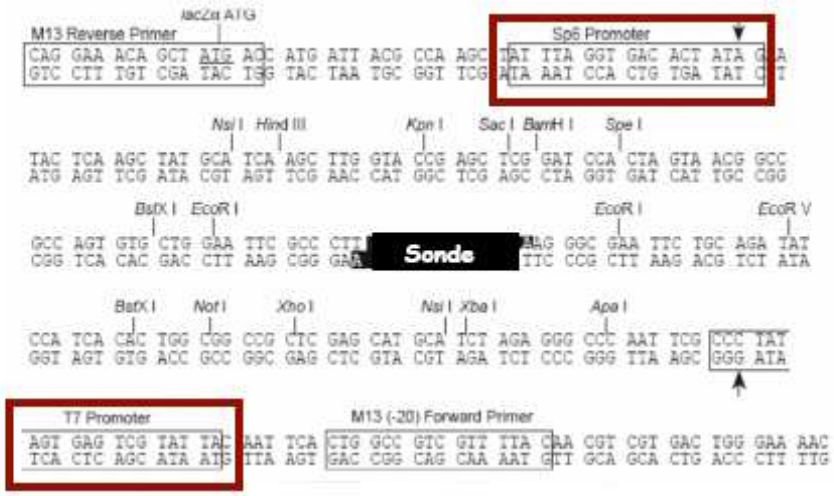
II.2.3 Construction des sondes et marquage des sondes au ^{32}P radioactif

Pour détecter la présence spécifique des gènes PAN A et PAN B et la sous-unité alpha du protéasome, des sondes spécifiques de ces gènes ont été construites par une amplification de régions intragéniques par réaction de PCR comme indiqués dans le paragraphe Amplification des gènes par PCR.

La présence des fragments d'ADN correspondant à la taille attendue est détectée par une analyse par gel d'agarose, le produit PCR est ensuite cloné dans le vecteur pCRII-TOPO selon les indications d'Invitrogen. Le vecteur pCRII-TOPO posséde deux promoteurs SP6 et T7 permettant une transcription bi-directionnelle (Figure 10).

Les produits de la réaction TA-TOPO sont ensuite utilisés pour transformer les cellules TOP 10F. Les transformants sont sélectionnés sur des boîtes de pétri contenant 50 µM d'ampicilline. L'ADN plasmidique est ensuite purifié et la présence du fragment d'intérêt est vérifiée par une hydrolyse de l'ADN par l'enzyme de restriction EcoRI. Le plasmide portant notre fragment d'intérêt est envoyé à séquencer pour vérifier à la fois la présence du fragment et détecter son orientation afin de déterminer le choix du promoteur. L'enzyme de restriction est choisi afin de permettre une linéarisation de la sonde du côté 5' du gène permettant la transcription de l'ARN anti-messager. Les sondes sont linéarisées par les enzymes de restriction convenables, la linéarisation est vérifiée sur gel d'agarose, et les sondes sont purifées à partir des gels d'agarose comme indiqués auparavant et traitées à la protéinase K suivi d'une précipitation au phénol-chloroforme.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006



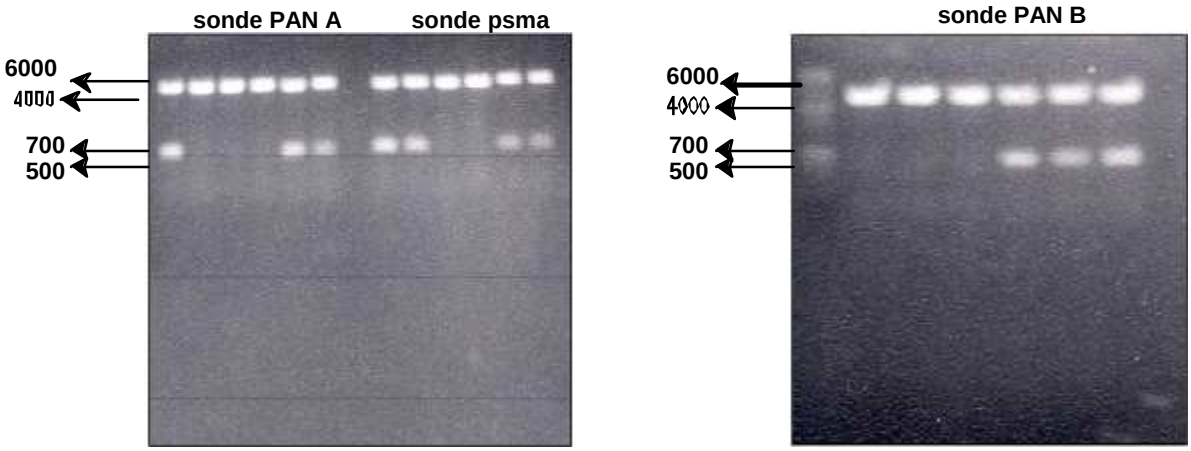


Figure 10: Clonage des sondes dirigées contre PAN A, PAN B et la sous-unité alpha du protéasome dans le vecteur de transcription pCR II-TOPO.

En haut : Séquence nucléotidique du vecteur pCRII-TOPO qui entoure le site de clonage de la sonde. La figure montre les deux promoteurs Sp6 et T7 (encadrés en rouge) qui permettent la transcription *in vitro* des sondes. Les débuts de transcription de l'ARN T7 polymérase et de la Sp6 ARN polymérase sont indiqués par une flèche.

En bas : Des régions spécifiques des gènes PAN A (747 p.b) , PAN B (637 p.b) et la sous-unité alpha du protéasome (524 p.b) ont été amplifiés par PCR et ont été clonés dans le vecteur pCRII-TOPO permettant leur transcription *in vitro* pour générer des sondes ARN anti-sens.
La figure montre la vérification des plasmides (par digestion à l'enzyme de restriction EcoRI) sur un gel d'agarose 1%. Les plasmides ont été purifiés à partir des clones Top10F transformées par la réaction de ligation des sondes dans le vecteur PCRII-TOPO

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.2.4 Transcription des sondes *in vitro* et marquage au 32 P radioactif

Pour marquer radioactivement les sondes au ^{32} P, nous avons procédé à la transcription *in vitro* des sondes pour produire des sondes ARN anti-sens m ou riboprobes.
Pour transcrire *in vitro* les sondes, nous avons utilisé le kit MAXIscript (Ambion). 1 µg de sonde linéarisée et purifiée sur gel d'agarose est incubée pendant 15 min à 37°C dans un mélange réactionnel contenant 10 mM de chacun des 4 dNTP, et de l'UTP marqué radioactivement au ^{32} P à une concentration finale de 3.125 µM soit 5 µl d'une concentration de 10 mCi/ml en présence de l'ARN polymérase (30 U T7 ARN polymérase ou 20 U SP6 ARN polymérase). Après élimintation de l'ADN par une digestion à la DNase à 37°C pendant 10 min, la sonde anti-ARNm est prête pour l'utilisation.

II.2.5 Hybridation et détection par autoradiographie

Les membranes sont incubées pendant 30 min dans le tampon d'hybridation Ultrahyb (Ambion). La sonde est ensuite ajoutée à une concentration qui ne dépasse pas les 10 ng/ml. L'hybridation se fait à 68 °C pendant la nuit sur une roue tournante. Les lavages successifs se font selon les recommandations d'Ambion. Les membranes sont tout d'abord lavées 2 x 5 min dans une solution contenant 2X SSPE, 0,1% SDS à 68°C, et ensuite 2 x 15 min dans une solution contenant 0,1X SSPE 0,1% SDS à 68°C. Le deuxième lavage supplémentaire de 15 min se fait uniquement si le signal est très fort. La détection du signal se fait par autoradiographie.

II.3 Ribonuclease Protection Assay

La RPA est une méthode extrêmement sensitive pour la détection et la quantification d'un ARN spécifique dans un mélange complexe d'ARN. Le principe se base sur l'utilisation d'une sonde RNA marquée radioactivement synthétisée *in vitro*. La sonde complémentaire à une région spécifique de l'ARN va donc s'hybrider spécifiquement à cette région dans un mélange d'ARN et l'hybride ARN/sonde serait protégé de l'attaque des ribonucléases. Les résultats de la réaction de digestion par les ribonucléases sont ensuite analysés sur un gel de polyacrylamide détecté par autoradiographie.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.3.1 Extraction de l'ARNm d'intérêt

L'échantillon d'ARN a été préparé comme indiqué ci-dessus. Pour les expériences de RPA, l'ADN résiduel éventuellement présent dans les échantillons a été éliminé par le kit DNA-free de chez Ambion selon les instructions du fabricant.

II.3.2 Construction, clonage de la sonde d'intérêt et transcription *in vitro*

La sonde de 594 p.b. couvrant le début de l'ORF PAN B et la fin de l'ORF de l'oligoendopeptidase a été amplifiée par une réaction de PCR en utilisant les oligonucléotides suivants : 5' GCATCCCGCATTTCTACTACAA 3' ; 5' CGTTTTCAGCGTCTCTCGTTCT 3' et en utilisant l'ADN génomique total *d'Halobacterium salinairum* comme matrice. Une fois amplifiée, la présence de la sonde a été vérifiée sur un gel d'agarose, et la sonde a été ensuite clonée dans le vecteur pCRII-TOPO permettant une transcription bi-dimensionnelle. La sonde a été ensuite envoyée à séquencer pour vérifier l'orientation de la sonde permettant la transcription de l'ARN anti-sens (Figure 11). La sonde a été ensuite transcrite *in vitro* par le Kit « Maxiscript » selon les instructions du fabricant en utilisant l'UTP ^{32}P comme élément radioactif. La sonde a été ensuite purifiée par dépôt sur un gel de 6% polyacrylamide – 7 M urée. La migration se fait dans du 1X TBE pendant 1 heure à 100 V, la bande correspondant à la sonde complète est découpée, et éluée par une incubation avec 350 µl de tampon d'élution (0,5 M ammonium acétate, 1 mM EDTA, 0,2% SDS) pendant 2h à 37°C.

Avant de passer à la réaction d'hybridation, la sonde est précipitée par l'addition de 3 volumes d'éthanol 100 % suivie d'une incubation pendant 15 min à – 20 °C sur la nuit et une centrifugation pendant 15 min à 10, 000 rpm. La sonde est reprise dans de l'eau traitée au *DEPC*.

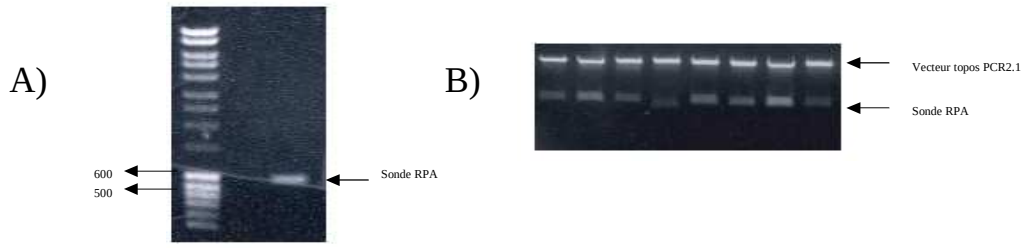


Figure 11 : Construction de la sonde pour la protection à la ribonucléase et clonage dans le vecteur PCRII-TOPO.

A) Vérification de la sonde de 594 p.b amplifiée par PCR sur un gel d'agarose 0,8%.

B) Vérification des clones transformés avec le produit de ligation de la sonde dans le vecteur PCRII-TOPO . L'ADN plasmidique purifié des clones transformés est digéré avec l'enzyme EcoRI pour libérer la sonde.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.3.3 Hybridation de l'ARN contre la sonde et digestion à la ribonucléase

Les étapes suivantes ont été effectuées en utilisant le Kit RPA poursuivie de chez Ambion en suivant les instructions du fabricant.

150-600 pg de la sonde marquée radioactivement au ^{32}P ont été mélangés à 0,6 µg d'ARNm extraits d'*Halobacterium*. Deux échantillons ont été inclus comme contrôle négatif : la sonde sans échantillon d'ARN, la sonde mélangée à 0,6 µg d'ARN de levure comme échantillon d'ARN non spécifique. La sonde et les ARNm ont été co-précipités en ajoutant 1/10 V d'ammonium acétate (3M pH =4,8) et 2,5V d'éthanol 100%. Le mélange est incubé 15 min à –20°C. Après centrifugation de l'échantillon (10000 rpm, 10 min, + 4°C), le précipitat est repris dans 10 µl du tampon d'hybridation (Ambion) du kit RPA. La réaction commence par une étape de dénaturation de 3-4 min à 95°C et l'hybridation se fait par une incubation sur la nuit à 42°C. Cette réaction permet l'hybridation spécifique de la sonde à la région d'ARN d'intérêt formant ainsi un ARN double-brin qui sera protégé de l'attaque subséquente des RNases. La réaction d'hybridation est arrêtée par une brève centrifugation et d'une incubation des échantillons sur glace. Le mélange est ensuite digéré à la RNase par l'addition de 150 µl de la RNase (mélange RNase A/ RNaseT1) diluée à 1 :100 dans le tampon de digestion (Ambion : kit RPA). La réaction de digestion est incubée à 37 °C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 225 µl de tampon d'Inactivation (Ambion : kit RPA) qui va inactiver la réaction en précipitant les échantillons. Le mélange est ensuite homogénéisé. Après incubation pendant 15 min à – 20°C et une centrifugation (10000 rpm,15 min, 4°C), les produits de la RPA sont repris dans le tampon de dépôt de formaldéhyde (Ambion : kit RPA). Ils sont dénaturés 3 min à 95°C et analysés par dépôt sur un gel de 6% polyacrylamide – 7 M urée. La migration se fait pendant 4 heures à 25-30 mA dans du 1X TBE. Le gel est transféré sur papier Whatmann 3 MM, séché sous vide à 80 °C et la détection se fait par autoradiographie à –70°C.

Tampon TBE (10X)

Composants	*Concentration*
Tris-Base	0,9 M
Acide borique	0,9 M
EDTA	0,5 M

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Gel 6% Acrylamide – 7M urée

Composants	*Quantité pour 50 ml*
40 % Acrylamide/bis Acrylamide 19 :1	6,3 ml
Urée	24 g
TBE 10 X	5 ml
Ammonium Persulfate (10% : p/v)	400 µl
TEMED	53,3 µl

II.4 Extension d'amorce ou Primer extension

L'extension d'amorce ou primer extension est une technique simple et facile pour cartographier et déterminer le début de la transcription dans la région 5' de l'ARNm.

La technique utilise un oligonucléotide marqué et complémentaire à la région d'ARN d'intérêt servant comme amorce pour la réverse transcriptase qui va amplifier la région 5' de l'ARNm. La technique comprend une étape d'extraction d'ARNm totaux d'*Halobacterium*, une étape de marquage des oligonucléotides utilisés pour la primer extension, une étape d'hybridation des oligonucléotides et de réaction d'extension d'amorce, une dernière étape de vérification des produits d'extension d'amorces par gel de polyacrylamide.

Pour l'extraction des ARNm totaux, nous avons utilisé la même procédure décrite dans le paragraphe ci-dessus. Les ARNm ont servi donc de matrice pour des réactions d'extension d'amorce.

Pour le marquage des oligonucléotides, 25 µg d'oligonucléotide sont resuspendus dans 1 µl du tampon PNK, ils sont phosphorylés dans un mélange réactionnel de 10 µl renfermant 1 Unité de la T4 PNK et 1-2 µl d'une solution γ^{32} P ATP (10 µCi ; 3000 Ci/mole, 3,3 pmoles) par une incubation de 40 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 µl d'une solution d'EDTA (250 mM, pH = 8) suivie d'un chauffage à 65°C pendant 5 min. Les nucléotides non incorporés sont éliminés par précipitation à l'éthanol en présence du « tRNA carrier ».

Pour la réaction d'hybridation et d'extension, 1µl de l'oligonucléotide marqué et 10-20 µg d'ARN sont co-précipités en ajoutant 1/10 volume de sodium acétate et 3 volumes d'éthanol 95%. Une étape d'incubation à –20°C et de centrifugation (10000 g pendant 10 min) permet la récupération du co-précipité. Le co-précipité est repris dans 10 µl du tampon KTE. Le

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

mélange réactionnel est chauffé 5 min à 65°C et refroidi lentement jusqu'à 37°C. La réaction d'hybridation se fait pendant 1 heure à 37°C.

La réaction d'extension se fait par une addition de 10 µl du tampon MNM et 5 Unités du RNA guard, ainsi que 5 unités de la réverse transcriptase. La réaction est incubée 15 min à 37°C.Les produits de la réaction d'extension sont précipités en ajoutant 2 µl d'EDTA (0,5M, PH=8), 78 µl d'eau distillée et 10 µl de sodium acétate, et 250 µl d'éthanol 95%. Après une étape d'incubation et de centrifugation, les produits d'extension sont repris dans 2,5 µl d'eau et 2,5 µl du tampon de dépôt contenant de formamide (Ambion). Les échantillons sont dénaturés et séparés sur un gel de séquençage 6% polyacrylamide et 7 M urée. La migration se fait à 40 mA pendant 3-4 heures et le gel est transféré sur papier Whatman 3 MM, séché sous vide à 80 °C et les produits d'extension sont révélés par autoradiographie.

La réaction de séquençage sur la région 5'UTR de PAN A amplifié en utilisant l'oligonculéotide servant à la réaction d'extension d'amorce a été réalisée selon la méthode de Sanger en utilisant le T7 sequencing kit (Amersham) selon les recommandations du fabricant.

Tampon TNK (10x)

Composants	*Concentration*
Tris-HCl (pH= 7,6)	500 mM
$MgCl_2$	100 mM
DTT (dithiothreitol)	50 mM
Spermidine	1 mM

Tampon MNM mix

Composants	*Concentration*
$MgCl_2$	10 mM
dATP, dGTP, dCTP et dTTP	1 mM
β-mercaptoéthanol	10 mM

Tampon KTE

Composants	*Concentration*
KCl	80 mM
Tris-HCl (pH = 8,5)	20 mM
EDTA	0,5 mM

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III Techniques de Biochimie et de Biologie cellulaire

III.1 Culture et Expériences de stress

Halobacterium salinarium et *H. marsimortui*, en tant qu'organisme aérobie chémoorganotrophe, sont cultivés dans les milieux riches contenant de fortes concentrations en sel. La croissance s'effectue à 37°C dans un incubateur avec oxygénation par agitation mécanique à 200 tr/min. La croissance cellulaire est mesurée par le suivi de la densité optique à une absorbance de 620 nm. Les cellules sont diluées au cinquième une fois que la densité optique atteigne 1,2 unités de densité optique.

Pour les expériences de choc thermique, des cellules en pleine phase exponentielle (O.D = 0,6) sont transférées dans un bain-marie à 60°C et sont incubées pendant 60 min. Au cours du temps, 1 ml de cellules sont récupérées par centrifugation à 10000 g pendant 5 min. les cellules sont congelées à l'azote liquide et gardées à – 70°C.

Pour les expériences de stress salin, les cellules en phase exponentielle sont diluées de 4,2 M NaCl (25% NaCl) à 1,7 M NaCl (10%NaCl) en ajoutant 2,5V le volume d'un milieu de culture à une concentration de 0 M NaCl.

Pour les expériences d'adaptation aux concentrations en sel, les cellules en phase stationnaire sont centrifugées à 4000 rpm pendant 4 min et reprises directement dans des milieux de culture contenant la concentration en sel appropriée. Le suivi de la croissance s'est fait par une mesure de la densité optique. Les échantillons ont été prélevés en phase exponentielle et en phase stationnaire correspondant à plusieurs dilutions.

Pour les expériences d'inhibition du protéasome par l'utilisation de la drogue NLVS, deux méthodes ont été utilisées : des cellules en phase stationnaire ont été diluées directement dans un milieu de culture contenant 15 ou 30 µM en NLVS comme concentration finale.

La deuxième méthode consiste à rajouter la drogue à des cellules en phase exponentielle et à collecter les échantillons sur les trois heures qui suivent l'addition de la drogue.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Milieu *Halobacterium salinarium* (Hackett and Dassarma, 1989)

Composants	*Quantité pour 1 litre*
NaCl	250 g
Extrait de levure	3 g
Tryptone	5 g
$MgSO_4$,7 H_20	20 g
KCl	3 g
Trisodium Citrate. $2H_20$	3 g
Après Autoclave (120 °C, 20 min, 1,2 Bar), Ajuster le pH à 7,5 par une solution de NaOH 3N.	

Milieu *Haloarcula marismortui* (Mevarech *et al.*, 1976)

Composants	*Quantité pour 1 litre*
NaCl	208 g
Extrait de levure	20 g
Compléter jusqu'à 898 ml d'eau	
Après Autoclave (120 °C, 20 min, 1,2 Bar), Ajouter :	
$MgSO_4$,7 H_20 (466 g/l)	100 ml
$CaCl_2$ (50 g/l)	1 ml
$MnCl_2$ (125 g/l)	1 ml

III.2 Immunodétection

III.2.1 Purification des anticorps sur colonne d'affinité

Les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines PAN A, les protéines PAN B ainsi que le protéasome ont été reçus sous forme de sérum de lapin (Eurogentec).

Les anticorps ont été utilisés directement sous forme de sérum à une dilution de 1/10000 pour les réactions d'immunodétection ou purifiés sur des colonnes de sépharose portant des groupes -NHS activés (Hi-Trap NHS-activated 1 ml - Amersham) qui permettent l'attachement covalent des peptides immunogènes.

Pour la purification des anticorps sur la colonne Hi-trap NHS-activated :

1 ml de peptide immunogène (Reçu d'Eurogentec en suspension à une concentration de 1 mg/ml) est dialysé contre 500 ml de tampon de couplage (0,1 M NaHCO3 et 0,5 M NaCl pH =8,3) pendant la nuit à +4°C. 1 ml du peptide est ensuite déposé sur la colonne prélavée

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

avec le tampon de couplage. Les sites non occupés par le peptide sont ensuite saturés par des lavages successifs avec 6* 1ml du tampon basique (0,5M Ethanolamine, 0,5M NaCl pH= 8,3) et 6 * 1 ml du tampon acide (0,1M tampon Acétate et 0,5M NaCl pH=4).

La colonne est ensuite lavée avec du TBS (Tris-HCl 50 mM pH = 7,5 et 150 mM NaCl) quii est le tampon de la réaction peptide- anticorps.

5 ml du sérum sont dialysés sur la nuit contre du TBS à +4°C, et sont ensuite déposés sur la colonne. La réaction peptide - anticorps est incubée pendant 1 heure à 37°C. La colonne est ensuite lavée plusieurs fois avec 3* 10 ml de TBS et l'anticorps est ensuite élué de la colonne par 1 ml de 100 mM glycine pH=2,5 dans un tube contenant une solution tampon de 1M tris base. L'anticorps ainsi purifié est concentré avec des colonnes de concentrations commercialisées par millipore (Centricons : M.W Cut-off : 10,000) et utilisé à une dilution 1/2000 dans du tampon TBS-tween.

III.2.2 Préparation des extraits protéiques et détermination de la concentration protéique

Les cellules issues des différentes expériences (Croissance, Choc thermique, Choc salin) sont resuspendues dans le tampon de lyse. Les cellules sont cassées et lysat est ensuite homogénéisé par plusieurs passages à travers une seringue, centrifugé à 10000 g pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires.

La concentration en protéines de nos échantillons est mesurée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le bleu de Coomassie G250, sous sa forme anionique, se fixe aux groupements cationiques des protéines par interactions électrostatiques.

Une gamme étalon de BSA comprise entre 15 µg/ml et 0,5 mg/ml sert de référence pour l'estimation de la concentration. Les échantillons protéiques à doser et la gamme sont utilisés comme suit : dans chaque puits sont déposés 150 µl d'eau UHP, 10 µl de gamme ou d'échantillon (plusieurs dilutions sont testées) et 40 µl de réactif Biorad Protein Assay contenant le bleu de Coomassie. Après homogénéisation, La Densité Optique (DO) est mesurée à 595 nm contre un témoin ne contenant pas de protéines, à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA de 96 puits. La concentration de nos échantillons est déduite à l'aide de la courbe étalon réalisée à partir de la gamme BSA et en prenant en considération les dilutions réalisées.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Une fois la concentration protéique déterminée, les échantillons dans le tampon de dépôt et sont chauffés 5 min à 100 °C et centrifugés quelques secondes, et analysés sur un gel dénaturant SDS.

Tampon de lyse

Composants	*Concentration*
Tris-HCl (pH= 7,6)	100 mM
Triton X-100	0,1 %
Complete (protease inhibitors) Amersham	0,04 %

Tampon de dépôt (2x)

Composants	*Concentration*
Tris-HCl (pH= 6,8)	100 mM
SDS	4 %
Glycérol	20 %
Bleu de Bromophénol	0,2 %
Ajouter extemporanément DTT (dithiothreitol) 200 mM	

III.2.3 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse apparente par migration sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) sous l'effet d'un champ électrique. Le gel de polyacrylamide est coulé entre deux plaques de verre (Taille mini 10 cm x 8 cm) montées dans un système Amersham. Il se compose de deux gels : le gel de concentration et le gel de séparation proprement dit. Le gel de concentration permet de concentrer toutes les protéines d'un même puit sur une seule ligne afin qu'elles pénètrent le gel de séparation sur un même front et débutent leur séparation en même temps. Le gel de séparation utilisé dans nos études est de 12% et le gel de concentration est de 5%. La composition des gels de séparation et de concentration est donnée dans les tableaux suivants.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Solutions pour préparation de gel

Gel de séparation 12% (par gel)		*Gel de concentration 5 %*	
30% Acrylamide	2 ml	**30% Acrylamide**	400 µl
Tris 1,5M pH = 8,8	1,25 ml	**Tris 0,5M pH = 6,8**	625 µl
H20	2 ml	**H20**	1,45 ml
SDS 10%	0,04 ml	**SDS 10%**	0,04 ml
Persulfate d'ammonium (10%)	0,05 ml	**Persulfate d'ammonium (10%)**	80 µl
TEMED	0,01 ml	**TEMED**	8 µl

Tampon de Migration (5x)

Composants	*Quantité pour 1 litre*
Tris Base	15,1 g
Glycine	94 g
SDS (10 % : p/v)	50 ml

Les échantillons sont déposés au fond des puits au niveau de l'anode et vont migrer vers la cathode grâce à la charge négative que leur confère le SDS. Afin de faciliter l'identification des protéines recherchées, un marqueur de poids moléculaire est également déposé sur le gel. La migration s'effectue sous une tension constante de 100 Volts dans le gel de concentration puis 150 Volts dans le gel de séparation. Après avoir passé le gel de concentration, les protéines se séparent en fonction de leur masse apparente. La migration est arrêtée lorsque le front de migration représenté par le bleu de bromophénol atteint le bas du gel. Le gel est ensuite démoulé et les protéines peuvent être visualisées globalement par coloration au bleu de Coomassie ou être transférées sur une membrane pour une analyse par Western Blot.

III.2.4 Coloration des gels au bleu de Coomassie

Les protéines présentes sur le gel peuvent être colorées à l'aide d'une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie R250 (0,15% de Bleu de Coomassie, 46% H20 , 45% Ethanol pur, 9% acide acétique) par incubation de celui-ci pendant 15 min sous agitation constante puis par décoloration (7,5% d'acide acétique glacial, 5% d'éthanol, 87,5% H20) par changement régulier de bain.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.2.5 Technique de Western Blot

Cette technique permet d'identifier les protéines par immunomarquage spécifique après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert des protéines sur une membrane de type nitrocellulose ou PVDF (Immobilon) par exemple.

III.2.5.1 Electrotransfert des protéines sur membrane

Les protéines ayant migré sur le gel de polyacrylamide sont transférées sous l'impulsion d'un courant électrique sur une membrane de PVDF dans le cas général. Le gel situé du côté de l'anode est déposé en sandwich entre des papiers Whatman découpées à la taille du gel et imbibées par la solution de transfert. La membrane recouvre le gel et est située du côté de la cathode. Le transfert des protéines se fait dans un appareil à transfert liquide (Amersham) à 100V, 500 mA pendant 2h.

Tampon de Transfert

Composants	*Quantité pour 1 litre*
1 M Tris-HCl pH= 8,3	25 ml
Méthanol (100 %)	200 ml
Glycine	11,25 g

III.2.5.2 Coloration de la membrane de PVDF

La qualité de transfert peut être contrôlée par coloration de la membrane au bleu de Coomassie R250. Il s'agit d'une coloration irréversible de la membrane. A cet effet, la membrane est immergée 1 min dans du méthanol 100%, 1 min dans de l'eau, 1 min dans une solution de coloration contenant 0,1% Bleu de Bromophénol, 40% méthanol, 1% acide acétique et 1 min dans 50% méthanol , bien lavée avec de l'eau distillée, puis laisser sécher à température ambiante.

III.2.5.3 Immunodétection des protéines sur la membrane

Toutes les étapes sont effectuées à température ambiante. Dans un premier temps, les sites aspécifiques de la membrane non occupés par les protéines transférées sont saturés

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

pendant 1 heure et sous agitation permanente par une solution à 5 % de lait écrémé dilué dans du TBS-Tween.

La membrane est ensuite placée pendant une heure ou toute la nuit sous agitation constante en présence de l'anticorps primaire, spécifique de la protéine à détecter, diluée dans du TBS-tween. Cette incubation est suivie d'un lavage de 10 min avec du TBS-tween.

La membrane est ensuite incubée sous agitation constante pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire spécifique au lapin et couplé à une enzyme (HRP, la péroxydase Raifort) et dilué dans du TBS-tween. Cette incubation est suivie d'un lavage de 10 min dans du TBS-Tween.

La révélation des protéines se fait par l'incubation de la membrane en présence d'une solution commerciale ECL (Enhanced Chemiluminescence – Amersham) pendant 1 minute. Le peracide contenu dans cette solution va oxyder l'enzyme portée par l'anticorps secondaire (HRP) qui, pour revenir à son état initial, va oxyder à son tour le luminol présent dans la solution. Le luminol qui se trouve alors dans un état énergétique élevé revient à un état stable en émettant de la lumière détectée sur un film radiographique. Les bandes lumineuses correspondent aux protéines ciblées.

Tampon TBS-Tween

Composants	*Concentration*
Tris-HCl (pH= 7,6)	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	0,05 %

III.3 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est une technique hautement spécifique et efficace pour la séparation analytique des antigènes d'un lysat cellulaire brut. Nous avons utilisé deux méthodes pour l'immunoprécipitation des PANs dans la cellule.

Pour immunoprécipiter les deux isoformes de chaque PAN, nous avons utilisé le protocole suivant :

Pour la préparation du lysat cellulaire, 1g de pâte cellulaire est repris dans 10 ml du tampon d'immunoprécipitation suivant : 0,5 M KCl, 50 mM Tris-HCl pH = 7,5 et 1 % triton et des inhibiteurs de protéase Complete (0,04%). Le lysat est homogénéisé par passages à plusieurs reprises dans une seringue.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Une étape de centrifugation à 10000g pendant 10 min est ensuite effectuée pour éliminer les débris cellulaires. La réaction d'immunoprécipitation est ensuite effectuée avec 1 ml d'extraits cellulaires pendant 1 heure à température ambiante en ajoutant 1 à 2 µg d'anticorps PAN A ou l'anticorps PAN B. La réaction est ensuite incubée avec 100 µl de billes de protéine A-sépharose (Amersham) prélavées avec le tampon d'immunoprécipitation pendant 1 heure à température ambiante. Deux échantillons contrôle ont été inclus : le premier où les billes sont incubées uniquement avec les extraits, et le deuxième où les billes sont incubées avec un anticorps non spécifique (Anti-TET, anti-Malate déshydrogénase).

La protéine A de *Staphylococcus aureus* va interagir spécifiquement avec les immunoglobulines de l'anticorps permettant ainsi l'isolation du complexe anticorps-antigène du reste du lysat cellulaire par une simple centrifugation à 5000 g pendant 1 min qui va répartir le complexe antigène - anticorps lié aux billes dans le culot et le reste du lysat cellulaire dans le surnageant. Le culot subit ensuite plusieurs lavages par le tampon d'immunoprécipitation pour l'élimination des protéines fixées non spécifiquement sur les billes.

Après élimination du surnageant, le culot est ensuite analysé par SDS-PAGE ou par un gel bidimensionnel. Pour le SDS PAGE, les billes ont été tout de suite reprises dans le tampon de dépôt et les complexes anticorps-antigène sont ensuite libérés par chauffage de l'échantillon à 95°C pendant 5 min.

Pour le gel bidimensionnel, les culots respectifs sont repris directement dans le tampon de réhydratation (8 M urée, 4 % CHAPS, 60 mM DTT, 0,5% ampholytes porteurs et une trace du bleu de bromophénol) et la technique de gel bidimensionnel est appliquée comme indiquée ci-dessous.

Pour détecter la co-immunoprécipitation des deux PANs, nous avons modifié les conditions d'immunoprécipitation comme suit :

- la concentration en sel dans le tampon d'immunoprécipitation. Ainsi, la réaction d'immunoprécipitation est réalisée dans plusieurs concentrations en sel (0,5M KCl, ou 1 M KCl, ou 1,5M KCL, ou 2,5 M KCl) et 50 mM tris-HCl pH = 7,5 et 0,1% TritonX-100.
- Afin de pouvoir détecter la présence des PANs par immunoblot, nous avons utilisé le Rabbit TrueBlot Kit (eBioscience) qui permet la détection des antigènes dont la détection est affectée par la présence des immunoglobulines lourdes. Le kit utilise des billes précouplées à des anticorps lapin permettant la reconnaissance spécifique des

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

anticorps lapin et utilise un anticorps secondaire qui détecte uniquement les chaînes d'immunoglobulines natives.

III.4 Techniques de Purification

III.4.1 Purification du complexe natif

Pour purifier le complexe, plusieurs litres de culture d'*Halobacterium* (à peu près 13 litres de culture correspondant à 10 g de pâte cellulaire) en début de phase stationnaire ont été culottés, congelés à l'azote liquide et gardés à –70°C jusqu'à son utilisation. Pour détecter la présence des PANs, les échantillons ont été précipités au TCA en ajoutant 10 x le volume de l'échantillon d'une solution de TCA 10 %, lavés à l'acétone froid, séchés et repris dans le tampon de dépôt pour gel. La présence des PANs dans les différentes étapes de purification a été suivie par immunodétection.

III.4.1.1 Clarification des extraits

10 g de pâte cellulaire sont repris dans 40 ml de tampon A contenant de fortes concentrations d'ammonium sulfate : 2,2 M $(NH4)_2$ SO_4, 50 mM Tris-HCl pH = 7,6, 40 mM $MgSO_4$. Le sulfate d'ammonium est utilisé dans la plupart des étapes de purification des protéines halophiles (Mevarech et al, 1976). En effet, ce sel renforce l'effet hydrophobe ; on peut donc en modifiant la concentration en sulfate d'ammonium contrôler la solubilité globale tout en restant dans des conditions non dénaturantes pour les protéines halophiles. Le même effet permet, à forte concentration en Ammonium Sulfate, l'adsorption des protéines sur des surfaces solides ou des gels.

Deux étapes de centrifugation (30000 g à + 4°C pendant 1 heure) et d'ultracentrifugation (160000 g à +4°C pendant 3 heures) sont ensuite effectuées pour éliminer les débris cellulaires et les membranes mais aussi des protéines insolubles à de fortes concentrations d'ammonium sulfate.

III.4.1.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe

Nous avons utilisé en deuxième étape de purification la sépharose 4B. Cette matrice utilisée usuellement comme un gel de filtration, sert dans le cas des protéines halophiles comme colonne de chromatographie d'adsorption. Les protéines halophiles en présence de

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

fortes concentrations en Ammonium Sulfate se fixent à la matrice par l'intermédiaire des liasions hydrogène et d'interactions de Van der Waals ou hydrophobes. L'élution se fait en appliquant un gradient de concentration linéaire décroissant de sulfate d'ammonium. Le surnageant (S160) de volume 40 ml a été donc déposé sur une colonne de sépharose 4B prééquilibrée avec le tampon A. L'élution s'est faite par 950 ml de gradient décroissant en ammonium sulfate : de 4M $(NH4)_2$ SO_4,50 mM Tris-HCl pH = 7,5 jusqu'à 0,5M $(NH4)_2$ SO_4, 50 mM Tris-HCl pH=7,5. Les PANs sont élués dans les fractions 9,10,11 correspondant à 1,4 M concentration en ammonium sulfate.

III.4.1.3 Chromatographie échangeuse des ions

Les fractions 9,10,11 après élution de la colonne de sépharose ont été groupées, la concentration en ammonium sulfate est augmentée jusqu'à 4 M par l'ajout progressif de la quantité nécessaire d'ammonium sulfate en poudre. Les fractions sont ensuite déposées sur une colonne de DEAE-cellulose. La DEAE-cellulose chargée positivement à haute concentration en AS fixe les protéines halophiles chargées négativement. Les protéines sont ensuite éluées progressivement à l'aide de 500 ml de gradient croisé décroissant en ammonium sulfate et croissant en NaCl : 4 M $(NH4)_2$ SO_4, 0,2 M NaCl → 0,5 M $(NH4)_2$ SO_4,, 2 M NaCl. Le but de ce gradient croisé est de baisser l'effet hydrophobe et les interactions ioniques, tout en conservant des conditions favorables à la stabilité des protéines halophiles.

III.4.1.4 Hydroxylapatite

Le principe d'adsorption puis de désorption de la matrice d'hydroxylapatite repose sur l'utilisation d'un gradient croissant d'ions phosphates et n'est pas influencé par de fortes concentrations en sel. Les fractions éluées de la colonne de chromatographie échangeuse d'ions sont déposées au sommet d'une colonne d'hydroxylapatite et élués à l'aide d'un gradient de 200 ml : 20 mM Sodium phosphate pH=7,2, 4 M NaCl → 300 mM Sodium phosphate pH = 7,2, 4 M NaCl.

III.4.1.5 Chromatographie sur Gel-filtration

Les fractions contenant les protéines PANs ont été donc dialysées contre un tampon contenant 3M KCL avant d'être analysées en chromatographie sur gel filtration de type G3000 en présence de fortes concentrations de sel. Pour cela, La colonne a été calibrée par les complexes halophiles déjà purifiés au laboratoire et dont la masse moléculaire est déjà

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

connue : la malate déshydrogénase halophile 130 kda, le complexe TET halophile (500 Kda) et le protéasome (750 kda).

III.4.2 Expression et Purification des protéines PAN recombinantes

III.4.2.1 Clonage des protéines recombinantes

Les deux gènes *panA* (1218 pb) et *panB* (1236 pb) ont été tout d'abord amplifiés par la réaction de PCR à l'aide des amorces portant des sites de restriction NdeI et BamH1 (voir tableau 1) et en utilisant comme matrice l'ADN génomique total d'*Halobacterium*. Une fois que les produits d'amplification sont vérifiés sur gel d'agarose, ils sont ensuite clonés directement dans le vecteur intermédiaire PCRII-TOPO. Les gènes destinés à être clonés sont ensuite libérés du vecteur PCRII-TOPO par une digestion avec les endonucléases NdeI et BamH1 et purifiés sur gel d'agarose. Le clonage dans le vecteur d'expression pET-11a se fait par une réaction de ligation en utilisant les bouts cohésifs portant les sites de restriction NdeI et BamH1. Les clones portant le vecteur pET-11a- PAN A et le vecteur PAN B sont vérifiées sur gel, et les vecteurs sont envoyés à séquencer pour vérifier la présence des PANs. La figure 12 résume les différentes étapes du clonage. Nous avons choisi le vecteur pET-11a comme vecteur d'expression en particulier car en plus de son utilisation fréquente pour la surexpression des protéines halophiles, il présentait l'avantage pour notre étude de pouvoir sur exprimer les protéines PANs recombinantes sans aucune étiquette, les protéines recombinantes vont donc se comporter comme les protéines PANs natives en électrophorèse et vont migrer exactement au même niveau.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

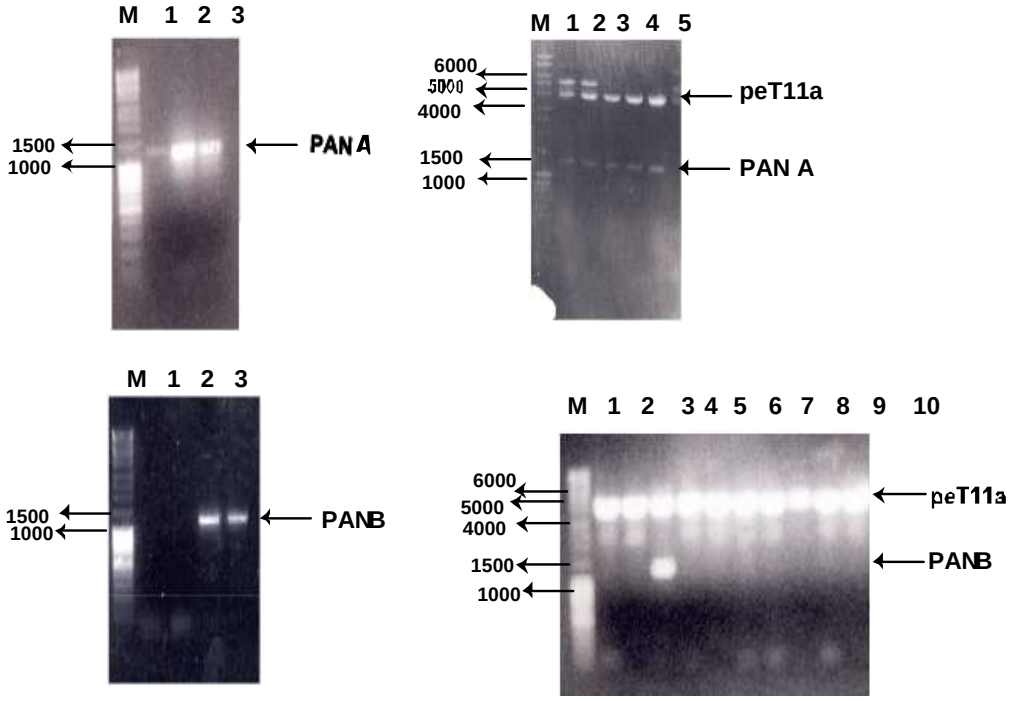


Figure 12 : Amplification des gènes PAN A et PAN B et clonage dans le vecteur d'expression pET-11a.

Les gènes PAN A (1218 p.b) et PAN B (1230 p.b) ont été amplifiés par une réaction PCR et vérifiés sur un gel d'agarose 0,8% (A.) Les gènes ont été clonés ensuite dans le vecteur pET-11a (5,6 Kb) via leurs sites de restriction NdeI et BamHI. La figure B montre la vérification des clones transformés par le vecteur pET-11a –PAN A et le vecteur pET-11a-PANB par une digestion de l'ADN plasmidique avec les enzymes de restriction NdeI et BamHI. M : échelle de fragments d'ADN. 1,2,3 (À gauche) : différentes conditions d'amplification par PCR.(1,…..10 : Numérotation à droite): différents clones testés pour la présence du fragment amplifié.

III.4.2.2 Expression des protéines recombinantes

Les souches compétentes BL21, BL21 (DE3) plys et BL21 codon plus, BL21 Top10 F ont été transformées par le vecteur pET-11a portant le gène PAN A et le gène PAN B. Les transformants sont cultivés dans le milieu LB contenant de l'Ampicilline à une concentration de 50 µg/ml. Les deux protéines PANs sont surexprimées en ajoutant 0.5 mM de l'inducteur IPTG à des souches d'expression d'*E. coli* BL21 en phase exponentielle transformées avec le vecteur pET-11a-PAN A ou le vecteur pET-11a-PAN B. Après 3h d'induction, les cellules sont centrifugées et le culot est ensuite analysé pour la présence des protéines surexprimées.

Pour l'analyse par immunodétection, 1 ml de cellules induites ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 5 min et repris dans 600 µl de tampon de dépôt.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.4.2.3 Essais de Purification des protéines recombinantes

Pour la purification des protéines recombinantes, 1 litre de cellules BL21 exprimant la protéine PAN A ou la protéine PAN B a été centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire a été repris dans 10 ml du tampon suivant : 3 M KCl, 20 mM Tris-HCl pH =7,5, 10 mM $MgCl_2$, 0,1% Triton-X100. Une première étape de centrifugation permet l'élimination des protéines insolubles et des débris membranaires. Le surnageant est ensuite dialysé contre 1 litre du tampon : 20 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM $MgCl_2$ et 1,5 M $(NH4)_2SO4$. Il est ensuite déposé au sommet d'une colonne d'interaction hydrophobe (S4B) pré-équilibrée dans 20 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM $MgCl_2$ et 1,5 M $(NH4)_2SO4$. L'élution se fait par 200 ml d'un gradient décroissant de tampon d'ammonium sulfate de 2 M jusqu'à 0,5 M. L'éluat est ensuite analysé par immunodétection et les fractions où sortent les protéines PANs sont récupérées (correspondant à 20 ml) et sont ensuite dialysés contre du 1,5 M tampon ammonium sulfate et sont déposés au sommet d'une colonne échangeuse d'ions DEAE-cellulose. Les protéines ont été éluées par 200 ml d'un gradient croisé (1,5M -> 0,5 M As et de 0 M NaCl -> 3 M NaCl). La présence de PANs dans les différentes étapes de la purification a été suivie par immunodétection.

III.5 Séparation sur Gradient de sucrose

Pour les expériences d'oligomérisation et d'association des PANs avec le protéasome, 2 grammes de culot de cellules gardés à – 70°C sont repris dans 15 ml de tampon A : 3,4 M KCl, 100mM MgAc, 60 mM Tris-HCl pH = 7,5, 0,04% inhibiteurs de protéases (Complete, Roche). Après sonication (6 x 10 secondes), les membranes et les débris cellulaires sont éliminés par une étape de centrifugation à 30000 g pendant 1 heure. Les polyribosomes ainsi que les autres complexes ont été séparés du surnageant (S30) par une étape d'ultracentrifugation (160,000 g) pendant 3 heures. 0,5 ml des deux surnageants (S30 et S160) ont été déposés au sommet de 10 ml d'un gradient de sucrose de 5-20% préparés dans le tampon A. Les gradients sont ensuite centrifugés dans un SW41 rotor pendant 15 h à 250 000 g et 10 °C. Les gradients sont ensuite fractionnés en utilisant une pompe péristaltique de haut en bas en de fractions de 750 µl. Les protéines des différentes fractions sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique (15% au final), lavées à l'acétone, séchées et reprises dans le tampon de dépôt. Après dénaturation des échantillons par chauffage pendant 3 min à 100°C, les protéines sont séparées par SDS-PAGE et les protéines spécifiques sont détectées par leur

anticorps correspondant. Pour calibrer les gradients, divers complexes halophiles purifiés au laboratoire ont été déposés au sommet des gradients et leur position a été déterminée en déposant les fractions du gradient et en les analysant par gel après coloration au bleu de Coomassie.

Pour les expériences de localisation cellulaire, 500 ml de culture d'*Halobacterium salinarium* sont prélevés en phase exponentielle, centrifugés 30 min à 9000 rpm, à 4°C. Puis le culot est repris dans 4 mL de tampon de lyse froid (3,4 M KCl; 100 mM MgAc; 60 mM Tris pH 7,6; 6 mM bêta mercapto éthanol). Les cellules sont homogénéisées mécaniquement à l'aide d'un pilon. Puis le lysat est incubé 30 min à température ambiante en présence de 400 U de DNAse. Enfin les cellules sont dialysées contre 500 mL de tampon froid pendant 2h à 4°C, pour une lyse douce des cellules et préserver ainsi les complexes cellulaires.Un gradient linéaire de 10 ml: 7-30% sucrose (3,4 M KCl; 100 mM MgAc; 60 mM Tris pH 7,6) est coulé, On dépose à son sommet 0,5 ml de lysat cellulaire. Les gradients sont ensuite centrifugés (ultracentrifugation) pendant 90 min à 26000 rpm et à 4°C pour séparer les formes associées de PAN des formes oligomériques. Puis le gradient est divisé en 15 échantillons de 0,7 ml. La présence des protéines PAN est révélée par Western blot.

III.6 Gels Bidimensionnels

L'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. La première dimension sépare les protéines selon leur pI dans un gel de polyacrylamide comportant un gradient de pH. La deuxième dimension utilise l'électrophorèse en présence de SDS (Sodium Dodecyl sulfate), qui sépare les protéines selon leur masse. La première dimension est celle qui apporte le surcroît d'information le plus net, en séparant les isoformes ou les formes modifiées des protéines (par exemple phosphorylées ou glycosylées). En revanche, cette première dimension est aussi le point faible de la technique : le fait d'amener les protéines à leur pI limite la capacité de la séparation, car le pI représente le point de solubilité minimale.

Le gradient de pH peut être généré au moyen d'ampholytes porteurs ou par des gradients de pH immobilisés. Cette dernière technique a considérablement accru la reproductibilité, la flexibilité et la capacité des séparations par électrophorèse bidimensionnelle. Les seules limitations à la technique sont la présence de la protéine étudiée dans la fenêtre d'analyse (pI et masse) et sa solubilité, qui doit être suffisante.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.6.1 Extraction et solubilisation de l'échantillon protéique

Cette étape est particulièrement importante pour éliminer les contaminants qui interfèrent avec la première dimension. Ces contaminants sont notamment les sels, les lipides et les acides nucléiques.

Les protéines halophiles sont particulièrement délicates à ce sujet, notamment la présence de fortes concentrations de sel dans les extraits protéiques.

Pour extraire et solubiliser les protéines halophiles, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 10000 g pendant 5 min. Le culot a été ensuite resuspendu dans le tampon de lyse (et centrifugé à 10000 g pendant 5 min pour enlever les débris. À cette étape, la concentration protéique a été déterminée comme indiquée ci-dessus.

Une étape de déssalage a été ensuite effectuée en utilisant des colonnes de déssalage commercialisée par Millipore (3KDa Cut-off) pour se débarrasser des sels qui interfèrent avec la première dimension. Le déssalage s'est fait en mélangeant 200 µl d'échantillon protéique avec 200 µl de tampon de lyse et en centrifugeant le tout sur la colonne à 6000 g pendant 30 min. La même étape a été répétée plusieurs fois pour s'assurer du déssalage complet.

Les protéines sont ensuite précipitées en ajoutant 10 fois le volume de 10% TCA suivie d'une centrifugation à 10000 g pendant 10 min. Les culots des protéines sont ensuite lavés avec 10% d'acétone froid. L'échantillon était de nouveau centrifugé et le culot est séché à température ambiante et resolubilisé dans le tampon de réhydratation contenant 8 M urée, 4 % CHAPS, 60 mM DTT, 0,5% ampholytes porteurs et une trace du bleu de bromophénol. Les protéines sont à nouveau rapidement centrifugées avant de procéder à la réhydratation.

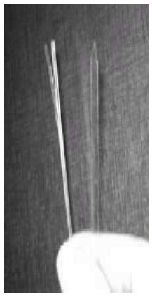
III.6.2 Première dimension

Pour la première dimension, des IPGstrips ou bandelettes de 7 cm et de gamme de pH = 3.9 - 5.1 sont utilisés pour une séparation des protéines qui ont le pI majoritairement acide. Les échantillons sont incorporés « passivement » dans les IPG à gradient de pH immobilisés sans l'application d'un courant électrique à 22°C pendant toute la nuit.

L'appareil de Biorad IEF protean cell est utilisé pour la focalisation et la séparation des protéines selon leur point isoélectrique. Le programme suivant a été utilisé : 10V pendant 1 heure, 100 V pendant 1 heure, 1000V pendant 1 heure et 6400 V pendant six heures.

Les bandelettes ou IPG strips sont gardées à – 20°C sur la nuit, ou à – 80°C sur plusieurs jours jusqu'à leur utilisation.

A) B) C)



Matériels utilisés pour la séparation des protéines selon leur point isolélectrique ou première dimension.
A) IPG strip ou bandelettes qui consiste en une matrice faite de polyacrylamide et comportant un gradient de pH. B) plateau de focalisation portant à ses deux extrémités les cathodes et les anodes et pouvant comporter 12 IPG strips dans les canaux. C) IEF protean cell qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique en appliquant un voltage très important pouvant atteindre les 10,000V.

III.6.3 Deuxième dimension

La migration en deuxième dimension doit se faire selon la masse de chaque protéine, ce qui implique l'uniformisation des charges. La technique du SDS PAGE est donc traditionnellement employée. Toutefois il est difficile de faire bouillir la bandelette de 1ère dimension pour dénaturer les protéines. En fait une équilibration de dix minutes dans une solution d'urée 6M, de glycérol 30%, de SDS 2% et de DTT 65mM (extemporanément) dans 50mM de Tris-HCl pH 8,8 remplace très bien la dénaturation selon Laemmli.

Dans le cas où une microanalyse des protéines est prévue par spectrométrie de masse, il est possible de bloquer le groupement -SH des cystéines par 10 minutes de carbamidométhylation à l'iodoacétamide à 55mM (extemporanément dans la même solution d'équilibration mais sans DTT). Ainsi traités, les bandelettes doivent aussitôt être placées sur les gels de 2ème dimension. Chaque bandelette est déposée au sommet d'un gel de 12% qui ne dispose pas d'un gel de condensation. Elle est stabilisée en contact avec le gel en versant de l'agarose 1,4% (low melting dans du tampon de migration à moins de 50°C au moment de l'utilisation).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Des marqueurs de poids moléculaire ou de l'échantillon brut peuvent être déposés de chaque coté de la bandelette. La migration se fait comme décrit auparavant dans le paragraphe x. Les gels sont ensuite analysés soit par coloration au nitrate d'argent pour l'analyse en spectrométrie de Masse, ou selon la méthode d'immunodétection décrite ci-desssus.

III.6.4 Coloration du gel au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est une méthode très sensible qui permet la détection de quantités très faibles de protéines (1ng – 10 ng). Dans le but du séquençage par spectrométrie de masse, les gels bidimensionnels sont colorés selon la méthode suivante (Shevchenko *et al*., 1996) :

Après la deuxième dimension, les protéines sont fixées par immersion du gel dans une solution de fixation (50% Méthanol, 5% acide acétique) pendant toute la nuit.

Le gel est ensuite lavé deux fois 10 min avec du 50% méthanol afin d'éliminer le reste de l'acide acétique. Le gel est ensuite sensibilisé par une immersion rapide dans une solution de 0,02 % de sodium thiosulfate. Après plusieurs lavages rapides à l'eau, le gel est incubé dans la solution colorante de nitrate d'argent à 0,1% pendant 20 min.

La réaction est ensuite développée par l'ajout de 6 % sodium phosphate, 0,04% formaldéhyde. Le gel est gardé dans du 1% acide acétique jusqu'à séquençage par spectrométrie de masse.

Les spots de la région du gel susceptibles de contenir les protéines d'intérêt sont excisés, les protéines sont digérés à la trypsine et sont ensuite identifiées par une spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse a été effectuée en collaboration avec M. Jaquinod au CEA-grenoble.

• Outils de Bioinformatique

Les sites des génomes disponibles:

http://www.halolex.mpg.de/ : Séquence du génome d'Halobacterium NRC-sp. Max Planck Institut fur Bioichimie – Martinsried – Allemagne.

http://halo.umbi.umd.edu/ : Séquence du génome d'Halobacterium NRC-sp,

http://www-archbac.u-psud.fr/genomics/lbmgeBlast.html : Séquences disponibles de tous les génomes d'archéobactéries.

Les sites spécifiques aux analyses Bioinformatiques :

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Primer 3 : http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi . Le programme permet la construction des oligonucléotides optimums pour l'amplification d'une région de gène donnée.

Clustal W : alignement de multiples des séquences de protéines. http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html.

BoxShader : ce programme localisé sur le même site que Clustal W permet d'éditer les alignements de séquence pour une meilleure présentation. http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html :

ProtParam : permet de calculer les paramètres physiques et chimiques d'une protéine http://www.expasy.ch/tools/protparam.html

Coiled-coil : Programme qui permet la prédiction des régions d'une séquence donnée susceptible d'adopter une conformation coiled-coil. http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html (Lupas *et al*., 1997).

http://aaa-proteins.uni-graz.at/Default.html : regroupe toutes les données et les informations sur la famille des AAA..

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

*

Résultats et Discussions

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Chapitre I : Les deux PANs d'*Halobacterium salinarium*

Le séquençage du génome d'*Halobacterium* en 2000 a révélé la présence de deux gènes codant des protéines homologues à PANs (Ng *et al*., 2000, Oesterhelt *et al.*, Unpublished). En absence d'autres génomes séquencés à cette date-là, *Halobacterium salinarium* était le premier organisme possédant deux gènes régulateurs du protéasome PANs. Plus tard, le séquençage du génome d'autres archéobactéries halophiles comme *Haloarcula marismortui* (Baliga *et al.*, 2004) et *Haloferax volcanii* (Reuters *et al.*, 2004) ont montré que la présence des deux PANs est une caractéristique des toutes les espèces d'archéobactéries halophiles en général et pas uniquement de l'espèce *Halobacterium* en particulier. Le séquençage des génomes d'autres archéobactéries se succédaient, et la présence des deux PANs est aussi détectée dans le génome des *Méthanosarcinacées* (Galagan *et al*., 2002).

Chez les eucaryotes, il existe 6 gènes différents homologues à PANs ou rpt qui codent pour des ATPases impliqués dans la régulation du protéasome. Ces 6 gènes sont très conservés d'une espèce à une autre. Les rpt eucaryotes très similaires (plus de 60% d'identité) possèdent des fonctions non-redondantes dans la cellule, mais coopèrent dans la dégradation d'un substrat (Glickman *et al*.,1998). Elles participent aussi à des fonctions indépendantes de la protéolyse comme la régulation de la transcription (Gonzalez *et al*., 2002 ; Ottosen *et al*.,2000) et la réparation de l'ADN (Gilette *et al*., 2001 ; Russell *et al*., 1999). La présence des deux PANs chez les microorganismes halophiles pose un grand nombre de questions sur le degré d'homologie entre ces deux PANs mais également avec leurs homologues archéobactériennes et eucaryotes. Pourquoi les halophiles et les méthanosarcinacées ont-ils besoin d'avoir deux PANs ? Est-ce que les deux PANs, comme leurs homologues eucaryotes, participent à des fonctions non redondantes dans la cellule ? Ou seraient-ils impliqués dans deux fonctions différentes ?

Cette partie sera consacrée dans un premier temps à une présentation des deux protéines PANs, et la comparaison des deux protéines au niveau de la séquence. Dans un deuxième temps, nous allons présenter les différentes expériences qui nous ont permis de détecter que les deux protéines PANs sont effectivement exprimées dans les extraits d'*Halobacterium* sous deux formes qui diffèrent dans leur région N-terminale. Dernièrement, nous allons présenter les mécanismes qui seraient responsables de cette hétérogénéité et le rôle probable de cette hétérogénéité dans la cellule.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I Analyse des séquences protéiques des deux PANs d'*Halobacterium salinarium*

Nous avons comparé en premier lieu les deux protéines PAN A et PAN B ; nous avons ensuite comparé les protéines PAN A et PAN B à leurs homologues dans d'autres groupes**.**

I.1 Comparaison des deux PANs au niveau de la séquence

Afin d'étudier les deux protéines PANs, les séquences correspondantes aux deux cadres de lectures ORFs *OE1765* et *OE3805* codant pour les protéines PANs ont été extraits du site du Max Planck Institut localisé à Munich http://halolex.mpg.de. Le gène *OE1765* code pour une protéine de 406 résidus dont le poids moléculaire est estimé à 44.972 Kda et un point isoélectrique = 4,52. Le gène *OE3805* code pour une protéine de 410 résidus dont le poids moléculaire est estimé à 45.184 Kda et un point isoélectrique de 4,35. On a nommé au cours de nos études PAN A le produit du gène *OE1765* et PAN B le produit du gène *OE3805*. Notez que le pI acide de ces protéines traduit probablement leur caractère halophile (Ng *et al*., 2000) L'alignement de séquences des deux protéines PAN A et PAN B (Figure 13) a montré que celles-ci présentent un domaine central très conservé et deux domaines N-terminaux et C-terminaux divergents. Les deux protéines sont étroitement liées avec 60% d'acides aminés identiques et 78% de similarité. Le domaine le plus conservé est le domaine P-loop central (résidus 185-372 pour PAN A et résidus 188-375 pour PAN B) présent chez tous les membres de la superfamille des AAA+. Il comprend le Walker A (GPPGTGKT) et le Walker B (DEID) responsable de la liaison et de l'hydrolyse des nucléotides, et la région SRH (T/S)-(N/S)-X5-DXA-X2-R-X2-RX-(D/E) conservée chez toutes les AAA-ATPases dont la fonction n'est toujours pas connue. Dans la région N-terminale, la recherche d'une région coiled-coil selon la méthode de Lupas a montré en effet la présence des résidus (17-71 pour PAN A et 39-68 pour PANB) pouvant adopter une conformation coiled-coil. Cependant ces deux régions diffèrent par leur longueur et la nature de leurs résidus. Comme le domaine N-terminal est impliqué dans la liaison des AAA-ATPases à leurs substrats ou à leurs adaptateurs en particulier via le motif coiled-coil, ceci pourrait laisser penser que les deux PANs possèdent des rôles similaires mais probablement leurs substrats seront différents dans la cellule. La région C-terminale est aussi divergente avec un pourcentage de similarité de 17%. Comme cette région est probablement importante dans l'interaction des AAA+ à leurs partenaires peptidasiques (Sauer *et al*., 2004), il est possible que les deux PANs A et B aient alors des

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

affinités différentes pour leur association avec le protéasome, voire susceptibles d'interagir avec d'autres partenaires.

Le deux protéines sont donc très similaires, cependant la divergence au niveau de leur extrémité N-terminale et C-terminale laissent penser que les protéines vont avoir des fonctions non redondantes dans la cellule.

En conclusion, on peut dire que les deux protéines sont 2 AAA-ATPases de la même famille, très similaires dans leur région fonctionnelle mais avec des différences marquées dans les extrémités N-terminales et C-terminales supposées contrôler l'association et la spécificité des complexes, ceci suggère que PAN A et PAN B participent à une même fonction de désassemblage des protéines mais jouent des rôles distinctes *in cellulo*.

Il était donc intéressant de comparer les PANs à leurs homologues eucaryotes et à leurs homologues des autres archéobactéries. Nous avons donc entamé un alignement de séquences entre les deux PANs halophiles et leurs orthologues.

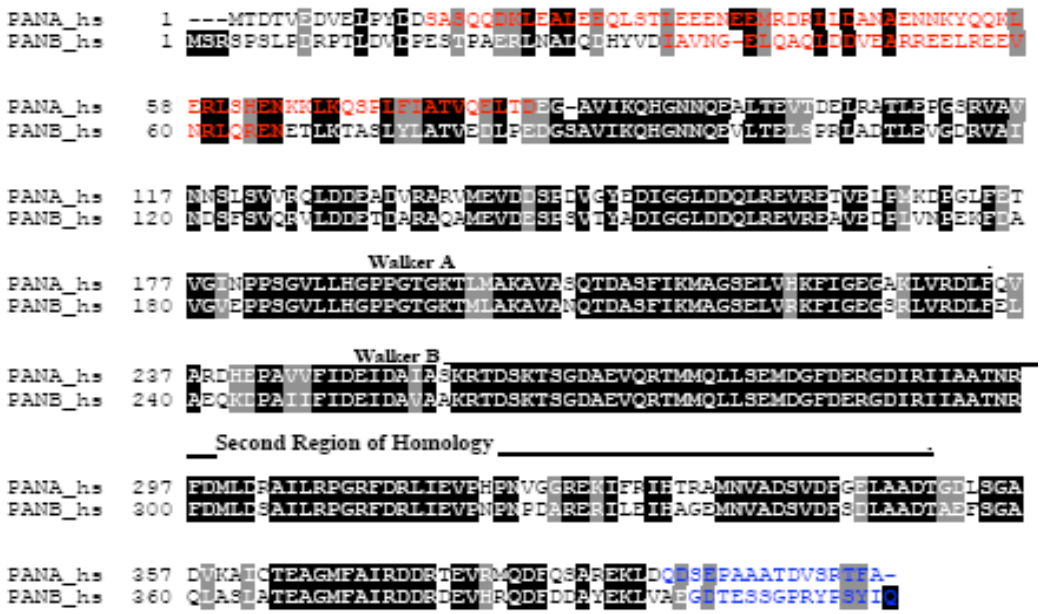


Figure 13: Alignement des séquences protéiques des deux PANs d'*Halobacterium salinarium*.

Sur la figure est représenté le domaine ATPasique central formé par le *Walker A* et le *Walker B* ainsi que la deuxième région d'homologie. La région susceptible d'adopter un motif coiled-coil est représentée par les résidus colorés en rouge. Les peptides en C-terminal qui ont servi à la fabrication des anticorps polyclonaux chez le lapin sont colorés en bleu. Les résidus identiques sont colorés en noir. Les résidus similaires sont colorés en gris.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I.2 Comparaison des protéines PANs halophiles par rapport à leurs homologues

I.2.1 Homologie des protéines PANs halophiles à leurs orthologues halophiles

Les PANs d'*Halobacterium* et les PANs des autres espèces d'archéobactéries halophiles ont une ressemblance frappante au niveau des séquences primaires des protéines. Les PANs A d'*Halobacterium* partagent plus de 80% de similarité avec leurs orthologues PANs A des autres espèces halophiles, de même que pour les PANs B (Figure 14).

Au cours de notre étude, Reuters et coll. ont publié la séquence des deux PANs d'*Haloferax volcanii*, ils ont suggéré à travers une étude phylogénétique des protéines PANs que les protéines PANs A et PANs B résultent d'une duplication de gènes récente qui a eu lieu juste avant la spéciation du groupe halophile, ce qui suggère que les deux PANs halophiles auront probablement une fonction non redondante dans la cellule (Reuters *et al*., 2004).

La présence des deux PANs n'est pas spécifique aux espèces halophiles, les méthanosarcinacées possèdent au niveau de leur génome deux gènes qui codent pour des protéines homologues à PANs. Reuters *et coll*. ont suggéré que les deux PANs de méthanosarcinacéess nommées PAN I et PANs II résultent d'une divergence antérieure à la divergence des protéines PANs halophiles.

I.2.2 Homologie des protéines PANs à leurs homologues archaéobactériens et eucaryotes

La comparaison des protéines PANs halophiles à leurs homologues eucaryotes et archéobactériens à travers les alignements de séquence identifie un domaine central ATPasique conservé chez tous les membres de la famille des AAA, et deux autres régions très conservées : l'une en N-terminale et l'autre en C-terminale qui sont spécifiques des protéines PANs et de leurs homologues eucaryotes (Figure 14).

En effet, au niveau du domaine central, on retrouve le module AAA avec les deux motifs Walker A et Walker B responsable de la liaison et de l'hydrolyse des nucléotides, et la région SRH qui est conservée chez tous les membres de la famille des AAA.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Le motif FIGE qui a été décrit récemment comme un motif important dans le mécanisme de dépliement (Park *et al*., 2005) est aussi présent chez les protéines PANs et leurs homologues eucaryotes.

On relève la présence dans la région C-terminale, d'une région très conservée caractérisée par la séquence suivante : $GAX_6TEAGMXAIR$. Des études récentes montrent l'implication du dernier résidu arginine au niveau de la région C-terminale de PAN de *Méthanocaldococcus janaschii* avec le protéasome 20 S, cependant ce résidu semble ne pas être conservé chez les PANs. Il n'y a pas à l'heure actuelle d'études portant sur la fonction de cette région conservée en C-terminal, mais en analogie avec les autres complexes bactériens notamment le complexe HslU-HslV (le mieux caractérisé structuralement) où la liaison des AAA+ à leur partenaire peptidasique se fait via leur domaine C-terminale (Song *et al*., 2000), cette région serait importante dans la liaison au protéasome .

Quant au domaine N-terminal, la recherche dans les bases de données de domaines annotées de type InterPro et Pfam nous a permis de diviser ce domaine en trois motifs différents que nous avons annoté de I à III en partant du coté C-terminal (figure 14) :

Le motif I est formé de 70 acides aminés, ce motif semble être spécifique aux PANs les rpt ainsi que les protéines cdc48 ou VAT parmi tous les autres membres de la famille des AAA+. Aucune étude structurale ni biochimique n'a été réalisée sur ce motif.

Le motif II formé d'une cinquantaine d'acides aminés. Ce motif est spécifique aux protéines PANs et les rpt uniquement parmi tous les autres membres des AAA+. Ce motif suggère un lien de parenté entre les protéines PANs A, PANs B halophiles et les PANs I de méthanosarcinacées d'une part, et un lien de parenté entre les PANs II des méthanosarcinacées et les autres PANs d'autre part.

Le motif coiled-coil qui est un motif commun de la région N-terminale d'une grande majorité des AAA-ATPases et qui est impliqué dans la liaison du substrat (Voir les régions soulignées dans la figure 14).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

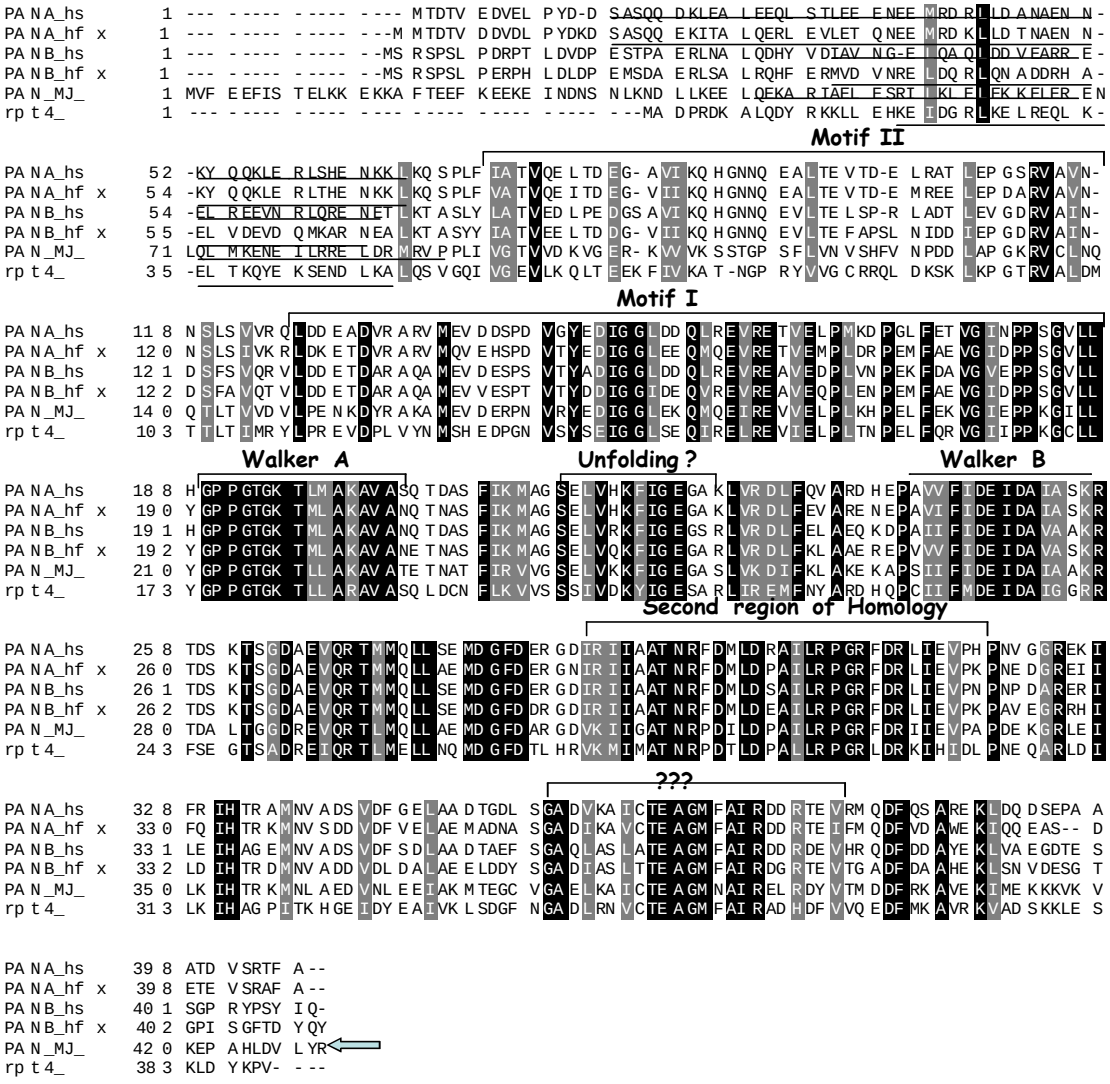


Figure 14: Alignement des séquences protéiques des deux PANs d'*Halobacterium salinarium* avec les PANs *d'Haloferax volcanii*, de *Méthanocaldococcus janaschii* et l'une des sous-unités ATPasiques régulatrices du protéasome eucaryote la rpt4.

L'alignement montre les régions conservées entre les PANs halophiles et leurs homologues d'archéobactéries et eucaryotes. Pour la simplicité de la figure nous avons choisi PAN de *Méthanocaldococcus janaschii* qui a été le plus caractérisé biochimiquement et la sous-unité rpt4 humaine. Les régions principalement conservées sont le domaine ATPasique spécifique de toutes les protéines AAA+ caractérisés par la présence des motifs Walker A et Walker B ainsi que la deuxième région d'homologie SRH. La figure montre les trois motifs de la région N-terminale : Motif I, Motif II et les motifs coiled-coil soulignés ; et la région conservée en C-terminale (???). Le résidu arginine dans la région C-terminale du PAN de *Méthanocaldococcus janaschii* important dans la liaison et l'activation du protéasome est indiqué par une flèche (Forster *et al*., 2005).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II Les deux protéines PAN A et PAN B sont exprimées dans *Halobacterium* et existent sous deux formes différentes

Le séquençage du génome d'*Halobacterium* a révélé donc la présence de deux gènes potentiels *PAN*s, nous avons voulu en premier lieu détecter si les deux protéines PANs sont effectivement synthétisées dans les cellules d'*Halobacterium salinarium*.
Une approche d'immunodétection sur des extraits cellulaires totaux a été donc envisagée en utilisant des anticorps spécifiques à chacun des deux PANs.

II.1 Immunodétection des PANs dans les extraits totaux d'*Halobacterium salinarium*

Puisqu'on voulait détecter spécifiquement chacune des deux protéines, il fallait choisir des anticorps dirigés contre les régions non homologues des deux PANs. L'alignement de séquences a montré que les deux PANs sont très divergents au niveau de leur région N-terminale et C-terminale, on a choisi de préférence les deux peptides immunogènes dans la région C-terminale non homologue des PANs tel est montré dans la figure 13 de l'alignement des séquences des deux PANs. Une fois la séquence des peptides choisis, un programme d'immunisation de lapin contre les peptides immunogènes est lancé en vue d'obtention des anticorps polyclonaux.

Les extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium* ont été analysés par un « Western Blot ». La présence des PANs a été détectée en utilisant les anticorps dirigés contre les protéines PAN A et PAN B. Comme le montre la figure 15, les anticorps dirigés contre les deux protéines PAN A et PAN B ont détecté un signal dans les extraits d'*Halobacterium salinarium*. Ce signal se présentait dans les deux cas pour PAN A et pour PAN B sous la forme de deux bandes migrant à une hauteur très proche du poids moléculaire estimé pour les deux protéines PANs. Dans le cas de PAN A, les deux bandes se trouvent à 54 Kda et à 47 Kda approximativement. Alors que dans le cas de PAN B, les deux bandes se trouvent à 56 Kda à et à 49 Kda approximativement. PAN A a un poids moléculaire estimé à 44 Kda et PAN B un poids moléculaire estimé à 45 kDa. On aurait pu tout de suite conclure que la bande inférieure dans chaque cas correspond à la protéine PAN vue que c'est la bande la plus proche du poids moléculaire estimé. Cependant, il fallait prendre en considération le caractère

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

acide fort des protéines halophiles qui provoque des retards de migration sur le gel pouvant atteindre quelquefois des écarts importants variant de 5 à 10 KDa par rapport à leur poids moléculaire estimé, il était donc très difficile pour nous de trancher laquelle des deux bandes correspondait en réalité à la protéine prédite (Yao and Spudich , 1992).

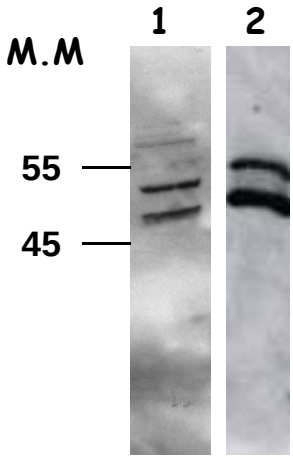


Figure 15: **Immunodétection des extraits totaux d'*Halobacterium salinarium* avec des anticorps dirigés contre les régions C-terminaux de PAN A et de PAN B.**

Les extraits protéiques totaux d'*Halobacterium salinarium* ont été déposés sur un gel SDS de 12%, transférés sur une membrane PVDF et révélés par l'anticorps PAN A (1) et l'anticorps PAN B (2).

Il était possible que l'une des bandes détectées corresponde à un signal non spécifique de l'anticorps, ce qui n'était pas très probable car le profil de l'immunodétection était très similaire pour l'anticorps PAN A et pour l'anticorps PAN B de même que l'écart entre les deux bandes. Nous avons tout de même procédé à une purification des anticorps sur colonne d'affinité. Après couplage de la colonne par le peptide immunogène, nous avons détecté le même signal que l'anticorps non purifié, et qui correspondait toujours à deux bandes. Pour pouvoir se fier aux résultats de l'immunodétection, il nous fallait un contrôle positif qui nous permettrait de tester l'efficacité de l'anticorps et en même temps nous renseigner sur le profil exact de migration des protéines PANs en électrophorèse. Nous avons procédé alors à la surexpression des deux protéines PAN A et PAN B recombinantes dans *E. coli*. Les deux protéines recombinantes vont servir comme contrôle pour tester l'efficacité de l'anticorps sur les protéines recombinantes d'un côté et pour pouvoir interpréter et valider les résultats obtenus sur les extraits protéiques totaux d'*Halobacterium salinarium* de l'autre côté.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III Les deux PANs existent sous deux isoformes dans les extraits d'*Halobacterium salinarium* tronquées dans leur région N-terminale

Les deux protéines PAN A et PAN B ont été clonées et surexprimées dans *E. coli* (vir Matériels et Méthodes). Les protéines recombinantes surexprimées dans *E. coli* et les extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium* ont été déposés côte à côte sur un même gel et la présence des PANs a été détectée par les anticorps dirigés contre les protéines (Figure 16), Les résultats de l'immunodétection montrent bien que les protéines recombinantes migrent au même niveau que la bande supérieure détectée par les anticorps dans les extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium.*

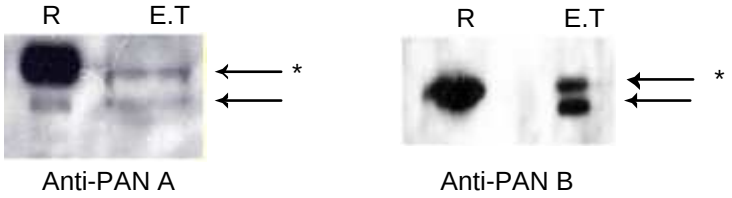


Figure 16 : Immunodétection des protéines recombinantes et des extraits totaux avec les anticorps dirigés contre PAN A et PAN B.

Les extraits protéiques totaux d'Halobacterium ainsi que les extraits protéiques d'*E. coli* surexprimant les protéines PANs recombinantes ont été séparées sur un gel SDS 12%. Après transfert du gel sur une membrane PVDF, la présence de chaque PAN a été détectée par son anticorps respectif. E.T : Extraits totaux *d'Halobacterium salinarium*. R : Extraits totaux *d'E. coli* surexprimant la protéine recombinante.

En effet, lorsqu'on induit la surexpression de la protéine PAN A, l'anticorps PAN A détecte une bande majoritaire située vers 54 KDa ce qui correspond à la bande supérieure détectée dans les extraits d'*Halobacterium salinarium*. De même, la protéine PAN B surexprimée dans E. coli, sa révélation par l'anticorps PAN B montre qu'elle migre sous forme d'une seule bande située vers 56 Kda dans les extraits induits correspondant aussi à la bande supérieure détectée dans les extraits d'*Halobacterium salinarium*. L'immunodétection des protéines PANs surexprimées a démontré que les anticorps sont effectivement fonctionnels et qu'ils détectent spécifiquement les protéines PANs recombinantes. Nous avons aussi profité de la surexpression des protéines recombinantes pour tester la réaction croisée des anticorps sur les

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

protéines PANs, et les résultats ont montré que l'anticorps PAN A ne détecte que la protéine recombinante PAN A et non pas la protéine PAN B, de même que l'anticorps PAN B qui détecte spécifiquement et uniquement la protéine PAN B.

A quoi donc est due la présence de la bande inférieure ? et pourquoi détecte-t-on le même profil pour les deux PANs ? Comme l'anticorps a été choisi pour détecter la région C-terminale de chaque PAN, cette forme courte est probablement une forme tronquée dans sa région N-terminale des deux PANs. En estimant l'écart entre les deux bandes supérieures de 7 à 8 KDa, la forme courte correspondrait à une protéine ayant de 20 à 30 acides aminés de moins dans la région N-terminale.

Nous avons essayé donc d'identifier les deux formes de chaque protéine PAN et d'obtenir un séquençage en N-terminal et pour cela nous avons opté pour trois méthodes :

- Séparation en gel bi-dimensionnel après une première étape de purification.
- Immunoprécipitation
- Purification partielle ou totale des PANs à partir des extraits totaux d'*Halobacterium*.

i. Gel bidimensionnel sur un extrait protéique partiellement purifié

Le gel bidimensionnel est extrêmement puissant pour séparer des profils complexes de protéines. Cependant, la technique n'est pas encore assez développée chez les archéobactéries halophiles, car le gel bidimensionnel est particulièrement délicat à mettre en œuvre dans le cas des protéines halophiles. La présence du sel dans l'échantillon interfère beaucoup lors de la séparation isoélectrique et les concentrations en sel ne doivent pas dépasser les 10 mM.

Les protéines halophiles ont un contenu assez élevé en résidus acides, la majorité des protéines halophiles ont leur point isoélectrique compris entre 3,5 et 4,5.

Après plusieurs mises au point, nous avons trouvé qu'un nettoyage de l'échantillon sur une colonne de dessalage suivi d'une précipitation des protéines avec une solution diluée d'acide trichloroacétique et un lavage à 10% d'acétone ont permis une bonne séparation des protéines sur un gel bidimensionnel tel qu'est montré par la figure 17 du gel 2D coloré par le nitrate d'argent. Pour une optimisation de la séparation, nous avons utilisé les bandelettes de pH compris entre 3,9-5,1 qui a permis une bonne résolution des protéines halophiles.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

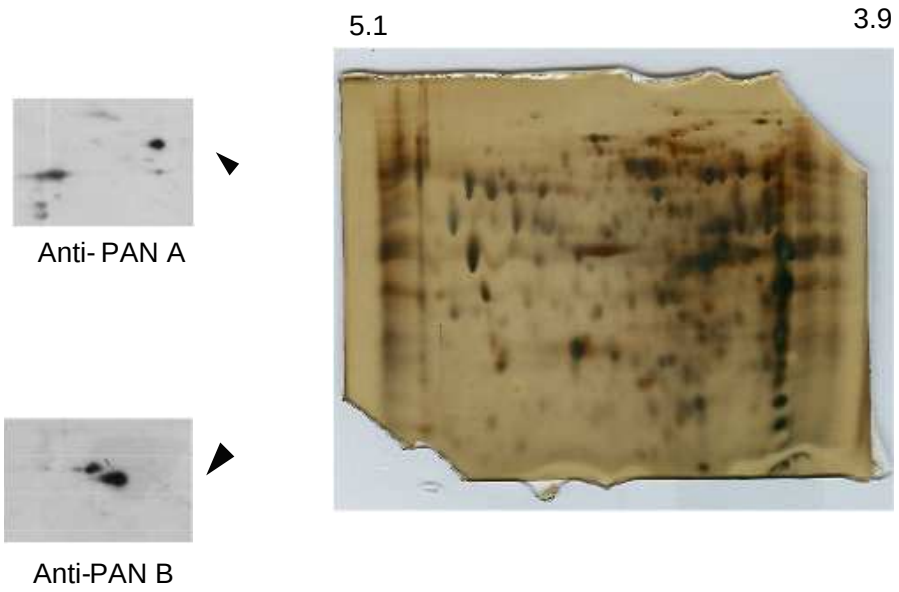


Figure 17 : Séparation bi-dimensionnelle des extraits totaux d'*Halobacterium salinarium*.

Les extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium* ont été déssalés, précipités au TCA, lavés à l'acétone et resuspendus dans le tampon de réhydratation.Ils sont ensuite séparés suivant leur point isoélectrique en première dimension sur des IPGstrips de 3.9-5.1, et suivant leur poids moléculaire en deuxième dimension sur un gel 12%. La séparation des protéines a été vérifiée par coloration au nitrate d'argent, et la détection des protéines PANs par Western Blot grâce aux anticorps dirigés contre les protéines PANS.

Les extraits totaux protéiques ont été centrifugés pour éliminer des débris et les membranes, puis une deuxième étape d'ultracentrifugation a été utilisée pour éliminer la majeure partie des protéines ribosomiques. Après séparation de l'échantillon sur un gel bidimensionnel, nous avons essayé de localiser la position des spots par immunodétection afin de les découper en vue d'un séquençage N-ter. Les résultats par immunodétection ont montré la présence de deux spots qui correspondent aux protéines PANs dans chaque cas. Dans le cas de PAN A, les deux spots ne possédaient pas le même point isoélectrique, avec le spot inférieur étant plus basique que le spot supérieur. Ce qui confirme aussi que la protéine est tronquée dans sa région N-terminale car une protéine tronquée de PAN A en N-terminale aurait un pI plus basique comme l'a montré le programme de prédiction des points isoélectriques. Dans le cas de PAN B, les deux spots étaient relativement très proches avec le spot inférieur légèrement plus acide que le spot supérieur, ce qui correspond aussi au comportement électrophorétique prédit pour une protéine PAN B tronquée en N-terminal.

Cependant, nous n'avons pas pu découper les spots pour les séquencer, car le profil des protéines était toujours très complexe. De plus, la technique s'est confrontée à un

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

problème de quantité de protéines après transfert sur la membrane. Nous n'avons pas pu visualiser les spots sur la membrane après transfert car nous utilisons un système permettant la séparation uniquement de 100 microgrammes d'extraits protéiques totaux, ce qui ne permet pas le séquençage en N-ter.

ii. Immunoprécipitation

Pour obtenir les deux isoformes des PANs et séquencer leur région N-terminale, nous avons essayé d'immunoprécipiter les PANs à partir des extraits protéiques totaux d'*Halobacterium* en utilisant les anticorps PAN A et PAN B.

Les immunoglobulines lourdes migrent aux alentours de 55 kda, juste à la même hauteur des protéines PANs, ce qui empêche la détection des protéines PANs et ne permet pas un séquençage en N-terminal. Nous avons essayé d'éliminer les immunoglobulines contaminantes par plusieurs méthodes de couplage des immunoglobulines aux colonnes de Sépharose S4B comme l'utilisation de sépharose portant des groupes actifs -NHS qui permettent l'attachement covalent des groupes amines primaires sur les colonnes. Cependant ces méthodes se sont avérées inefficaces et nous avions toujours une contamination d'immunoglobulines dans notre éluat. Nous avons alors pensé que les immunoglobulines et les protéines PANs n'ont pas le même point isoélectrique ; une immunoprécipitation suivie d'une séparation de protéines par un gel bidimensionnel permet de séparer les différentes protéines de la réaction d'immunoprécipitation. La réaction d'immunoprécipitation était très faible, nous avons immunoprécipité des quantités de protéines ne dépassant pas les 15 ng, et nous perdons une quantité importante des protéines après le passage sur un gel bidimensionnel, ce qui rendait la quantité insuffisante pour faire un séquençage N-terminal. Cependant, l'identification des protéines par spectrométrie de masse ont montré que les deux formes observées par western blot appartiennent bien aux mêmes séquences peptidiques mais n'a pas donné des informations concernant l'extrémité N-terminale des deux isoformes.

Nous avons donc pensé qu'un gel bidimensionnel sur un extrait protéique total ou partiellement purifié pourrait nous donner accès aux séquences N-ter des isoformes des deux protéines.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

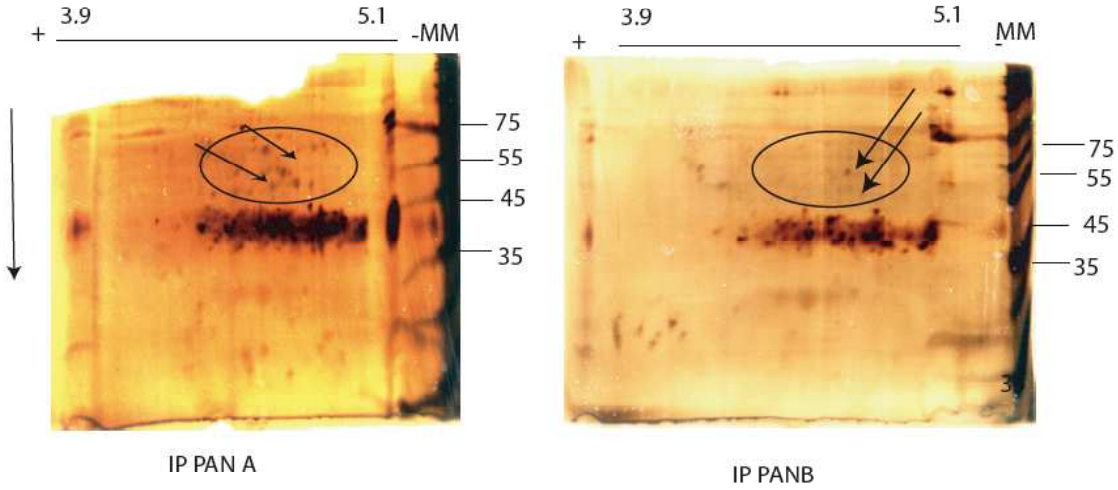


Figure 18 : Immunoprécipitations de PAN A et de PAN B couplées à un gel bidimiensionnel.

Des extraits protéiques d'*Halobacterium salinarium* ont été utilisés pour une réaction d'immunoprécipitation soit avec l'anticorps PAN A ou avec l'anticorps PANB. L'immunoprécipité a été ensuite élué par le tampon de réhydratation et séparé sur un gel bidimensionnel en utilisant en première dimension des IPGstrips de 3.9-5.1, et en deuxième dimension un gel de 12%. Les spots protéiques ont été visualisés après coloration au nitrate d'argent. La région susceptible de contenir les isoformes des deux PANs est encerclée. Les spots de cette région ont été découpés et séquencés par spectrométrie de masse.

iii. Purification totale ou partielle des PANs et de leurs isoformes à partir d'extraits protéiques totaux d'Halobacterium

Cette partie sera détaillée dans le chapitre suivant. Pour résumer, les isoformes des protéines PANs se sont avérées très instables lors des étapes de la purification, et nous les avons perdues après l'utilisation de la première colonne. Nous sommes passés à d'autres méthodes plus rapides de purification telles la séparation sur gradient de sucrose, beaucoup de mises au point sont en cours et qui devraient permettre le séquençage N-terminal des isoformes courtes des protéines PANs.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.1 Mécanismes responsables de l'hétérogénéité en N-terminale chez les PANs

À partir des données précédentes, nous avons regardé de près la région N-terminale pour essayer d'avoir une explication probable sur la présence de deux isoformes des protéines PANs. Nous avons donc cherché à quoi peut correspondre la suppression de 20 à 30 acides aminés dans la région N-terminale chez les PANs halophiles (Figure 19).

Deux hypothèses peuvent être proposées : Un mécanisme de maturation post-traductionnelle en N-terminal : il se peut que les PANs soient synthétisés sous forme d'une protéine entière tout d'abord, et qu'un mécanisme de régulation post-traductionnelle intervienne ensuite pour cliver une partie de la région N-terminale et qui va générer une forme mature de la protéine.

La présence d'une deuxième forme plus courte des PANs dans les extraits protéiques peut correspondre à un deuxième produit du gène issu d'un début de traduction différent. L'utilisation alternative d'un codon initiateur peut provenir soit de l'utilisation d'un deuxième site de transcription, soit de l'utilisation d'une séquence interne de liaison des ribosomes ou Shine-Dalgarno.

III.1.1 Utilisation alternée de deux départs de traduction

Pour vérifier si les PANs peuvent avoir une utilisation alternée de départ de traduction, nous avons regardé de près la séquence protéique et nucléotidique des PANs (Figure 19).

Chez PAN A, nous avons noté la présence d'une deuxième méthionine potentielle située à 38 acides aminés en aval de la première méthionine (Figure 19 A) qui est conservée aussi chez les autres PANs A halophiles. En amont de cette deuxième méthionine se trouve une séquence de Shine-Dalgarno AGAGGAG (Figure 19 B) à la position – 9 du codon initiateur ATG qui est probablement utilisée comme site interne d'initiation de la traduction (Sartorius-Neef *et al*., 2004). Lors de la surexpression de la protéine PAN A dans *E. coli*, nous avons détecté un deuxième produit à la même hauteur que le produit détecté dans les extraits d'*Halobacterium* (Figure 16), ce qui suggère que *E. coli* est capable d'utiliser ce deuxième site comme site interne de traduction. Le cadre de lecture de PAN A comportant deux débuts de traduction possibles (Figure 19A), il y a un désaccord entre les deux groupes qui ont séquencé le génome d'*Halobacterium* sur le début de la traduction concernant la protéine.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Dassarma et coll. du site Maryland Institute (http://zdna2.umbi.umd.edu) ont attribué le début de la traduction à la deuxième méthionine possible avec une protéine plus courte de 368 résidus de poids moléculaire estimé à 40.616 Kda et un pI = 4.79. Ceci pourrait expliquer en effet l'écart entre les deux protéines observé au cours de nos expériences que ce soit au niveau de l'écart pour le poids moléculaire ou pour l'écart observé pour le point isoélectrique.

Par contre chez PAN B, la présence d'une deuxième méthionine n'est pas si évidente, et il n'existe pas de séquence Shine-Dalgarno assez évidente. Néanmoins, une valine correspondant à un codon GTG est situé à la position + 105 en aval du premier codon start (figure 19B). Le codon GTG peut être utilisé comme codon initiateur chez les archéobactéries (Torarinson *et al*.,2005, Londei *et al*., 2005). Notons que la présence de cette valine est bien conservée chez les orthologues PANs B halophiles.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

A)

```
PANA_ntx   1 MMTDTVDDVDLPYDKDSASQQEKITALQERLEVLETQNEEMRDKLLDTNAENNKYQQKLE 60
PANA_hm    1 -MTDTVDEVDMPYD-DDASQQQKIEALQERLEVLESQNEEMRDKLLDANAENNKYQQKLE 58
PANA_hs    1 -MTDTVEDVELPYD-DSASQQDKLEALEEQLSTLEEENEEMRDRLLDANAENNKYQQKLE 58

PANB_hfx   1 MSRSPSLPERPHLDLDPEMSDAERLSALRQHFERMVDVNRELDQRLQNADDRHAELVDEV 60
PANB_hm    1 MSRSPSLPERPRLELDPDMTPDERLEALREHFKEIVQVNEQLTEQLDAARDRQHDLTDEV 60
PANB_hs    1 MSRSPSLPDRPTLDVDPESTPAERLNALQDHYVDIV-VNGELQAQLDDVEARREELREEV 60
```

B)

PAN A :

```
  1 CTGTGAGAGGGTGTCGTTGTATTCGAGGACCTTGGCGACGAGCTTCGCGC
 51 TCGGCGGGAGGGATTCGAGTGCGTCCGCCGTCTCGGTAGCGCTCATACCC
101 ACCAGTATCGAATGCGCTGTATTAATTCTTTTGCTATATTTGATGCGCTA
151 CGGTAATTCAGCGGCGGGATGGCTGCGTCGGTCACGGGGAATGGATTCAC
201 CCCCAACGACCGGCTGTGACTGTCTCGCGCGTGCGGTTTCGAACCCCCAC
251 ACAGGTTGGGTCACCCGAAGCCTCTTATGAACTAACACCCTACTCAGTGG
301 TGATGACCGATACCGTCGAGGACGTGGAGCTCCCCTACGACGACAGCGCC
351 TCACAACAGGACAAACTGGAGGCGCTAGAGGAGCAACTCTCTACCCTCGA
401 AGAGGAGAACGAGGAGATGCGAGACCGGCTGCTTGATGCCAACGCAGAGA
451 ACAACAAATACCAGCAGAAGC
```

PAN B :

```
  1  GCATCCCGCATTTCTACTACAACTTCTACGTCTTCCAGTACGCCACCGGC
 51 ATCTCCGCGGCGGTCGCGCTCGTCGAGGACATCCTCGACGACGACCAGCC
101 CGACGCCGCCGCCCGCTACCGGGAGTTCCTCACCCGCGGGTCCAGCGCGT
151 ACCCGATCGAACTCCTCCAGGACGCCGGCGTCGACATGTCCACGAGCGCC
201 CCCATCGAGCGCGCGATCGGCGTCTACGACCACTACCTCGACGAGGCCGA
251 CGACCTCGTCTAACGCCGCGCCGCCACACCCCCGTTTGGCGTCCCGCGCA
301 CGGACAGTGTAGCCTACCCAAAGGAACTTCTACGCGCGGCCCCTATGGAC
351 GGCAACGAATGTCGCGTAGCCCCTCATTGCCGGACCGGCCGACGCTCGAC
401 GTCGATCCCGAGTCGACGCCGGCGGAACGCCTCAACGCGCTCCAAGACCA
451 CTACGTGGATATCGTGGCGGTCAACGGAGAGCTGCAGGCGCAACTCGACG
501 ATGTCGAAGCCCGCCGCGAAGAACTCCGCGAGGAGGTCAACCGCCTCCAG
551 CGCGAGAACGAGACGCTGAAAACG
```

Figure 19 : Région N-terminale des protéines PANs.

A) Séquence protéique des régions N-terminales des différents PANs halophiles. La deuxième méthionine possible est colorée en rouge. B) Séquence nucléotidique de la région 5' UTR des gènes PAN A et des gènes PAN B. Les différents codons initiateurs sont représentés en rouge. La séquence Shine-Dalgarno est représentée en vert. Les oligonucléotides utilisés pour la réaction d'extension d'amorce sont soulignés. Les sites de départ de la transcription tels qu'ils ont été déterminés par la réaction d'extension d'amorce sont colorés en bleu.

III.6.4.1 Deux départs de transcription des PANs

Afin de déterminer si la deuxième forme courte observée pour les PANs résulte d'une utilisation d'un deuxième site de transcription, nous avons décidé de cartographier le site de départ de transcription des deux PANs par la réaction d'extension d'amorce. Pour la réaction, nous avons utilisé deux oligonucléotides marqués radioactivement situés à 100 p.b approximativement en aval du deuxième codon initiateur probable de chaque PAN. Les oligonucléotides choisis sont représentés sur le schéma ci-dessus (Figure 19B).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Les résultats de la réaction d'extension d'amorce suggèrent qu'il existe deux départs de la transcription (Figure 20). En effet, la détection par autoradiographie de la réaction d'extension d'amorce a montré la présence de deux produits pour les deux PANs (Piste numéro 1 : PAN A et piste numéro 2 : PAN B) correspondant à deux départs de la transcription. Pour PAN A, le premier départ de transcription (S1) se situe à la position – 138 en amont de l'oligonucléotide choisi, ce qui correspond à la thymine ou à la cytosine en amont du codon d'initiation probable. Nous n'avons pas pu déterminer la position de l'autre départ de transcription qui est exclu des limites de résolution du gel et qui correspond à l'extension de l'ARNm du premier codon initiateur. Pour PAN B, le premier départ de transcription se situe à la position – 114 en amont de l'oligonucléotide choisi, ce qui correspond à la thymine ou à l'alanine en amont du codon initiateur GTG. Il existe aussi un deuxième produit d'extension d'amorce qui est exclu des limites de résolution du gel d'acrylamide et qui correspond à l'extension de l'ARNm contenant le premier codon d'initiation de la traduction. Les résultats de l'extension d'amorce ont montré que la présence d'une forme tronquée des PANs est liée à l'existence d'un deuxième départ de transcription en aval du premier codon initiateur. Ce deuxième départ de transcription expliquerait la présence d'une deuxième forme tronquée des protéines PANs dans les extraits protéiques. Dans le cas de PANA, cette forme tronquée aura comme début de la traduction le deuxième codon initiateur ATG résultant en une forme tronquée. Cette forme tronquée aurait un poids moléculaire de 40,616 Kda et un pI de 4,79 ce qui expliquerait la différence sur le gel SDS et la différence observée dans le point isoélectrique en gel bidimensionnel.

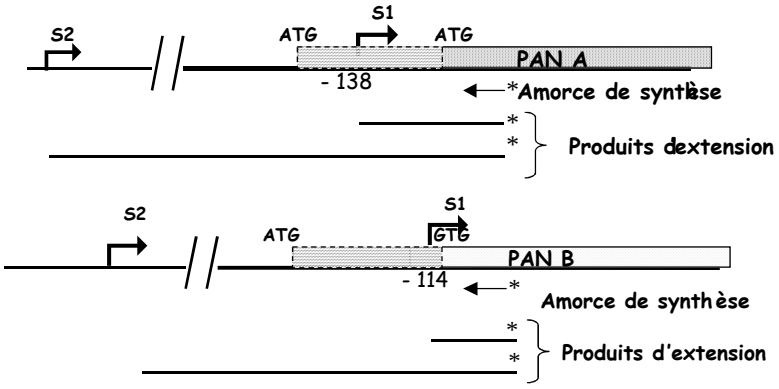
Dans le cas de PANB, la forme tronquée résulte de l'utilisation du codon initiateur GTG avec un ARN probablement « Leaderless » qui produit une protéine plus courte de 376 acides aminés de 41,379 Kda et d'un pI = 4,31 ce qui expliquerait aussi la différence observée sur gel.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

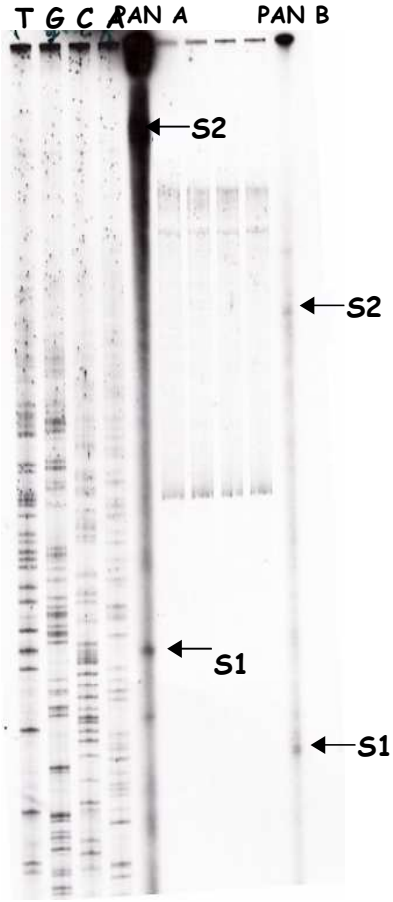
Figure 20: Cartographie de la région 5' des ARNm des PANs chez *Halobacterium salinarium* par extension d'amorce.

A: représentation schématique de la réaction d'extension d'amorce.
B : détection par autoradiographie des produits de la réaction d'extension d'amorce.
Les ARNm totaux extraits d'*Halobacterium* ont été hybridés contre un oligonucléotide marqué radioactivement avec le ^{32}P servant comme amorce pour la rétrotranscription de la région 5' UTR de l'ARNm des PANs.
La piste 1 représente le produit d'extension obtenu par la rétrotranscription de l'ARNm du *PAN A* par un oligonucléotide situé à 90 p.b. en aval du deuxième codon start. La piste 2 représente le produit d'extension de l'ARNm de PAN B. Sont représentées par des flèches les deux sites de transcription pour PAN A et pour PAN B S1 et S2.
À gauche se trouve une échelle de nucléotides obtenu par une réaction de séquençage par la méthode de Sanger de la région 5'UTR de PAN A.

A)



B)



tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

.

III.2 Discussion sur l'hétérogénéité N-terminale des protéines PANs

Nos résultats par immunodétection, et les expériences consécutives d'immunoprécipitation, et des gels bidimensionnels ont montré que les protéines PANs s'accumulent dans la cellule sous deux formes dont l'une est tronquée en N-terminale. Cette accumulation d'une forme tronquée peut avoir diverses origines : elle peut provenir de l'utilisation d'un deuxième site de transcription, d'un deuxième site de traduction ou d'une maturation post-traductionnelle. En absence des séquences N-terminales des protéines tronquées, nous ne pouvons pas nous prononcer d'une façon définitive pour l'un de ces mécanismes, quoique nos résultats par extension d'amorce pointent sur une utilisation de deux sites de transcription. Ceci n'exclut pas cependant les autres hypothèses comme l'utilisation alternée d'un deuxième site d'initiation de la traduction ou la maturation post-traductionnelle. L'utilisation alternée d'un deuxième site de traduction est une hypothèse confortée chez PAN A par le fait qu'on observe la même forme tronquée lorsqu'on exprime la protéine PAN A dans *E. coli*. (Ce qui n'est pas le cas de la protéine PAN B). Cette idée est renforcée par une autre étude faite sur PAN de *Méthanocaldococcus janaschii* ; lorsque la protéine PAN de *M. janaschii* est surexprimée dans *E. coli*, une deuxième forme tronquée apparaît qui résulte d'une utilisation alternée d'un deuxième site de Shine-Dalgarno (Wilson *et al*., 2000). À cette indication s'ajoute aussi le fait que les protéines ClpB et de ClpA membres de la famille des AAA+ sont exprimées sous deux formes *in vivo* résultant d'une utilisation alternée de deux sites de traduction (Maurizi *et al*., 2004).

Afin de pouvoir conclure sur les mécanismes responsables de la génération de cette deuxième forme tronquée, plusieurs expériences supplémentaires doivent être réalisées :

- Obtenir les séquences N-terminales des protéines tronquées. Nos expériences précédentes par immunoprécipitation et par le gel bidimensionnel se sont confrontées à la faible quantité des protéines. L'augmentation des quantités de protéines dans ces expériences permettrait le séquençage N-terminal.
- Il serait intéressant de faire des expériences de « pulse-chase » sur les protéines PANs afin de suivre la synthèse des deux isoformes des PANs. Ces expériences permettront de voir si la forme tronquée est générée avec un certain retard par rapport à la forme complète ou pas ce qui indiquerait un mécanisme de maturation post-traductionnelle.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

- exprimer hétérologuement les protéines PANs d'*Halobacterium* dans *Haloferax volcanii*. La génétique d'*Haloferax* est bien développée et il est facile de surexprimer les protéines contrairement à *Halobacterium.* L'expression hétérologue des PANs dans *Haloferax volcanii* permettra de vérifier si *Haloferax* est capable de synthétiser les deux formes de chaque PAN, et si c'est le cas d'introduire des mutations au niveau de la séquence Shine-Dalgarno et du deuxième codon initiateur et regarder si ces mutations affecteraient la synthèse de la forme tronquée des PANs.

Quelle est l'importance pour la cellule d'avoir deux versions de chaque PAN ? et en quoi consiste l'importance de cette régulation au niveau de la région N-terminale ?

Le rôle exact de la région N-terminale est encore très mal défini chez les AAA-ATPases en général. Les études structurales et biochimiques sur différents membres de la famille ont suggéré que les domaines N-terminaux constituent des domaines flexibles, distaux par rapport à l'axe de l'hexamère et localisés à l'extérieur de la surface de l'hexamère et qui joue un rôle important dans la liaison aux substrats. La région N-terminale porte aussi les sites de liaison des AAA+ à leurs adaptateurs (Dougan, 2002 ; Meyer, HH 2000). Comme les sous-unités régulatrices du protéasome, les PANs possèdent dans leur région N-terminale des motifs coiled-coil. Les coiled-coil représentent des motifs structuraux importants dans la fonction des chaperonnes, mais aussi dans toutes les liaisons protéine-protéine. Chez les rpt eucaryotes, les motifs coiled-coil sont supposés médier les interactions entre les différentes rpt (Richmond *et al.*, 1997 ; Wollenberg *et al.*, 2001). La région N-terminale de PAN pourrait donc influencer l'interaction des PANs avec les protéines substrats, la présence d'une forme tronquée de PAN influencerait l'interaction des PANs et la spécificité des substrats. La délétion de la région N-terminale en cas où il s'agirait d'un deuxième départ de traduction des PANs éliminerait une partie du motif coiled-coil pour PAN A (coiled-coil à 17-79 et en considérant le deuxième départ situé à + 36) et exposerait le motif coiled-coil pour PAN B. (coiled-coil 39-68 et en considérant le deuxième départ de traduction situé à + 38).

Dans le futur, il sera intéressant d'étudier l'effet de l'élimination du peptide N-terminal sur l'activité des protéines PANs *in vitro* et *in vivo*. Le comportement *in vivo* des différentes formes de PANs font l'objet du chapitre suivant. En ce qui concerne les propriétés *in vitro*, il serait intéressant de produire des protéines recombinantes qui sont tronquées dans leur région N-terminale et de regarder l'effet de la délétion N-terminale sur les différentes

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

propriétés du complexe telles : l'association, l'oligomérisation, l'activité chaperonne et l'activation de la protéolyse par le protéasome. Ces expériences devraient permettre de dire si la délétion en N-terminalcorrespond à une activation du système PAN ou à une modification des propriétés fonctionnelles du complexe. En ce qui concerne la signification physiologique du rôle du peptide N-terminal par rapport à la spécificité des complexes, seules les expériences *in vivo* pourraient apporter des réponses et en même temps permettre la détermination des substrats naturels spécifiques à PAN A et/ou PAN B.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Chapitre II : Oligomérisation et interaction des PANs

La capacité des protéines AAA+ à conduire des activités biologiques repose en grande partie sur leur capacité à s'oligomériser. La plupart de ces protéines forment des complexes en anneaux souvent sous forme hexamérique (Lupas *et al*., 2002). Ainsi la majorité des protéines AAA+, partenaires de complexes peptidasiques, s'associent à ce dernier sous forme hexamérique et stimule la dégradation ATP-dépendante des protéines (Pickart *et al*., 2004).
In vitro, la protéine PAN de *Méthanococcus janaschii* exprimée sous forme recombinante est capable de s'oligomériser en un grand complexe probablement un double hexamère en présence d'ATP (Zwickl *et al*., 1999). En absence d'ATP, PAN forme des agrégats insolubles (Benaroudj *et al*., 2000). PAN, sous sa forme oligomérique, est capable de stimuler la dégradation des protéines par le protéasome d'une manière ATP-dépendante (Zwickl *et al*., 1999). L'association de PAN au protéasome est suggérée, mais elle n'est pas réellement démontrée. Il est possible que cette association est transitoire et dynamique, ce qui a pour conséquence la difficulté de piéger des complexes PAN-protéasome associés (Forster *et al.*, 2005).

Quels sont les états d'oligomérisation et d'association des protéines PANs dans les cellules d'*Halobacterium* ? Est-ce que les deux PANs forment un seul complexe hétérooligomérique ou forment-ils deux complexes différents dans la cellule ? Est-ce que les protéines PANs sont capables d'interagir dans la cellule ? Sont-elles associées au protéasome d'une manière stable et labile ? Les protéines PAN modifiées en N-terminales présentent-elles les mêmes propriétés que la protéine native ?
Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé plusieurs approches. La première consistait à étudier l'oligomérisation des protéines PANs *in vitro* par la surexpression des protéines recombinantes dans *E. coli.* Nous avons tenté de purifier les protéines recombinantes dans le but de voir en premier lieu si chacun des deux PANs est capable de s'oligomériser *in vitro* et puis si les deux protéines sont capables d'interagir et de former un complexe en solution.
La deuxième approche est l'étude des protéines dans leur contexte cellulaire natif étant donné la facilité de cultiver ces archéobactéries. Nous avons ainsi étudié les PANs dans leur contexte natif en utilisant plusieurs méthodes: la première consistait à essayer de purifier le(s) complexe(s) PAN à partir des extraits totaux d'*Halobacterium* à travers les techniques conventionnelles de chromatographie et de purification utilisées dans le laboratoire, la deuxième consistait à étudier l'état *in cellulo* des différents complexes (oligomérisation,

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

association) en utilisant la séparation sur gradient de sucrose et enfin nous avons étudié les interactions entre les différentes protéines par immunoprécipitation.

I Etudes des PANs recombinantes *in vitro*

Les protéines PANs recombinantes ont été surexprimées dans *E. coli par* l'utilisation du système d'expression pET (matériels et méthodes). Leur purification s'est confrontée à plusieurs problèmes :

Le faible niveau d'expression : Plusieurs souches d'expression ont été testées afin d'améliorer le niveau d'expression, cependant les deux protéines PANs sont faiblement surexprimées et ne sont pas détectables sur un gel de bleu de coomassie. Nous avons utilisé une souche BL21 Top 10F (Invitrogen) qui a permis une bonne expression des protéines recombinantes, et qui faciliterait la purification de ces protéines à partir *d'E. coli*.

La solubilité des protéines PANs : Les deux PANs ne sont pas solubles en conditions de basse salinité, ceci reflète probablement leur caractère halophile qui est indiqué par leur point isoélectrique très bas. L'utilisation des tampons contenant de fortes concentrations de sel n'a pas permis non plus de solubiliser les protéines PANs recombinantes . L'utilisation d'un tampon contenant de fortes concentrations de sel combiné à l'utilisation du détergent (Triton-X100) a permis la récupération des protéines recombinantes dans le surnageant.

Les méthodes de purification standards utilisées pour la purification des protéines halophiles telles la précipitation différentielle en sulfate d'ammonium n'étaient pas très efficaces pour la purification des protéines PANs. Les protéines PANs se trouvent avec la majorité des protéines d'*E. coli* après précipitation en ammonium sulfate. Nous avons testé plusieurs concentrations d'ammonium sulfate, et nous avons trouvé que PAN peut être solubilisé à 1.5 M concentration en ammonium sulfate. Diverses stratégies pour la purification des protéines halophiles (détaillées dans Matériels et Méthodes) ont été utilisées. Dans la majorité des cas, les protéines ne s'accrochaient pas sur les colonnes utilisées ou présentaient un profil d'élution non résolutif. Pour pouvoir purifier les protéines recombinantes, il faudra utiliser une autre méthode de purification. Le plus simple serait l'étiquetage des protéines par la GST ou par des étiquettes Histidines qui permettrait une purification plus rapide et plus efficace des deux protéines en conditions agrégées ou dénaturées suivies d'essai de renaturation.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II Tentatives de purification du (des) complexe(s) PANs à partir des extraits d'*Halobacterium*

Nous avons procédé en utilisant les techniques de purification des protéines halophiles déjà développées au laboratoire à la purification des PANs à partir des extraits totaux d'*Halobacterium*. La purification des protéines halophiles est particulièrement délicate car ces protéines se déplient lorsque la concentration en sel diminue. (Pour plus de détails sur les différentes étapes de purification, voir matériels et méthodes).

Après deux étapes de centrifugation, une colonne d'interaction hydrophobe et une colonne échangeuse d'ions et une colonne d'hydroxylapatite, les deux protéines PANs ne sont toujours pas identifiables en gel SDS-PAGE 1D coloré (Figure 21A). Au cours de ces purifications, la forme courte des protéines PANs s'est révélée très instable et nous détectons très faiblement ou pas du tout sa présence au bout de la troisième étape de purification (Figure 21B). Nous avons procédé à une chromatographie sur gel filtration pour pouvoir accéder à des informations concernant le degré d'oligomérisation des deux PANs partiellement purifiés. Les fractions de la colonne d'hydroxylapatite contenant les protéines PANs ont été dialysées contre un tampon contenant 3M KCL avant d'être résolues sur colonne HPLC de type G3000 (figure 21 C). La colonne a été calibrée avec les complexes halophiles déjà purifiés au laboratoire et dont la masse moléculaire est déjà connue : la malate déshydrogénase halophile 130 kda, Le complexe TET halophile (500 Kda) et le protéasome (750 kda). Les résultats en chromatographie sur gel filtration ont montré que les protéines PANs sont oligomériques et qu'ils sont élués dans les fractions 14 et 15 de la colonne. Ces fractions correspondent aux fractions entre la malate déshydrogénase et le complexe TET, ce qui suggère que les protéines PANs possèdent la capacité de s'oligomériser. Cependant les résultats ne permettent pas de dire si les protéines PANs forment un seul complexe ou deux complexes différents et nécessitent des études biophysiques beaucoup plus approfondies. Les protéines PANs présentent apparement les mêmes caractéristiques physico-chimiques et elles se comportent pratiquement de la même façon au cours de toutes les purifications.

Nos études ont montré que les formes courtes des PANs sont très instables, et elles sont perdues au cours des purifications, probablement car les étapes de purification sont très longues et les échantillons sont gardés sur plusieurs jours.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

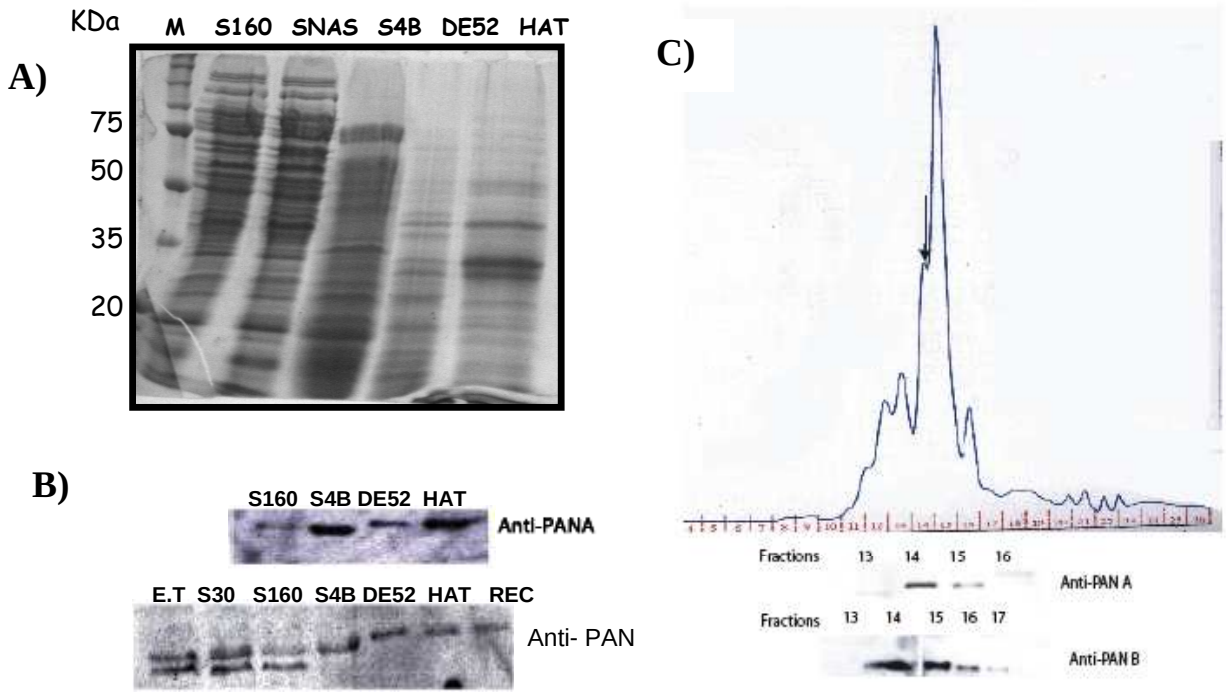


Figure 21 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PAN.

A) Gel récapitulatif coloré au bleu de coomassie résumant les différentes étapes de la purification.
B) Immunodétection des différentes étapes de purification.
C) Chromatographie sur gel filtration du complexe PAN partiellement purifié et immunodétection des différentes fractions issues de la colonne.

S30 : surnageant après centrifugation à 30000g. S160 : Surnageant après ultracentrifugation à 160 000 g. S4B : fractions d'élution des PANs groupées après colonne d'interaction hydrophobe. DE52 : fractions groupées après la colonne échangeuse d'ions. HAT : fractions groupées après la colonne d'hydroxylapatite.

Nous avons pu conclure après ces différentes étapes de purification que les protéines PANs n'étaient pas très abondantes dans les extraits protéiques d'*Halobacterium* à la différence du protéasome par exemple qui constitue 1 à 2 % des extraits protéiques totaux d'*Halobacterium*.

Nous nous sommes rendus compte que la purification des protéines PANs nécessite une stratégie différente, cependant la particularité des protéines halophiles nous limite dans le type des matrices de chromatographie qu'on peut choisir pour la purification du complexe. Nous avons donc essayé d'adopter la même stratégie que celle utilisée pour purifier le protéasome 20 S *d'Haloarcula marismortui* (Franzetti *et al*., 2002). La stratégie consiste à

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

faire une précipitation différentielle au PolyEthylène Gycol suivie d'un chauffage des extraits protéiques. C'est une stratégie rapide et très efficace pour la purification du protéasome 20S. Cependant, la stratégie de la purification s'est avérée inutile car les protéines PANs tombaient dans le culot avec la majorité des autres protéines après chauffage des extraits. Ceci est dû probablement à la nature « chaperone-like » de PAN qui a tendance à s'associer aux protéines en voie de dénaturation pour empêcher la formation des agrégats.

Les tentatives de purification ont fourni quelques renseignements sur l'oligomérisation des PANs cependant elles ne permettent pas de dire si les deux PANs peuvent interagir ensemble pour former un seul complexe. De plus, du fait de l'instabilité des formes tronquées, on ne sait pas si celles-ci sont incorporées au niveau du complexe.

Nous avons utilisé alors une méthode plus directe qui préserverait la nature de l'échantillon, Pour cela, nous avons fractionné des extraits cellulaires totaux et analysées les extraits par utltracentrifugation sur gradient de sucrose.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III Oligomérisation et interaction des PANs *in vivo*

Pour étudier l'état d'oligomérisation des PANs dans un contexte cellulaire, nous avons eu recours au fractionnement sur gradient de sucrose.

Deux types d'expériences ont été mis au point :

La première vise à obtenir des informations concernant la localisation cellulaire et l'état d'association des PANs à des complexes supramoléculaires *in vivo* en optant pour une lyse osmotique douce qui préserve les interactions au sein de l'échantillon.

La deuxième expérience vise à obtenir des informations concernant uniquement l'état d'oligomérisation. Dans ce protocole, la lyse est plus violente (ultrasons) et les extraits sont clarifiés par une ou deux étapes de centrifugation .

III.1 Localisation cellulaire des PANs dans les cellules

Afin d'étudier la localisation cellulaire des PANs (membranaire, associés aux polyribosomes ou associés à des complexes lourds), les suspensions cellulaires sont lysées doucement par dialyse contre un tampon contenant de fortes concentrations de sel (3,4 M KCl) et de magnésium (60 –100 mM) qui va préserver les interactions au sein de l'échantillon. Après homogénéisation, le lysat est déposé au sommet d'un gradient de sucrose de 7-30%, la présence des PANs dans les différentes fractions est détectée par « Western Blot ».

Les résultats du fractionnement du gradient de sucrose ont montré clairement une localisation différente de PAN A et de PAN B dans les extraits cellulaires (Figure 22). En effet, pour PAN A, on constate que, dans les extraits bruts, la protéine est essentiellement retrouvée dans les fractions « lourdes ». Ce qui traduit une association de PAN A avec des complexes de haut poids moléculaires. La même expérience a été réalisée en présence de triton, un détergent qui rompt les liaisons avec les composés lipidiques. Cette fois l'ensemble de PAN A est réparti dans les fractions légères. *In cellulo*, PAN A est donc associé à des complexes sensibles au triton, probablement des membranes. Mais éventuellement au protéasome dont la liaison pressentie avec les protéines PAN peut être également sensible au triton (en effet le triton a déjà été décrit comme pouvant déstabiliser les interactions protéines /protéines). On constate également une différence de comportement entre les deux isoformes avec l'isoforme courte majoritairement dans les fractions légères. La forme « longue » semble interagir avec au

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

moins deux complexes différents, on observe en effet deux maxima, l'un dans la fraction 11 et l'autre dans la fraction 15. Ce qui n'est pas le cas pour l'isoforme « court » qui ne présente qu'un seul maximum dans la fraction 11. La fraction 11 pourrait elle correspondre à l'association PAN /protéasome Pour PAN B, on observe une distribution de la protéine majoritairement dans la fraction légère non associée en absence ou en présence de triton. Cette différence flagrante entre PAN A et PAN B témoigne d'un comportement et donc d'un rôle probablement différent au sein de la cellule.

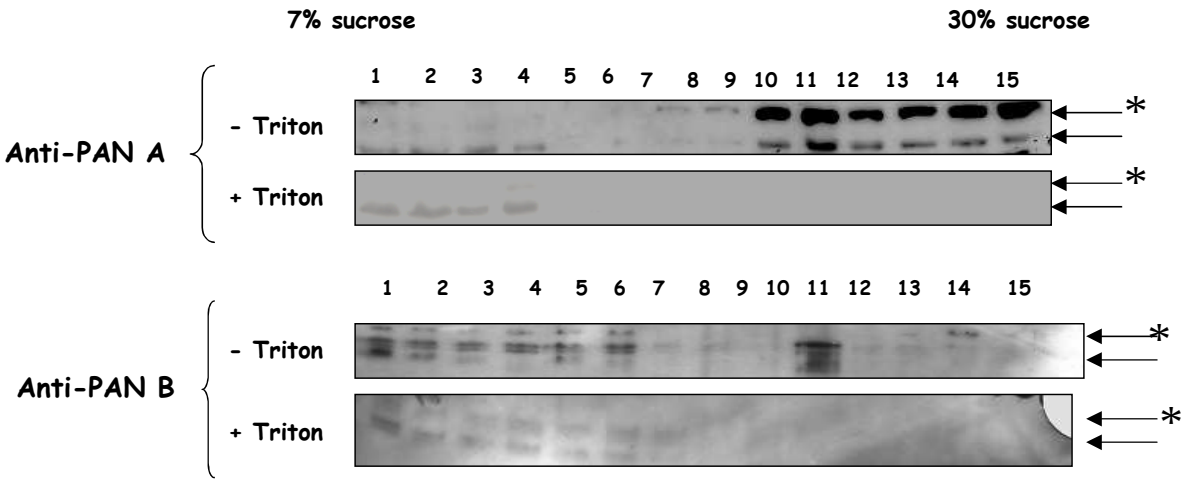


Figure 22 : Localisation cellulaire des PANs *d'Halobacterium salinarium*.

Les cellules d'*Halobacterium* ont subi une lyse douce par dialyse contre un tampon froid contenant de fortes concentrations de sel et de Magnésium en présence ou en absence de triton. Le lysat a été déposé ensuite sur un gradient de sucrose 7-30% afin de déterminer la localisation cellulaire des PANs.
La présence des PANs dans les différentes fractions a été détectée par immunodétection.
Note : la fraction 11 dans l'immunodétection PAN B correspond à un extrait d'*E. coli* surexprimant PAN B dans sa forme entière déposé comme contrôle positif permettant la détection de la forme longue.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.2 Etat d'oligomérisation des PANs et association au protéasome

Pour regarder l'état d'oligomérisaton des PANs et leur association potentielle au protéasome et à d'autres complexes, nous avons utilisé un gradient de sucrose continu de 7 à 30% de sucrose. Les cellules ont été resuspendues dans un tampon de lyse hypersalin (3,4 M KCl), et deux étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation ont été utilisées pour éliminer les débris cellulaires et les membranes.

Afin d'avoir des renseignements sur la taille des complexes de PANs, nous avons précalibré le gradient avec du protéasome 20S purifié (760 Kda) qui sédimente à peu près au milieu du gradient (fraction 7 majoritaire) dans les conditions expérimentales choisies.La position d'autres protéines d'*Halobacterium salinarium* a été révélée par immunodétection. Nous avons utilisé des anticorps anti malate et des anticorps anti - TET qui corespondent à des complexes de poids moléculaire 130 Kda et 500 Kda respectivement (Résultats non présentés).

La figure 23 montre que PAN A et B sédimentent majoritairement dans les fractions de bas poids moléculaires. Dans la cellule, les protéines PAN sont donc essentiellement sous forme non hexamérique, et non associées de façon stable avec le protéasome. Il existe une différence de comportement en ce qui concerne la forme courte des deux protéines. Pour PAN A et pour B l'isoforme « long » donne un signal maximal dans la fraction 3 ce qui correspond à une forme di ou trimérique Dans le cas de PAN B, une partie de la forme « courte » sédimente plus loin dans le gradient. Elle présente deux maxima l'un dans la fraction 1, correspondant probablement à une molécule monomérique, et un deuxième dans la fraction 5 qui d'après notre calibration pourrait être la forme hexamèrique de 270 KDa. Or c'est sous cette forme que les protéines PAN joueraient leur rôle activateur sur la protéolyse protéasome dépendante. Pour PAN A les isoformes n'ont pas la capacité de s'oligomèriser en hexamère. On trouve un signal maximum dans la fraction 3 (isoforme « long ») et 4 (Isoforme « court »). Il est important de noter qu'on ne retrouve pas d'association avec le protéasome pour PAN A et B dans les extraits solubles (pas de signal maximum dans la fraction 7 /8), ce qui indique que les protéines PAN interagiraient avec le protéasome de façon dynamique via des liaisons faibles et donc labiles.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

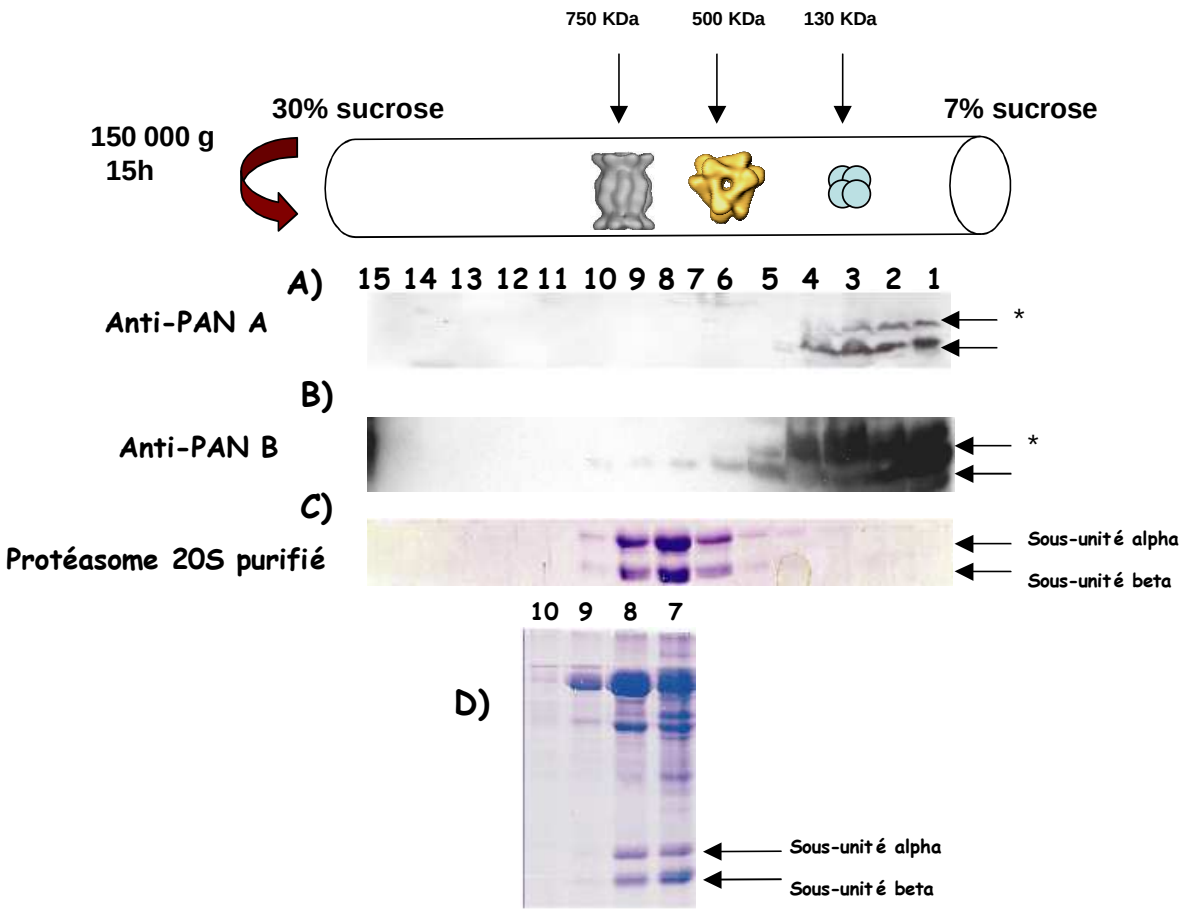


Figure 23 : Etude d'oligomérisation des protéines PANs sur un gradient de sucrose de 7-30%.

Les extraits protéiques totaux d'*Halobacterium* ont été partiellement purifiés par ultracentrifugation, et le surnageant a été ensuite déposé au sommet d'un gradient de sucrose de 7-30%. Le gradient a été calibré par le protéasome 20S halophile, et le complexe TET halophile (500 Kda) et le complexe malate désyhdrogénase 130 Kda. Les différents gradients ont été fractionnés et les 15 fractions du gradient ont été soit analysées sur gel pour la visualisation des protéines par coloration au Coomassie Blue, soit par Western Blot pour l'immunodétection des protéines PANs.
A : Immunodétection de PAN A dans les fractions du gradient
B : Immunodétection de PAN B dans les fractions du gradient.
C : Calibration du gradient avec le protéasome 20S halophile
D : Détection des fractions 7,8,9,10 sur un gel après coloration du bleu de coomassie montrant la présence des sous-unités du protéasome 20S.
Les deux formes des protéines PANs sont indiquées par des flèches, la protéine entière est désignée par une astérique.

La plupart des protéines AAA+ nécessitent pour leur oligomérisation et leur interaction avec leurs partenaires protéolytiques de l'ATP, nous avons donc pensé qu'une augmentation de la concentration de l'ATP dans les extraits cellulaires avant leur dépôt sur le gradient

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

permettrait une récupération d'une partie des PANs sous forme oligomérique libre ou associée avec le protéasome dans un complexe supramoléculaire.

Les résultats préliminaires de notre travail ont effectivement montré une distribution différente des PANs dans les extraits pré-incubées avec de l'ATP, les deux PANs A et B sédimentent dans la fraction 15 « lourde » après dépôt des extraits sur un gradient de sucrose. Ce décalage des PANs dans les fractions possédant un haut coefficient de sédimentation suggère une association des PANs avec le protéasome après addition de l'ATP aux extraits cellulaires. Il serait donc intéressant de reprendre les mêmes expériences et de vérifier la distribution du protéasome et de son activité le long du gradient ainsi que les protéines PANs avant et après l'addition de l'ATP.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.3 Les PANs sont capables d'interagir pour former un complexe hétérooligomérique

Dans le but de déterminer si les PANs sont capables d'interagir *in vivo* pour former un complexe hétérooligomérique, nous avons décidé de réaliser des expériences d'immunoprécipitation.

Pour ce type d'expérience, il était nécessaire de déterminer les concentrations protéiques de l'échantillon et les concentrations de sel permettant à la fois de préserver les interactions au sein de l'échantillon, et la solubilité des protéines halophiles, tout en gardant une spécificité de la réaction anticorps-antigène.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'immunoprécipiter spécifiquement PAN A et PAN B jusqu'à une concentration saline de 2,5 M KCl dans le tampon de réaction (Figure 24 A). On obtient un optimum d'efficacité dans 1,5 M KCl. Ces conditions correspondent à un environnement « natif » pour les protéines et complexes halophiles (la concentration saline intracellulaire dépasse les 3 M KCl). Dans ces conditions hyposalines, la réaction d'immunoprécipitation demeure très spécifique comme le montre l'absence de signal non spécifique (résultats non présentés) quand on utilise d'autres anticorps dirigés contre d'autres protéines halophiles (TET, la malate déshydrogénase, la catalase peroxydase, …). Lorsque la réaction d'immunoprécipitation avec l'anticorps PAN B est conduite dans des conditions natives (> 1,5 M KCL), nous détectons la présence de PAN A dans l'immunoprécipité. Cependant la réaction est faible dans le sens inverse, la présence de PAN B est faiblement détectée par une réaction d'immunoprécipitation par l'anticorps PAN A.

Ces expériences montrent que PAN A et PAN B interagissent ensemble et uniquement en conditions natives dans les extraits cellulaires d'*Halobacterium salinarium* (Figure 24B).

Dans ces expériences d'immunoprécipitation, nous n'avons pas pu détecter les « isoformes » courtes des deux protéines PANs, contrairement aux expériences d'immunoprécipitation décrites dans le chapitre précédent dans lesquelles nous avons pu immunoprécipiter l'isoforme courte des deux PANs comme l'ont montré les résultats de spectrométrie de masse. Il est possible que dans les conditions de basse salinité (dénaturantes pour les protéines halophiles), on bloque le mécanisme responsable de la disparition des isoformes courtes dans les extraits cellulaires (Voir le chapitre sur les essais de purification des complexes PANs).

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

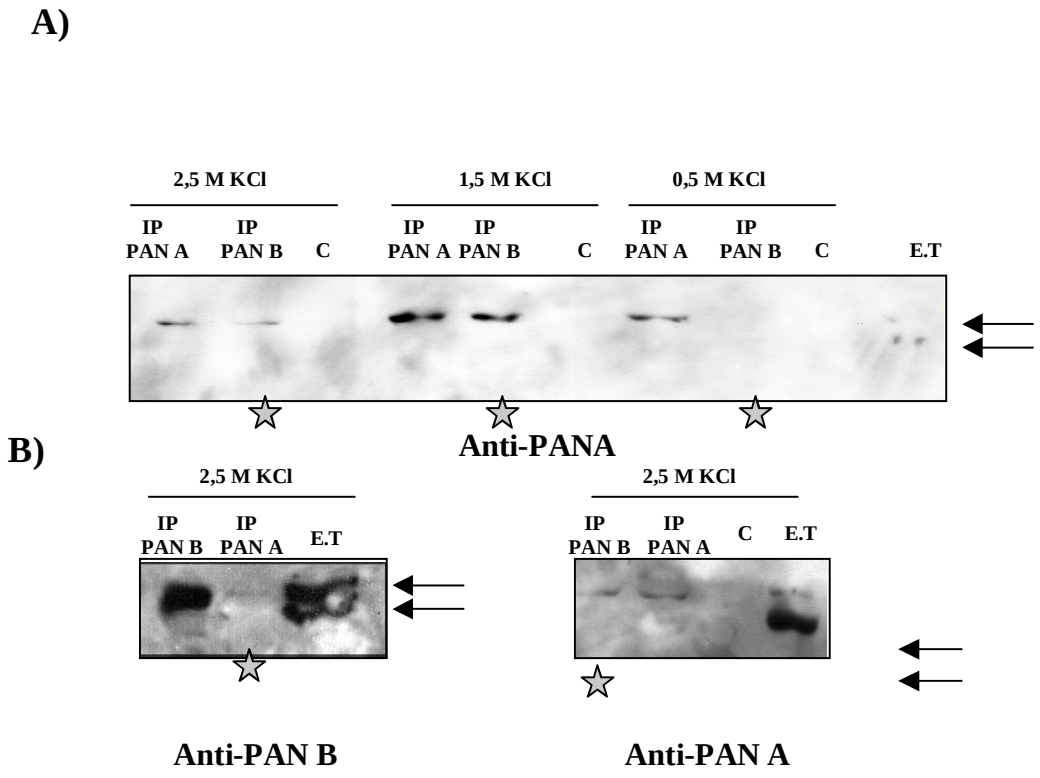


Figure 24: Co-immunoprécipitation des protéines PAN A et PANB.

A)Mise au point de l'immunoprécipitation à de différentes concentrations en sel. B) co-immunoprécipitation des protéines PAN A et PAN B. Les extraits protéiques totaux d'*Halobacterium salinarium* ont été incubés en présence de l'anticorps PAN A ou de l'anticorps PAN B. Le complexe précipité a été ensuite analysé par immunodétection pour la présence de la protéine PAN A ou la protéine PAN B en utilisant le Kit « TrueBLot ». E.T : extraits protéiques totaux d'*Halobacterium salinarium*. C : contrôle. Les protéines PAN A et PAN B co-immunoprécipitées sont indiquées par une étoile.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

III.4 Discusssion sur l'oligomérisation et l'interaction des PANs

Il est intéressant de souligner que nos expériences montrent que les formes entières « full-length » des deux PANs sont capables de s'oligomériser. Les complexes oligomériques de bas poids moléculaire détectés dans nos expériences de fractionnement cellulaire sur un gradient de sucrose correspondent à des hétérooligomères PAN A/PANB. En conséquence, il est vraisemblable que l'activation du protéasome 20 S par le complexe PAN *d'Halobacterium salinarium* se fasse via un hexamère hétérooligomérique labile. Ceci suggère que l'absence du peptide N-terminal ne constitue pas un mécanisme d'activation des PANs qui induit leur oligomérisation. Il s'agit plus vraisemblablement d'un « état alternatif » des PANs destiné à modifier leurs propriétés de liaison aux substrats.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

CHAPITRE III : ROLE CELLULAIRE DES PANS

Le rôle cellulaire des PANs n'est pas encore bien compris en particulier on ne sait pas si en l'absence du système ubiquitine et de complexe de type 19S, ils jouent un rôle de régulateur dans la protéolyse et ou dans le contrôle de repliement des protéines. La plupart des études portaient sur les caractéristiques biochimiques de la protéine recombinante. *In vitro* PAN est capable de stimuler la dégradation des protéines par le protéasome (Zwickl *et al*.,1999). PAN agit également comme une chaperonne moléculaire capable de solubiliser les agrégats (Benaroudj *et al*., 2000).

Nous étions donc intéressés à comprendre le rôle physiologique des PANs et en particulier leur participation au système de contrôle de qualité des protéines. De plus, la présence de deux PANs chez *Halobacterium salinarium* pose la problématique sur la régulation de l'expression de ces deux protéines. Les deux protéines partagent une similarité significative (plus de 60 %), elles diffèrent essentiellement au niveau de leurs régions N-terminales et C-terminales, ce qui suggère que les protéines peuvent remplir des fonctions non redondantes dans la cellule.

Nous avons effectué une étude d'expression des PANs et du protéasome au cours de la croissance et dans des situations environnementales du stress. Nous avons suivi les modifications d'accumulation des ARNm et des protéines. En parallèle à notre étude d'expression, nous avons initié un projet de délétions de gènes PANs et protéasome (Knock-out) qui n'a pas abouti suite à des problèmes de clonage.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I Co- Régulation des PANs au cours de la croissance

I.1 Introduction

Toutes les bactéries possèdent la capacité de se multiplier et de se diviser. Ce phénomène résulte en une augmentation du nombre de cellules ce qu'on appelle croissance cellulaire. La croissance cellulaire ou accroissement ordonné des composants de la bactérie nécessite la mise en place de nombreuses réactions de synthèses de macromolécules dans la cellule notamment la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. Dans un système clos, les bactéries se divisent activement lorsqu'elles sont transférées dans un nouveau milieu. Elles présentent alors une courbe de croissance avec quatre phases typiques : une phase de latence au cours de laquelle la bactérie synthétise les enzymes adaptées au nouveau milieu ; une phase exponentielle où les cellules sont en division active, le nombre de cellules bactériennes est doublé résultant en une fonction exponentielle de la croissance ; une phase stationnaire où les cellules arrêtent de se diviser et se trouvent en état de privation des nutriments et une phase de déclin où les cellules commencent à mourir par lyse bactérienne.

Le passage d'une phase de croissance à l'autre s'accompagne par de grands changements au niveau de l'expression des gènes (Gottesman, 1992). La protéolyse cellulaire intervient dans de nombreux processus régulateurs permettant le bon déroulement de la croissance cellulaire notamment la phase stationnaire qui constitue une phase stressante pour les cellules à cause de leur privation en nutriments (Gottesman, 2003). Chez les bactéries, le niveau protéique de nombreuses protéines régulatrices est ajusté par la protéolyse cellulaire, Ainsi Chez *E. coli*, les niveaux du régulateur de la division SulA et du régulateur de la synthèse de la capsule RcsA sont contrôlés par la protéolyse (Mizusawa *et al.*, 1983 ; Torres – Cabassa *et al.*, 1987). Durant la phase stationnaire, la protéolyse assure la génération des acides aminés nécessaires à cause de la privation du milieu extérieur en nutriments, elle intervient également dans la dégradation de nombreuses enzymes dont le niveau est affecté par l'entrée en phase stationnaire (Weichart *et al.*, 2003).

Chez les eucaryotes inférieurs et en particulier chez *Saccaromyces cerivisiae*, le protéasome joue un rôle important à la fois dans les cellules en phase exponentielle et en phase stationnaire. Le protéasome contrôle la dégradation de nombreuses protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Kirshner *et al*., 1999). La fonction exacte du protéasome et de son complexe régulateur 19 S en phase stationnaire n'est pas encore bien comprise. Alors que les cellules qui sont défectueuses dans la synthèse du protéasome (*ump-/-)* sont incapables d'entrer correctement en phase stationnaire (Fujimoro *et al*., 1998), des études assez récentes

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

montrent que le protéasome 26S se désassemble en un complexe 20S et 19S lorsque les cellules entrent en phase stationnaire et qui s'accompagne par une chute de la protéolyse protéasome-dépendante, les auteurs suggèrent un mécanisme de contrôle de l'activité du protéasome en phase stationnaire via le désassemblage du protéasome 26S en deux complexes : le 20S qui aurait alors un rôle limité à la dégradation des peptides, et le complexe 19S qui pourrait participer au système de contrôle de qualité des protéines (Bajorek et al, 2003).

Nous étions intéressés à comprendre le rôle que peuvent jouer les deux protéines PANs au cours de la croissance chez *Halobacterium salinarium*. La présence de deux PANs qui diffèrent par leurs extrémités N-terminale et C-terminale posait la question du rôle respectif de ces PANs au cours de la croissance. Il était donc intéressant de voir si les PANs sont co-régulés au cours de la croissance ou s'ils sont différentiellement régulés. La régulation des PANs par rapport aux sous-unités du protéasome était particulièrement intéressante afin de regarder si les différentes protéines sont co-régulées par les mêmes mécanismes dans la cellule. Nous nous sommes intéressés à la sous-unité alpha car elle constitue le partenaire potentiel des protéines PANs. Nous avons donc suivi le changement du niveau d'expression des PANs et de la sous-unité alpha du protéasome au cours des différentes phases de la croissance.

I.2 Etude d'expression des PANs au cours de la croissance

Afin d'étudier le rôle des PANs au cours de la croissance chez *Halobacterium salinarium,* les cellules ont été transférées dans un nouveau milieu et différents points de la croissance correspondant à divers stades de la croissance ont été aliquotés afin de les analyser au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Halobacterium salinarium montre une courbe de croissance typique des bactéries avec une phase de latence rapide, une phase exponentielle dans laquelle le nombre de cellules augmente d'une façon exponentielle et une phase stationnaire où les cellules arrêtent de se diviser. Le temps de génération d'*Halobacterium salinarium* est de 10 heures comme le montre la figure 25.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

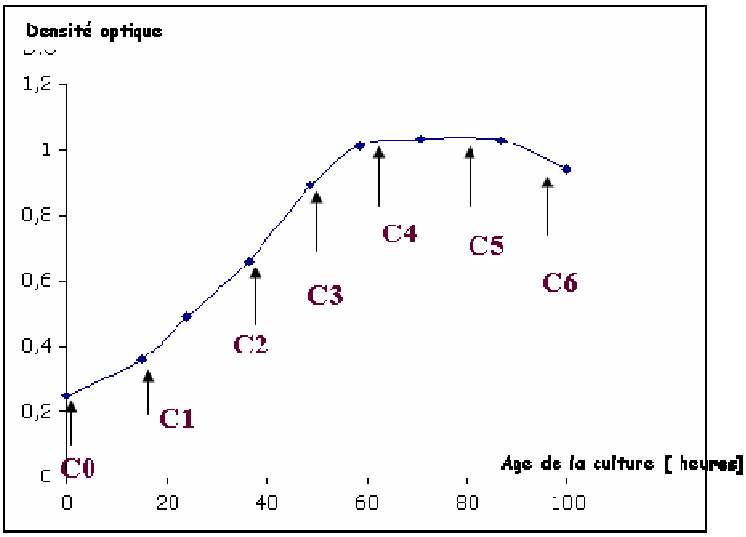


Figure 25 : Courbe de croissance typique d'*Halobacterium salinarium*.
Halobacterium salinarium présente une courbe de croissance typique avec un temps de génération relativement long de l'ordre de 10 heures. La phase de latence est très courte, la phase exponentielle dure environ 40 heures, et une phase stationnaire avant que les cellules ne commencent à mourir.

I.2.1 Régulation au niveau transcriptionnel

Les ARNm accumulés dans les cellules des différentes phases de la croissance ont été extraits, et les variations des transcrits *PANA*, *PANB* et celui de la sous-unité alpha du protéasome (psmA) ont été détectés par autoradiographie par des sondes ARN « anti-sens » dirigés contre les ARNm de *PAN A* et *PANB* et la sous-unité alpha du protéasome. Au cours de la croissance, les ARNm de PAN A, PAN B et la sous-unité alpha (psmA) sont détectés sous forme d'ARNm monocistroniques dont la taille correspond à celle prédite pour les gènes *PAN A* (1218 p.b), *PAN B* (1236 p.b) et le gène *psmA* (732 p.b).

Les résultats par Northern Blot (Figure 26) ont montré une accumulation des ARNm très similaire pour les deux PANs. En effet, le niveau des transcrits augmente d'une façon significative dès l'entrée des cellules en phase exponentielle, atteint son maximum au milieu de la phase exponentielle, puis décroît remarquablement à la phase de transition entre la phase

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

exponentielle et la phase stationnaire. Quand les cellules rentrent en phase stationnaire, une nouvelle augmentation des niveaux des transcrits *PAN A* et *PAN B* est observée.

Quant à la sous-unité alpha du protéasome, les résultats du « Northern blot » ont montré que les niveaux étaient plus ou moins constants tout au long de la croissance avec une légère diminution au milieu de la phase exponentielle, et une diminution de ces niveaux quand les cellules sont en fin de phase stationnaire. Les variations de la sous-unité alpha du protéasome ne corrélaient pas avec les mêmes variations observées dans le cas des PANs.

Nos résultats montrent que le niveau des transcrits des PANs est régulé. Deux niveaux de régulation ont été observés : une première régulation dès l'entrée des cellules en phase exponentielle, une deuxième régulation dès l'entrée des cellules en phase stationnaire. Quant à la sous-unité alpha du protéasome ; les variations du niveau des transcrits sont observées uniquement en fin de phase stationnaire.

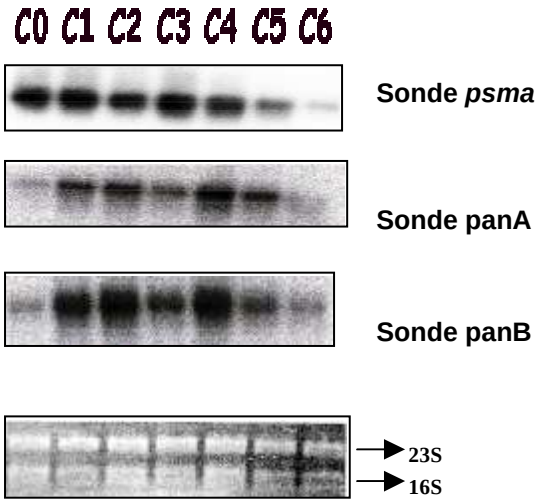


Figure 26: Variation des transcrits PAN A et PAN B et celle de la sous-unité alpha du protéasome au cours de la croissance.
Des cellules ont été prélevées à différents temps de croissance qui sont indiqués par une flèche sur la courbe, et les ARNm de ces points sont extraits et sont séparés sur un gel d'agarose – formaldéhyde et transférés sur membrane de nitrocellulose. Le dépôt des échantillons est vérifié par les ARN ribosomiques 23S et 16S suite à une coloration du gel au bromure d'éthidium (panneau du bas). Les différents transcrits sont ensuite détectés par les sondes ARN anti-sens synthétisées *in vitro* et marqués radioactivement au ^{32}P. Les transcrits sont ensuite détectés par autoradiographie.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I.2.2 Régulation au niveau protéique

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier si la régulation au niveau transcriptionnelle se reflète au niveau protéique. Nous étions aussi intéressés à suivre les variations des isoformes des PANs au cours de la croissance. Les échantillons de cellules utilisées pour les analyses en Northern Blot ont été analysés par immunodétection. Nous avons uniquement pu suivre le changement des niveaux des protéines PAN A et PAN B car nous n'avons pas pu obtenir un anti-protéasome de qualité. Les anticorps dirigés contre les sous-unités du protéasome donnaient un signal très faible et non exploitable même après des essais de purification de l'anticorps.

Les résultats de l'immunodétection des PANs A et des PANs B (Figure 27) montrent que le niveau des protéines des PANs variait au cours de la croissance. En effet, une variation est observée lorsque les cellules entrent au début de la phase exponentielle, les niveaux protéiques diminuent légèrement à la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, une autre petite augmentation est ensuite observée lorsque les cellules entrent en phase stationnaire. Les deux isoformes de chaque protéine variaient d'une façon très similaire au cours de la croissance. La régulation des niveaux de protéines PANs corrèle avec les variations observées au niveau des ARN messagers, Cependant la variation des protéines n'est pas aussi marquante que celles observées au niveau de l'ARNm. Ce qui suggère que la régulation des gènes PANs se fait essentiellement au niveau de la transcription, et que la demie-vie des protéines PANs *in cellulo* est relativement longue ce qui explique que les variations constatées au niveau des ARNm se réflètent avec une moindre ampleur au niveau protéique.

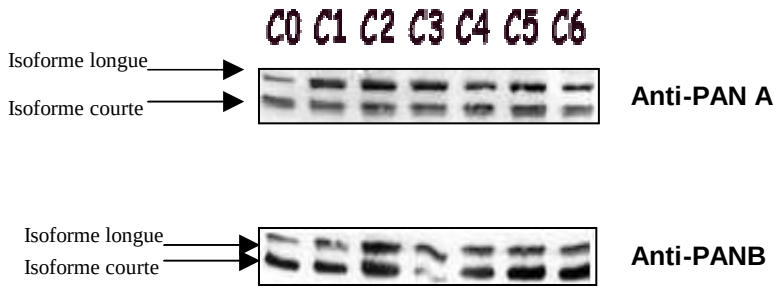


Figure 27 : Variation des niveaux protéiques de PAN A et de PAN B au cours de la croissance.

Les extraits protéiques totaux de différentes phases de la croissance ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 12%. La présence des protéines PANs ainsi que leurs isoformes est ensuite détectée par des anticorps spécifiques dirigés contre PANA et PAN B. Les échantillons prélevés sont indiqués par une flèche sur la courbe.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

I.3 Signification physiologique de la co-régulation des PANs en fonction de la croissance

Lorsque les cellules rentrent en phase exponentielle, elles se divisent activement, et beaucoup de processus biochimiques importants se mettent en route telle la réplication de l'ADN, et la synthèse protéique. La régulation positive observée pour les transcrits des *PANs* à ce niveau peut contribuer au bon fonctionnement de ces processus dans la cellule dans le contrôle de la demie-vie des protéines régulatrices, mais aussi dans la participation au système de contrôle de qualité des protéines néosynthétisées dans la cellule. Durant la phase exponentielle, un grand nombre de protéines néosynthétisées sont défectueuses et nécessitent pour leur élimination l'action concertée des chaperonnes et des protéases dans la cellule.
Les PANs sont aussi régulés positivement dès l'entrée des cellules en phase stationnaire, ce qui implique une importance des PANs dans l'adaptation des cellules à la phase stationnaire : une phase de stress pour la cellule. Il serait donc intéressant d'essayer de déterminer les partenaires des PANs au cours des différentes phases de la croissance. L'approche par immunoprécipitation couplée à la protéomique déjà développée et bien mise au point pourrait constituer une bonne méthode afin de déterminer les partenaires potentiels de PANs selon les différentes phases de la croissance.

La co-régulation des deux PANs au cours de la croissance indique que les deux protéines puissent s'assembler en un seul complexe hétérooligomérique dans la cellule. Les résultats des expériences d'immunoprécipitation vont dans ce sens car elles montrent que les PANs sont capables d'interagir ensemble.

Les variations de la sous-unité alpha du protéasome au cours de la croissance montrent que les sous-unités du protéasome ne sont pas sujettes au même type de régulation que les protéines PANs. Nous ne savons pas comment la régulation des sous-unités alpha au niveau transcriptionnel se réflète au niveau protéique, ni si cette régulation a un effet sur l'activité du protéasome. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité du protéasome au cours de la croissance.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II Régulation des PANs en fonction du stress

II.1 Introduction

La survie des microorganismes dépend en grande partie de leur capacité à surmonter rapidement les changements dans leur environnement. La cause, ou l'élément stressant peut être de plusieurs types, par exemple physique (élévation de teméprature) ou chimique (augmentation ou diminution du pH, salinité ou concentration en oxygène) (Hall *et al.*, 1995 ; Watson, 1990). Une des composantes clés du stress est la dénaturation des protéines (Parsell& Lindquist,1993). Certaines protéines perdent en effet leur configuration native, fonctionnelle, et ont tendance à s'agréger. Les cellules répondent à un stress par l'induction de la synthèse d'un groupe de protéines, appelées de ce fait, protéines de stress (Georgopoulos *et al.*, 1994 ; Hecker *et al.*, 1996 ; Morimoto, 1998, Macario *et al.*, 1997). La concentration de ces protéines dans la cellule va augmenter, protégeant ainsi la cellule des effets destructeurs engendrés. Ces produits vont favoriser la remise en état de la cellule permettant ainsi la renaturation des protéines partiellement dénaturées. (Parsell& Lindquist, 1993). Les protéines de stress sont souvent appelées « heat shock » ou Hsps dans la littérature pour des raisons historiques. Les Hsp ont été observées pour la première fois chez la drosophile exposée à une température supérieure à son optimum de croissance (Ritossa, 1962).

La participation du protéasome ou de ses complexes régulateurs au système de contrôle des protéines n'est pas encore élucidée chez les archaébactéries. Une étude sur l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* suggère que le protéasome est indispensable uniquement en conditions de stress, les cellules présentent une croissance normale en présence de la drogue inhibitrice du protéasome mais sont incapables de survivre lorsqu'elles sont soumises à un choc thermique (Ruepp *et al.*, 1998).

D'autres études de notre laboratoire suggèrent qu'à de faibles concentrations en sel, qui constituent des conditions de dépliement de protéines halophiles, le protéasome 20S est toujours fonctionnel et capable de dégrader des protéines en voie de dépliement comme la malate désyhdrogénase halophile sans l'aide de complexes régulateurs ATPasiques de type PAN. Ceci suggère que le protéasome 20S pourrait agir en conditions de stress pour éliminer les protéines défectueuses sans l'aide de complexes régulateurs PANs (Franzetti *et al.*, 2001). *In vitro*, les PANs possèdent une activité chaperonne, leur rôle dans le système de contrôle de qualité des protéines est déjà évoqué, il était donc intéressant d'étudier leur participation à une telle réponse *in vivo*.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Pour étudier la participation du protéasome et de ces sous-unités régulatrices PANs dans une réponse au stress, nous avons dressé trois types d'expériences :

- leur régulation pendant un stress rapide résultant d'un changement brusque et brutal dans l'environnement extérieur
- leur régulation en fonction d'une adaptation à un stress. Le stimulus serait alors un stress de plus longue durée mais de faible intensité, nous avons opté alors pour une adaptation à de faibles concentrations en sel.
- Leur régulation à des conditions de stress en présence d'une drogue inhibitrice du protéasome.

II.2 Régulation du protéasome et des PANs après un choc thermique et salin

Pour étudier le rôle du protéasome et des PANs dans la réponse au stress, des cellules d'*Halobacterium salinarium* en pleine phase exponentielle ont été soumises à un choc thermique, ou un choc salin.

Halobacterium salinarium a une température optimale de croissance de 42°C et une concentration en sel optimale de 40% NaCl. Il était donc convenable pour des expériences de choc d'augmenter drastiquement la température, ou de baisser la concentration en sel. En effet, une augmentation de la température, ou une diminution de la concentration en sel provoque l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme et induit la réponse cellulaire au stress (Daniels *et al*., 1984 ; Kuo *et al*, 1997 ; Mojica *et al*., 1997) Pour déterminer les conditions optimales pour les expériences de stress, nous avons utilisé dans des expériences préliminaires un contrôle positif, le thermosome. Le thermosome est une chaperonine dont le rôle a été déjà bien établi dans une réponse au choc thermique et salin chez *Haloferax volcanii* (Kuo et al, 1997). Nous avons donc choisi les conditions optimales où le thermosome serait induit en suivant par immunodétection le niveau protéique grâce un anticorps dirigé contre la sous-unité alpha du thermosome.

Pour le choc thermique, les cellules d'*Halobacterium* de la phase exponentielle ($O.D_{620}$= 0.5-0.6) ont été transférées dans un bain-marie à 60°C et des échantillons ont été prélevés au temps t = 0, 15', 30' et 1h. Pour un choc salin, les cellules sont diluées de 25 % NaCl jusqu'à 10% NaCl et les échantillons sont alors prélevés au temps t= 0, 30', 1h, 2h.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Les échantillons des deux expériences ont été ensuite analysés par « Northern blot » pour détecter le changement au niveau des ARNm de la sous-unité alpha du protéasome et des PANs ou par immunodétection pour suivre les variations des protéines PANs.

II.2.1 Réponse au niveau transcriptionnel

Lorsque les cellules ont été soumises à un stress thermique ou salin, les résultats par Northern Blot ont montré un comportement différent pour PAN A, PAN B et la sous-unité alpha du protéasome.

Le niveau des transcrits de la sous-unité alpha du protéasome diminuait drastiquement après les expériences de choc thermique et salin tel est montré par la figure 28. En revanche, pour PAN A, on constate une nette induction consécutive pour les deux chocs thermiques et salins. Nous avons observé une augmentation du niveau des transcrits de 7 à 8 fois de celui du contrôle. Le niveau du transcrit PAN A diminuait après une heure de choc thermique et après deux heures de choc salin.

Quant à PAN B, dans le cas du choc thermique nous avons observé une induction dès 15 min du choc thermique. En parallèle à cette induction, nous avons observé l'accumulation d'un nouveau transcrit de plus grande taille qui n'était pas détecté dans les conditions non stressantes. Dans le cas du choc salin, nous n'avons pas vu d'induction au niveau du transcrit PAN B, cependant nous avons observé dès 30 min du choc salin l'accumulation de nouveaux transcrits dont la taille est de 1 à 1,5 kb de plus que le transcrit détecté en conditions non stressantes.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

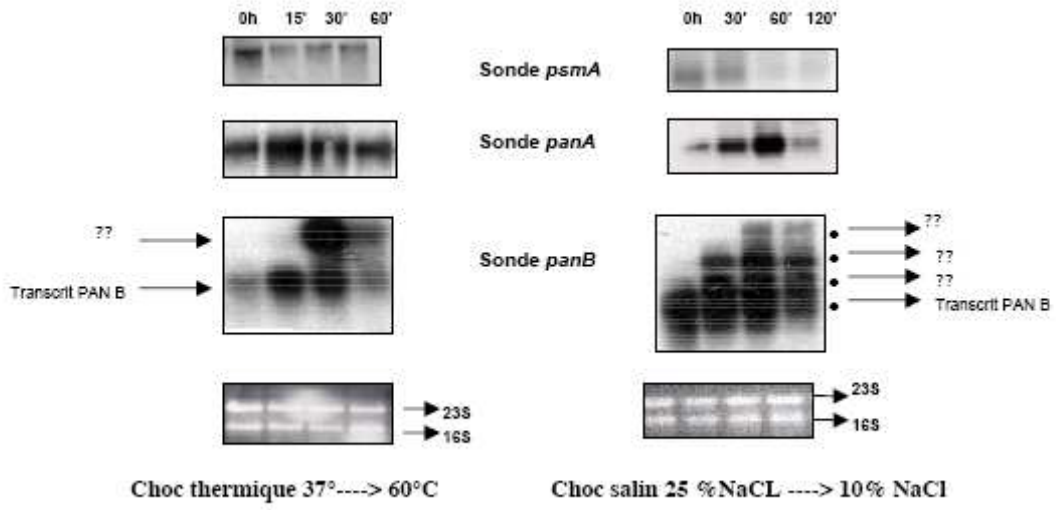


Figure 28 : Etude de la régulation transcriptionnelle des PANs au cours du stress salin et thermique.

Les cellules d'*Halobacterium salinarium* ont subi un stress thermique par transfert de 37°C à 60 °C ; ou salin par transfert de 25 % NaCl jusqu'à 10 % NaCl. Les ARNm extraits aux temps indiqués ont été analysés par Northen Blot. Les transcrits PAN A, PAN B et ceux de la sous-unité alpha ont été détectés par autoradiographie par des sondes ARN anti-sens marqués au 32P. Le dépôt des échantillons a été vérifié par les ARN ribosomiques 23 S et 16 S après une coloration du gel au bromure d'éthidium.

Nos résultats montrent que contrairement à la sous-unité alpha du protéasome, les protéines rpt-like PAN sont très fortement régulées au niveau transcriptionnel en conditions de stress. *PAN A* et *PAN B* ne présentent pas les mêmes profils de régulation en particulier, on constate une modification drastique de l'état des ARNm de PAN B et l'apparition des transcrits supplémentaires.

II.2.2 Régulation au niveau post-transcriptionnel

Nous avons donc vu que la régulation des PANs dans la réponse au stress est bien évidente au niveau transcriptionnel. Mais qu'en est-il du niveau des protéines ?

Les résultats présentés dans la figure 29 montrent une régulation différentielle des protéines PANs. Les deux isoformes de la protéine PAN A sont induites avec une augmentation de 3 à 4 fois après un choc thermique ou salin. Ce profil d'induction est très similaire à celle du thermosome . Par contre,dans le cas de PAN B, nous avons observé une

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

diminution du niveau protéique des deux isoformes après le choc. Dans le cas du choc thermique, nous avons observé une diminution du niveau des protéines une heure après le choc thermique ; alors que dans le cas du choc salin, la diminution est beaucoup plus tardive et nous l'avons observé deux heures après le choc salin.

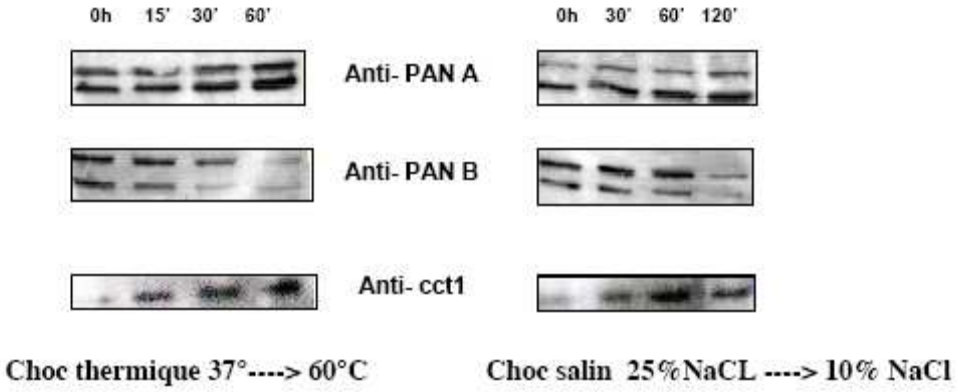


Figure 29 : Varitation des niveaux protéiques de PAN A, PAN B et du thermosome au cours de stress thermique et salin.

Les extraits protéiques prélevés aux temps indiqués ci-dessus ont été séparés sur un gel SDS 12% et les différentes protéines ont été détectées par immunodétection par des anticorps dirigés spécifiquement contre chacune de ces protéines.

II.2.3 Discussion sur la réponse des PANs au stress

Nos résultats ont montré que les deux protéines PANs et la sous-unité alpha du protéasome sont différentiellement régulées au cours du stress.

PAN A se comporte comme une vraie protéine de stress induite au cours de deux types de stress différents, ce qui suggère que PAN A pourrait jouer un rôle régulateur notamment dans les conditions de stress en activant l'élimination des protéines défectueuses par le protéasome dans la cellule. Il est également possible que l'induction de PAN dans les cellules soit liée à son activité chaperonne ou anti-agrégation suggérée par les expériences *in vitro* effectuées sur la protéine recombinante de *Méthanocaldococcus janaschii*.

Pour PAN B, l'altération des niveaux de transcrits par le stress s'accompagne par une diminution du niveau protéique au cours du stress, ceci suggère que PAN B joue un rôle différent de PAN A au cours du stress. On peut imaginer que PAN B aurait plus un rôle de ménage dans la cellule en assurant l'élimination des protéines régulatrices ou en jouant un rôle dans le contrôle de la qualité des protéines néosynthétisées . L'apparition des transcrits

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

supplémentaires qui apparaissent uniquement en conditions de stress suggèrent une co-transcription de PAN B avec d'autres gènes en amont ou en aval en conditions de stress. Cette accumulation de nouveaux transcrits peut provenir de la synthèse de nouveaux transcrits ou de la stabilisation de certains ARNm polycystroniques. Une altération au cours du stress de l'activité de l'exosome : complexe responsable de la dégradation des ARNm pourrait être responsable de l'apparition de ces transcrits supplémentaires en conditions de stress. En effet, la stabilité de certains ARNm est influencée par la salinité du milieu extérieur et la demie-vie de certains ARNm est augmentée lors d'une diminution de la salinité dans le milieu extérieur (Roder *et al*.,1996).

La sous-unité alpha du protéasome est régulée négativement au cours du stress. La signification de cette diminution par rapport à une augmentation du transcrit PAN A n'est pas bien comprise, des études plus poussées sur l'activité du protéasome dans des cellules stressées devraient permettre de conclure si cette diminution de transcrits de sous-unités alpha s'accompagne par une diminution au niveau protéique et influence vraiment l'activité du protéasome en conditions de stress. Il est intéressant de tester si dans les cellules stressées il y a une chute de la protéolyse protéasome-dépendante en mesurant l'activité du protéasome sur des substrats fluorégéniques de cellules stressées et de cellules non stressées.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.3 Co-transcription de PAN B avec d'autres gènes en conditions de stress

Lors de la réponse au stress, nous avons observé dans le cas de PAN B l'accumulation de plusieurs nouveaux transcrits de plus grande taille qui n'étaient pas présents au cours de conditions normales de croissance. Nous étions donc intéressés à savoir à quoi correspondent ces longs transcrits détectés en conditions de stress. Pour avoir une idée sur ces longs transcrits potentiels, nous avons analysé la région chromosomique du gène *PANB* afin d'identifier des opérons polycistroniques potentiels. La région chromosomique du gène *PANB* comprend plusieurs gènes candidats qui peuvent être co-transcrits avec *PANB.* (Figure 30A). En amont du gène *PAN B* de 1236 p se trouve un cadre de lecture correspondant à une protéine homologue à une oligoendopeptidase (1759 p.b), et en aval du gène *PAN B* se trouve deux petits cadre de lecture (482 p.b et 510 p.b) correspondant à des protéines hypothétiques et non identifiées. Cette organisation du gène PAN B est assez conservée chez les autres espèces halophiles du même groupe dont le génome est disponible et notamment chez *Haloarcula marismortui*.

La taille du long transcrit détectée par les Northern Blot (à peu près vers les 3000 p.b) correspondait plus à un long cadre de lecture, ce qui suggère que la co-transcription serait beaucoup plus probable avec l'oligoendopeptidase ou *yjbG*. De plus, l'oligoendopeptidase s'est avérée particulièrement intéressante, car cette oligoendopeptidase est l'homologue de la thimet oligoendopeptidase : enzyme impliquée dans la dégradation des peptides générés par le protéasome chez les eucaryotes (Saric *et al*., 2004). Cette oligoendopeptidase pourrait donc constituer un partenaire probable de PAN B et il ne serait pas étonnant que PAN B et l'oligoendopeptidase appartiennent à un même opéron induit par le stress car les gènes appartenant à un même opéron codent pour des protéines dont les fonctions peuvent être associées (Jacob and Monod, 1961).

Nous avons donc tenté de démontrer une co-transcription entre *panB* et l'oligoendopeptidase, nous avons eu recours à la méthode RPA pour ribonuclease protection assay. Pour détecter la co-transcription entre PAN B et l'oligoendopeptidase, nous avons construit une sonde complémentaire au transcrit long généré par la co-transcription putative entre PANB et l'oligoendopeptidase, et cela en choisissant une sonde de 594 nt complémentaire au début de l'ORF *PAN B* et complémentaire à la fin de l'ORF de

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

l'oligoendopeptidase telle indiquée par la figure 30 B. Les ARN messagers totaux extraits des expériences de choc thermique et de choc salin ainsi que les échantillons contrôles ont été donc hybridés contre la sonde transcrite *in vitro* et marquée au ^{32}P radioactif, et la réaction a été ensuite digérée par l'utilisation d'un mélange RNase A/RNase T qui va digérer les ARN simple brin. Les produits de digestion ont été ensuite analysés sur un gel de polyacrylamide et détectés par autoradiographie. Les résultats de l'autoradiographie (figure 30 C) ont montré la présence d'une bande majoritaire aux alentours de 200 nt et une autre bande de plus faible intensité située vers les 90 nt. Ces deux bandes correspondent aux deux fragments d'ARN protégés dont les extrémités correspondent aux départs de transcription et confirment l'existence d'une hétérogénéité d'ARN messagers de PAN B comme l'ont montré les résultats obtenus par extension d'amorce décrits dans le chapitre I. Dans nos résultats, nous n'avons pas pu détecter la sonde complète dans aucun de ces échantillons qui devrait correspondre au long transcrit généré par la co-transcription entre *PAN B* et l'oligoendopeptidase. ce qui suggère que probablement il n'y a pas de co-transcription entre le gène *PAN B* et l'oligoendopeptidase. Nous n'avons pas détecté non plus la partie de la sonde correspondante à l'oligoendopeptidase, ce qui suggère que l'oligoendopeptidase n'est pas transcrite.

Avant de conclure de façon définitive, il est nécessaire de refaire les expériences. En effet, l'intégrité de la sonde n'était pas maintenue au cours de l'expérience comme le montre la piste 2 du gel représenté dans la figure. Ceci peut empêcher l'hybridation de la sonde complète sur la totalité de sa longueur. Il serait intéressant de construire une sonde plus courte qui sera moins sujette à la dégradation.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

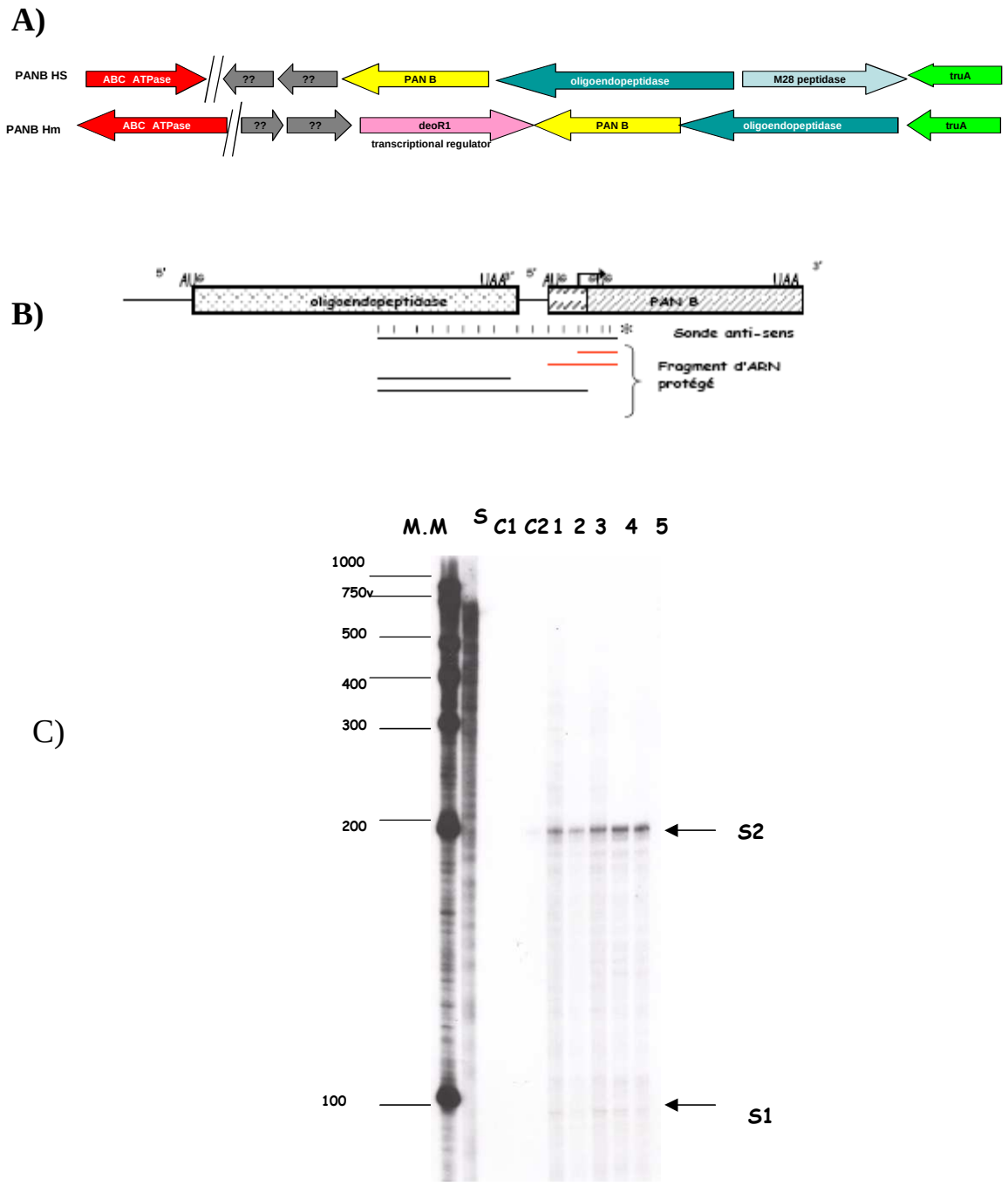


Figure 30 : Ribonuclease protection assay pour détecter la co-transcription entre *panB* et l'oligoendopeptidase.

A) Représentation schématique de la région chromosomique de *PAN B* chez *Halobacterium salinarium (Hs) et Haloarcula marismortui (Hm).*

B) Représentation schématique de la RPA. Une sonde anti-sens de 594 nt a été synthétisée *in vitro* et marquée au à l'UTP ^{32}P. Cette sonde est complémentaire au début de l'ORF *PAN B* et à la fin de l'ORF de l'oligoendopeptidase. Les fragments d'ARN qui sont protégés de l'attaque de la ribonucléase sont présentés. Seuls les fragments détectés par autoradiographie sont colorés en rouge.

C) Détection des fragments d'ARN protégés sur un gel de polyacrylamide 5 % - 7 M urée. MM : marqueur poids moléculaire RNA century plus. S : sonde complète non digérée. C1 : contrôle sonde digérée toute seule. C2 : sonde +ARN non spécifique de levure digéré. 1 : Extrait d'ARNm contrôle. 2 : Extrait d'ARNm choc thermique 15 min. 3 : extrait d'ARNm choc thermique 60 min. 4 : Extrait d'ARNm choc salin 30 min. 5 : extrait d'ARNm choc salin 60 min.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

II.4 Réponse cellulaire des archéobactéries halophiles dans l'adaptation à de faibles concentrations salines

La réponse cellulaire à un stress dépend de l'intensité et de la durée du stimulus. La réponse à un stress rapide n'implique pas forcément les mêmes mécanismes que ceux mis en jeux lors d'une réponse à une exposition prolongée à une situation environnementale hostile. Plus le stimulus est fort et brusque, moins les cellules seraient capables de le surmonter sur une longue durée et de récupérer après retour à des conditions de croissance standards (Macario *et al*., 1997). Enfin au delà d'un seuil critique, les cellules ne peuvent plus supporter le stress et meurent.

Un stress rapide va provoquer l'induction transitoire de protéines de stress qui sont en général des chaperonnes et des protéases pour prévenir l'accumulation des protéines défectueuses dans le cytoplasme. Une réponse à une adaptation implique la mise en place de processus plus efficaces sur une longue durée pour réguler la globalité des processus de synthèse dans la cellule. Nous avons voulu étudier si les protéines PANs et le protéasome participent à l'adaptation des archéobactéries halophiles à différentes concentrations en sel. Les expériences qui sont présentées dans les deux parties suivantes (Adapatation à différentes concentrations salines et réponse à la drogue NLVS) sont préliminaires et incomplètes mais qui portent des indications et des perspectives pour un travail futur.

Halobacterium salinarium et *Haloarcula marismortui* sont des archéobactéries halophiles extrêmes qui sont capables de survivre dans des conditions salines proches de la saturation. La concentration optimale en sel pour la croissance d'*Halobacterium salinarium* est de 4.2 M alors que celle d'*Haloarcula marismortui* est de 3,5 M.

Nous avons étudié l'adaptation de ces deux microorganismes à de différentes concentrations en sel. *Halobacterium salinarium* et *Haloarcula marismortui* ont été transférées dans des milieux de culture contenant des concentrations de sel variables de 2 M, 2,5M, 3M, 3,5M et 4,2M (en dessous de 1,5 M les cellules se lysent par choc osmotique) et nous avons suivi la croissance des cellules par une mesure de la densité optique.

Les résultats montrent qu'*Halobacterium* n'est pas capable de survivre que dans des milieux contenant au minimum 3 M NaCl en concentration. Les courbes de croissance dans des milieux contenant 4,2 M, 3,5 M et 3 M ont montré une allure assez similaire avec un temps de génération très proche.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Contrairement à *H. salinarium*, *Haloarcula marismortui* est capable de survivre dans de faibles concentrations en sel jusqu'à 1,5 M. Un ralentissement de la vitesse de croissance est observé pour les cellules qui poussent à 2,5M et à 2 M. Les cellules qui poussent à 2,5 M ont pu atteindre la même densité optique de celles qui poussent dans des conditions normales.
Les cellules qui poussent à 2 M n'ont pas pu atteindre des densités optiques très hautes, la densité optique a diminué drastiquement suite à la mort cellulaire après un cycle de dilution.

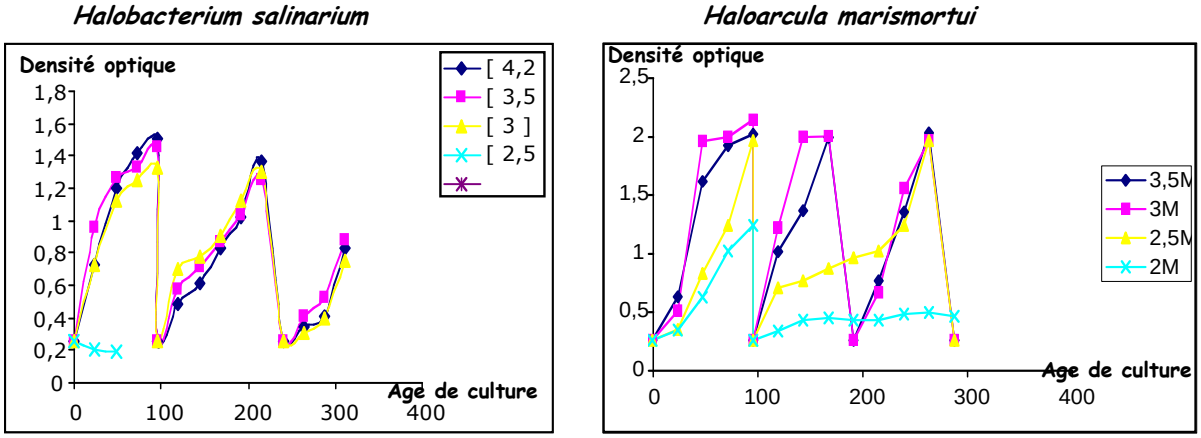


Figure 31 : Adaptation d'*Halobacterium salinarium* et d'*Haloarcula marismortui* à différentes concentrations de sel.

La figure montre le suivi de la croissance (mesure de la D.O) sur plusieurs générations. Sur l'axe des abscisses est représenté l'âge de la culture en heures, et sur l'axe des ordonnées est représentée la densité optique mesurée à 620 nm.

Nous avons tenté d'adapter progressivement les deux microorganismes à des concentrations en sel plus basses. Pour *Halobacterium salinarium*, il n'a pas été possible d'amener les cellules à se développer normalemeent dans des concentrations en sel plus basses. En revanche, pour *Haloarcula marsimortui*, il a été possible d'obtenir des cultures qui se développent normalement à 1,5 M NaCl.
L'ensemble de ces expériences met en avance l'idée que *H. marsimortui* est une souche d'archaea particulièrement apte à surmonter le stress et en conséquence représente un bon système pour des études protéomiques de l'adaptation des organismes halophiles aux milieux salins.

Nous avons procédé à une immunodétection des extraits cellulaires provenant de cellules cultivées *de Haloarcula marismortui* de la sous-unité alpha du thermosome et de PAN B dans différentes conditions de salinité. Les cellules ont été prélevées à 3 stades de croissance : phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire. Les résultats ont montré que les

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

niveaux protéiques du thermosome ou de PAN B restent inchangés pour une même phase de la croissance quand les cellules poussent dans un milieu contenant différentes concentrations en sel plus basses (Résultats non montrés). Nous ne pouvons pas à ce stade conclure que le thermosome et les protéines PANs ne participent pas à l'adaptation à de conditions salines ; les expériences n'ont pas été reproduites plusieurs fois, et des études supplémentaires au niveau transcriptionnel doivent permettre de conclure si les protéines PANs et le protéasome participent à l'adaptation à différentes concentrations en sel.

III.5 Réponse cellulaire des archéobactéries halophiles après inhibition du protéasome par la drogue NLVS

Nous n'avons pas pu réaliser des mutants (KO) de protéasome ou des protéines PANs, nous avons donc décidé d'étudier la réponse cellulaire d'*Halobacterium* à une inactivation chimique du protéasome par l'utilisation de drogue inhibant son activité. Chez les archéobactéries, l'inhibition de l'activité du protéasome a été effectuée sur l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* en utilisant le NLVS comme inhibiteur (Ruepp *et al*.,1998). Le NLVS ou tripeptidyl vinyl sulfone inhibe l'activité trypsine-like, chymotrypsine-like et l'activité peptidyl gultamyl du protéasome via la modification irréversible des sites actifs thréonine des extrémités N-terminales des sous-unités bêta du protéasome (Bogyo *et al*.,1997). L'inhibition de l'activité du protéasome archéobactérien par le NLVS n'avait apparemnt aucun effet sur la croissance de *Thermoplasma acidophilum*, indiquant que le protéasome n'est pas essentiel dans les conditions normales de croissance. Cependant l'inhibition du protéasome au cours d'un stress thermique résulte en une incapacité des cellules à surmonter le stress. Il était donc intéressant de tester la réponse cellulaire des archéobactéries halophiles aux stress salin lorsque celles-ci sont incubées en présence d'une drogue inhibitrice du protéasome. L'objectif était également d'observer le comportement des protéines PANs et du thermosome en situation de détresse protéolytique.

. Nous avons testé plusieurs concentrations de drogue (15 µM et 30 µM) sur les deux souches dont on dispose au laboratoire : *Halobacterium salinarium* et *Haloarcula marismortui*. Nous avons donc ajouté la drogue à des cellules en début de phase de croissance et nous avons suivi la croissance de ces cellules par mesure de la densité optique. Les résultats de la figure 32 ont montré qu'en conditions de cultures normales, les cellules étaient capables de croître normalement en présence de la drogue NLVS.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

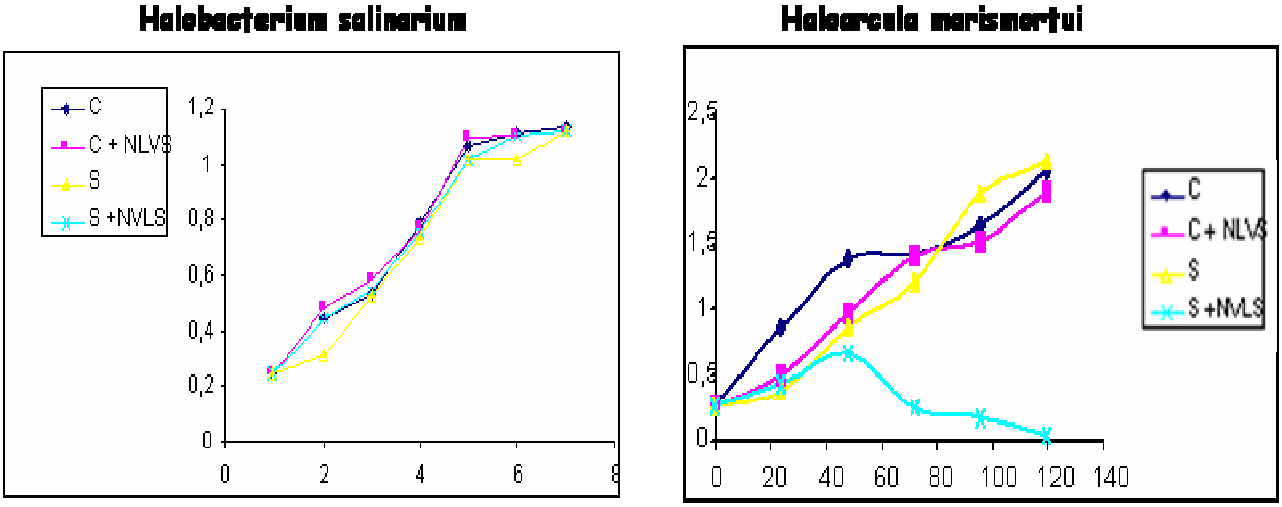


Figure 32 : Réponse des archéobactéries halophiles après l'addition de la drogue inhibitrice du protéasome NLVS.

A gauche : Réponse cellulaire d'*Halobacterium salinarium* au cours de la croissance après l'addition de la drogue inhibitrice du protéasome NLVS. Les cellules issues d'une phase stationnaire ont été reprises dans des milieux contenant 4,2M NaCl (C = contrôle sur la figure) ou en présence de 3 M NaCl (S sur la figure) en absence et en présence de 30 µM de NLVS.

A droite : Réponse cellulaire d'*Haloarcula marismortui* au cours de la croissance après l'addition de la drogue inhibitrice du protéasome NLVS. Les cellules issues d'une phase stationnaire ont été reprises dans de milieux contenant 3,5 M NaCl (C= contrôle sur la figure) en en présence de 2,5 M NaCl (S= stress sur la figure) en absence et en présence de 30 µM de NLVS.

Nous avons testé si les cellules pouvaient surmonter le stress en présence de la drogue inhibitrice. Les cellules ont été donc incubées dans des milieux de culture contenant des concentrations de sel différentes (nous avons choisi 3 M pour *Halobacterium* et 2,5 M pour *Haloarcula marismortui* qui correspondent à une situation de stress non létale pour les cellules), et la drogue a été ensuite ajoutée au début de la phase de croissance. Nous avons ensuite suivi la croissance par un suivi de la densité optique.

Aucune différence sur la croissance entre les cellules stressées ou non stressées n'a été observée pour *Halobacterium salinarium*. Par contre, pour *Haloarcula marismortui*, les cellules stressées à 2,5 M en sel en présence de la drogue ont poussé normalement jusqu'à en milieu de la phase exponentielle et meurent.

À ce stade du travail, il est nécessaire de faire un contrôle pour tester l'efficacité de la drogue sur le protéasome à la fois *in vivo* et *in vitro*, nous ne savons pas si la différence observée pour la réponse de la drogue entre *Halobacterium salinarium* et *Haloarcula marismortui* est due à

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

une inefficacité de la drogue à pénétrer dans le cytoplasme d'*Halobacterium salinarium.* Il est aussi possible qu'à de concentrations en sel très hautes (4,2 M, ou 3 M), la drogue est moins soluble ce qui la rend inefficace.

Nous avons aussi testé la réponse à la drogue en présence d'un stress thermique (Résultats non montrés). L'expérience consistait à faire un choc thermique de 15 min à 60°C et remettre les cellules à pousser normalement. Nous n'avons pas vu de différence entre la croissance des cellules en présence ou en absence de drogue.

En parallèle à notre étude sur la réponse cellulaire à la drogue après un stress ou une adaptation, nous avons étudié la réponse cellulaire au bout de trois heures de l'ajout de la drogue chez *Haloarcula marismortui* en l'absence d'un stress (nous doutions de l'efficacité de la drogue sur *Halobacterium salinarium*).

Nous avons étudié l'accumulation de la protéine PAN B et de TF55 dans les cellules traitées par la drogue à une concentration de 30 µM et nous avons suivi les variations de PAN B et TF55 au cours des trois heures qui suivent l'addition de la drogue (Figure 33). TET est un complexe peptidase qui a été proposé être responsable de l'élimination des peptides issus de l'activité du protéasome 20 S (Franzetti *et al*., 2002). Nos résultats préliminaires ont montré l'induction de TF55 et de PAN B une heure après l'ajout de la drogue d'une façon assez similaire pour les deux protéines.

Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent une connexion entre le système chaperonne et la fonction de la protéolyse cytosolique : notez que cette connexion a été déjà proposée pour les cellules eucaryotes dans lesquelles une altération de l'activité du protéasome provoque une stimulation d'un système heat shock (Bush *et al*., 1997). Dans le cas de PANB, l'induction de la protéine indique que la régulation des protéines PANs est contrôlée par l'activité de la protéolyse cytoplasmique. Dans le cas de TET, nous n'observons pas d'altération supposée du niveau des protéines en réponse à une inhibition de l'activité du protéasome.

Ces résultats sont néanmoins préliminaires et nous ne pouvons pas nous prononcer de façon définitive sur l'effet de la drogue sur *Haloarcula marismortui*.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

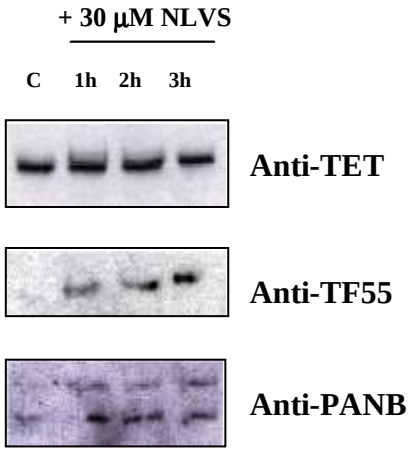


Figure 33 : Variation des protéines TET, TF55 et PAN B après l'addition de la drogue NLVS inhibitrice du protéasome.

Les cellules d'*Haloarcula marismortui* (phase exponentielle) ont été incubées en présence de 30 µM de la drogue NLVS pendant 3 heures. Aux temps indiqués, les cellules ont été récupérées par centrifugation et analysées par immunodétection.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Conclusions et Perspectives

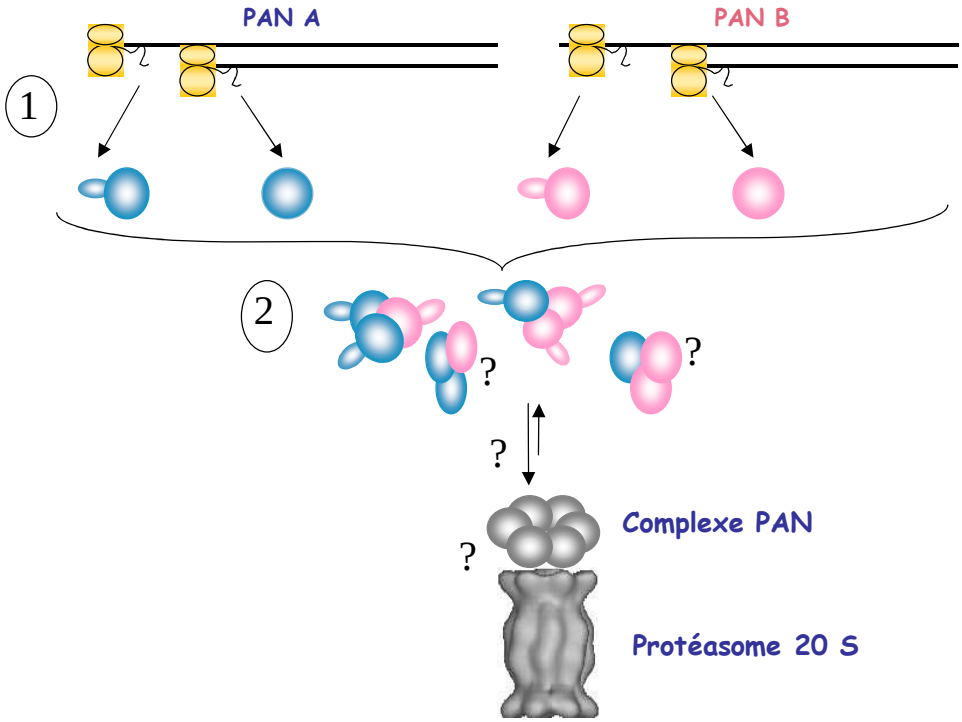
L'objectif de la thèse était de préciser le rôle physiologique des deux protéines PANs dans la protéolyse cellulaire chez *Halobacterium salinarium.* Les études sur l'état des deux protéines PANs *in vivo* ont révélé la présence de deux isoformes (Schéma récapitulatif spéculatif I). Ces deux isoformes sont probablement générées par une hétérogénéité des ARNm dans leurs extrémités 5' qui a pour effet de conduire à l'utilisation d'un deuxième site de traduction.

Il sera important dans un travail futur de déterminer l'extrémité N-terminale de chacune des protéines et de vérifier par l'utilisation de constructions contenant la région 5' non traduite de chaque PAN s'il y a une utilisation d'un deuxième site de traduction.

A ce stade du travail, nous ne savons pas l'effet de cette hétérogénéité N-terminale sur les propriétés d'assemblage, de reconnaissance des substrats et d'association avec le protéasome.

On peut tout de même dire que la forme tronquée semble plus instable que la protéine « full-length ». Il est cependant clair que les deux protéines PANs entières *in vivo* interagissent ensemble pour formerde petits complexes hétérooligomériques, que ceux-ci ne s'assemblent pas d'une façon stable avec le protéasome. Il sera intéresssant d'étudier le caractère ATP-dépendant de l'association des protéines PANs avec le protéasome.

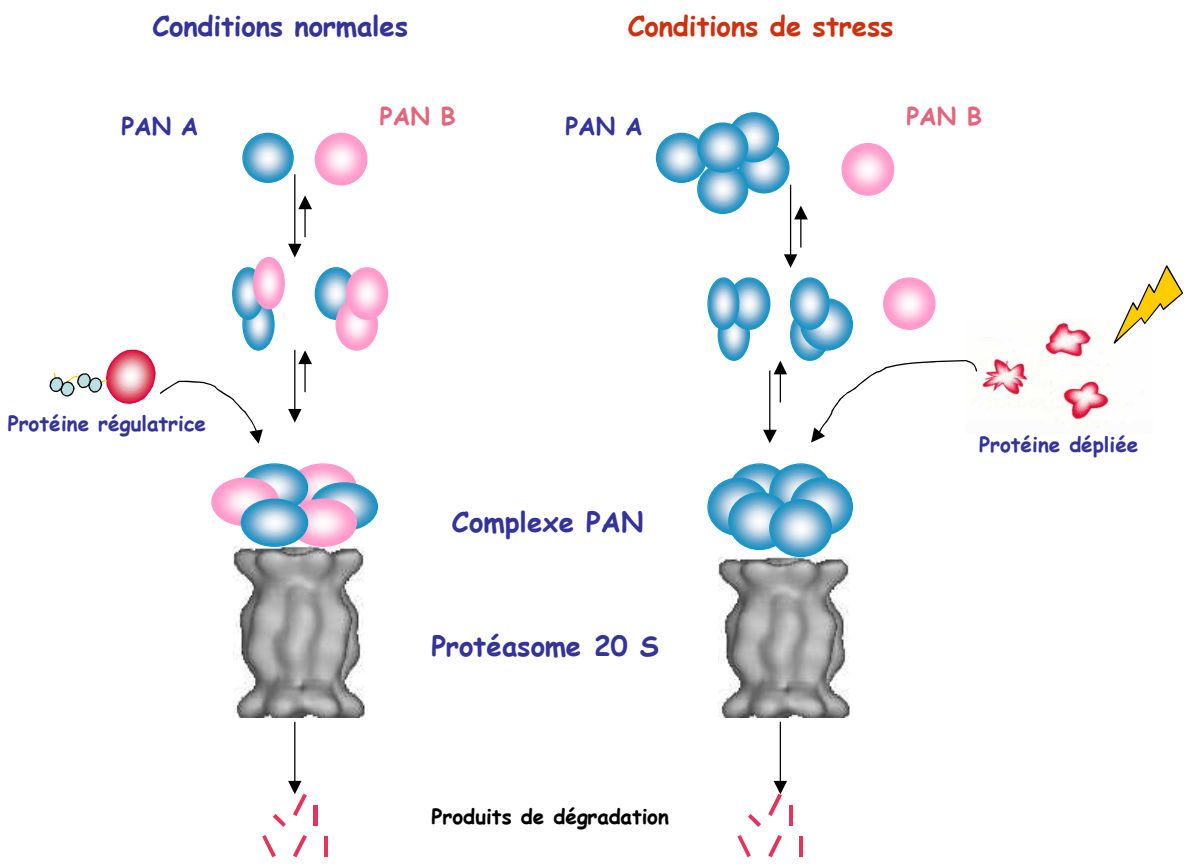
Schéma récapitulatif I:



tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

En ce qui concerne le rôle physiologique, nous avons montré que les deux protéines sont co-régulées au niveau transcriptionnel et au niveau protéique au cours de la croissance.
n revanche, il apparaît que PAN A dans les conditions de stress se comporte comme une protéine heat shock alors que pour PAN B, on constate une altération du profil de transcription et une chute du niveau protéique au cours du stress. Ceci pourrait indiquer un rôle biologique différent des PANs avec un complexe PAN A majoritaire qui sera plus impliqué dans l'élimination des protéines mal repliées alors que PAN B aurait plus un role dans l'élimination des protéines régulatrices (Schéma récapitulatif II).

Schéma récapitulatif II:



tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

Références Bibliographiques

1. Akopian, T.N., Kisselev, A.F. and Goldberg, A.L., 1997. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from Thermoplasma acidophilum. J Biol Chem, 272(3): 1791-8.
2. Allers, T. and Mevarech, M., 2005. Archaeal genetics - the third way. Nat Rev Genet, 6(1): 58-73.
3. Arcangeletti, C. et al., 1997. Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and actin networks by "instantaneous fixation" preserving the cytoskeleton. J Struct Biol, 119(1): 35-58.
4. Armon, T., Ganoth, D. and Hershko, A., 1990. Assembly of the 26 S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity. J Biol Chem, 265(34): 20723-6.
5. Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L. and Welch, W.J., 1988. Identify of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). Nature, 331(6152): 192-4.
6. Azim, M.K. et al., 2005. Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. Protein Sci, 14(5): 1357-62.
7. Babbitt, S.E. et al., 2005. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. Cell, 121(4): 553-65.
8. Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D., 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. Embo J, 17(11): 2982-93.
9. Bajorek, M., Finley, D. and Glickman, M.H., 2003. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. Curr Biol, 13(13): 1140-4.
10. Baliga, N.S. et al., 2004. Genome sequence of Haloarcula marismortui: a halophilic archaeon from the Dead Sea. Genome Res, 14(11): 2221-34.
11. Baliga, N.S. et al., 2002. Coordinate regulation of energy transduction modules in Halobacterium sp. analyzed by a global systems approach. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(23): 14913-8.
12. Baugh, J.M. and Pilipenko, E.V., 2004. 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. Mol Cell, 16(4): 575-86.
13. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E., 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell, 92(3): 367-80.
14. Beinker, P., Schlee, S., Groemping, Y., Seidel, R. and Reinstein, J., 2002. The N terminus of ClpB from Thermus thermophilus is not essential for the chaperone activity. J Biol Chem, 277(49): 47160-6.
15. Benaroudj, N. and Goldberg, A.L., 2000. PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaebacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. Nat Cell Biol, 2(11): 833-9.
16. Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W. and Goldberg, A.L., 2003. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. Mol Cell, 11(1): 69-78.
17. Bochtler, M. et al., 2000. The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. Nature, 403(6771): 800-5.
18. Bogyo, M. et al., 1997. Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(13): 6629-34.
19. Braun, B.C. et al., 1999. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. Nat Cell Biol, 1(4): 221-6.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

20. Bush, K.T., Goldberg, A.L. and Nigam, S.K., 1997. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. J Biol Chem, 272(14): 9086-92.
21. Cardozo, C., 1993. Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). Enzyme Protein, 47(4-6): 296-305.
22. Chen, X. et al., 2004. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). Mol Cell, 16(5): 839-47.
23. Chuang, S.E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D.L. and Blattner, F.R., 1993. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in Escherichia coli. Gene, 134(1): 1-6.
24. Chung, C.H. and Goldberg, A.L., 1981. The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(8): 4931-5.
25. Ciechanover, A. et al., 2001. Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. Biochimie, 83(3-4): 341-9.
26. Coffino, P., 2001. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. Biochimie, 83(3-4): 319-23.
27. Conconi, M. et al., 1998. Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. Biochem J, 333 (Pt 2): 407-15.
28. Confalonieri, F. and Duguet, M., 1995. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. Bioessays, 17(7): 639-50.
29. Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu Rev Biochem, 65: 801-47.
30. Dahlmann, B. et al., 1989. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. FEBS Lett, 251(1-2): 125-31.
31. Daniels, C.J., Mckee, A.H.Z., Doolittle, W.F., 1984. Archaebacterial heat-shock proteins. Embo J, 3: 745-749.
32. De Mot, R., Nagy, I., Walz, J. and Baumeister, W., 1999. Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. Trends Microbiol, 7(2): 88-92.
33. DeMartino, G.N. et al., 1994. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. J Biol Chem, 269(33): 20878-84.
34. Dougan, D.A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K. and Bukau, B., 2002. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. FEBS Lett, 529(1): 6-10.
35. Dougan, D.A., Reid, B.G., Horwich, A.L. and Bukau, B., 2002. ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. Mol Cell, 9(3): 673-83.
36. Dreveny, I. et al., 2004. Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. Embo J, 23(5): 1030-9.
37. Dubiel, W., Ferrell, K., Pratt, G. and Rechsteiner, M., 1992. Subunit 4 of the 26 S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family. J Biol Chem, 267(32): 22699-702.
38. Edmunds, T.a.P., R.J., 1982. A high molecular weight peptide hydrolase in erythrocytes. Int J Biochem, 14(8): 701-3.
39. Ehlers, C., Kopp, F. and Dahlmann, B., 1997. Screening for molecules interacting with proteasomes in Thermoplasma acidophilum. Biol Chem, 378(3-4): 249-53.
40. Etlinger, J.D. and Goldberg, A.L., 1977. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(1): 54-8.
41. Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T. and Hershko, A., 1989. ATP-dependent

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Proc Natl Acad Sci U S A, 86(20): 7751-5.
42. Fagan, J.M. and Waxman, L., 1991. Purification of a protease in red blood cells that degrades oxidatively damaged haemoglobin. Biochem J, 277 (Pt 3): 779-86.
43. Ferdous, A., Kodadek, T. and Johnston, S.A., 2002. A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. Biochemistry, 41(42): 12798-805.
44. Ferrell, K., Wilkinson, C.R., Dubiel, W. and Gordon, C., 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends Biochem Sci, 25(2): 83-8.
45. Finley, D. et al., 1998. Unified nomenclature for subunits of the Saccharomyces cerevisiae proteasome regulatory particle. Trends Biochem Sci, 23(7): 244-5.
46. Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T. and Baker, T.A., 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol Cell, 11(3): 671-83.
47. Forster, A., Masters, E.I., Whitby, F.G., Robinson, H. and Hill, C.P., 2005. The 1.9 A structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. Mol Cell, 18(5): 589-99.
48. Franch, H.A. and Price, S.R., 2005. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 8(3): 271-5.
49. Franzetti, B., Schoehn, G., Garcia, D., Ruigrok, R.W. and Zaccai, G., 2002. Characterization of the proteasome from the extremely halophilic archaeon Haloarcula marismortui. Archaea, 1(1): 53-61.
50. Franzetti, B. et al., 2002. Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea. Embo J, 21(9): 2132-8.
51. Fraser, R.A., Rossignol, M., Heard, D.J., Egly, J.M. and Chambon, P., 1997. SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. J Biol Chem, 272(11): 7122-6.
52. Fu, H., Doelling, J.H., Rubin, D.M. and Vierstra, R.D., 1999. Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the Arabidopsis 26S proteasome. Plant J, 18(5): 529-39.
53. Fujimuro, M. et al., 1998. Growth-dependent change of the 26S proteasome in budding yeast. Biochem Biophys Res Commun, 251(3): 818-23.
54. Galagan, J.E. et al., 2002. The genome of M. acetivorans reveals extensive metabolic and physiological diversity. Genome Res, 12(4): 532-42.
55. Georgopoulos, C. and Welch, W.J., 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annu Rev Cell Biol, 9: 601-34.
56. Gerlinger, U.M., Guckel, R., Hoffmann, M., Wolf, D.H. and Hilt, W., 1997. Yeast cycloheximide-resistant crl mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. Mol Biol Cell, 8(12): 2487-99.
57. Ghislain, M., Udvardy, A. and Mann, C., 1993. S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. Nature, 366(6453): 358-62.
58. Gillette, T.G. et al., 2001. The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. Genes Dev, 15(12): 1528-39.
59. Glickman, M.H. and Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev, 82(2): 373-428.
60. Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. and Finley, D., 1998. The regulatory particle of the Saccharomyces cerevisiae proteasome. Mol Cell Biol, 18(6): 3149-62.
61. Goff, S.A. and Goldberg, A.L., 1985. Production of abnormal proteins in E. coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes. Cell, 41(2): 587-95.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

62. Golbik, R., Lupas, A.N., Koretke, K.K., Baumeister, W. and Peters, J., 1999. The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding. Biol Chem, 380(9): 1049-62.
63. Goldberg, A.L., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature, 426(6968): 895-9.
64. Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. and Johnston, S.A., 2002. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. Science, 296(5567): 548-50.
65. Gorbea, C., Taillandier, D. and Rechsteiner, M., 2000. Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26 S proteasome. S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. J Biol Chem, 275(2): 875-82.
66. Gordon, C., McGurk, G., Dillon, P., Rosen, C. and Hastie, N.D., 1993. Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. Nature, 366(6453): 355-7.
67. Gottesman, S., 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. Annu Rev Cell Dev Biol, 19: 565-87.
68. Gottesman, S. and Maurizi, M.R., 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. Microbiol Rev, 56(4): 592-621.
69. Gottesman, S., Maurizi, M.R. and Wickner, S., 1997. Regulatory subunits of energy-dependent proteases. Cell, 91(4): 435-8.
70. Gray, C.W., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N., 1994. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. J Mol Biol, 236(1): 7-15.
71. Groll, M. et al., 2000. A gated channel into the proteasome core particle. Nat Struct Biol, 7(11): 1062-7.
72. Groll, M. et al., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. Nature, 386(6624): 463-71.
73. Guo, F., Esser, L., Singh, S.K., Maurizi, M.R. and Xia, D., 2002. Crystal structure of the heterodimeric complex of the adaptor, ClpS, with the N-domain of the AAA+ chaperone, ClpA. J Biol Chem, 277(48): 46753-62.
74. Hackett, N.R. and DasSarma, S., 1989. Characterization of the small endogenous plasmid of Halobacterium strain SB3 and its use in transformation of H. halobium. Can J Microbiol, 35(1): 86-91.
75. Hall, H.K., Karem, K.L. and Foster, J.W., 1995. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. Adv Microb Physiol, 37: 229-72.
76. Hanson, P.I. and Whiteheart, S.W., 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. Nat Rev Mol Cell Biol, 6(7): 519-29.
77. Haracska, L. and Udvardy, A., 1996. Dissection of the regulator complex of the Drosophila 26S protease by limited proteolysis. Biochem Biophys Res Commun, 220(1): 166-70.
78. Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U., 1996. Heat-shock and general stress response in Bacillus subtilis. Mol Microbiol, 19(3): 417-28.
79. Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H., 1991. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. Embo J, 10(3): 555-62.
80. Hengge, R. and Bukau, B., 2003. Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. Mol Microbiol, 49(6): 1451-62.
81. Hershko, A., 1988. Ubiquitin-mediated protein degradation. J Biol Chem, 263(30): 15237-40.
82. Hetzer, M. et al., 2001. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. Nat Cell Biol, 3(12): 1086-91.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

83. Hilt, W., Heinemeyer, W. and Wolf, D.H., 1993. Studies on the yeast proteasome uncover its basic structural features and multiple in vivo functions. Enzyme Protein, 47(4-6): 189-201.
84. Hishida, T., Iwasaki, H., Ohno, T., Morishita, T. and Shinagawa, H., 2001. A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(15): 8283-9.
85. Hochstrasser, M., 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. Annu Rev Genet, 30: 405-39.
86. Hoffman, L. and Rechsteiner, M., 1997. Effects of nucleotides on assembly of the 26S proteasome and degradation of ubiquitin conjugates. Mol Biol Rep, 24(1-2): 13-6.
87. Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R. and Wickner, S., 2000. Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(16): 8892-7.
88. Jacob, F. and Monod, J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol, 3: 318-56.
89. Jelinsky, S.A. and Samson, L.D., 1999. Global response of Saccharomyces cerevisiae to an alkylating agent. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(4): 1486-91.
90. Joshi, S.A., Baker, T.A. and Sauer, R.T., 2003. C-terminal domain mutations in ClpX uncouple substrate binding from an engagement step required for unfolding. Mol Microbiol, 48(1): 67-76.
91. Joshi, S.A., Hersch, G.L., Baker, T.A. and Sauer, R.T., 2004. Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. Nat Struct Mol Biol, 11(5): 404-11.
92. Kaczowka, S.J. and Maupin-Furlow, J.A., 2003. Subunit topology of two 20S proteasomes from Haloferax volcanii. J Bacteriol, 185(1): 165-74.
93. Kamekura , M., Zhou, P., and Kushner, D.J., 1986. Protein turnover in *Halobacterium cutirubrum* and other microorganisms that live in extreme environments. Syst. Appl. Microbiol., 7: 330 - 336.
94. Keiler, K.C., Waller, P.R. and Sauer, R.T., 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. Science, 271(5251): 990-3.
95. Kenniston, J.A., Baker, T.A., Fernandez, J.M. and Sauer, R.T., 2003. Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. Cell, 114(4): 511-20.
96. Kenniston, J.A., Baker, T.A. and Sauer, R.T., 2005. Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(5): 1390-5.
97. Kenniston, J.A., Burton, R.E., Siddiqui, S.M., Baker, T.A. and Sauer, R.T., 2004. Effects of local protein stability and the geometric position of the substrate degradation tag on the efficiency of ClpXP denaturation and degradation. J Struct Biol, 146(1-2): 130-40.
98. Kessel, M. et al., 1995. Homology in structural organization between E. coli ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. J Mol Biol, 250(5): 587-94.
99. Kim, D.Y. and Kim, K.K., 2003. Crystal structure of ClpX molecular chaperone from Helicobacter pylori. J Biol Chem, 278(50): 50664-70.
100. Kirschner, M., 1999. Intracellular proteolysis. Trends Cell Biol, 9(12): M42-5.
101. Kisselev, A.F., Akopian, T.N. and Goldberg, A.L., 1998. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. J Biol Chem, 273(4): 1982-9.
102. Kloetzel, P.M., 2004. Generation of major histocompatibility complex class I

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. Nat Immunol, 5(7): 661-9.
103. Kohler, A. et al., 2001. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. Mol Cell, 7(6): 1143-52.
104. Koonin, E.V., 1993. A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. Nucleic Acids Res, 21(11): 2541-7.
105. Kroh, H.E. and Simon, L.D., 1990. The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5. J Bacteriol, 172(10): 6026-34.
106. Kruger, E., Witt, E., Ohlmeier, S., Hanschke, R. and Hecker, M., 2000. The clp proteases of Bacillus subtilis are directly involved in degradation of misfolded proteins. J Bacteriol, 182(11): 3259-65.
107. Kuckelkorn, U., Knuehl, C., Boes-Fabian, B., Drung, I. and Kloetzel, P.M., 2000. The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes. Biol Chem, 381(9-10): 1017-23.
108. Kuo, Y.P., Thompson, D.K., St Jean, A., Charlebois, R.L. and Daniels, C.J., 1997. Characterization of two heat shock genes from Haloferax volcanii: a model system for transcription regulation in the Archaea. J Bacteriol, 179(20): 6318-24.
109. Kushner, D.J., 1985. The Bacteria, VIII. Academic Press, London, 171 pp.
110. Larsen, C.N. and Finley, D., 1997. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. Cell, 91(4): 431-4.
111. Lee, C., Schwartz, M.P., Prakash, S., Iwakura, M. and Matouschek, A., 2001. ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. Mol Cell, 7(3): 627-37.
112. Lee, S.Y. et al., 2003. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. Genes Dev, 17(20): 2552-63.
113. Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W. and Langer, T., 1999. Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. Nature, 398(6725): 348-51.
114. Levchenko, I., Luo, L. and Baker, T.A., 1995. Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. Genes Dev, 9(19): 2399-408.
115. Li, J. and Sha, B., 2002. Crystal structure of E. coli Hsp100 ClpB nucleotide-binding domain 1 (NBD1) and mechanistic studies on ClpB ATPase activity. J Mol Biol, 318(4): 1127-37.
116. Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N. and Thomas, P.J., 2003. Endoproteolytic activity of the proteasome. Science, 299(5605): 408-11.
117. Liu, C.W., Strickland, E., Demartino, G.N. and Thomas, P.J., 2005. Recognition and processing of misfolded proteins by PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. Methods Mol Biol, 301: 71-81.
118. Lowe, J. et al., 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 A resolution. Science, 268(5210): 533-9.
119. Lucero, H.A., Chojnicki, E.W., Mandiyan, S., Nelson, H. and Nelson, N., 1995. Cloning and expression of a yeast gene encoding a protein with ATPase activity and high identity to the subunit 4 of the human 26 S protease. J Biol Chem, 270(16): 9178-84.
120. Lupas, A., 1997. Predicting coiled-coil regions in proteins. Curr Opin Struct Biol, 7(3): 388-93.
121. Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T. and Baumeister, W., 1997. Self-

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

compartmentalizing proteases. Trends Biochem Sci, 22(10): 399-404.
122. Lupas, A.N. and Martin, J., 2002. AAA proteins. Curr Opin Struct Biol, 12(6): 746-53.
123. Macario, A.J. and Conway de Macario, E., 1997. Mini-Review; Stress Genes: An Introductory Overview. Stress, 1(3): 123-134.
124. Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles, 4(2): 91-8.
125. Mani, A. and Gelmann, E.P., 2005. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. J Clin Oncol, 23(21): 4776-89.
126. Martin, J., Gruber, M. and Lupas, A.N., 2004. Coiled coils meet the chaperone world. Trends Biochem Sci, 29(9): 455-8.
127. Matouschek, A., 2003. Protein unfolding--an important process in vivo? Curr Opin Struct Biol, 13(1): 98-109.
128. Maupin-Furlow, J.A., Aldrich, H.C. and Ferry, J.G., 1998. Biochemical characterization of the 20S proteasome from the methanoarchaeon Methanosarcina thermophila. J Bacteriol, 180(6): 1480-7.
129. Maupin-Furlow, J.A., Wilson, H.L., Kaczowka, S.J. and Ou, M.S., 2000. Proteasomes in the archaea: from structure to function. Front Biosci, 5: D837-65.
130. Maurizi, M.R. and Xia, D., 2004. Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. Structure (Camb), 12(2): 175-83.
131. McGuire, M.J. and DeMartino, G.N., 1989. The latent form of macropain (high molecular weight multicatalytic protease) restores ATP-dependent proteolysis to soluble extracts of BHK fibroblasts pretreated with anti-macropain antibodies. Biochem Biophys Res Commun, 160(2): 911-6.
132. Mevarech, M., Leicht, W. and Werber, M.M., 1976. Hydrophobic chromatography and fractionation of enzymes from extremely halophilic bacteria using decreasing concentration gradients of ammonium sulfate. Biochemistry, 15(11): 2383-7.
133. Meyer, H.H., 2005. Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family. Biochim Biophys Acta, 1744(2): 108-19.
134. Mizusawa, S., Court, D. and Gottesman, S., 1983. Transcription of the sulA gene and repression by LexA. J Mol Biol, 171(3): 337-43.
135. Mogk, A. et al., 2004. Broad yet high substrate specificity: the challenge of AAA+ proteins. J Struct Biol, 146(1-2): 90-8.
136. Mojica, F.J., Cisneros, E., Ferrer, C., Rodriguez-Valera, F. and Juez, G., 1997. Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes: the bacterium Halomonas elongata and the archaeon Haloferax volcanii. J Bacteriol, 179(17): 5471-81.
137. Morimoto, R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev, 12(24): 3788-96.
138. Mykles, D.L. and Haire, M.F., 1991. Sodium dodecyl sulfate and heat induce two distinct forms of lobster muscle multicatalytic proteinase: the heat-activated form degrades myofibrillar proteins. Arch Biochem Biophys, 288(2): 543-51.
139. Navon, A. and Goldberg, A.L., 2001. Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. Mol Cell, 8(6): 1339-49.
140. Neher, S.B., Flynn, J.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A., 2003. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. Genes Dev, 17(9): 1084-9.
141. Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V., 1999. AAA+: A

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. Genome Res, 9(1): 27-43.
142. Ng, W.V. et al., 2000. Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(22): 12176-81.
143. Ogura, T. and Tanaka, K., 2003. Dissecting various ATP-dependent steps involved in proteasomal degradation. Mol Cell, 11(1): 3-5.
144. Oren, A., 2000. Halophilic Microorganisms and their Environments. Cellular Origin and Life in extreme conditions, 5. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
145. Orlowski, M., Cardozo, C. and Michaud, C., 1993. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. Biochemistry, 32(6): 1563-72.
146. Ortega, J., Singh, S.K., Ishikawa, T., Maurizi, M.R. and Steven, A.C., 2000. Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. Mol Cell, 6(6): 1515-21.
147. Osmulski, P.A. and Gaczynska, M., 2000. Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20 S proteasome from fission yeast. J Biol Chem, 275(18): 13171-4.
148. Ottosen, S., Herrera, F.J. and Triezenberg, S.J., 2002. Transcription. Proteasome parts at gene promoters. Science, 296(5567): 479-81.
149. Pak, M., Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R. and Wickner, S., 1999. Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ClpA ATP binding site for chaperone activity. J Biol Chem, 274(27): 19316-22.
150. Pak, M. and Wickner, S., 1997. Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(10): 4901-6.
151. Park, E. et al., 2005. Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. J Biol Chem, 280(24): 22892-8.
152. Park, S.K. et al., 1993. Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the clpB gene of Escherichia coli and characterization of its gene products. J Biol Chem, 268(27): 20170-4.
153. Parsell, D.A. and Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet, 27: 437-96.
154. Patel, S. and Latterich, M., 1998. The AAA team: related ATPases with diverse functions. Trends Cell Biol, 8(2): 65-71.
155. Peters, J.M., Franke, W.W. and Kleinschmidt, J.A., 1994. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. J Biol Chem, 269(10): 7709-18.
156. Pickart, C.M., 1997. Targeting of substrates to the 26S proteasome. Faseb J, 11(13): 1055-66.
157. Pickart, C.M. and Cohen, R.E., 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. Nat Rev Mol Cell Biol, 5(3): 177-87.
158. Reid, B.G., Fenton, W.A., Horwich, A.L. and Weber-Ban, E.U., 2001. ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(7): 3768-72.
159. Reuter, C.J., Kaczowka, S.J. and Maupin-Furlow, J.A., 2004. Differential regulation of the PanA and PanB proteasome-activating nucleotidase and 20S proteasomal proteins of the haloarchaeon Haloferax volcanii. J Bacteriol, 186(22):

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

7763-72.
160. Reuter, C.J. and Maupin-Furlow, J.A., 2004. Analysis of proteasome-dependent proteolysis in Haloferax volcanii cells, using short-lived green fluorescent proteins. Appl Environ Microbiol, 70(12): 7530-8.
161. Rivett, A.J., 1993. Characterization of proteasomes isolated from rat liver. Enzyme Protein, 47(4-6): 210-9.
162. Rivett, A.J., 1998. Intracellular distribution of proteasomes. Curr Opin Immunol, 10(1): 110-4.
163. Rockel, B. et al., 1999. Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon Thermoplasma acidophilum as studied by electron tomography. FEBS Lett, 451(1): 27-32.
164. Roder, R. and Pfeifer, F., 1996. Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of Haloferax mediterranei and identification of the endogenous transcriptional activator gene. Microbiology, 142 (Pt 7): 1715-23.
165. Rohrwild, M.C., O., huang, H.C, Moerschell, R.P., Yoo, S.J., seol,J.H., Chung, C.H., and Goldberg, A.L., 1996. HsIV-HsIU: A novel ATP-dependent protease complex in Escherichia coli related to the eukaryotic proteasome. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(12): 5808-13.
166. Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D., 1998. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. Embo J, 17(17): 4909-19.
167. Ruepp, A., Eckerskorn, C., Bogyo, M. and Baumeister, W., 1998. Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in Thermoplasma acidophilum. FEBS Lett, 425(1): 87-90.
168. Russell, S.J., Gonzalez, F., Joshua-Tor, L. and Johnston, S.A., 2001. Selective chemical inactivation of AAA proteins reveals distinct functions of proteasomal ATPases. Chem Biol, 8(10): 941-50.
169. Russell, S.J., Reed, S.H., Huang, W., Friedberg, E.C. and Johnston, S.A., 1999. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. Mol Cell, 3(6): 687-95.
170. Russell, S.J., Sathyanarayana, U.G. and Johnston, S.A., 1996. Isolation and characterization of SUG2. A novel ATPase family component of the yeast 26 S proteasome. J Biol Chem, 271(51): 32810-7.
171. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 3 v. pp.
172. Saric, T., Graef, C.I. and Goldberg, A.L., 2004. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. J Biol Chem, 279(45): 46723-32.
173. Sartorius-Neef, S. and Pfeifer, F., 2004. In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon Halobacterium salinarum. Mol Microbiol, 51(2): 579-88.
174. Sauer, R.T. et al., 2004. Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. Cell, 119(1): 9-18.
175. Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. and Lindquist, S., 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. Trends Biochem Sci, 21(8): 289-96.
176. Schmidt, M., Lupas, A.N. and Finley, D., 1999. Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. Curr Opin Chem Biol, 3(5): 584-91.
177. Schnall, R. et al., 1994. Identification of a set of yeast genes coding for a novel

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. Yeast, 10(9): 1141-55.
178. Seemuller, E. et al., 1995. Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease. Science, 268(5210): 579-82.
179. Seong, I.S. et al., 2002. The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. J Biol Chem, 277(29): 25976-82.
180. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem, 68(5): 850-8.
181. Shockley, K.R. et al., 2003. Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. Appl Environ Microbiol, 69(4): 2365-71.
182. Shuman, S., 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J Biol Chem, 269(51): 32678-84.
183. Song, H.K. et al., 2000. Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26): 14103-8.
184. Sousa, M.C. et al., 2000. Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. Cell, 103(4): 633-43.
185. Stahlberg, H. et al., 1999. Mitochondrial Lon of Saccharomyces cerevisiae is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(12): 6787-90.
186. Straus, D.B., Walter, W.A. and Gross, C.A., 1988. Escherichia coli heat shock gene mutants are defective in proteolysis. Genes Dev, 2(12B): 1851-8.
187. Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P.J. and DeMartino, G.N., 2000. Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. J Biol Chem, 275(8): 5565-72.
188. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol, 185: 60-89.
189. Suzuki, C.K. et al., 1997. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. Trends Biochem Sci, 22(4): 118-23.
190. Swaffield, J.C., Melcher, K. and Johnston, S.A., 1995. A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. Nature, 374(6517): 88-91.
191. Torarinsson, E., Klenk, H.P. and Garrett, R.A., 2005. Divergent transcriptional and translational signals in Archaea. Environ Microbiol, 7(1): 47-54.
192. Torres-Cabassa, A.S. and Gottesman, S., 1987. Capsule synthesis in Escherichia coli K-12 is regulated by proteolysis. J Bacteriol, 169(3): 981-9.
193. Vale, R.D., 2000. AAA proteins. Lords of the ring. J Cell Biol, 150(1): F13-9.
194. Varshavsky, A., 2005. Regulated protein degradation. Trends Biochem Sci, 30(6): 283-6.
195. Verma, R. et al., 2000. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. Mol Biol Cell, 11(10): 3425-39.
196. Walz, J. et al., 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. J Struct Biol, 121(1): 19-29.
197. Watson, K., 1990. Microbial stress proteins. Adv Microb Physiol, 31: 183-223.
198. Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D. and Horwich, A.L., 1999. Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. Nature, 401(6748): 90-3.
199. Weitman, D. and Etlinger, J.D., 1992. A monoclonal antibody that distinguishes latent and active forms of the proteasome (multicatalytic proteinase

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

complex). J Biol Chem, 267(10): 6977-82.
200. Wenzel, T. and Baumeister, W., 1993. Thermoplasma acidophilum proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. FEBS Lett, 326(1-3): 215-8.
201. Wenzel T, B.W., 1995. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. Nat Struct Biol., 2(3): 199-204.
202. Whitby, F.G. et al., 2000. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. Nature, 408(6808): 115-20.
203. Wickner, S. et al., 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(25): 12218-22.
204. Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S., 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. Science, 286(5446): 1888-93.
205. Wilk, S. and Orlowski, M., 1980. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. J Neurochem, 35(5): 1172-82.
206. Wilson, H.L., Aldrich, H.C. and Maupin-Furlow, J., 1999. Halophilic 20S proteasomes of the archaeon Haloferax volcanii: purification, characterization, and gene sequence analysis. J Bacteriol, 181(18): 5814-24.
207. Wilson, H.L., Ou, M.S., Aldrich, H.C. and Maupin-Furlow, J., 2000. Biochemical and physical properties of the Methanococcus jannaschii 20S proteasome and PAN, a homolog of the ATPase (Rpt) subunits of the eucaryal 26S proteasome. J Bacteriol, 182(6): 1680-92.
208. Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(12): 4576-9.
209. Wojtyra, U.A., Thibault, G., Tuite, A. and Houry, W.A., 2003. The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. J Biol Chem, 278(49): 48981-90.
210. Wollenberg, K. and Swaffield, J.C., 2001. Evolution of proteasomal ATPases. Mol Biol Evol, 18(6): 962-74.
211. Xie, Y. and Varshavsky, A., 2000. Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(6): 2497-502.
212. Yao, V.J. and Spudich, J.L., 1992. Primary structure of an archaebacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(24): 11915-9.
213. Yoo, S.J. et al., 1998. Effects of the cys mutations on structure and function of the ATP-dependent HslVU protease in Escherichia coli. The Cys287 to Val mutation in HslU uncouples the ATP-dependent proteolysis by HslvU from ATP hydrolysis. J Biol Chem, 273(36): 22929-35.
214. Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M. and Rechsteiner, M., 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. J Biol Chem, 273(10): 5461-7.
215. Zeth, K. et al., 2002. Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. Nat Struct Biol, 9(12): 906-11.
216. Zhang, X. et al., 2004. The N-terminal coiled coil of the Rhodococcus erythropolis ARC AAA ATPase is neither necessary for oligomerization nor nucleotide hydrolysis. J Struct Biol, 146(1-2): 155-65.
217. Zolkiewski, M., 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from Escherichia coli. J Biol Chem, 274(40): 28083-6.
218. Zwickl, P. and Baumeister, W., 1999. AAA-ATPases at the crossroads of

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006

protein life and death. Nat Cell Biol, 1(4): E97-8.

219. Zwickl, P., Baumeister, W. and Steven, A., 2000. Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. Curr Opin Struct Biol, 10(2): 242-50.

220. Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P. and Goldberg, A.L., 1999. An archaebacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. J Biol Chem, 274(37): 26008-14.

tel-00011475, version 1 - 27 Jan 2006