

## Régulation de la protéolyse : l'action des protéasomes

par David Papapostolou & Michèle Reboud-Ravaux

Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle, Département de Biologie, Institut Jacques Monod, UMR 7592, CNRS-Universités Paris 6 & 7, Tour 43, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.

Courriel : reboud@ccr.jussieu.fr

Reçu le 27 mai 2004

### RÉSUMÉ

Le protéasome est un complexe multicatalytique, trouvé de manière ubiquitaire dans le noyau et le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes. Responsable de la plus grande partie de la protéolyse non lysosomale, il joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des protéines. Il dégrade notamment les protéines oxydées. Outre son rôle de ménage, il intervient dans des processus cellulaires majeurs tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la régulation des gènes. Il présente des propriétés uniques au niveau de

son architecture modulaire, de l'organisation de ses sites actifs et de son fonctionnement. Les sites actifs sont confinés à l'intérieur de la chambre catalytique, ce qui impose un contrôle à l'accès des substrats et favorise leur dégradation itérative. Le développement d'inhibiteurs synthétiques du protéasome, très utiles pour élucider ses différents rôles biologiques, a abouti à la mise sur le marché du Velcade® (bortezomid), ce qui valide cette enzyme en tant que cible dans la lutte anticancéreuse.

### SUMMARY Proteasome and proteolysis

The maintenance of cellular homeostasis and the ability of cells to respond to their environment depend on the degradation of bulk proteins and orderly degradation of key regulatory proteins and their inhibitors. The 26S proteasome plays an essential role in these degradations. It is involved in the activation and inactivation of many cellular processes such as cell cycle progression, apoptosis and regula-

tion of gene expression. It presents unique structural and functional properties. It degrades proteins by an unusual mechanism. Several series of proteasome inhibitors have been developed, useful to elucidate the biological roles of this multicatalytic enzyme. Velcade® (bortezomid) was the first proteasome inhibitor to undergo, in May 2003, clinical trials in cancer patients.

Entre les années 60 et 80, la recherche en Biologie s'est focalisée sur l'étude des acides nucléiques et de la traduction de l'information qu'ils contiennent en protéines nouvellement synthétisées. Comparée à cet effort, l'étude de la dégradation des protéines a été négligée puisque considérée comme un processus non spécifique et non régulé. Malgré la mise en évidence de l'existence d'un renouvellement des protéines dont la durée de vie est très variable, de quelques minutes à plusieurs jours, l'étendue et la spécificité du phénomène n'était pas appréhendée. C'est la découverte en 1978 du système ubiquitine-protéasome et les travaux des deux décennies suivantes qui ont révolutionné le domaine (DeMartino & Goldberg, 1979; Matthews *et al.*, 1989; Hershko, 1996). Il est apparu que la dégradation des protéines cellulaires est un processus hautement complexe, contrôlé dans le temps et soigneusement régulé, qui joue des rôles majeurs dans une grande variété de voies essentielles intervenant

à la fois dans la vie et la mort de la cellule, et donc intéressant les domaines de la santé et des maladies.

Plusieurs systèmes de dégradation intracellulaire des protéines sont connus. La voie lysosomale intervient de façon essentielle dans la dégradation des protéines extracellulaires (hétérophagie) et intracellulaires (autophagie). La voie cytosolique fait intervenir, d'une part, les calpaïnes qui dégradent de manière limitée et sélective un nombre relativement restreint de substrats, d'autre part, le système ubiquitine-protéasome considéré aujourd'hui comme le système protéolytique jouant le rôle majeur à ce niveau. Les études biochimiques d'extraits de cellules de mammifères et les études génétiques chez la levure ont beaucoup contribué à élucider l'importance de son rôle dans la régulation de différents processus cellulaires (Ciechanover, 1994). Le développement d'inhibiteurs du protéasome pénétrant dans les cellules a permis de montrer que ce système multienzymatique est responsable



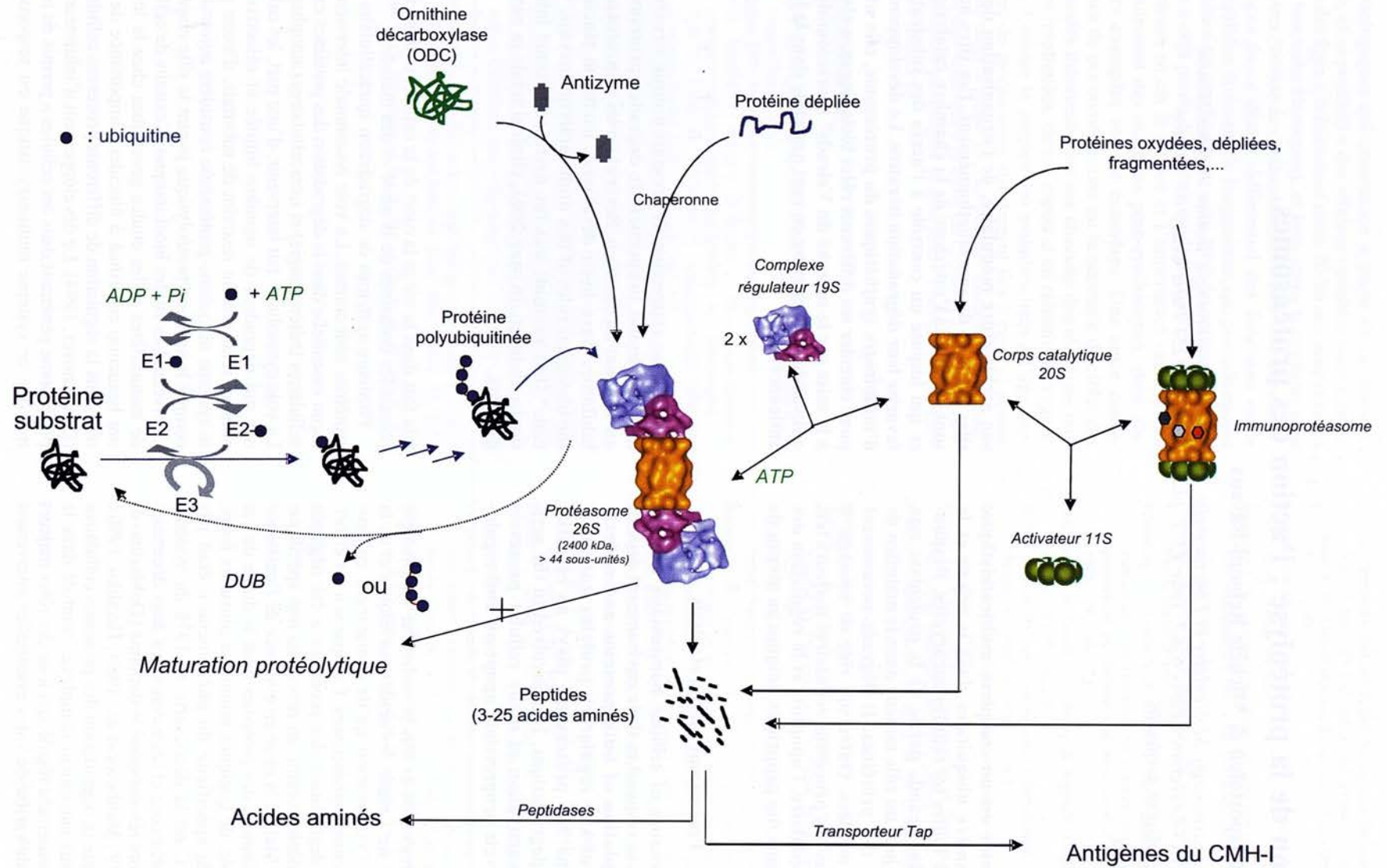


FIG. 1. – La voie ubiquitine-protéasome et les fonctions du protéasome (d'après Kisselev & Golberg, 2001 ; Glickman & Ciechanover, 2001).  
DU : enzymes de désubiquitination. ○ : sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome.



de l'élimination de plus de 80 % des protéines cellulaires (Rock *et al.*, 1994 ; Richardson *et al.*, 2003). Localisé de manière ubiquitaire dans le noyau et le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes, le protéasome peut représenter jusqu'à 1 % du contenu en protéines des cellules à métabolisme actif comme le foie et les testicules.

### UNE MULTIPLICITÉ DE RÔLES PHYSIOLOGIQUES ET UNE IMPLICATION LARGE DANS DES PATHOLOGIES

Le protéasome joue un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie des protéines, que ce soit au niveau de leur quantité ou de leur qualité, rôle qui n'avait pas été soupçonné. Il dégrade à la fois les protéines à courte et à longue durée de vie (Coux *et al.*, 1996 ; Baumeister *et al.*, 1998 ; Hershko & Ciechanover, 1998 ; Voges *et al.*, 1999). En hydrolysant sélectivement les protéines mutées, abîmées, mal repliées (CFTR $\Delta$ F508,  $\alpha$ 1-P1) ou oxydées (protéines âgées), il a un véritable rôle de « ménage ». Ainsi, un tiers des protéines nouvellement synthétisées seraient mal repliées et éliminées par le protéasome (Schubert *et al.*, 2000). Il contrôle aussi la dégradation de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (p27<sup>Kip1</sup>, p21, cyclines), l'expression des gènes et la croissance cellulaire (c-Jun, E2F1, I $\kappa$ B,  $\beta$ -caténine) ; il dégrade des protéines essentielles pour l'apoptose (Bcl-2, cIAP, XIAP) ou la régulation de voies métaboliques (ornithine décarboxylase, HMG-CoA réductase). À l'échelle de l'organisme, il joue un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire, l'oncogenèse (p53, p27<sup>Kip1</sup>, bax, I $\kappa$ B), l'inflammation (I $\kappa$ B, p105 précurseur de NF- $\kappa$ B), la mémoire à long terme (protéine kinase A) et la régulation de l'horloge circadienne (protéine "timeless"). Cette complexité d'action et le rôle critique joué dans les processus cellulaires sous-tendent l'existence de beaucoup d'aberrations observées dans de nombreuses pathologies aussi bien acquises qu'héritées (Plemper & Hammond, 2002). À titre d'exemples, on peut citer des désordres neurologiques affectant diverses protéines : ubiquitine B (syndrome de Down, formes non familiales de la maladie d'Alzheimer), présénilines 1 et

2 (formes familiales précoces de maladie d'Alzheimer),  $\alpha$ -synucléine (forme familiale autosomique dominante de la maladie de Parkinson), huntingtine (maladie de Huntington), protéine prion (maladie de Creutzfeldt-Jacob) ; des carcinomes affectant la protéine p27 (cancers colorectal et du sein) ; des troubles métaboliques affectant par exemple le récepteur CFTR (mucoviscidose) ou l'inhibiteur d'élastase leucocytaire  $\alpha$ 1-P1 (emphysème pulmonaire) ; enfin, des pathologies virales affectant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (infection par le cytomégalovirus) ou le récepteur CD4 (infection par le virus de l'immunodéficience humaine). La mise sur le marché américain au printemps 2003 du bortezomid (VELCADE<sup>®</sup>, précédemment PS341) en vue de traiter le myélome multiple démontre que l'inhibition du protéasome est une nouvelle approche dans le traitement du cancer (Adams, 2003).

### RECONNAISSANCE DES SUBSTRATS PROTÉIQUES ET PROTÉOLYSE

La très grande variété des substrats protéiques pose le problème de la sélection de la protéine qui doit être préférentiellement dégradée (pour une revue : Glickman & Ciechanover, 2001). La reconnaissance des protéines se fait principalement par la voie ubiquitine-protéasome (Fig. 1). Celle-ci comporte deux étapes discrètes successives qui doivent être finement régulées pour dégrader de manière efficace et spécifique une protéine donnée à un moment donné. L'ubiquitination de la protéine substrat par attachement covalent de plusieurs molécules d'ubiquitine (petite molécule ubiquitaire et très conservée de 76 acides aminés) est suivie du processus catalytique de protéolyse par le protéasome 26S (2,4 MDa). Chez l'Homme, une seule enzyme E1 active l'ubiquitine (E1) en catalysant la formation d'une liaison thioester entre le carboxyle de la glycine C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine active de l'enzyme, ce qui nécessite la consommation d'une molécule d'ATP (Fig. 2). L'ubiquitine est ensuite transférée sur le résidu thiol d'une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2 (famille comportant au moins 20 membres) créant ainsi une nouvelle liaison

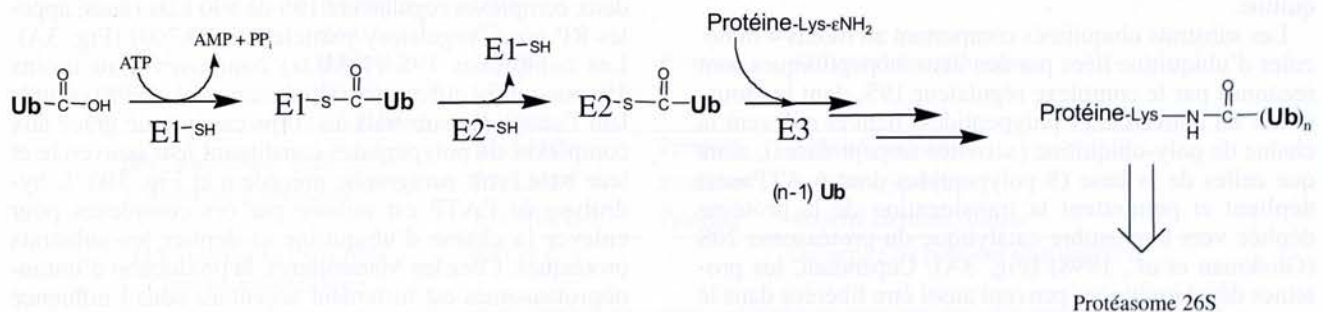


FIG. 2. — La cascade d'activation aboutissant à la poly-ubiquitination du substrat protéique qui sera alors reconnu par le protéasome 26S. E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine ; E2 (ou Ubc) : enzymes de conjugaison à l'ubiquitine ; E3 (ou Ub-ligase) : ubiquitine-protéine ligases.



thioester. Le transfert de cette ubiquitine sur le groupe  $\epsilon$ -aminé d'un résidu lysine du substrat protéique à dégrader crée une liaison isopeptidique. Les ubiquitines suivantes se lient au groupe  $\epsilon$ -aminé de la Lys48 de l'ubiquitine précédemment liée sous l'influence catalytique d'enzymes nommées E3. Celles-ci constituent une grande famille dont le nombre de membres ne cesse d'augmenter (plus d'une centaine). Les enzymes E3 sont responsables de la reconnaissance spécifique d'un substrat *via* des motifs de reconnaissance similaires ou identiques. Cependant, la hiérarchisation des activités enzymatiques décrite ci-dessus est plus compliquée qu'une simple organisation pyramidale : il s'agit plus d'un réseau complexe d'interactions entre les différents composants. Ainsi, des enzymes E3 spécifiques peuvent interagir avec plusieurs E2 et quelques substrats peuvent être reconnus par plusieurs E3. Celles-ci sont constituées d'une protéine ou d'un complexe de protéines qui lient à la fois l'enzyme E2 et le substrat protéique. Les enzymes E3 présentant un domaine en doigt RING servent de matrice pour la rencontre de E2 et du substrat, ce qui permet le transfert efficace de l'ubiquitine activée de E2 au substrat (Jackson *et al.*, 2000 ; Joazeiro & Weissman, 2000). Moins fréquemment (enzymes E3 à domaine HECT), l'ubiquitine est transférée à un résidu Cys de E3 avant sa conjugaison avec un groupe  $\text{NH}_2$  du substrat (Huibregtse *et al.*, 1995 ; Scheffner *et al.*, 1995). Il existe d'autres variantes (enzymes E3 à domaine "U-box") (Koegl *et al.*, 1999). Divers modes de reconnaissance des protéines substrats par les ubiquitine-ligases E3 peuvent être mis en œuvre parmi lesquels on peut citer l'identification de la nature du résidu N-terminal (Bachmair *et al.*, 1986), la reconnaissance de motifs secondaires ayant subi une phosphorylation (Glickman & Ciechanover, 2002) et l'association à une protéine ancillaire (Ciechanover *et al.*, 1998).

La réversibilité de l'ubiquitination constitue un point de régulation supplémentaire puisque la désubiquitination annule le signal de dégradation ce qui permet d'allonger la durée de vie d'une protéine destinée à la dégradation par le protéasome (Lam *et al.* 1997). Cette désubiquitination peut être réalisée par des enzymes de désubiquitination (ou DUB) dans le cytoplasme ou par le protéasome lui-même (Fig. 1). Certaines DUB libèrent des unités simples d'ubiquitine, d'autres des chaînes d'ubiquitine.

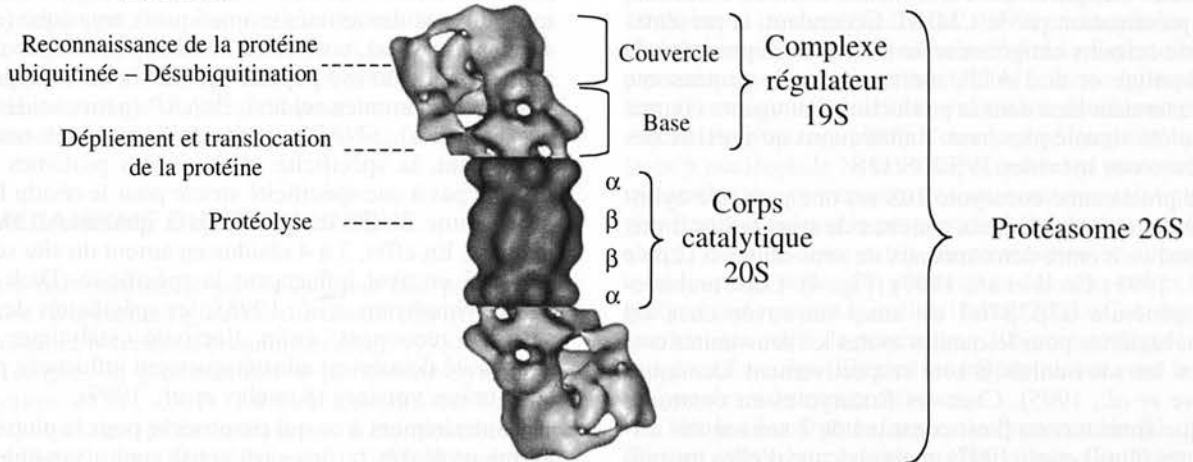
Les substrats ubiquitinés comportant au moins 4 molécules d'ubiquitine liées par des liens isopeptidiques sont reconnus par le complexe régulateur 19S, dont les sous-unités du couvercle (9 polypeptides) lient et enlèvent la chaîne de poly-ubiquitine (activités isopeptidases), alors que celles de la base (8 polypeptides dont 6 ATPases) déplient et permettent la translocation de la protéine dépliée vers la chambre catalytique du protéasome 20S (Glickman *et al.*, 1998) (Fig. 3A). Cependant, les protéines désubiquitinées peuvent aussi être libérées dans le cytosol (Fig. 1). L'action protéolytique du protéasome 20S conduit à la formation de peptides de 3 à 25 acides aminés, avec une longueur moyenne de 7 à 9 acides aminés. Libérés dans le cytosol, la plupart des peptides sont

rapidement hydrolysés par diverses peptidases cellulaires (candidats possibles : THIMET, TPPII, leucine amino peptidase, dipeptidyl peptidase IV (Engel *et al.*, 2003); Tricorn chez les Archéobactéries), ce qui fournit à la cellule de nouvelles ressources d'acides aminés. Quelques-uns des peptides sont présentés par les molécules du complexe majeur d'immunohistocompatibilité CMH-I après fixation au transporteur Tap (Fig. 1).

Dans quelques cas, les protéines sont ciblées vers le protéasome 26S en dehors de toute ubiquitination (Fig. 1). C'est par exemple le cas de l'ornithine décarboxylase (ODC) qui est reconnue et hydrolysée par le protéasome après qu'elle ait été complexée à une autre protéine, l'antizyme (Hoyt *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2003 et 2004). Il semble aujourd'hui que la voie indépendante de l'ubiquitine ait été sous-estimée (Orlowski & Wilk, 2003) puisque plusieurs protéines, parmi lesquelles les protéines c-Fos (Bossis *et al.*, 2003) et p21 (Sheaff *et al.*, 2000), sont dégradées physiologiquement par le protéasome d'une manière indépendante de l'ubiquitine. Il faut remarquer qu'il existe des protéines dépourvues de lysine. Le protéasome 20S peut aussi dégrader les protéines oxydées en dehors de tout processus préalable d'ubiquitination (Shringarpure *et al.*, 2003). Des protéines dépliées peuvent également être reconnues directement par le complexe 19S ou après association à une protéine chaperonne (Braun *et al.*, 1999 ; Strickland *et al.*, 2000). Enfin, par des mécanismes non totalement compris, le protéasome est capable de réaliser des maturations. C'est le cas par exemple des précurseurs p105 et p100 des protéines p50 et p52 qui sont respectivement des constituants des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (Palombella *et al.*, 1994) et NF- $\kappa$ B2 (Heusch *et al.*, 1999). La séquence GRR au centre de la protéine interviendrait en tant que signal de maturation (Sears *et al.*, 1998).

## UNE ARCHITECTURE HIÉRARCHISÉE : STRUCTURE DES PROTÉASOMES

Machine à protéolyser multifonctionnelle, le protéasome 26S des eucaryotes a des propriétés uniques le distinguant des enzymes protéolytiques typiques. Le corps catalytique 20S (720 kDa) est pris en sandwich entre deux complexes régulateurs 19S de 890 kDa (aussi appelés RP pour "regulatory particle" ou PA700) (Fig. 3A). Les complexes 19S (1 MDa) composés d'au moins 19 sous-unités différentes (Glickman *et al.*, 1998) contrôlent l'accès des substrats au corps catalytique grâce aux complexes de polypeptides constituant leur couvercle et leur base (voir paragraphe précédent et Fig. 3B). L'hydrolyse de l'ATP est utilisée par ces complexes pour enlever la chaîne d'ubiquitine et déplier les substrats protéiques. Chez les Mammifères, la production d'immunoprotéasomes est fortement accentuée sous l'influence du puissant stimulant de la réponse immunitaire qu'est l'interféron  $\gamma$ . Celui-ci provoque l'expression de trois nouvelles sous-unités  $\beta$  et d'un complexe heptamérique, le complexe 11S ou PA28 (Fig. 1 et 3B). Cet édifice

**A****Fonctions****B**

| Sous-complexe      | Sous-unité<br>(nomenclature<br><i>S. cerevisiae</i> )                                                                      | Homologue<br>mammifère                                  | Activité<br>catalytique          | Fonction                                                                                                                 |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19S couvercle      | Rpn11                                                                                                                      |                                                         | Isopeptidase                     | Décrochage de la chaîne de poly-Ub                                                                                       |
|                    | Rpn3-9 et<br>Rpn12-13                                                                                                      |                                                         |                                  | Reconnaissance de l'Ub ?<br>Interaction avec des protéines auxiliaires                                                   |
|                    | Rpn1-2<br>Rpn10                                                                                                            |                                                         |                                  | Stabilise l'interaction couvercle-base                                                                                   |
| 19S base           | Rpt1-6                                                                                                                     |                                                         | ATPase                           | Dépliage et translocation du substrat<br>Ouverture du pore des sous-unités<br>Interaction avec des protéines auxiliaires |
|                    | $\alpha$ 1/C7<br>$\alpha$ 2/Y7<br>$\alpha$ 3/Y13<br>$\alpha$ 4/PRE6<br>$\alpha$ 5/PUP2<br>$\alpha$ 6/PRE5<br>$\alpha$ 7/C1 | iota<br>C3<br>C9<br>C6<br>zeta<br>C2<br>C8              |                                  | Compartmentation, contrôle de l'accès du<br>substrat au corps catalytique                                                |
| 20S<br>constitutif | $\beta$ 1/PRE3<br>$\beta$ 2/PUP1<br>$\beta$ 3/PUP3<br>$\beta$ 4/C11<br>$\beta$ 5/PRE2<br>$\beta$ 6/C5<br>$\beta$ 7/PRE4    | delta<br>Z<br>C10<br>C7<br>X/MB1<br>C5<br>N3/beta       | Protéase<br>Protéase<br>Protéase | Activité post-acide<br>Activité trypsique<br>Activité chymotrypsique                                                     |
|                    | 20S : sous-unités inductibles<br>(Immunoprotéasome)                                                                        | $\beta$ 1i/LMP2<br>$\beta$ 2i/LMP7<br>$\beta$ 5i/MECL-1 | Protéase<br>Protéase<br>Protéase | Activité post-acide<br>Activité trypsique<br>Activité chymotrypsique                                                     |
|                    | 11S : complexe inductible<br>(Immunoprotéasome)                                                                            | REG $\alpha$ $\beta$ , $\gamma$                         |                                  | Ouverture du pore des sous-unités $\alpha$                                                                               |

FIG. 3. – Le protéasome et ses sous-complexes. A. Le protéasome 26S est composé d'un corps catalytique 20S (720 kDa) et de deux complexes régulateurs 19S (890 kDa) (d'après Voges *et al.*, 1998). B. Les sous-unités constitutives et inductibles des sous-complexes et leur fonction.



modifie la qualité des peptides issus de la dégradation des protéines (longueur de 8 à 9 acides aminés) favorisant leur présentation par le CMH-I. Cependant, la présentation de certains antigènes reste fortement dépendante de l'ubiquitine et de l'ATP, montrant que le protéasome 26S intervient bien dans la production d'antigènes comme cela a été signalé plus haut. Remarquons qu'il existe des protéasomes hybrides 19S/20S/11S.

Le protéasome eucaryote 20S est une particule cylindrique constituée de deux anneaux de sous-unités  $\beta$  pris en sandwich entre deux anneaux de sous-unités  $\alpha$  (Lowe *et al.*, 1995 ; Groll *et al.*, 1997) (Fig. 4). Cette architecture générale  $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$  est aussi retrouvée chez les Archéobactéries pour lesquelles toutes les sous-unités  $\alpha$  et toutes les sous-unités  $\beta$  sont respectivement identiques (Löwe *et al.*, 1995). Chez les Eucaryotes au contraire, chaque anneau  $\alpha$  ou  $\beta$  est constitué de 7 sous-unités différentes (Groll *et al.*, 1997), mais chacune d'elles est présente en deux copies occupant des sites uniques (Fig. 4B). Chaque anneau  $\beta$  contient 3 sites actifs différents identifiés en cristallographie par la fixation d'inhibiteurs peptidiques (Groll & Huber, 2003). Sur la base de la réaction avec des petits substrats synthétiques (Fig. 4), on distingue cinq types de spécificité nommées en fon-

ction de la nature du résidu P1 indiqué entre parenthèses et situé en amont de la liaison amide coupée : chymotrypsique (acides aminés aromatiques), trypsique (acides aminés basiques), post-acide aussi appelée "hydrolysant un peptidylglutamyl peptide" (PGDH) ou de type caspase (acides aminés acides), BrAAP (petits acides aminés branchés), SNAPP (petits acides aminés neutres). Cependant, la spécificité vis-à-vis des protéines ne se ramène pas à une spécificité stricte pour le résidu P1. Le protéasome coupe les protéines à quasiment tous les niveaux. En effet, 3 à 4 résidus en amont du site sécable et 2 à 3 en aval influencent la spécificité (Dick *et al.*, 1998 ; Nussbaum *et al.*, 1998) ; les spécificités des sites actifs se recoupent ; enfin, l'activité catalytique d'une sous-unité donnée est allostériquement influencée par les sous-unités voisines (Kisselev *et al.*, 1999).

Contrairement à ce qui est observé pour la plupart des autres protéases où les sites actifs sont accessibles, les sites actifs du protéasome sont donc confinés (Baumeister *et al.*, 1998). Ceci crée une véritable compartimentation empêchant une destruction incontrôlée de l'ensemble des protéines cellulaires. De plus, cette organisation du protéasome favorise la dégradation itérative des protéines. Celles-ci sont en effet coupées en de multiples

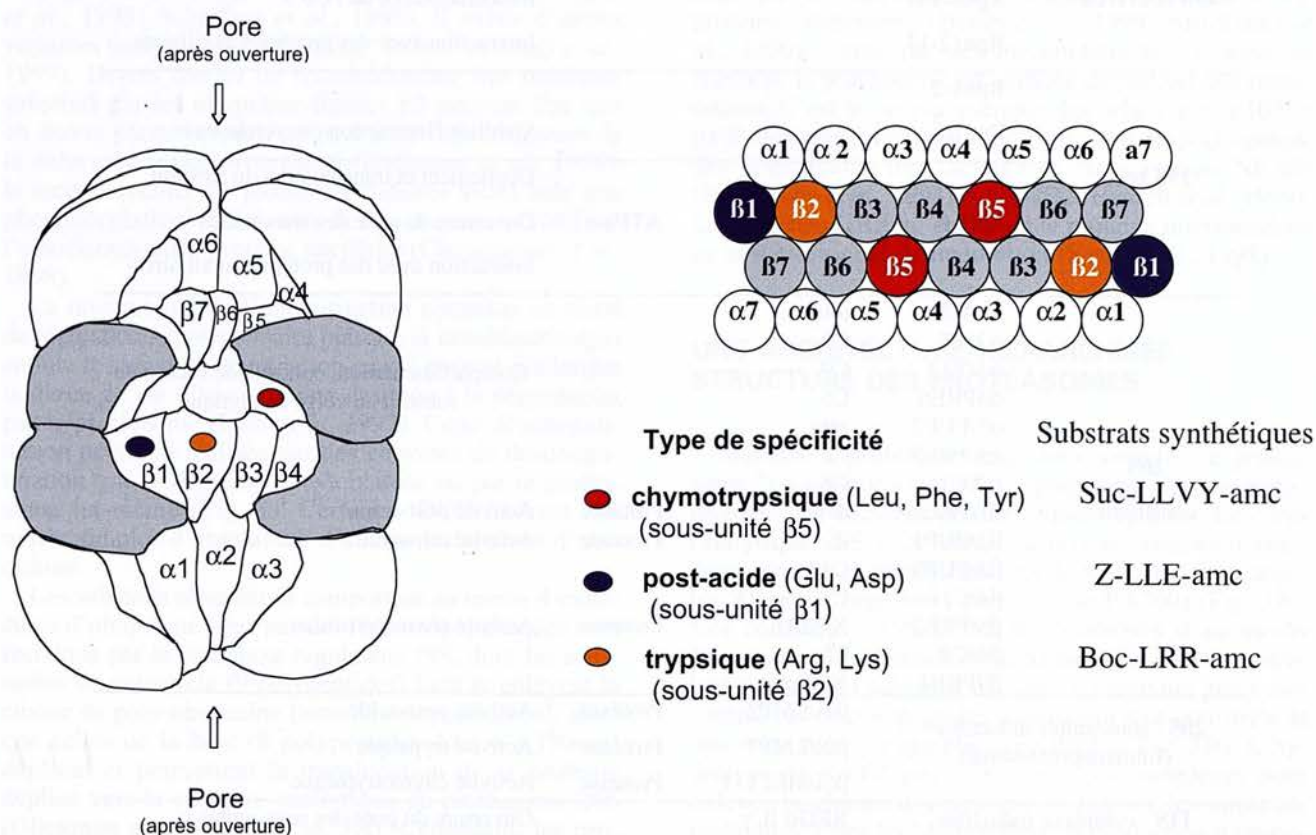


FIG. 4. – Représentation schématique du protéasome 20S. A. La coupe du cylindre creux formé par la particule 20S permet de montrer les arrangements des sous-unités entre elles ainsi que les positions des sites actifs (3 × 2) (d'après Kisselev & Goldberg, 2001). Les flèches indiquent les pores (montrés ouverts) par lesquels les substrats doivent entrer et les produits sortir. Dans le protéasome isolé de levure, ces pores sont obstrués par les extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha 3$ . amc : 7-amido-4-méthylcoumarine ; Suc : succinyl ; Z : beuryloxy-carbonyl ; Boc : *tert*-butyloxy-carbonyl. B. Positionnement relatif des sous-unités du protéasome 20S de levure.



endroits jusqu'à générer des peptides constitués de 2 à 23 acides aminés. Capables de diffuser vers l'extérieur, ces peptides sont donc les produits finaux libérés avant que ne pénètre le prochain substrat. À partir d'une protéine donnée et de manière stable en fonction du temps, on obtient la même distribution pour les peptides générés (Kisselev *et al.*, 1998 ; Nussbaum *et al.*, 1998).

## UN MÉCANISME D'ACTION UNIQUE

Autre particularité, le protéasome est une protéase à thréonine. Il appartient à la nouvelle famille des hydrolases à nucléophile N-terminal (Brannigan *et al.*, 1995) comme, par exemple, la glucosamine-6-phosphate synthase (Teplyakov *et al.*, 2001). La thréonine qui est l'acide aminé 1 des sous-unités catalytiques a été identifiée par mutagenèse dirigée (Seemüller *et al.*, 1995 ; Kisselev *et al.*, 2000), cristallographie aux rayons X de protéasomes provenant de *Thermoplasma acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) ou de Levure (Groll *et al.*, 1997) et complexés avec l'inhibiteur peptidique de calpaïne I, AcLLnL-al, ainsi que par marquage avec divers inhibiteurs tels que la lactacystine (Fenteany *et al.*, 1995) et des vinylsulfones peptidiques (Bogyo *et al.*, 1997). Comme pour les autres hydrolases à nucléophile N-terminal, il existe un processus de maturation des précurseurs des sous-unités catalytiques  $\beta$  permettant d'enlever le propeptide. L'inhibiteur AcLLnL-al fixé dans les sites actifs du protéasome se superpose avec les propeptides des précurseurs des sous-unités catalytiques non matures (Groll & Huber, 2003). Ceci suggère que les sites actifs du protéasome 20S sont configurés à la fois pour l'autolyse libérant les propeptides et pour la protéolyse des substrats protéiques.

Chez les Eucaryotes, seules les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  sont actives sur le plan protéolytique. Contrairement

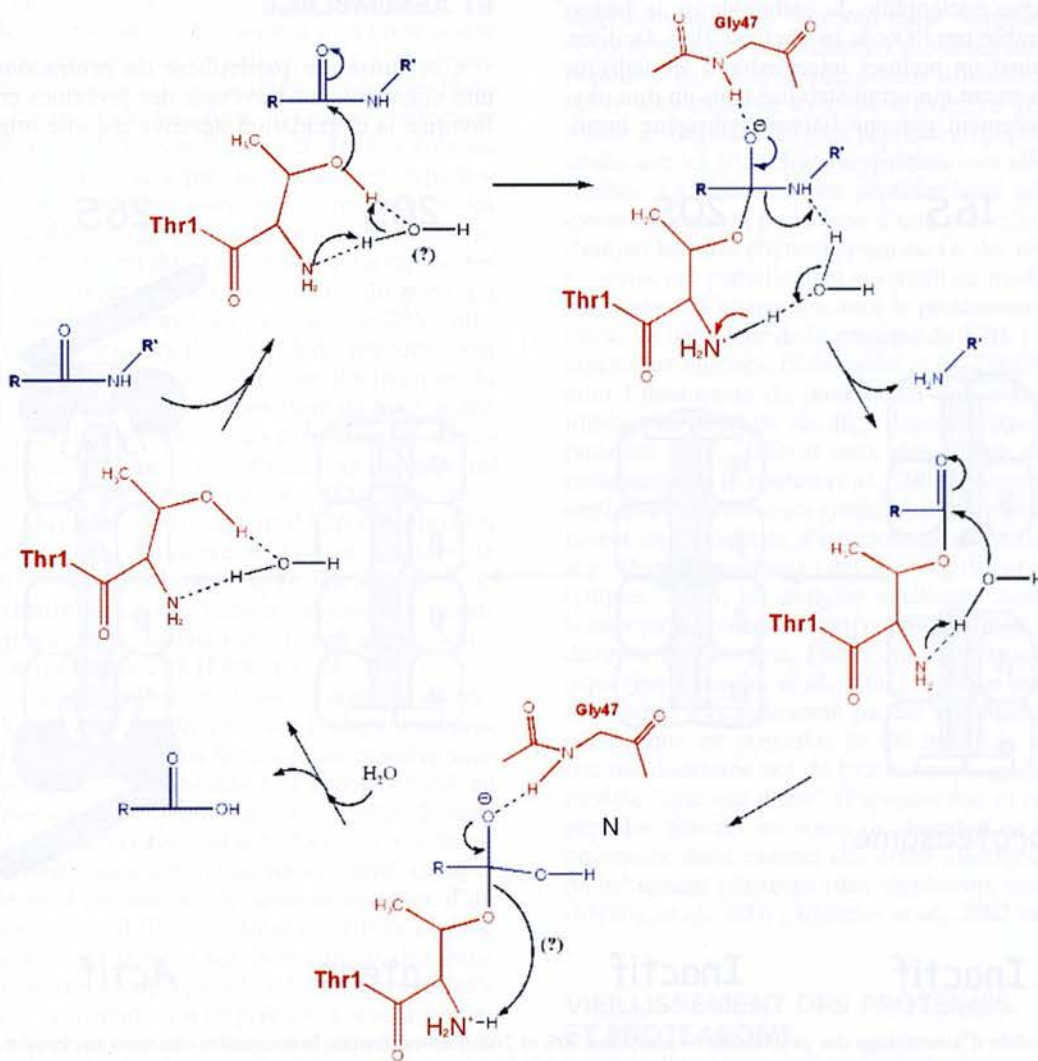


FIG. 5. – Hypothèse de mécanisme pour l'hydrolyse des liaisons peptidiques par le protéasome. Dans ce schéma, il a été tenu compte de la molécule d'eau structurale suggérée par les travaux de cristallographie (d'après Kisselev & Goldberg, 2001 ; Groll & Huber, 2003).

à ce qui est observé chez les Archéobactéries, les sous-unités  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  et  $\beta 7$  sont en effet inactives. Par mutagenèse dirigée, on n'a pas réussi à les rendre actives alors que la géométrie du squelette peptidique est correcte et que la majorité des résidus construisant le site actif est conservée (Groll *et al.*, 1999).

Une molécule d'eau est localisée au voisinage de l'azote  $\alpha\text{NH}_2$  de la Thr1 et jouerait vraisemblablement un rôle dans le transfert des protons (Groll *et al.*, 1997) (Fig. 5). Parmi les six résidus situés à proximité de l'Oy de la Thr1, on trouve les résidus Glu/Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 et Ser169 dont la présence semble essentielle pour la catalyse. Très probablement chargée dans l'environnement du site actif, la Lys33 ne peut jouer le rôle d'accepteur de proton comme le fait le résidu His57 des protéases à sérine. Elle est impliquée dans un pont salin avec l'Asp17. Par son potentiel électrostatique, elle pourrait diminuer le  $\text{pK}_a$  du groupe aminé N-terminal de la Thr1, ce qui permettrait à celui-ci d'accepter plus facilement un proton de la molécule d'eau (Groll *et al.*, 1997; Arendt & Hochstrasse, 1999) : l'attaque nucléophile du carbonyl de la liaison peptidique sécable par l'Oy de la Thr1 est alors facilitée. Il se forme ainsi un premier intermédiaire tétraédrique chargé négativement qui serait stabilisé dans un trou oxyanion principalement par une liaison hydrogène impli-

quant le groupe amine de la Gly47. La formation de l'acyl-enzyme s'accompagne du départ du premier produit de la réaction  $\text{R}'\text{-NH}_2$  (Fig. 5) correspondant à la partie C-terminale du substrat protéique. L'hydrolyse de l'acyl-enzyme fait intervenir une molécule d'eau activée par le même processus que précédemment. Le deuxième intermédiaire tétraédrique formé, stabilisé dans le trou oxyanion, se décompose pour former le deuxième produit  $\text{RCOOH}$  correspondant à la partie N-terminale du substrat. Le site actif se retrouve dans l'état de départ. Pour l'autolyse du propeptide des sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  immatures, le groupe  $\alpha\text{-NH}_2$  de la Thr1 n'est pas libre puisqu'il est impliqué dans une liaison peptidique. Une molécule d'eau a été trouvée correctement positionnée pour agir en tant que catalyseur basique et arracher un proton de l'Oy de la Thr1 (Groll *et al.*, 1997).

### UN ACCÈS CONTRÔLÉ À LA CHAMBRE CATALYTIQUE – LATENCE ET ASSEMBLAGE

L'organisation particulière du protéasome empêche une dégradation à l'aveugle des protéines endogènes et favorise la dégradation itérative car elle impose de très

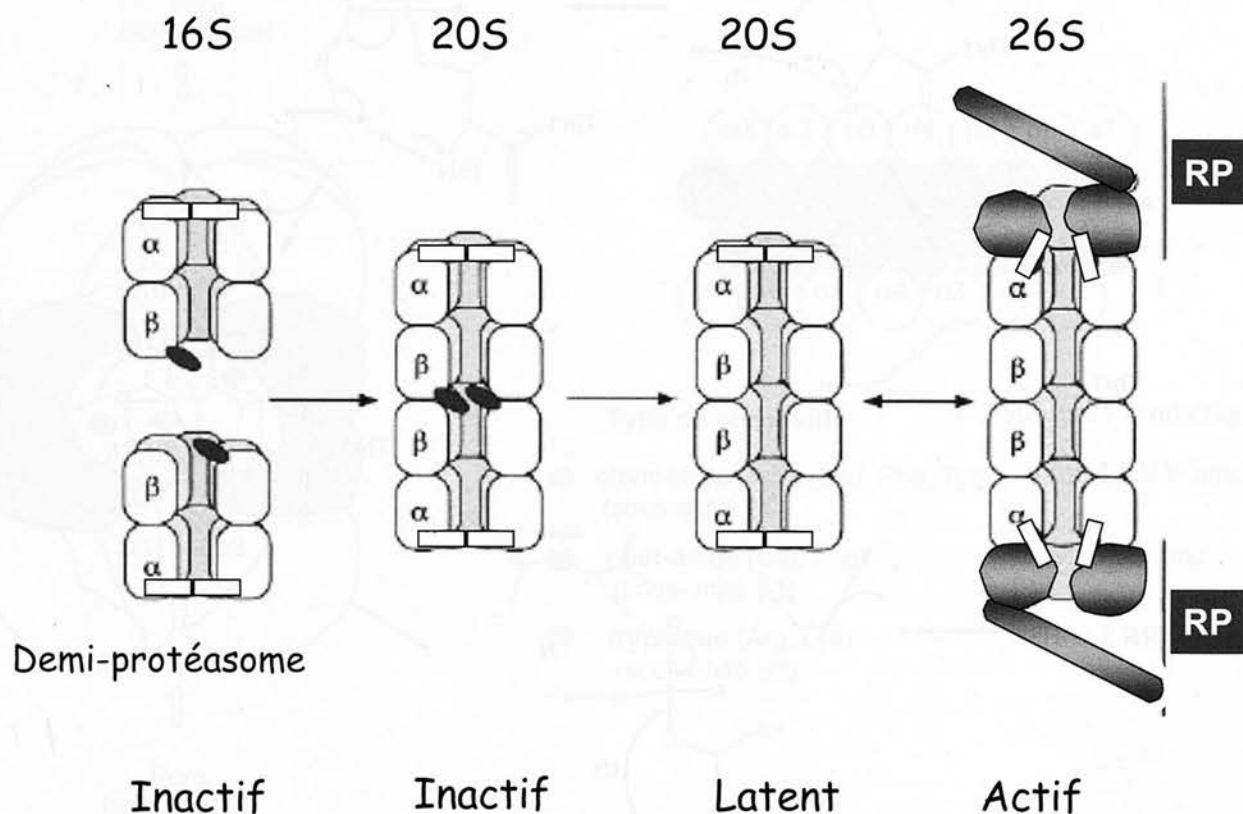


FIG. 6. – Modèle d'assemblage des protéasomes eucaryotes 20S et 26S. Les extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont représentées par des rectangles hachurés et des petites pastilles aplaties gris foncé, respectivement. La coupure autocatalytique des extrémités N-terminales des précurseurs des sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  permet de passer du protéasome 20S inactif au protéasome 20S latent. L'association avec le complexe régulateur RP permet l'ouverture du pore par réarrangement des extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha$  (d'après Groll *et al.*, 2000).



fortes contraintes pour l'accès des substrats à la chambre catalytique et pour la libération des produits (Akopian *et al.*, 1997). La structure cristallographique du protéasome de *Thermoplasma* montre l'existence de deux pores d'accès d'environ 13 Å de diamètre constitués par les sous-unités  $\alpha$  (Löwe *et al.*, 1995) alors qu'il n'y a pas d'accès à la chambre catalytique du protéasome 20S de levure (Groll *et al.*, 1997). Quelques fenêtres latérales sont présentes au niveau de l'interface entre sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  conduisant aux thréonines actives mais elles semblent trop étroites pour permettre l'accès des substrats (Groll & Huber, 2003). Les extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha$  obstruent l'accès à la chambre catalytique. L'activité catalytique du protéasome 20S est alors réduite (Fig. 6). Il est dit à l'état latent car l'activité peut être stimulée : 1) par l'interaction avec les sous-unités régulatrices 19S conduisant à la formation du protéasome 26S ; 2) par les complexes régulateurs 11S (immunoprotéasome) ; 3) par des traitements chimiques doux tels que de faibles concentrations de dodécylsulfate de sodium (SDS). La délétion des 9 résidus de l'extrémité N-terminale de la sous-unité  $\alpha 3$  (mutant 3DN) conduit à un protéasome dans lequel on constate, par cristallographie, l'ouverture d'un pore de dimensions comparables à celui de *Thermoplasma* ; l'activité peptidasique du mutant est forte et non activable par le SDS (Groll *et al.*, 2000). Par ailleurs, la structure cristallographique du mutant est superposable à celle de l'enzyme sauvage, ce qui exclut des remaniements allostériques de la structure. L'hydrolyse facilitée des substrats est due à une entrée plus rapide des protéines à hydrolyser grâce à l'ouverture du pore. La résolution cristallographique du protéasome 20S complexé avec le complexe régulateur 11S de *Trypanosoma brucei* (aussi appelé 26S) suggère que l'activation du protéasome 20S résulterait de l'ouverture du pore, grâce au désordre introduit au niveau des extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha$  par l'interaction avec les sous-unités du complexe 26S (Whitby *et al.*, 2000). Une nouvelle analyse du cristal du régulateur PA26 complexé au protéasome de levure montre au contraire, dans le modèle activé, une conformation symétrique (C7) et ordonnée stabilisée par des liaisons hydrogène impliquant un agrégat de 4 résidus très conservés des sous-unités  $\alpha$  du protéasome 20S (Förster *et al.*, 2003).

On dispose d'indications sur l'assemblage du protéasome 20S (Voges *et al.*, 1998) (Fig. 6). Il s'agit d'un processus ordonné et régulé. Si on le résume de manière simplifiée, les sous-unités  $\alpha$  s'assemblent spontanément en anneaux heptamériques auxquels les sous-unités  $\beta$  viennent s'associer de façon ordonnée conduisant au précurseur 16S ou demi-protéasome catalytiquement inactif. Celui-ci est donc formé d'un anneau de sous-unités  $\alpha$  et d'un anneau de sous-unités  $\beta$  (Baumeister *et al.*, 1998). Dans le demi-protéasome, les propeptides N-terminaux des sous-unités  $\beta$  catalytiques occupent le site actif. Le clivage autocatalytique des propeptides est un processus ordonné reflétant la hiérarchisation des sites, l'activation des sous-unités se faisant dans l'ordre  $\beta 5$ ,  $\beta 2$ , puis  $\beta 1$  (Jager *et al.*, 1999). Cette maturation conduisant au protéasome 20S latent est couplée à l'association des deux demi-protéasomes.

L'assemblage du protéasome fait intervenir des facteurs protéiques tels que hsp73 et POMP ("proteasome maturation protein") (Witt *et al.*, 2000). La dernière étape est la formation du protéasome 26S actif lorsque se fixe la particule régulatrice RP, ce qui permet l'ouverture du canal par suite du réarrangement des extrémités N-terminales des sous-unités  $\alpha$ . La problématique de l'assemblage du protéasome n'est pas complètement résolue car il existe un équilibre dynamique entre le protéasome 26S et ses différents constituants (Coux, 2002 et 2003).

### UNE DÉGRADATION ITÉRATIVE DES PROTÉINES : MODÈLE "BITE AND CHEW" ET/OU MODÈLE "TWO-SITE MODIFIER"

Le premier modèle proposé pour expliquer la dégradation des protéines par le protéasome (Kisselev *et al.*, 1999) se fonde sur la hiérarchisation des activités du protéasome, l'action des sites chymotrypsiques étant prépondérante. Le modèle cyclique du "bite and chew" suppose que les sites chymotrypsiques dégradent les protéines substrats en gros peptides. Par suite d'interactions allostériques, les sites actifs post-acides se trouvent activés, ce qui va leur permettre de dégrader les gros peptides en peptides plus petits tandis que les sites chymotrypsiques sont allostériquement inhibés. La libération des peptides ainsi générés dans le cytosol permet la protéolyse d'une nouvelle protéine substrat par les sites chymotrypsiques. Or des résultats expérimentaux ont partiellement contredit ce modèle. L'analyse cinétique de l'interaction avec le protéasome 20S du Ritonavir, un inhibiteur de la protéase du VIH-1 utilisé en thérapeutique humaine (Schmidtke *et al.*, 2000), nos résultats pour l'interaction du protéasome 26S avec des peptides mimant les produits de dégradation des protéines (Papapostolou *et al.*, 2002) et ceux plus récents de Goldberg et collaborateurs (Kisselev *et al.*, 2003) pour des interactions impliquant des substrats synthétiques du protéasome sont en faveur de l'existence d'interactions allostériques entre les sites chymotrypsiques et des sites régulateurs dits non catalytiques. Ainsi, les analyses cinétiques montrent que des hexapeptides chargés négativement se fixent sur deux sites distincts de l'enzyme, l'un d'eux étant le site chymotrypsique (Papapostolou *et al.*, 2002). Lorsque le site post-acide est bloqué spécifiquement par un inhibiteur, le processus allostérique est conservé, ce qui exclut le site post-acide comme deuxième site de fixation ainsi que le prévoyait le modèle "bite and chew" (Papapostolou *et al.*, 2002). Les peptides générés en cours de dégradation des protéines pourraient donc exercer des effets allostériques. Il existe probablement plusieurs sites régulateurs non catalytiques (Myung *et al.*, 2001 ; Kisselev *et al.*, 2002 et 2003).

### VEILLISSEMENT DES PROTÉINES ET PROTÉASOME

Au cours du vieillissement et dans certains états pathologiques tels que les maladies d'Alzheimer et de Par-



kinson, les protéines altérées par des modifications post-traductionnelles (oxydation, glycation, conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique) s'accumulent (Bertlett & Stadtman, 1997 ; Stadtman, 2001). Bien qu'il existe quelques processus de réparation des protéines oxydées (thiorédoxine/thiorédoxine réductase, peptide méthionine sulfoxyde réductases) (Picot *et al.*, 2004), l'équilibre entre protéines natives et protéines endommagées peut être perturbé par l'accumulation des protéines abîmées (Friguet, 2002 ; Grune *et al.*, 2003). Le protéasome représente le système principal d'élimination des protéines altérées (oxydées) : il participe au contrôle de la qualité des protéines qui est strict dans les cellules jeunes. Un déséquilibre entre synthèse de protéines et capacité protéolytique contribue à l'accumulation des protéines pontées, ce qui peut être dû à plusieurs perturbations du métabolisme cellulaire : baisse génétiquement déterminée de la susceptibilité à la protéolyse de la protéine ou augmentation de la capacité d'agrégation souvent favorisée par un allongement de la durée de vie de la protéine rendant plus probable l'oxydation d'agrégats. L'accumulation de ceux-ci peut aussi être due à une augmentation des modifications post-traductionnelles pouvant changer la susceptibilité à la protéolyse (cas de l'oxydation et de la phosphorylation de certaines protéines), ou simplement contribuer à déborder les capacités dégradatives des systèmes protéolytiques. Enfin, un déséquilibre

entre synthèse des protéines et capacités dégradatives explique l'accumulation de protéines pontées (Friguet, 2002 ; Mack *et al.*, 2001 ; Weimer *et al.*, 2002). Avec le temps, ces agrégats créent un matériel hautement ponté (lipofuscine, céroïde ou AGEs pour "advanced glycation end-products") (Yin, 1996).

Il existe un consensus pour considérer que la dégradation des protéines diminue avec l'âge (Ward, 2002). En ce qui concerne la voie lysosomale, la dégradation hétérophagique des protéines extracellulaires serait peu affectée, voire augmentée (Ward 2000 et 2002), alors que la voie macroautophagique et l'autophagie médiée par les chaperonnes seraient diminuées. Au niveau de la voie cytosolique, l'activité des calpaïnes augmente avec l'âge, donc ces enzymes ne peuvent être invoquées pour expliquer le déclin avec l'âge de la dégradation des protéines (Saito *et al.* 1993 ; Glaser *et al.*, 1994). L'activité post-acide du protéasome diminue avec l'âge (Conconi *et al.*, 1996 ; Shibatani *et al.*, 1996 ; Anselmi *et al.*, 1998 ; Hayashi & Goto, 1998 ; Keller *et al.*, 2000) alors que des résultats contradictoires sont observés pour les activités chymotrypsique et trypsique. En résumé, la perte d'activité du protéasome avec l'âge, bien admise aujourd'hui, peut donc être expliquée par une baisse de l'expression du protéasome, une altération ou remplacement de ses sous-unités ou un effet inhibiteur des protéines endommagées (Carrard *et al.*, 2002).

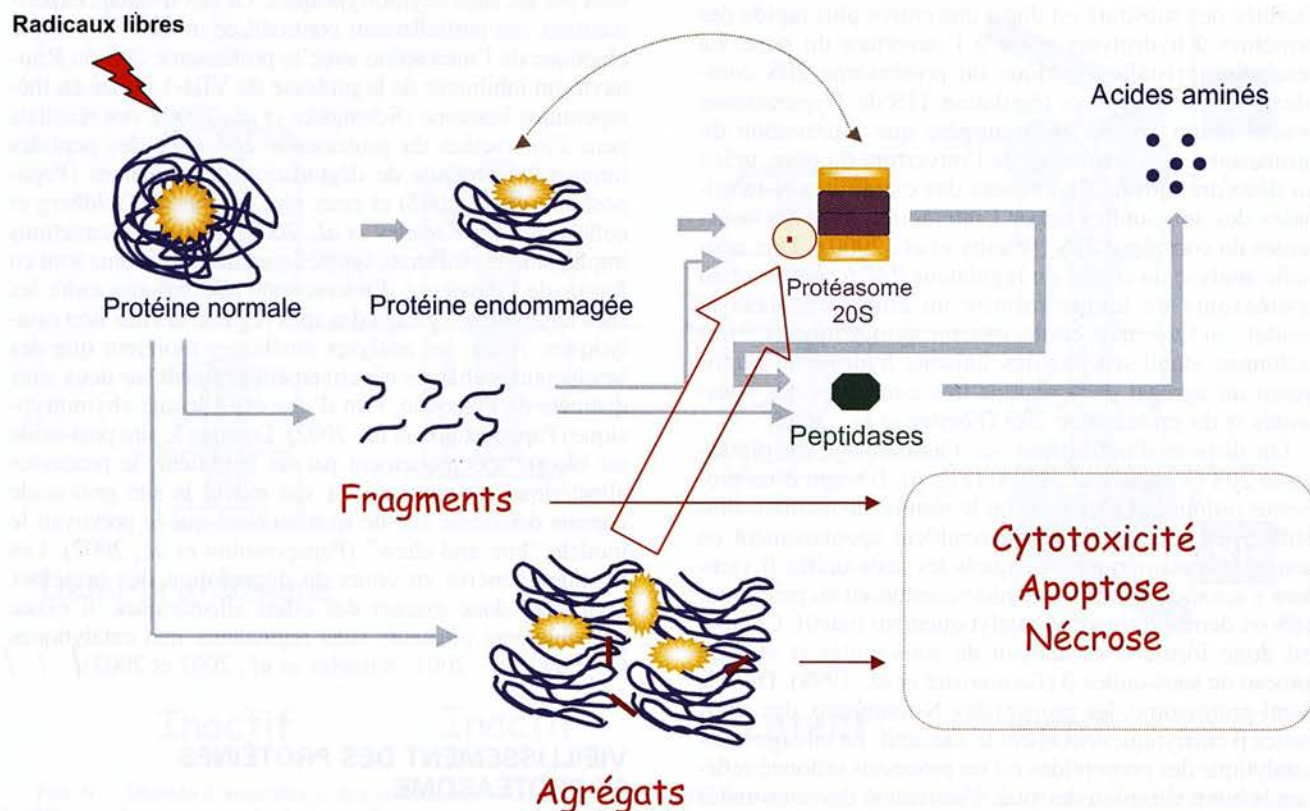


FIG. 7. – Proposition de mécanisme pour la dégradation des protéines oxydées par le protéasome 20S, leur fragmentation chimique et leur agrégation (d'après Davies, 2001 et Grune *et al.*, 2003).



## LA DÉGRADATION DES PROTÉINES OXYDÉES

Différentes expérimentations (purification d'activités enzymatiques, immunoprécipitation, utilisation d'oligonucléotides antisens) sont en faveur d'une implication forte du protéasome 20S dans la reconnaissance et la dégradation des protéines oxydées dans les cellules eucaryotes (Davies *et al.*, 2001). Au contraire, le stress oxydatif inactiverait le protéasome 26S ainsi que l'activation et la conjugaison à l'ubiquitine (Reinheckel *et al.*, 1998; Obin *et al.*, 1998). Davies a fait l'hypothèse que les protéines oxydées pourraient être dégradées sans conjugaison à l'ubiquitine et sans intervention d'ATP (Davies, 2001). Cette proposition de mécanisme est représentée sur la figure 7. Elle s'appuie notamment sur le changement biphasique de la susceptibilité à la protéolyse d'un certain nombre de substrats lorsqu'ils sont exposés aux oxydants : cette susceptibilité augmente à des concentrations modérées d'oxydants alors qu'elle diminue à des concentrations plus fortes (Grune *et al.*, 2003). Les stress oxydants doux (2 à 9 acides aminés oxydés par molécule de protéine), résultant du stress oxydatif normal et de sa production de radicaux libres, conduisent à un réarrangement de la structure secondaire et tertiaire de la protéine. Ainsi, des groupes hydrophobes qui étaient normalement enfouis dans leur cœur se trouvent exposés à la surface et peuvent se lier directement au domaine hydrophobe de liaison des sous-unités  $\alpha$ . Une dégradation rapide des protéines oxydées est ainsi assurée, sans qu'il y ait recours à la polyubiquitination et à l'hydrolyse de l'ATP. Une fragmentation chimique directe peut aussi avoir lieu dans ces conditions conduisant à des fragments dégradés par des peptidases. En cas de stress oxydants sévères où plus de 10 acides aminés sont oxydés par molécule de protéine (réponse inflammatoire, exposition à des oxydants extérieurs comme l'ozone), ou si l'activité du protéasome est insuffisante, on observe une augmentation de la fragmentation chimique directe des protéines ainsi qu'une augmentation de leur réticulation par formation de liaisons covalentes et des interactions hydrophobes entre protéines voisines. Apparaissent alors des agrégats de protéines qui peuvent s'accumuler à l'intérieur des cellules sous forme de corps d'inclusion (corps de Heinz, lipofuscine...). Ces agrégats peuvent perturber le métabolisme cellulaire et être cytotoxiques. On sait depuis longtemps qu'ils sont résistants à la protéolyse. On sait aujourd'hui qu'ils se lient au protéasome et l'inhibent irréversiblement (Grune *et al.*, 2003). Au cours du vieillissement et dans plusieurs pathologies dégénératives, il existerait un véritable cercle vicieux avec accroissement d'oxydation cellulaire, augmentation de protéines oxydées et des agrégats pontés qui s'accumulent à des concentrations anormales et qui alors inhibent le protéasome. Celui-ci voit donc son activité dégradative diminuée. Lorsqu'un niveau critique d'inactivation du protéasome est atteint, un déclin cellulaire se produirait avec une éventuelle issue vers l'apoptose et la nécrose.

## LES INHIBITEURS DU PROTÉASOME

Si la mise à disposition d'inhibiteurs du protéasome capables de pénétrer à l'intérieur des cellules a joué un rôle essentiel dans l'identification des substrats naturels du protéasome et de ses rôles biologiques, ces inhibiteurs sont aussi développés en vue d'obtenir des agents thérapeutiques (pour des revues : Rivett & Gardner, 2000; Kisselev & Goldberg, 2001; Reboud-Ravaux, 2002). Les inhibiteurs connus du protéasome agissent majoritairement en réalisant un adduit sur l'O<sub>γ</sub> de la Thr1, qu'il s'agisse d'inhibiteurs peptidiques qui sont des peptides courts présentant un groupe réactif fixé sur le C-terminal du peptide, ou d'inhibiteurs non peptidiques dans lesquels le groupe réactif est inclus dans une molécule organique (Fig. 8A). La difficulté de l'inhibition du protéasome *in vivo*, réside dans la nécessité d'être sélectif par rapport aux autres protéases intracellulaires, notamment les calpains (protéases à cystéine) et les cathepsines (protéases à cystéine, à sérine et à acides aspartiques). On remarquera le caractère hydrophobe d'un grand nombre d'inhibiteurs décrits puisque les sites chymotrypsiques sont souvent ciblés en première intention compte tenu de la hiérarchisation des activités enzymatiques évoquée plus haut.

La stratégie des aldéhydes peptidiques très utilisée dans l'inhibition des protéases à sérine et à cystéine a été de manière logique développée très tôt, conduisant à des molécules efficaces et très largement employées dans les études biologiques (Vinitsky *et al.*, 1997). C'est le cas de la molécule MG132, peu chère et commode d'utilisation mais non spécifique du protéasome (Fig. 8B). Les peptides boroniques plus spécifiques (le bore réagit moins bien avec les thiols que le carbone) sont aussi plus stables (Adams *et al.*, 1998). Inhibiteurs à fixation lente ("slow-binding"), l'un d'eux, le bortezomid (ou PS341 ou Velcade®) qui est un acide boronique dipeptidique a conduit à la première utilisation en mai 2003 aux États-Unis d'un inhibiteur du protéasome dans le traitement du myélome multiple (Adams, 2003). Les études précliniques sur les cellules de myélome multiple ont montré un mode d'action complexe (Richardson *et al.*, 2003). Le bortezomid inhibe directement la croissance cellulaire des cellules cancéreuses ; il interfère avec l'adhésion entre cellules de myélome et cellules stromales de la moëlle osseuse ; il inhibe la production de cytokines par la moëlle osseuse et il restreint l'angiogenèse. Alors qu'aldéhydes et boronates peptidiques conduisent à des adduits réversibles avec la Thr1 (meilleure réversibilité avec les aldéhydes), les vinylsulfones peptidiques, par addition de Michaël, conduisent à une fixation irréversible sur l'enzyme. En modifiant la séquence du peptide, des inhibitions sélectives des différents sites ont été obtenues (Bogyo *et al.*, 1998). L'utilisation des vinylsulfones peptidiques lorsqu'elles sont marquées peut être très utile dans les études biologiques. La seule molécule décrite comme étant réellement spécifique du protéasome est l'époxomicine et la molécule cousine, l'éponémicine. Il s'agit de molécules naturelles dont l'action anticancéreuse s'est révélée être liée à l'inhibition du protéasome (Meng *et al.*, 1992). La



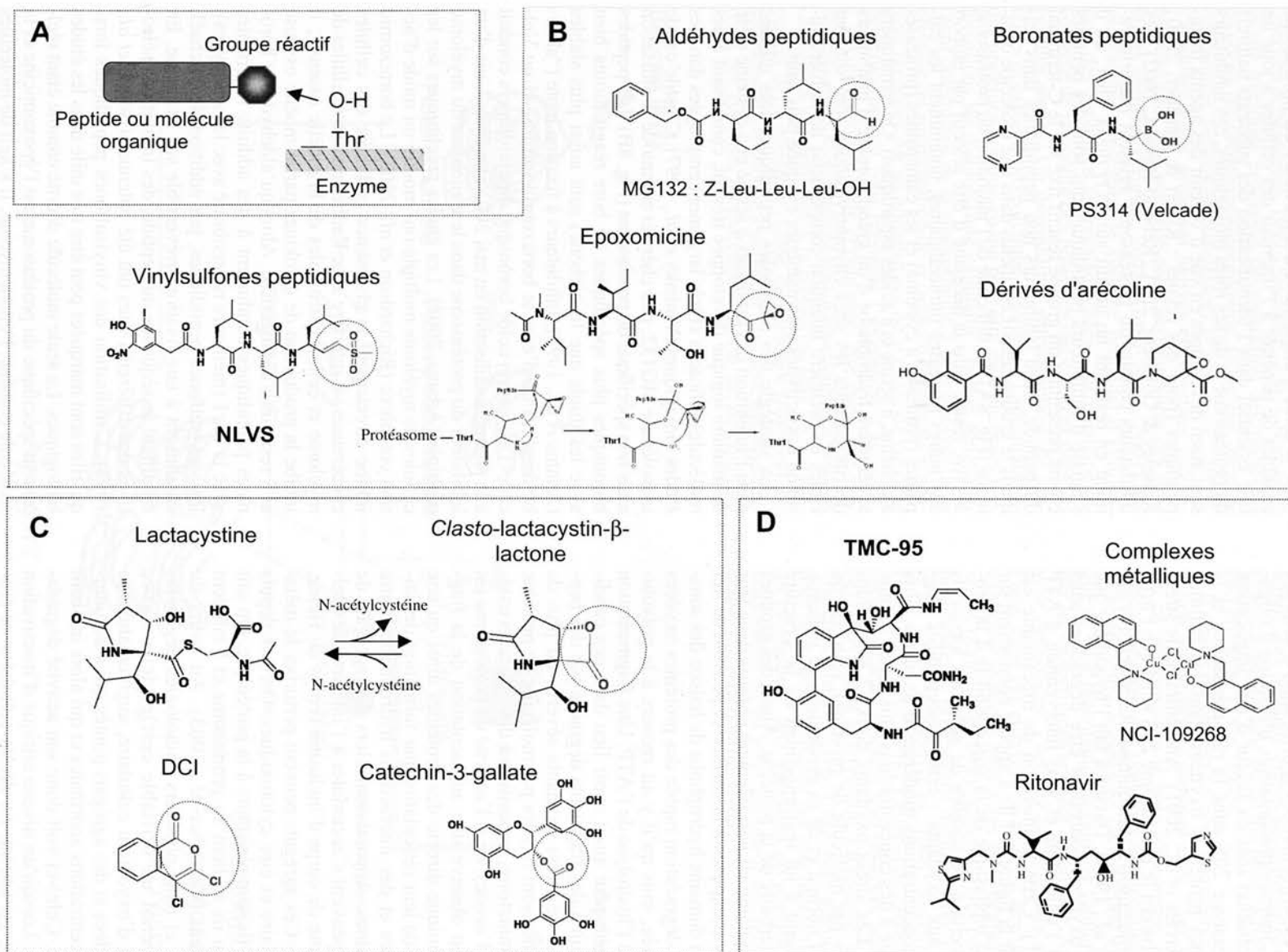


FIG. 8. — Les principaux inhibiteurs du protéasome. A. Formation d'un adduit entre un groupe réactif porté par la plupart des inhibiteurs et la Thr1 du protéasome. B et C. Inhibiteurs de nature peptidique et non peptidique, respectivement. Le groupe réactif est entouré d'un cercle en pointillé. D. Inhibiteurs se liant à l'enzyme sans formation de lien covalent. À noter : le mécanisme d'action du composé NCI-109268 est complexe : le chlorure cuivrique  $\text{CuCl}_2$  qui en est un des constituants agit irréversiblement avec le protéasome (Daniels *et al.*, 2004).



raison de l'action très sélective sur le protéasome a été révélée par l'analyse cristallographique du complexe époxomicine/protéasome 20S. L'inhibiteur réagit non seulement avec l'Oγ de la Thr1 mais aussi avec son groupe α-NH<sub>2</sub> conduisant à la formation d'un cycle morpholine selon le mécanisme décrit sur la figure 8B (Groll *et al.*, 2000). Récemment, des oxydes tripeptidiques d'arécoline, un alcaloïde naturel de la noix de bétel, se sont révélés inhibiteurs des sites actifs chymotrypsiques et trypsiques du protéasome bien que l'oxyde C-terminal d'arécoline ne se comporte pas comme un substrat réagissant avec la Thr1. L'inhibition est due au groupe hydroxy-2-méthyl benzoyl situé en N-terminal (Maras-toni *et al.*, 2004a, 2004b).

Parmi les inhibiteurs non peptidiques, la lactacystine longtemps considérée comme sélective du protéasome (alors qu'elle inhibe aussi la cathepsine A, la carboxypeptidase lysosomale et la tripeptidyl peptidase cytosolique) a été et continue à être un outil intéressant dans les études biologiques (Fig. 8C). Ce métabolite naturel de *Streptomyces*, non actif par lui-même, s'hydrolyse spontanément pour conduire à la N-acétylcystéine et la clasto-lactacystine-β-lactone capable de pénétrer dans les cellules contrairement à la lactacystine de départ. La clasto-lactacystine-β-lactone forme un acyl-enzyme stable par modification de la Thr1 ( $t_{1/2} = 20$  h environ pour l'hydrolyse de l'acyl-enzyme) (Dick *et al.*, 1996). Un inhibiteur général des protéases à sérine, la 3,4-dichloroisocoumarine, forme aussi un acyl-enzyme stable avec le protéasome mais sa toxicité et son absence de sélectivité ne permet pas son utilisation pour des études *in vivo* (Orlowski *et al.*, 1997). D'autres molécules naturelles polycycliques, les dérivés de cathéchin-3-gallate du thé vert, inhibent les activités chymotrypsique et post-acide des protéasomes 20S et 26S, mais pas l'activité trypsique en formant aussi des acyl-enzymes stables (Nam *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004). Très peu de molécules inhibent le protéasome uniquement par suite d'une fixation non covalente. Une molécule naturelle isolée du milieu de fermentation d'*Apiospora montagnei* Sacc. TC1093, le TMC 95-A (Fig. 8D), est un inhibiteur compétitif puissant du protéasome 20S avec des valeurs des IC<sub>50</sub> de 5,4 nM, 200 nM et 60 nM respectivement pour les activités chymotrypsique, trypsique et post-acide (Koguchi *et al.*, 2000; Khono *et al.*, 2000). Dans sa structure très originale, on reconnaît un tripeptide impliquant un résidu tyrosine, une asparagine et un résidu tryptophane hautement oxydé cyclisé par un pont biaryle entre les noyaux aromatiques. L'analyse cristallographique du complexe TMC-95A/protéasome montre une fixation de l'inhibiteur dans les sous-sites de l'enzyme via un réseau de cinq liaisons hydrogène et dans une conformation étendue de type β comme le ferait un substrat (Groll *et al.*, 2001). Différents analogues de cette molécule qui offre la possibilité de nombreuses modifications structurales ont été synthétisés afin de simplifier la structure tout en conservant l'efficacité inhibitrice (Kaiser *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Berthelot *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004).

On observe actuellement une certaine diversification structurale dans les molécules susceptibles d'agir sur le

protéasome. C'est ainsi que des complexes organiques du cuivre ont été décrits comme inhibant le protéasome et pouvant induire l'apoptose de cellules cancéreuses humaines (Daniel *et al.*, 2004).

Le protéasome a donc été validé en tant que cible thérapeutique dans le cancer. Compte tenu du caractère ubiquitaire du protéasome et de la multiplicité des aspects cellulaires dans lequel il intervient, les inhibiteurs irréversibles ont probablement un avenir limité. Se pose notamment le problème des caractéristiques favorables à l'action inhibitrice *in vitro* sur le protéasome et du contrôle de leur action *in vivo*, qu'elle soit générale ou localisée. Des recherches cliniques très intenses sont en cours avec le Velcade® en association avec d'autres molécules ou avec la radiothérapie en vue d'étendre son action aux tumeurs solides. Les contrôles de l'inflammation, de la fonte musculaire et des troubles immunologiques constituent aussi des objectifs thérapeutiques actuels pour les inhibiteurs de protéasome.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams J., Potential of proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, 2003, 8, 307-315.
- Adams J., Behnke M., Chen S., Cruickshank A. A., Dick L. R., Genier L., Klunder J. M., Ma Y. T., Plamondon L. & Stein R. L., Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 333-338.
- Akopian T. N., Kisselev A. F. & Goldberg A. L., Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 1791-1798.
- Anselmi B., Conconi M., Veyrat-Durebex C., Turlin E., Biville F., Alliot J. & Friguet B., Dietary self-selection can compensate an age-related decrease of rat liver 20S proteasome activity observed with standard diet. *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 1998, 53A, B173-B179.
- Arendt C. S. & Hochstrasse M., Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J.*, 1999, 18, 3575-3585.
- Bachmair A., Finley D. & Varshavsky A., *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234, 179-186.
- Baumeister W., Walz J., Zuhl F. & Seemüller E., The proteasome: a paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 1998, 92, 367-380.
- Berthelot A., Piguel S., Le Dour G. & Vidal J., Synthesis of macrocyclic peptide analogues of proteasome inhibitor TMC-95A. *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 9835-9838.
- Bertlett B. S. & Stadtman E. R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 20313-20316.
- Bogyo M., McMaster J. S., Gaczynska M., Tortorella D., Goldberg A. L. & Ploegh H., Covalent modification of the active Thr of proteasome β-subunits and the *E. coli* homologue of HslV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 6629-6634.
- Bogyo M., Shin S., McMaster J. S. & Ploegh H. L., Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes. *Chem. Biol.*, 1998, 5, 307-320.

- Bossis G., Frerrar P., Acquaviva C., Jariel-Encontre I. & Piechaczyl M., c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, 23, 7425-7436.
- Brannigan J. A., Dodson G., Duggleby H. J., Moody P. C., Smith J. L., Tomchick D. R. & Muzrin A. G., A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 1995, 378, 416-419.
- Braun B. C., Glickman M., Kraft R., Dahlmann B., Klotzel P. M., Finley D. & Schmidt M., The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell. Biol.*, 1999, 1, 221-226.
- Carrard G., Bulteau A. L., Petropoulos I. & Friguet B., Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002, 34, 1461-1474.
- Ciechanover A., The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 1994, 79, 13-21.
- Ciechanover A., The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*, 1998, 17, 7151-7160.
- Conconi M., Szveda L. L., Levine R. L., Stadtman E. R. & Friguet B., Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative damage by heat-shock protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, 331, 232-240.
- Coux O., An interaction map of proteasome subunits. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31, 465-469.
- Coux O., The 26S proteasome. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 2002, 29, 85-107.
- Coux O., Tanaka K. & Goldberg A. L., Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 801-847.
- Cuervo A. M. & Dice J. F., When lysosomes get old? *Exp. Gerontol.*, 2000, 35, 119-131.
- Daniel K. G., Gupta P., Harbach R. H., Guida W. C. & Dou P. Q., Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem. Pharm.*, 2004, 67, 1139-1151.
- Davies K. J. A., Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 2001, 83, 301-310.
- DeMartino G. N. & Goldberg A. L., Identification and purification of an ATP-stimulated alkaline protease in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 3712-3715.
- Dick L. R., Cruikshank A. A., Genier F. D., Melandri F. D., Nunes S. L. & Stein R. L., Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, 271, 182-188.
- Dick T. P., Nussbaum A. K., Deeg M., Heinemeyer W., Groll M., Huber R., Rammensee H. G. & Schild H., Contribution of proteasomal  $\beta$ -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 25637-25646.
- Engel M., Hoffmann T., Wagner L., Wermann M., Heiser U., Kiefersauer R., Huber R., Bode W., Demuth H. U. & Brandstetter H., The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 5063-5068.
- Fenteany G., Standaert R. F., Lane W. S., Choi S., Corey E. J. & Schreiber S. L., Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 1995, 268, 726-731.
- Förster A., Whitby F. G. & Hill C. P., The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J.*, 2003, 22, 4356-4364.
- Friguet B., Aging of proteins and the proteasome, organism. In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2002, Vol. 29, Reboud-Ravaux M., Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 17-33.
- Glaser T., Schwarz-Benmeier N., Barnoy S., Barak Z. & Kosower N. S., Calpain ( $\text{Ca}^{2+}$  dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 7879-7883.
- Glickman M. H., Rubin D. M., Fried V. A. & Finley D., The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 3149-3162.
- Glickman M. H. & Ciechanover A., The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, 2002, 82, 373-428.
- Groll M., Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin D. M., Huber R., Glickman M. H. & Finley D., A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 1062-1067.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H. D. & Huber R., Structure of 20S proteasome from yeast at a 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997, 386, 463-471.
- Groll M., Heinemeyer W., Jager S., Ullrich T., Bochtler M., Wolf D. H. & Huber R., The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 10976-10983.
- Groll M. & Huber R., Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, 35, 606-616.
- Groll M., Kim K. B., Kairies N., Huber R. & Crews C. M., Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of  $\alpha$ ,  $\beta$ -epoxyketone proteasome inhibitors. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2000, 122, 1237-1238.
- Groll M., Koguchi Y., Huber R., Khono J., Crystal structure of the 20S proteasome: TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 2001, 311, 543-548.
- Grune T., Merker K., Sandig G. & Davies K. J. A., Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by proteasome. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 2003, 305, 709-718.
- Hayashi T. & Goto S., Age-related changes in the 20S and 26S proteasome activities in the liver of male F344 rats. *Mech. Aging Dev.*, 1998, 102, 55-66.
- Hershko A., Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, 21, 445-449.
- Hershko A. & Ciechanover A., The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67, 425-479.
- Heusch M., Lin L., Geleziunas R. & Greene W. C., The generation of NF $\kappa$ B2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene*, 1999, 18, 6201-6208.
- Huibregtse J. M., Scheffner M., Beaudenon S. & Howley P. M., A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 2563-2567.
- Hoyt M. A., Zhang M. & Coffino P., Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fungal cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 12135-43.
- Jager S., Groll M., Huber R., Wolf D. H. & Heinemeyer W., Proteasome  $\beta$ -type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J. Mol. Biol.*, 1999, 291, 997-1013.
- Joazeiro C. & Weissman A. M., RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 2000, 102, 549-552.
- Jackson P. K., Eldridge A. G., Freed E., Frustenthal L., Hsu J. Y., Kaiser B. K. & Reimann J. D. R., The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.*, 2000, 10, 429-439.
- Kaiser M., Groll M., Renner C., Huber R. & Moroder L., The core structure of TMC-95A is a promising lead for reversible proteasome inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 780-783.
- Kaiser M., Milbradt A. G., Siciliano C., Assfalg-Machleidt I.,



- Machleidt W., Groll M., Renner C. & Moroder L., TMC-95A analogues with endocyclic biphenyl ether group as proteasome inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, 2004, 1, 161-173.
- Keller J. N., Hanni K. B. & Markesbery W. R., Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications of oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.*, 2000, 113, 61-70.
- Kisselev A. F., Akopian T. N. & Goldberg A. L., Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 1982-1989.
- Kisselev A. F., Akopian T. N., Castillo V. & Goldberg A. L., Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol. Cell.*, 1999, 4, 395-402.
- Kisselev A. F., Garcia-Calvo M., Overkleeft H. S., Peterson E., Pennington M. W., Ploegh H. L., Thornberry N. A., Goldberg A. L., The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J. Biol. Chem.*, 278, 35869-35877.
- Kisselev A. F., Kaganovich D. & Goldberg A. L., Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 22260-22270.
- Kisselev A. F., Songyang Z. & Goldberg A. L., Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 14831-14837.
- Kisselev A. F. & Goldberg A. L., Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.*, 2001, 8, 739-758.
- Koegl M., Hoppe T., Schenker S., Ulrich H. D., Mayer T. U. & Jentsch S., A novel ubiquitination cofactor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 1999, 96, 635-644.
- Koguchi Y., Kohno J., Nishio M., Takahashi K., Okuda T., Ohnuki T. & Komatsubara S., TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.*, 2000, 53, 105-109.
- Kohno J., Koguchi Y., Nishio M., Nakao K., Kuroda M., Shimizu R., Ohnuki T. & Komatsubara S., Structures of TMC-95A-D: novel proteasome inhibitors from *Apiospora montagnei* sacc. TC 1093. *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 990-995.
- Lam Y. A., Xu W., DeMartino G. N. & Cohen R. E., Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, 1997, 385, 737-740.
- Lin S., Yang Z. Q., Kwok B. H. B., Lkoldobskiy M., Crews C. M. & Danishefsky S. J., Total synthesis of TMC-95A and -B via a new reaction leading to Z-enamides. Some preliminary findings as to SAR. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2004, published on web.
- Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W. & Huber R., Crystal structure of the 26S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 1995, 268, 533-539.
- Mack T. C., Dayanandan R., van Siegenhorst M., Whone A., Hutten M., Lovestone S. & Anderton B. H., Tau levels with frontotemporal dementia-17 mutations have both altered expression levels and phosphorylation profiles in differential neuroblastoma cells. *Neuroscience*, 2001, 108, 701-712.
- Marastoni M., Baldisserotto A., Canella A., Gavioli R., De Risi C., Pollini G. P. & Tomatis R., Arecoline tripeptides inhibitors of proteasome. *J. Med. Chem.*, 2004a, 47, 1587-1590.
- Marastoni M., McDonald J., Baldisserotto A., Canella A., De Risi C., Pollini G. P. & Tomatis R., Proteasome inhibitors: synthesis and activity of arecoline oxide tripeptide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2004b, 14, 1965-1968.
- Matthews W., Driscoll J., Tanaka K., Ichihara A. & Goldberg A. L., Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 2597-2601.
- Meng L. H., Kwok B. H. B., Sin N. & Crews C. M., Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. *Cancer Res.*, 1999, 59, 2798-2801.
- Myung J., Kim B. K., Lindsten K., Dantuma N. P. & Crews C. M., Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors. *Mol. Cell*, 2001, 7, 411-420.
- Nam S., Smith D. M. & Dou Q. P., Ester bond-containing tea polyphenols potentially inhibit proteasome activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 13322-13330.
- Nussbaum A. K., Dick T. P., Keiholz W., Schirle M., Stavanovic S., Dietz K., Heinemeyer W., Groll M., Wolf D. H., Huber R. & Rammensee H. G., Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 12504-12509.
- Obin M. S., Shang F., Gong X., Handelman G., Blumberg J. & Taylor A., Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using thiol-specific oxidant diamide. *FASEB J.*, 1998, 12, 561-569.
- Orlowski M., Cardozo C., Eleuteri A. M., Kohanski R., Kam C. M. & Powers J. C., Reactions of [<sup>14</sup>C]-3,4-dichloroisocoumarin with subunits of pituitary and spleen multicatalytic proteinases complexes (proteasomes). *Biochemistry*, 1997, 36, 13946-13953.
- Orlowski M. & Wilk S., Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 415, 1-5.
- Palombella V. J., Rando O. J., Goldberg A. L. & Maniatis T., The ubiquitin proteasome pathway is required for processing of the NF-κB1 precursor protein and activation of NF-κB. *Cell*, 1994, 78, 773-785.
- Papapostolou D., Caux O. & Reboud-Ravaux M., Regulation of the 26S proteasome activities by peptides mimicking cleavage products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 295, 1090-1095.
- Pempler K. P. & Hammond A. L., Protein degradation in human disease. In: progress in molecular and subcellular biology, 2002, Vol. 29, Reboud-Ravaux M., Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 61-83.
- Picot C. R., Perichon M., Cintrat J. C., Friguet B. & Petropoulos I., The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are down-regulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.*, 2004, 558, 74-78.
- Reboud-Ravaux M., Proteasome inhibitors. In: Progress in molecular and subcellular biology, 2002, Vol. 29, Reboud-Ravaux M., Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 109-125.
- Reinheckel T., Sitte N., Ulrich O., Kuckelkorn U., Grune T., Davies K. J. A., Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome resistance to oxidative stress. *Biochem. J.*, 1998, 335, 637-642.
- Richardson P. G., Hideshima T. & Anderson K. C., Bortezomid (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*, 2003, 10, 361.
- Rivett A. J. & Gardner R. C., Proteasome inhibitors: from *in vitro* studies to clinical trials. *J. Peptide Sci.*, 2000, 6, 478-488.
- Rock K. L., Gramm C., Rothstein L., Clark R., Stein R., Dick L., Hwang D. & Goldberg A. L., Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 1994, 78, 761-771.
- Saito K. I., Elce J. S., Hamos J. E. & Nixon R. A., Widespread activation of calcium activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 2628-2632.

- Sears C., Olesen J., Rubin D. M., Finley D. & Maniatis T., NF- $\kappa$ B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 1409-1419.
- Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. & Baumeister W., Proteasome from *Thermoplasma acidophilum* – a threonine protease. *Science*, 1995, 268, 579-582.
- Scheffner M., Nuber U. & Huibregtse J. M., Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 1995, 373, 81-83.
- Shibatani T., Nazir M. & Ward W. F., Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 1996, 51A, B316-B322.
- Schmidtke G., Emch S., Groettrup M. & Holzthutter H. G., Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 22056-22063.
- Sheaff R. J., Singer J. D., Swanger J., Smitherman M., Roberts J. M. & Clurman B. E., Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol. Cell*, 2000, 5, 403-410.
- Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J. & Davies K. J., Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 311-318.
- Smith D. M., Daniel K. G., Wang Z., Guida W. C., Chan T. H. & Dou Q. P., Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins*, 2004, 54, 58-70.
- Stadtman E. R., Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2001, 928, 22-38.
- Strickland E., Hakala K., Thomas P. J. & DeMartino G., Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory sub-complex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 5565-5572.
- Teplyakov A., Obmolova G., Badet B., Badet-Denisot M. A., Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J. Mol. Biol.*, 2001, 313, 1093-102.
- Voges D., Zwickl P. & Baumeister W., The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, 68, 1015-1068.
- Ward W. F., Protein degradation in the aging organism. In: Progress in molecular and subcellular biology, 2002, Vol. 29, Reboud-Ravaux M., Ed, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 17-33.
- Ward W. F., The relentless effects of aging on protein turnover. *Biogerontology*, 2000, 1, 195-199.
- Weimer J. M., Kriszenski-Perry E., Elshatory Y. & Pearce D. A., The neuronal lipofuscinoses; mutations in different proteins result in similar disease. *Neurol. Med.*, 2002, 1, 111-124.
- Whitby F. G., Masters E. I., Kramer L., Knowlton J. R., Yao Y., Wang C. C. & Hill C. P., Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*, 2000, 408, 115-120.
- Witt E., Zantopf D., Schmidt M., Kraft R., Kloetzel P. M. & Kruger E., Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7( $\beta$ 5i) incorporation into 20S proteasomes. *J. Mol. Biol.*, 2000, 301, 1-9.
- Yin D., Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, 21, 871-888.
- Zhang M., Pickart C. M. & Coffino P., Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *EMBO J.*, 2003, 22, 1488-1496.
- Zhang M., MacDonald A. I., Hoyt M. A. & Coffino P., Proteasomes begin ornithine decarboxylase digestion at the C terminus. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 20959-20965.