

Peser le protéasome pour sonder sa structure

Résumé Grâce à leur structure tridimensionnelle, les protéines assurent différentes fonctions qui sont essentielles au bon fonctionnement cellulaire. Cependant, leur concentration doit être très finement régulée. De plus, l'accumulation de protéines mal repliées ou vieillissantes peut être fatale pour la cellule et l'organisme. En digérant ces protéines indésirables, le protéasome permet leur recyclage et est ainsi le garant du maintien de l'homéostasie protéique intracellulaire, mais il participe aussi à la réponse immunitaire en présentant certains peptides à la surface des cellules. Cet article présente comment la spectrométrie de masse (SM) peut apporter des informations sur la structure de complexes multiprotéiques, et plus particulièrement sur le protéasome humain. Cet assemblage macromoléculaire essentiel est un exemple idéal pour illustrer l'apport de la SM à la biologie structurale.

Mots-clés Spectrométrie de masse, biologie structurale, protéasome.

Abstract Weighing the proteasome to probe its structure

Thanks to their three-dimensional structure, proteins perform various functions that are essential for proper cell function. However, their concentration must be very tightly regulated. In addition, the accumulation of misfolded or aging proteins can be fatal to the cell and the organism. By digesting these unwanted proteins, the proteasome allows their recycling and thus guarantees the maintenance of intracellular protein homeostasis and also participates to cell immune response by presenting some peptides to the cell surface. This article presents how mass spectrometry (MS) can provide information on the structure of multiprotein complexes, and more particularly on the human proteasome. This essential macromolecular assembly is an ideal example to illustrate the contribution of MS to structural biology.

Keywords Mass spectrometry, structural biology, proteasome.

La spectrométrie de masse structurale, un domaine en pleine expansion

Autrefois cantonné à l'étude de petites molécules (i.e. < 200 Da), le champ d'application de la spectrométrie de masse (SM) s'est fortement diversifié depuis l'invention des sources d'ionisations dites « douces » au début des années 1980. Dans le domaine des biomolécules, et des protéines en particulier, une première révolution a consisté à déchiffrer leur séquence primaire par protéomique. En parallèle, différents groupes de recherche ont mis au point des méthodes, dites de « SM structurale », visant à obtenir un maximum d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines et complexes protéiques. Au cours des vingt dernières années, les développements technologiques et méthodologiques ont permis de faire de la SM structurale un pilier incontournable de la biologie structurale.

La régulation du protéasome est assurée par une grande hétérogénéité structurale

Le protéasome est un complexe protéique composé de vingt-huit sous-unités. Il est formé de quatre anneaux heptamériques empilés les uns sur les autres (figure 1). Conservé au cours de l'évolution, le protéasome s'est progressivement complexifié pour assurer des fonctions cellulaires de plus en plus diverses. Alors que le protéasome procaryote est constitué uniquement des sous-unités α et β (quatorze copies identiques), on compte chez l'homme pas moins de quinze sous-unités α différentes et dix-huit sous-unités β différentes, conduisant à plusieurs sous-types de protéasome, dont certains sont spécifiques de certains tissus [1]. C'est le cas de l'immunoprotéasome (i20S) dans les cellules lymphocytaires, du spermatoprotéasome (spt20S) dans les cellules germinales, ou du thymoprotéasome (t20S) dans le thymus.

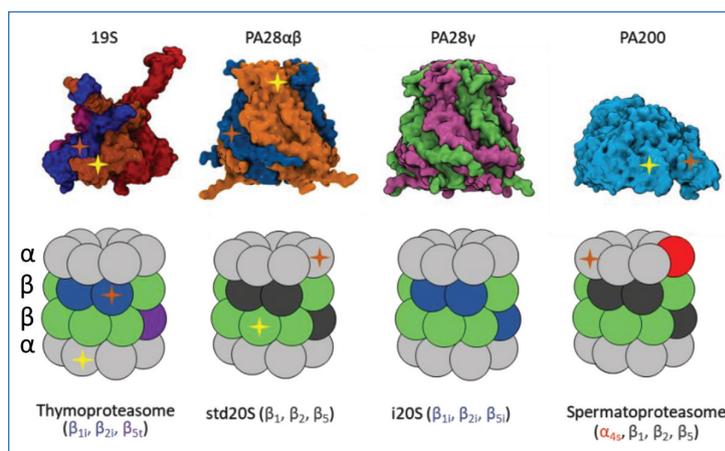


Figure 1 - Complexité des sous-types de protéasome. Chaque sous-type, défini par ses vingt-huit sous-unités α_{1-7} et β_{1-7} , peut interagir avec un ou deux régulateurs, via ses deux anneaux α . Les étoiles correspondent à des modifications post-traductionnelles éventuelles.

La fonction principale du protéasome est de digérer en peptides les protéines qui lui sont adressées. Ceci permet entre autres d'éviter l'accumulation de protéines anormales afin de les éliminer avant qu'elles ne constituent un risque pour l'organisme. Dans les cellules immunitaires, l'immunoprotéasome est capable de générer des peptides antigéniques d'origine pathogène, qui seront ensuite exprimés à la surface de la cellule par le complexe majeur d'histocompatibilité, afin d'activer les lymphocytes T cytotoxiques et d'induire une réponse immunitaire ciblée contre le pathogène en question.

La régulation du protéasome est donc cruciale au bon fonctionnement de la cellule et de nombreuses pathologies incluant certains cancers, maladies neurodégénératives ou auto-immunes, ont été liées à un dysfonctionnement de ce complexe. L'activité protéolytique du protéasome peut être

régulée par l'incorporation de sous-unités alternatives, mais également par l'interaction avec des protéines ou complexes protéiques régulateurs protéiques tels que le 19S, PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ et PA200 (figure 1).

Outre ces quatre activateurs majoritaires, plus de trois cent protéines interagissant avec le protéasome (PIP) ont été répertoriées dans la littérature, mais les bases structurales de ces interactions sont le plus souvent inconnues. De par son hétérogénéité, sa taille (0,7 MDa pour le cœur catalytique 20S) et les aspects dynamiques de ses interactions, le protéasome est un sujet d'étude idéal pour la protéomique et la SM structurale.

Sonder la structure et la dynamique du protéasome

Un protéasome plus dynamique dans les cellules germinales, à l'origine de nouvelles interactions intracellulaires

Le spermatoprotéasome, sous-type exprimé exclusivement dans les cellules germinales, est essentiel à leur bonne maturation. Les spermatozoïdes proviennent de spermatogonies (SPG) qui se différencient en spermatocytes (SPC), puis en spermatozoïdes (SPT). Le spermatoprotéasome diffère du protéasome standard uniquement par l'incorporation d'une sous-unité $\alpha 4s$ différente de la sous-unité $\alpha 4$ constitutive. Son expression est essentielle à la fertilité chez les eucaryotes supérieurs. Nous nous sommes dès lors posé les questions suivantes :

- En quoi cette substitution de sous-unité est nécessaire au bon développement des spermatozoïdes ?
- Quelles sont les modifications fonctionnelles liées à cette substitution (substrats et/ou partenaires spécifiques du spermatoprotéasome, localisation subcellulaire) ?
- Quels sont les réarrangements structuraux induits par $\alpha 4s$ pouvant expliquer sa spécificité fonctionnelle ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé différentes méthodes basées sur la SM : la protéomique bottom-up, consistant à digérer les protéines immunopurifiées avec le protéasome 20S, puis à séquencer et quantifier ces peptides,

nous a permis de suivre l'abondance relative des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 4s$ au cours de la spermatogenèse chez le rat. Nos résultats ont montré que la sous-unité $\alpha 4$ était l'espèce exclusive des cellules de Sertoli et des spermatogonies, puis était remplacée presque totalement par $\alpha 4s$ dans les spermatozoïdes et spermatozoïdes [2] (figure 2A).

Nous avons ensuite identifié les partenaires spécifiques du spermatoprotéasome chez le rat et avons ainsi observé une réorganisation des régulateurs du 20S dans les dernières phases de développement des cellules germinales mâles : les activateurs 19S et, dans une moindre mesure PA200, sont favorisés au détriment de l'activateur PA28 $\alpha\beta$ (figure 2B). D'autre part, nous avons identifié plusieurs partenaires dont P131 et FbxO7 qui semblent localiser le spermatoprotéasome au complexe synaptonémal qui permet d'initier la méiose en associant les chromosomes homologues entre eux.

La protéomique top-down consiste à analyser les protéines sous formes entières (sans étape protéolytique), afin d'obtenir toutes les masses moléculaires des espèces présentes dans l'échantillon. En effet, si l'approche classique par bottom-up est très efficace pour détecter et quantifier un très grand nombre de protéines, même à l'état de traces, l'étape de digestion est cependant source de limitations : les protéines sont souvent identifiées/quantifiées par quelques peptides seulement, et même si certains peuvent être modifiés, il est impossible de savoir quelles étaient la ou les séquences primaires avant digestion. Le terme de protéoforme désigne ainsi n'importe quel produit d'un gène [3], mais en incluant ses étapes de maturation, de troncation, ainsi que ses combinaisons éventuelles de mutation(s) et/ou modification(s) post-traductionnelle(s) (MPT).

Nous avons ainsi mis au point une stratégie expérimentale intégrée permettant de générer de véritables empreintes de protéoformes sous forme de cartes bidimensionnelles [4-5]. Appliquée au spermatoprotéasome, cette méthode nous indique de façon très précise les combinaisons de MPT de chacune des sous-unités et nous permet de les comparer au protéasome immunopurifié à partir de tissu musculaire [2] (figure 2C).

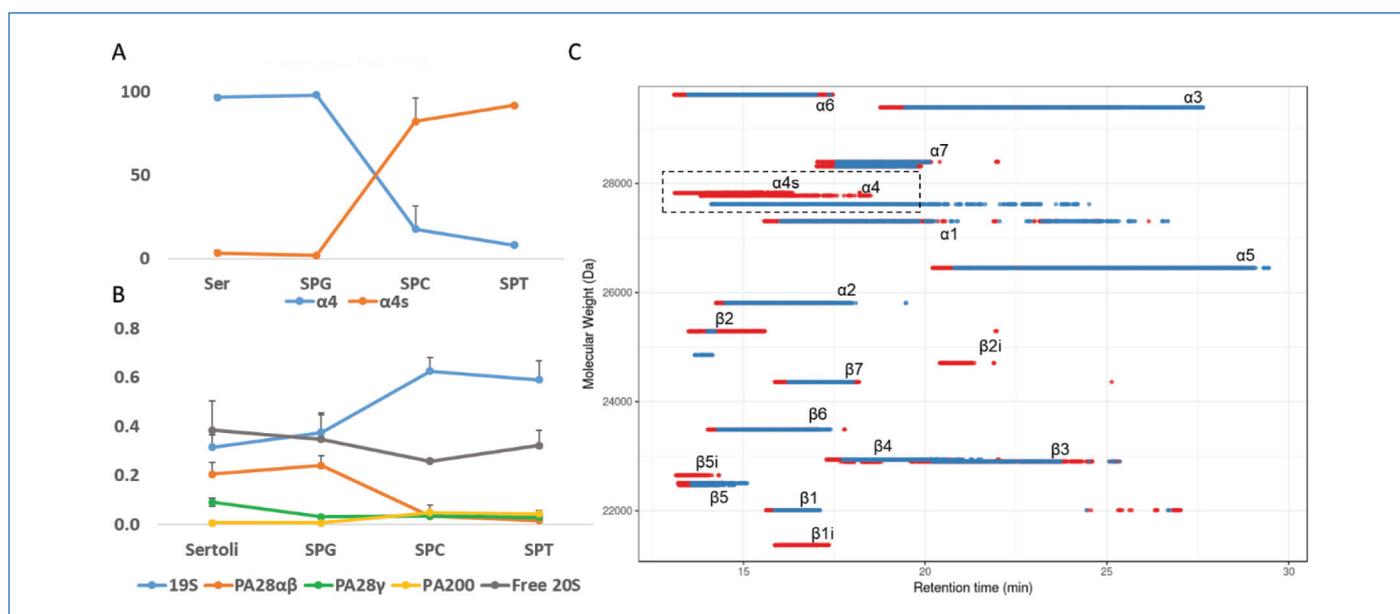


Figure 2 - Étude du spermatoprotéasome par protéomique bottom-up et top-down. Abondance relative (A) des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 4s$ et (B) des principaux activateurs du 20S dans des cellules de Sertoli (Ser), des spermatogonies (SPG), spermatocytes (SPC) et spermatozoïdes (SPT) de rat. (C) Cartographie des protéoformes du 20S immunopurifié à partir de testicules (rouge) et de muscle (bleu) bovin.

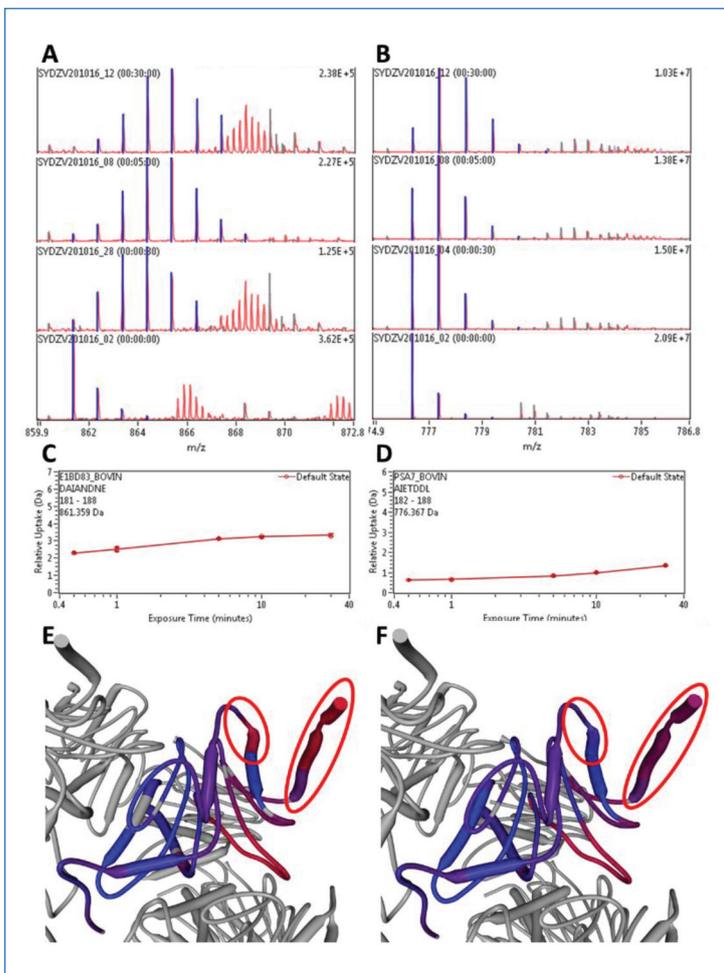


Figure 3 - Échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse. (A) Incorporation progressive (0 min, 0,5 min, 5 min, 30 min) du deutérium sur les peptides [181-188] d' $\alpha 4s$ (A) et [182-188] d' $\alpha 4$ (B) montrant une deutération plus importante chez $\alpha 4s$ (C) que chez $\alpha 4$ (D). La deutération relative est représentée de 0 % (bleu) à 50 % (rouge) sur la structure du protéasome 20S bovin (PDB 1IRU), permettant de localiser les régions plus dynamiques chez $\alpha 4s$ (E) que chez $\alpha 4$ (F).

appelée échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS). Le concept consiste à diluer la ou les protéines d'intérêt dans un tampon physiologique (PBS, Tris, HEPES à pH 7-8) deutéré et à suivre l'incorporation du deutérium sur les peptides obtenus après digestion protéolytique. La vitesse d'échange des protons amidiques dépendant de leur accessibilité au solvant et de leur implication dans la stabilisation de structures secondaires, on peut ainsi différencier les régions accessibles/flexibles des régions enfouies/rigides de la protéine. Il est alors possible de comparer les cinétiques de deutération de protéines seules et en complexe, afin d'identifier, par exemple, le site d'interaction d'un peptide sur un complexe protéique [6]. En comparant les taux de deutération d' $\alpha 4$ et d' $\alpha 4s$, nous avons observé que certains peptides étaient beaucoup plus rapidement deutérés chez $\alpha 4s$ que chez $\alpha 4$ [2] (figure 3A-D). Ces peptides sont localisés au niveau des deux dernières hélices α de la sous-unité et font face au solvant (figure 3E-F). Nous en avons déduit que les différences d'interaction et de fonction observées au niveau cellulaire étaient liées à cette plus forte dynamique structurale chez $\alpha 4s$.

Un dialogue intramoléculaire pour expliquer la régulation du protéasome

Un des points qu'il reste à élucider concerne certains mécanismes de régulation du protéasome, et notamment « Comment expliquer que l'insertion d'une sous-unité catalytique alternative modifie l'interactome du protéasome ? » En effet, ces sous-unités étant enfouies au cœur du protéasome, et non à sa surface comme $\alpha 4$ et $\alpha 4s$, nous avons dès lors envisagé l'existence de changements conformationnels allostériques.

Pour répondre à cette question, nous avons immunopurifié du protéasome standard (std20S) ainsi que de l'i20S à partir de lignées cellulaires exprimant uniquement l'une ou l'autre de ces isoformes. Nous avons tout d'abord vérifié le degré de pureté de ces échantillons par protéomique bottom-up et top-down (figure 4A-B). Nous avons ensuite utilisé l'échange hydrogène-deutérium pour étudier le protéasome 20S seul ou en complexe avec les régulateurs PA28 α ou PA28 γ [7]. En dehors du défi méthodologique (système le plus large et hétérogène jamais étudié par cette technique), cette étude

Afin de déterminer les mécanismes structuraux à l'origine de ces différences d'interactomes et donc fonctionnelles du spermatoprotéasome par rapport au protéasome standard, nous avons utilisé une méthode de marquage isotopique

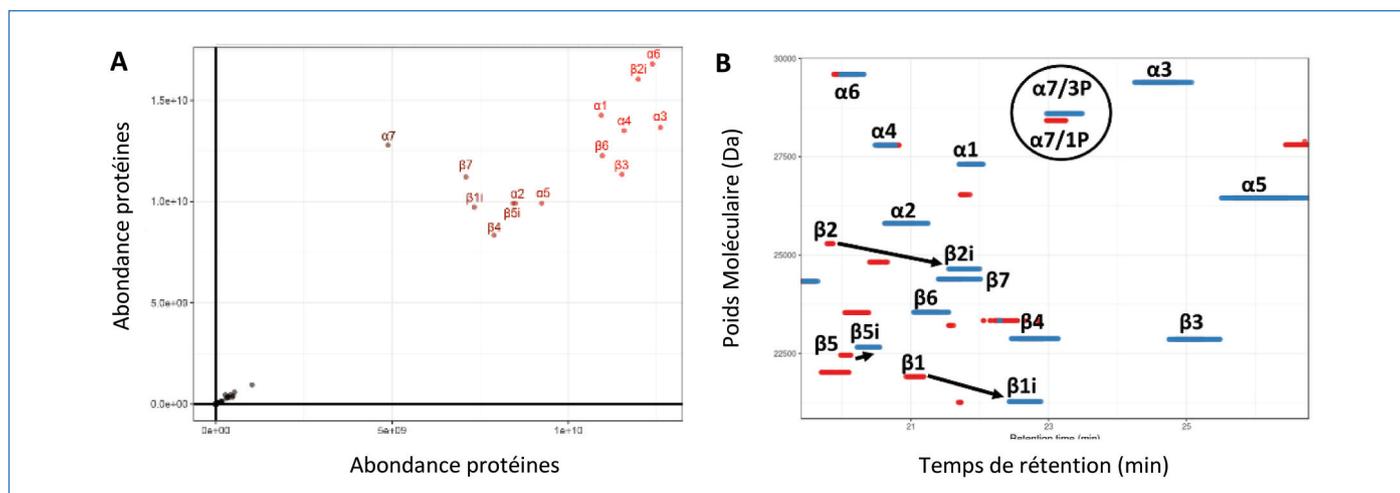


Figure 4 - A) Analyse bottom-up d'un complexe de i20S immunopurifié. La représentation de l'abondance des protéines de deux répliquats permet de s'assurer que l'échantillon contient exclusivement les protéines attendues (sous-unités α et β de l'i20S). Les autres protéines identifiées (points noirs) sont présentes sous forme de traces. B) Analyses top-down de complexes de protéasome après immunopurification à partir de cellules HEK-EBNA exprimant soit le protéasome std20S (rouge), soit l'immunoprotéasome i20S (bleu). Le remplacement des sous-unités catalytiques standards ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) par les sous-unités immuno ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) peut être facilement détecté, tout comme la présence de différentes protéoformes pour la sous-unité $\alpha 7$.

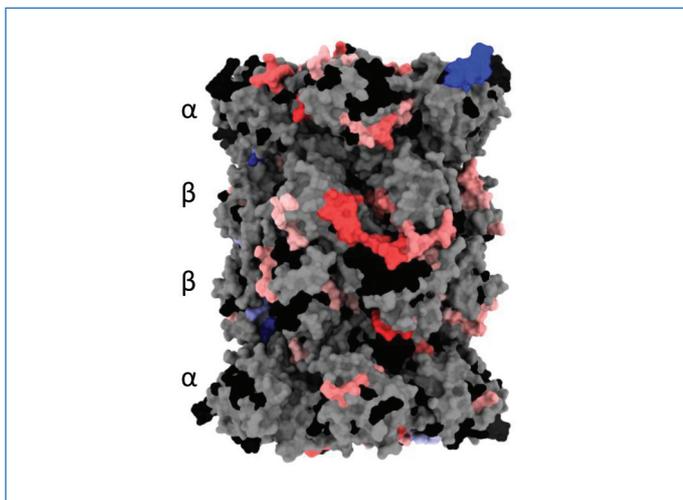


Figure 5 - Représentation tridimensionnelle (PDB : 5LE5) du cœur catalytique du protéasome 20S humain. Les régions plus ou moins flexibles/accessibles suite à l'interaction avec l'activateur PA28αβ sont représentées en rouge et bleu, respectivement. Ces résultats d'HDX-MS permettent ainsi d'identifier les régions directement affectées, ou qui subissent des réarrangements allostériques suite à l'interaction d'un partenaire.

a fourni quantité d'informations difficilement accessibles par d'autres méthodes classiques de biophysique. La comparaison des protéasomes std20S et i20S a permis de mettre en évidence des changements structuraux, non seulement autour des sous-unités catalytiques qui sont différentes, mais également à la surface du protéasome 20S, ce qui peut expliquer des différences d'interaction avec certains régulateurs, comme observé précédemment par protéomique [8]. À l'inverse, la comparaison des cinétiques de deutération avec et sans activateur (figure 5) a montré que le contact à la surface de l'anneau α pouvait être répercuté jusqu'à l'intérieur de la structure du protéasome 20S, et notamment proche des sites catalytiques, suggérant comment l'interaction avec un activateur peut modifier de façon spécifique l'activité protéolytique du protéasome [7].

Vers une protéomique holistique ?

Autrefois l'apanage de certains groupes spécialisés, les méthodes de SM structurale se sont démocratisées, notamment grâce au développement et à la commercialisation d'instruments permettant d'effectuer ces analyses en routine. Dès lors, un nombre croissant de groupes de recherche sont parvenus à combiner ces approches qui sont tout à fait complémentaires entre elles [9] (voir tableau) puisqu'elles apportent des informations à la fois sur l'interactome (protéomique bottom-up et interactomique par pontage covalent), les protéoformes (protéomique top-down), la stœchiométrie et les ligands non covalents (SM native), ainsi que sur la structure (pontage covalent) et la dynamique (HDX-MS) des systèmes étudiés. D'autre part, les frontières entre certaines méthodes sont de plus en plus poreuses : c'est le cas par exemple de la « NativeOmics » qui combine à la fois SM native, protéomique top-down et lipidomique [10]. Enfin, la sensibilité accrue des spectromètres de masse ouvre la voie vers les analyses protéomiques sur cellule unique. On peut donc

Méthode	Digestion	Information
Bottom-up	Oui	Séquence, modifications, partenaires, quantification
Top-down	Non	Séquence, protéoformes
SM native	Non	Stœchiométrie, partenaires
Cross-link	Oui	Contraintes de distance, partenaires
HDX-MS	Oui	Accessibilité, dynamique, interface d'interaction

Glossaire des différentes méthodes d'analyses de protéines par protéomique et SM structurale.

s'attendre à l'avenir à obtenir un plus grand nombre d'informations à partir d'une seule analyse MS, en partant d'un échantillon protéique de moins en moins concentré. La spectrométrie de masse intégrative s'inscrit tout à fait dans la tendance actuelle visant à promouvoir la biologie structurale intégrative [11].

- [1] A. Kniepert, M. Groettrup, The unique functions of tissue-specific proteasomes, *Trends Biochem Sci.*, **2014**, *39*, p. 17-24.
- [2] D. Živković, J. Marcoux, M.-P. Bousquet *et al.*, Proteasome complexes experience profound structural and functional rearrangements throughout mammalian spermatogenesis, *bioRxiv*, **2021**, doi.org/10.1101/2021.06.18.447862.
- [3] L.M. Smith, N.L. Kelleher & Consortium for top down proteomics, Proteoform: a single term describing protein complexity, *Nat. Methods*, **2013**, *10*, p. 186-187.
- [4] J. Lesne, M.-P. Bousquet, J. Marcoux, M. Locard-Paulet, Top-down and intact protein mass spectrometry data visualization for proteoform analysis using VisioProt-MS, *Bioinform. Biol. Insights*, **2019**, *13*, doi.org/10.1177/1177932219868223.
- [5] M. Locard-Paulet, J. Marcoux *et al.*, VisioProt-MS: interactive 2D maps from intact protein mass spectrometry, *Bioinformatics*, **2019**, *35*, p. 679-681.
- [6] V. Guillet, J. Marcoux, P. Genevoux, L. Mourey *et al.*, Structural insights into chaperone addition of toxin-antitoxin systems, *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, 782.
- [7] J. Lesne, M.-P. Bousquet, J. Marcoux *et al.*, Conformational maps of human 20S proteasomes reveal PA28- and immuno-dependent inter-ring crosstalks, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 6140.
- [8] B. Fabre, O. Bulet-Schiltz, M.-P. Bousquet-Dubouch *et al.*, Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case, *Mol. Syst. Biol.*, **2015**, *11*, 771.
- [9] J. Marcoux, S. Cianféroni, Towards integrative structural mass spectrometry: benefits from hybrid approaches, *Methods*, **2015**, *89*, p. 4-12.
- [10] J. Gault, C.V. Robinson *et al.*, High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins, *Nat. Methods*, **2016**, *13*, p. 333-336.
- [11] M. Faini, F. Stengel, R. Aebersold, The evolving contribution of mass spectrometry to integrative structural biology, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2016**, *27*, p. 966-974.

Marie-Pierre BOUSQUET, maître de conférences à l'Université Paul Sabatier Toulouse III, et **Julien MARCOUX***, chargé de recherche au CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse.



Julien MARCOUX a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2020.

* julien.marcoux@ipbs.fr

J. Marcoux