

Une nouvelle classe de protéines : les molécules chaperonnes

La conformation biologique des protéines. Dans les ouvrages de biochimie, il est généralement écrit que la conformation native des protéines résulte de la séquence des acides aminés. *In vitro*, cela se vérifie pour de petites protéines (une centaine d'acides aminés), en solution diluée et à des températures ne dépassant pas 20 °C. En revanche, dès que la longueur de la protéine, la concentration et la température (30 à 40 °C) augmentent, on constate que l'équilibre :

protéine native \rightleftharpoons protéine inactive est fortement déplacé vers la droite et des agrégats consécutifs à des liaisons hydrophobes entre protéines apparaissent.

Ces dernières conditions sont proches des conditions physiologiques, éventuellement amplifiées par des chocs thermiques. Comment les protéines sont-elles protégées de la dénaturation ? Indépendamment de ces aspects d'autres questions se posent. Qu'advient-il d'une séquence polypeptidique en cours de synthèse où la partie N-terminale apparaît avant l'extrémité C-terminale et pourrait s'impliquer dans des repliements non conformes ? Que se passe-t-il pour les protéines précurseurs dotées de séquences « signal » du côté de l'extrémité N-terminale ? Comment ces protéines précurseurs diffusent-elles dans une forme partiellement dénaturée au travers des membranes du réticulum endoplasmique, des mitochondries, des chloroplastes, etc. A ces questions le concept de molécules chaperonnes apporte des éléments de réponse.

En fait, les équilibres de transformation des structures protéiques sont complexes [1]. Trois étapes peuvent être identifiées :

protéine native \rightleftharpoons protéine fondue \rightleftharpoons protéine inactive.

L'étape intermédiaire (*molten globule* des anglo-saxons) est une étape-clé comportant encore des structures secondaires. C'est celle où des agrégats peuvent déjà se former.

Les protéines de stress. Le concept de molécules chaperonnes a émergé depuis quelques années. En fait, elles appartiennent pour leur plus grande part aux protéines de *stress*.

C'est en 1962 que l'on découvre que les chocs thermiques, les traitements aux agents découplants des phosphorylations oxydatives (2-4 dinitro-phénol, salicylate de Na), l'alcool éthylique, etc. font apparaître des *puffs* sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires de drosophile*. En 1974, les premières protéines synthétisées à la suite de ces *stress* sont identifiées. Ces protéines sont universellement rencontrées chez les micro-organismes, les animaux, les plantes. Six familles (Tableau I) sont à ce jour repérées [2].

Les gènes qui codent pour ces protéines commencent à être bien connus. Ils sont contrôlés par des facteurs protéiques présents dans le cytoplasme des cellules et activés par les différents types de *stress*. Une fois activés, ces facteurs viennent se fixer sur des sites (généralement deux) en amont du site promoteur. Indépendamment du contrôle par les différents types de *stress*, ces gènes peuvent être constitutifs ou s'exprimer au cours du développement.

Le concept de molécules chaperonnes. En étudiant la formation des

nucléosomes, dans des extraits d'œuf de xénope à partir d'ADN et d'histones, Laskey [3] constate qu'il est indispensable de travailler en présence d'une protéine, la nucléoplasmine. En absence de cette dernière, il se forme des agrégats insolubles. La nucléoplasmine ne fait pas partie des nucléosomes. Elle se contente simplement de faciliter les liaisons en empêchant les interactions incorrectes entre histones et ADN.

Au début des années 1980, des études sont effectuées sur la biogenèse de la RUBISCO [4]. La RUBISCO est certainement l'enzyme la plus abondante dans la biosphère. Elle catalyse la fixation du CO₂ dans le cycle de Calvin lors de la photosynthèse. Sa biogenèse requiert une coordination entre génome nucléaire (qui code pour huit sous-unités de 14 kDa) et génome chloroplastique (qui code pour huit grandes sous-unités de 52 kDa). L'assemblage des différentes sous-unités se fait dans le stroma des chloroplastes. On devait démontrer qu'il nécessite une protéine de 60 kDa homologue des protéines de choc thermique hsp 60 (hsp pour *heat shock protein*).

En 1985 [5], le rôle de ces protéines chaperonnes semble devoir être étendu à toute une série de protéines de choc thermique des cellules animales et microbiennes impliquées dans l'assemblage ou le désassemblage d'oligomères du noyau, du cytoplasme ou du réticulum endoplasmique. Il est suggéré que ces protéines peuvent jouer un rôle dans la conformation des protéines dans des cellules non soumises à un *stress*. De plus, leur synthèse peut être accrue au moment d'un *stress* pour limiter le processus de dénaturation.

On distingue aujourd'hui trois classes de molécules chaperonnes [6] (Tableau II). Nous ne reviendrons pas

* Les *puffs* correspondent à des régions de chromatine transcriptionnellement active au niveau desquelles s'accumulent les ARN en cours de transcription. Ils sont bien visibles sur les chromosomes polytènes de drosophile, formés d'un très grand nombre de brins d'ADN.

Tableau I
LES FAMILLES DE PROTÉINES DE *STRESS*

Famille	Fonction
hsp 110 (110 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> • concentrées dans le nucléole
hsp 90	<ul style="list-style-type: none"> • formation de complexe avec les récepteurs des hormones stéroïdes • à la suite d'une déficience en glucose une protéine apparaît dans le réticulum endoplasmique (GRP 94)
hsp 70	<ul style="list-style-type: none"> • molécules chaperonnes • famille la plus importante dans les cellules animales et hautement conservée sur le plan évolutif
hsp 60	<ul style="list-style-type: none"> • molécules chaperonnes (chaperonines)
hsp 20	<ul style="list-style-type: none"> • protéines induites à des stades spécifiques lors du développement chez la drosophile • protéines de faible poids moléculaire, très abondantes chez les plantes
Ubiquitine (8,5 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> • impliquées dans le catabolisme protéique

Tableau II
LES DIFFÉRENTES CLASSES DE MOLÉCULES CHAPERONNES ET LEUR FONCTION

Nom	Fonction des protéines
(1) Nucléoplasmine	<ul style="list-style-type: none"> • assemblage des nucléosomes
(2) Chaperonines	
Protéines analogues aux protéines de choc thermique de 60 kDa et 10 kDa (hsp 60 hsp 10)	
(a) <i>E. Coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • indispensables à la viabilité cellulaire • participent à l'assemblage des phages λ, T4 et T5 • impliquées dans la réplication de l'ADN, le <i>turn over</i> des ARNm • maintiennent dans une structure compétente les protéines qui doivent être excrétées (β-lactamase)
GRO EL hsp 60	
GRO ES hsp 10	
(b) Mitochondrie	<ul style="list-style-type: none"> • impliquées dans l'assemblage des systèmes multi-enzymatiques membranaires (ATP synthétase) ou des enzymes matricielles • maintiennent dans une structure compétente certaines enzymes qui transitent par la matrice avant d'être exportées dans l'espace intermembranaire (cytochrome b2)
hsp 60 (analogie avec GRO EL 45 à 54 %)	
hsp 10	
(c) Chloroplaste	<ul style="list-style-type: none"> • impliquées dans l'assemblage de la RUBISCO
hsp 60 (analogie avec GRO EL 46 %)	
hsp 10	
(3) Protéines chaperonnes analogues à des protéines de choc thermique de 70 kDa (hsp 70)	
(a) <i>E. Coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • protéine du gène <i>DnaK</i>, indispensable pour la réplication du phage λ
(b) Cytoplasme	<ul style="list-style-type: none"> • protéine de transport des protéines précurseurs dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique • désassemblage des clathrines dans les processus d'endocytose
(c) Réticulum endoplasmique	<ul style="list-style-type: none"> • protéines fixatrices des chaînes lourdes des immunoglobulines • protéines fixées sur des protéines en cours de glycosylation dans les cellules privées de glucose (GRP 78)
(d) Mitochondrie et chloroplaste	<ul style="list-style-type: none"> • réception des protéines précurseurs dans la matrice des mitochondries et le stroma des chloroplastes
(e) Noyau	<ul style="list-style-type: none"> • on trouve des hsp 70 dans les composants nucléolaires endommagés par des chocs thermiques

sur les propriétés de la nucléoplasmine qui, par ailleurs, ne semble pas faire partie de la même famille que les protéines de choc thermique. La seconde classe porte le nom de chaperonines. Elle regroupe des protéines rencontrées dans les organites et analogues des protéines GROEL et GROES de *E. coli*. Les chaperonines de type hsp 60 sont des édifices macromoléculaires constitués de 14 sous-unités de 60 kDa chacune, structurés en deux couronnes superposées de sept sous-unités. Ces chaperonines sont surtout impliquées dans l'assemblage des systèmes multi-enzymatiques mitochondriaux et chloroplastiques.

Une expérience élégante [7] a montré l'étroite parenté de structure et de fonction entre les chaperonines de *E. coli* et celles des chloroplastes. Par les techniques du génie génétique, on a augmenté la synthèse chez *E. coli* des protéines GROEL et GROES. Dans la même cellule de *E. coli*, on a introduit des plasmides porteurs des gènes de la RUBISCO d'une cyanobactérie, *A. Nidulans*. On a obtenu dans les cellules de *E. coli* une RUBISCO fonctionnelle constituée de ses 16 sous-unités.

La dernière classe de molécules chaperonnes regroupe des protéines analogues des hsp 70. Elles sont essentiellement impliquées dans la synthèse des protéines précurseurs dotées d'une séquence « signal » et de leur translocation au travers des membranes.

Molécules chaperonnes et biogenèse des mitochondries. La biogenèse des mitochondries est un phénomène complexe sous la dépendance de deux génomes : (1) le génome mitochondrial qui code, dans les cellules animales, pour 13 protéines appartenant à la chaîne respiratoire ou à l'ATP synthétase ; (2) le génome nucléaire qui code pour les 400 à 500 protéines restantes.

La synthèse des protéines mitochondriales d'origine nucléaire se fait en cinq étapes.

(1) La synthèse dans le cytoplasme d'une protéine précurseur dont la séquence « signal » peut atteindre jusqu'à 80 acides aminés.

(2) La reconnaissance de cette

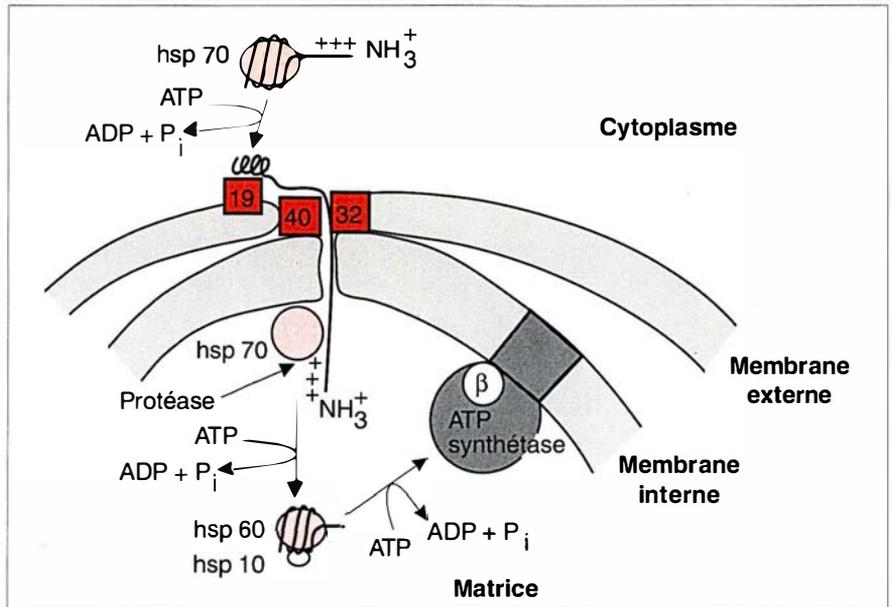


Figure 1. **Le rôle des protéines de choc thermique dans la synthèse des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire et l'assemblage des systèmes multi-enzymatiques de la membrane interne.** Nous suivons ici le cheminement de la sous-unité β de l'ATP synthétase de *S. Cerevisiae*. La protéine est synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'une protéine précurseur de 56 kDa (la protéine physiologiquement active est de 54 kDa). Elle est prise en charge par une protéine de choc thermique type hsp 70 qui l'achemine jusqu'au récepteur de la membrane externe (19 kDa). Deux autres protéines interviennent dans le processus de réception-translocation (40 kDa et 32 kDa qui est fortement analogue au transporteur du phosphate mitochondrial). Dans la matrice des mitochondries, une autre protéine hsp 70 prend en charge la sous-unité β et facilite ainsi le processus de translocation. La séquence « signal » est clivée par une protéase spécifique. La sous-unité β est alors prise en charge par un complexe hsp 60-hsp 10 qui facilite son insertion dans l'ATP synthétase.

séquence « signal » par des protéines réceptrices localisées dans la membrane externe des mitochondries.

(3) La translocation de la protéine précurseur au travers des deux membranes accolées dans un processus qui est dépendant du potentiel de membrane.

(4) Le clivage dans la matrice de la séquence « signal » par une peptidase spécifique.

(5) L'insertion de la protéine mature, soit dans un système multi-enzymatique de la membrane interne, soit sous une forme oligomérique, dans la matrice ou un autre compartiment mitochondrial.

Les résultats les plus récemment acquis concernent deux aspects : (1) les protéines réceptrices ou impliquées dans le processus de translocation [8-10] (figure 1) ; (2) les protéi-

nes analogues aux protéines de choc thermique indispensables à l'ensemble du processus [11, 12].

Quatre protéines de type hsp ont été identifiées. Dans le cytoplasme une protéine de la famille hsp 70 maintient la protéine compétente pour le processus de reconnaissance membranaire et de translocation. Dans la matrice, une protéine de la même famille facilite le transit au travers du double système membranaire et maintient la conformation de la protéine dans une structure adéquate pour le clivage de la séquence « signal ». Enfin, une protéine de la famille hsp 60, probablement associée à une hsp 10, facilite l'insertion de la protéine dans le système multi-enzymatique lui correspondant.

D'autres résultats [13] accréditent l'hypothèse que les hsp 70 et hsp 60

de la matrice mitochondriale seraient impliquées dans l'assemblage des microtubules.

Les protéines chaperonnes ont-elles usurpé leur nom ? Les points les plus saillants de leurs propriétés sont les suivants :

— elles sont impliquées dans les changements conformationnels majeurs et empêchent les interactions pouvant conduire à la formation d'agrégats ;

— elles ne sont pas partie prenante des systèmes multi-enzymatiques dont elles ont catalysé l'assemblage ;

— elles développent généralement une activité ATPase lors de la dissociation du complexe protéine chaperonne-protéine, complexe qui ne met jamais en jeu des liaisons covalentes.

La conformation native des protéines dépend de la séquence des acides aminés mais le passage de l'une à l'autre n'est pas, dans un contexte cellulaire, un phénomène spontané. Il requiert des aides. Comment les protéines chaperonnes font-elles pour guider la morphogénèse des protéines dans des directions compatibles avec l'homéostasie cellulaire ? Nous ne disposons d'aucune information sur leur mécanisme d'action. Elles n'ont pas usurpé leur nom. Chaperonner en vieux français veut dire accompagner, surveiller une jeune personne pour qu'elle ne fasse pas de bêtises ■

Roger Durand

Professeur de biochimie, Université Blaise-Pascal, Clermont II, URA Cnrs 360, 63177 Aubière Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Fischer G, Schmid FX. The mechanism of protein folding. Implication of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* 1990 ; 29 : 2205-12.
2. Lindquist S, Graig EA. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 1988 ; 22 : 631-77.
3. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 1978 ; 275 : 416-23.
4. Ellis RJ. Molecular chaperones : the plant connection. *Science* 1990 ; 250 : 954-9.
5. Pelham JRB. Speculations on the function of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 1986 ; 46 : 959-61.
6. Ellis RJ, Van Der Vies SM, Hemmingsen SM. The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp* 1989 ; 55 : 145-53.
7. Goloubinoff P, Gatenby AA, Lorimer GH. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 1989 ; 337 : 44-7.
8. Hartl FU, Neupert W. Protein sorting to mitochondria : evolutionary conservation of folding and assembly. *Science* 1990 ; 247 : 930-7.
9. Pain D, Murakami H, Blobel G. Identification of a receptor for protein import into mitochondria. *Nature* 1990 ; 347 : 444-9.
10. Baker KP, Schatz G. Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. *Nature* 1991 ; 349 : 205-8.
11. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig FA, Pfanner N. Requirement for hsp 70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 1990 ; 348 : 137-43.
12. Cheng YM, Hartl FU, Martin J, *et al.* Mitochondrial heat-shock protein hsp 60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 1989 ; 337 : 620-5.
13. Gutpa RS. Mitochondria, molecular chaperone proteins and the *in vivo* assembly of microtubules. *TIBS* 1990 ; 15 : 415-8.

TIRÉS A PART

R. Durand.

m/s n° 5, vol. 7, mai 91