

LES PRÉCURSEURS HORMONAUX POLYPEPTIDIQUES : LE TEMPS DE LA MATURITÉ

Xavier Bertagna

A défaut d'être égaux, les peptides hormonaux, qu'ils soient grands ou petits, naissent de la même façon. Au sein de précurseurs, ils sont tous libérés après un processus dit de maturation. Ce dernier associe, à des degrés divers, protéolyses et modifications chimiques. Bien établi aujourd'hui, ce mécanisme universel a connu quelques ratés fameux. On se souviendra que le premier et le plus court des neuropeptides hypothalamiques, le TRH, a vécu une période où sa biosynthèse était enzymatique à partir des acides aminés qui le composent. Une erreur en paternité corrigée, bien plus tard, lorsqu'un ADN complémentaire d'un messager isolé de la peau de grenouille révéla la vraie et longue nature du précurseur du tripeptide...

Si aucun endocrinologue n'ignore l'importance vitale de l'insuline et de l'ACTH, aucun biochimiste ne méconnaît le rôle pilote qu'ont joué ces deux hormones dans la reconnaissance des précurseurs polypeptidiques. Sitôt établie, la structure de la molécule d'insuline posait la question du mécanisme réglant l'assemblage idoine de ses deux chaînes. Pour résoudre ce problème, Donald Steiner, jeune étudiant à Chicago, développa une approche élégante utilisant la biosynthèse *in vitro*, d'abord dans un insulinome humain puis dans des îlots de Langerhans de rat : par ses expériences classiques de chasse isotopique après un marquage bref (*pulse-chase*), il découvrit un intermédiaire de haut poids moléculaire possédant des épitopes de l'insuline. La suite fut la purification de la pro-insuline par des techniques biochimiques classiques et l'établissement de sa structure primaire : celle-là dévoila, à l'intérieur d'un précurseur polypeptidique, les deux chaînes A et B de l'insuline reliées par un peptide de connection imprimant la disposition conformationnelle propre à établir les ponts disulfures adéquats [1].

A propos de l'ACTH, une question intriguait les cliniciens : pourquoi ses variations plasmatiques étaient-elles toujours et systématiquement accompagnées par des variations parallèles d'une autre hormone la β -MSH ? A l'ère de la pro-insuline, après la découverte des lipotropines et de la *big-ACTH*, l'hypothèse d'un précurseur commun était incontournable. Renforcée par l'étude de cellules isolées d'une tumeur corticotrope de souris (AtT20), elle fut définitivement confirmée par le clonage de l'ADN complémentaire de la proopiomélanocortine (POMC) à partir de l'hypophyse de bœuf [2].

La découverte des précurseurs polypeptidiques aura donc d'abord été la solution élégante apportée aux problèmes du puzzle moléculaire de certains systèmes hormonaux peptidiques. D'autres énigmes seront ainsi résolues, comme celle unissant vasopressine et ocytocine à leur neurophysines respectives ; quelques couacs retentissants seront rapidement oubliés comme ceux du précurseur commun de l'ACTH et de la calcitonine, ou encore du super-précurseur de toutes les hormones peptidiques... ! Avec la POMC, la génétique moléculaire entrait en jeu. Son fantastique pouvoir amplificateur allait rapidement faire exploser le domaine, si bien qu'aujourd'hui aucune hormone,

ADRESSE ET TIRÉS À PART

X. Bertagna : professeur d'endocrinologie. Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

grande ou petite, n'a résisté à la vague des précurseurs. De véritables gisements de séquences ont été mis au jour d'où se sont dégagées les grandes règles communes à tous les précurseurs polypeptidiques.

Dans l'ordre, le signal peptide est la séquence hydrophobe qui précède la partie N-terminale de tous les précurseurs. Il est l'élément indispensable qui guide la protéine naissante vers le réticulum endoplasmique rugueux et permet son passage au travers de ses membranes pour conférer à l'hormone sa destinée sécrétoire. Son rôle physiologique crucial, largement démontré dans plusieurs systèmes expérimentaux, vient d'être confirmé de superbe façon chez l'homme : une mutation ponctuelle d'un acide aminé du signal peptide de la préproPTH humaine interdit sa sécrétion et est responsable d'une forme familiale d'hypoparathyroïdie [3].

La confrontation de toutes ces séquences inédites a rapidement révélé une autre constante : au sein de leur précurseur, les hormones connues sont presque toujours encadrées par un doublet d'acides aminés basiques, véritable site consensus pour un clivage protéolytique [4]. A quelques rares exceptions près (le facteur natriurétique de l'oreillette, la somatostatine 28, la cholécystokinine..., obtenus après protéolyse sur un seul acide aminé basique), ces sites sont pratiquement indispensables : la métenképhaline, présente au sein de la POMC, n'y est pas flanquée d'une paire d'acides aminés basiques à son extrémité C-terminale. En conséquence, elle n'est pas produite par ce précurseur (contrairement à ce qui apparaît dans certains textes officiels !)... son vrai précurseur est ailleurs, c'est la proenképhaline.

L'importance fonctionnelle de ces sites de clivage est également illustrée par la pathologie. Dans plusieurs familles, des mutations ponctuelles portant sur un acide aminé basique constitutif de ces sites empêchent la maturation correcte de la pro-insuline et aboutissent à la sécrétion de pro-insuline et/ou d'intermédiaires de la maturation (peptide C relié soit à la chaîne A, soit à la chaîne B). Comme son ligand, le récepteur de

l'insuline est constitué par deux chaînes peptidiques dérivant d'un même précurseur (prorécepteur) par un clivage protéolytique portant, lui aussi, sur un site constitué par deux acides aminés basiques : une simple mutation ponctuelle, transformant une arginine en sérine sur ce site, interdit la maturation du prorécepteur et réduit radicalement son affinité pour son ligand, entraînant une forme familiale de résistance à l'insuline [5]. Le rôle potentiel de ces sites de clivage protéolytique a, bien sûr, pesé sur la façon de lire les précurseurs. La tendance a été naturellement de faire glisser un curseur qui s'arrêtait automatiquement sur chaque doublet basique, découpant autant de nouveaux peptides, et pourquoi pas de nouvelles hormones ! Cette approche est en réalité un peu courte. Il est apparu, en effet, deux notions essentielles : tous ces sites ne sont pas obligatoirement utilisés, et certains sont utilisés différemment selon le type cellulaire où s'exprime le précurseur considéré (voir les deux exemples des précurseurs du glucagon et de l'ACTH), (voir, dans ce même numéro, les articles de F. Pecker, D. Bataille et D. Vieau).

Ces précautions étant bien respectées, il reste que la moisson de molécules nouvelles a quand même été fructueuse : beaucoup d'anciennes hormones sont maintenant affublées de produits satellites co-sécrétés avec elles et donc éventuellement utiles pour l'investigateur clinicien ; la plupart ont des noms un peu ésotériques qui cachent la méconnaissance de leur rôle biologique — s'il existe — et se raccrochent à des notions purement structurales (C-peptide, *N-terminal fragment*, *joining peptide*, PHM, PYY...). D'autres, en revanche, se révèlent doués d'action biologique : le *GnRH-associated peptide* dans le précurseur du GnRH, le préproTRH (160-169) dans le précurseur du TRH, l'oxyntomoduline dans le précurseur du glucagon... Cette approche déborde le cadre des seuls précurseurs hormonaux. Les chromogranines, co-constituants de la fraction soluble des granules de sécrétion, ont une organisation structurale qui rappelle celle des précurseurs hormonaux

classiques. La chromogranine A ne comporte pas moins de 9 sites de clivage protéolytique potentiel ; deux de ses fragments possédant des activités biologiques ont été caractérisés : la pancréastatine et la chromostatine. Tous deux sont impliqués dans des phénomènes ultra-courts de rétrocontrôle négatif autocrine [6].

A côté des clivages protéolytiques, le précurseur polypeptidique, ou ses fragments, subissent de nombreuses modifications chimiques : phosphorylation, glycosylation, acétylation... Une des plus importantes est probablement l'amidation C-terminale, qui n'est pas sans conséquence sur l'activité biologique des substrats ainsi modifiés. L'enzyme responsable, la peptidyl glycine alpha-amidating monooxygénase, a été une des premières enzymes de maturation clonées (voir l'article de L. Ouafik dans ce même numéro).

Curieusement, les mécanismes de la protéolyse des précurseurs, les premiers entrevus, restent encore aujourd'hui les plus difficiles à démonter et les enzymes impliquées (maturases ou convertases) commencent seulement d'être imaginées. Longtemps ingrate, cette recherche est probablement sur le point d'aboutir. L'espoir vient de deux horizons : de façon — presque — prévisible, de l'utilisation habile des techniques de génétique moléculaire, et — de façon plutôt inattendue... — d'une levure. Depuis quelques années, de nombreux travaux s'attachent à étudier l'expression de gènes ou d'ADN complémentaires, sauvages ou mutés, des polypeptides précurseurs transfectés dans différents types de cellules endocrines ou non endocrines [7]. De toutes ces études, il ressort que l'utilisation d'un site de clivage dépend à la fois de sa séquence propre et immédiatement adjacente, et de l'environnement cellulaire (facteurs actifs en *cis* et en *trans*... au niveau protéique !) : le même doublet dibasique peut être utilisé différemment dans un même type cellulaire au sein de deux précurseurs différents ; le même doublet dibasique peut être utilisé différemment au sein du même précurseur dans deux types cellulaires différents. L'exemple caricatural

RÉFÉRENCES

1. Steiner DF, Clark JL, Nolan C, *et al.* Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Rec Progr Horm Res* 1969 ; 25 : 207-82.
 2. Nakanishi S, Anoue A, Kita T, *et al.* Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* 1979 ; 278 : 423-7.
 3. Arnold A, Horst SA, Gardella TJ, Baba H, Levine MA, Kronenberg HM. Mutation of the signal peptide-encoding region of the preproparathyroid hormone gene in familial isolated hypoparathyroidism. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1084-7.
 4. Douglass J, Civelli O, Herbert E. Polyprotein gene expression : generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Ann Rev Biochem* 1984 ; 53 : 665-715.
 5. Yoshimasa Y, Seino S, Whittaker J, *et al.* Insulin-resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. *Science* 1988 ; 240 : 784-7.
 6. Galindo E, Rill A, Bader MF, Aunis D. Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin A, inhibits chromaffin cell secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1426-30.
 7. Mains RE, Dickerson IM, May V, *et al.* Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. *Front Neuroendocrinol* 1990 ; 11 : 52-89.
 8. Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J. Isolation of the putative structural gene for the Lys-Arg-cleaving endopeptidase required for the processing of yeast pre-pro-alpha-factor. *Cell* 1984 ; 37 : 1075-89.
 9. Smeekens SP, Steiner DF. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 2997-3000.
 10. Seidah NG, Gaspar L, Mion P, Marcinkiewicz M, Mbikay M, Chrétien M. cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and Furin gene products : tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 1990 ; 9 : 415-24.
 11. Thomas G, Thorne BA, Thomas L, *et al.* Yeast Kex2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine pro-hormone in mammalian cells. *Science* 1988 ; 241 : 226-30.
 12. Zollinger L, Racine C, Crine P, *et al.* Intracellular proteolytic processing of pro-opiomelanocortin in heterologous Cos-1 cells by the yeast Kex2 endopeptidase. *Biochem Cell Biol* 1990 ; 68 : 635-40.
 13. Seidah NG, Marcinkiewicz M, Benjannet S, *et al.* Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin and Kex2 : distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 1991 ; 5 : 111-22.
 14. Fuller RS, Brake AJ, Thorner J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing convertase. *Science* 1989 ; 246 : 482-6.
- est celui de la POMC, qui subit une maturation strictement différente dans les cellules du lobe antérieur ou intermédiaire de l'hypophyse. Schématiquement, deux hypothèses — non exclusives — ont été proposées : ou bien les systèmes enzymatiques des deux types cellulaires sont les mêmes, mais agissent différemment en raison du pH, de la quantité de substrat, de la présence d'inhibiteurs compétitifs... ou bien les systèmes enzymatiques sont différents. Ces deux hypothèses ne pouvaient faire l'économie de la purification des enzymes de maturation. C'est là qu'intervient la levure. *Saccharomyces cerevisiae* ne fait pas de POMC ; en revanche, elle produit un précurseur polypeptidique, le *pre-pro-alpha-mating-factor* qui libère par protéolyse sur des sites dibasiques un petit peptide, le *alpha mating factor*, crucial pour la reproduction de la levure. C'est l'enzyme Kex2 [8], isolée et clonée, qui assure la maturation de ce précurseur. Il s'agit d'une sérine protéase dépendante du calcium, analogue aux subtilisines bactériennes. Son rôle physiologique est attesté par l'existence de mutants ayant perdu la fonction Kex2. L'idée que une (ou des) protéine(s) de type Kex2 existe(nt) également chez le mammifère et exerce(nt) un rôle de type maturase a été à l'origine de cette approche nouvelle et finalement payante : deux groupes ont simultanément utilisé des oligonucléotides encadrant le site catalytique de Kex2 pour cloner par PCR les protéines de mammifères analogues à partir d'ARN messagers provenant d'un insulinome humain ou d'hypophyses de souris [9, 10]. Par cette méthode, deux enzymes ont été clonées : PC1, PC2. Toutes deux sont très proches de Kex2 et les publications récentes montrent qu'elles peuvent assurer la maturation de la POMC exprimée dans des cellules endocrines ou même non endocrines [11, 12]. Le plus intéressant est que PC1 et PC2 ont une distribution différente et que, dans l'hypophyse, par exemple, elles sont présentes, chacune, dans le type cellulaire attendu d'après leur profil d'action sur la POMC : PC1, qui libère l'ACTH de la POMC, est trouvée de façon prédominante dans les cellules corticotropes antéhypophysaires, alors que PC2, qui libère l'alpha-MSH, est abondante dans les cellules du lobe intermédiaire [13]. *In fine* — et de façon, après tout, non surprenante — différentes enzymes entraînent donc différentes maturations. Une autre protéine, la furine, codée par le gène *fur* identifié par sa proximité vis-à-vis du proto-oncogène *fos/fps*, a révélé de façon inattendue une structure homologue à celle de Kex2 et aux subtilisines, et donc aussi à PC1 et PC2 [14]. Contrairement à PC1 et PC2, la distribution de la furine n'est pas limitée aux seules cellules endocriniennes. Cette enzyme est retrouvée dans la plupart des tissus, y compris le foie. Par opposition aux enzymes précédentes qui exercent leur action sur les protéines de la voie « contrôlée », la furine agirait sur les protéines sécrétées par la voie constitutive, telle la proalbumine, ou sur des glycoprotéines de membranes,... comme le récepteur de l'insuline (voir l'article de D. Germain *et al.*, p. 895 de ce numéro). La découverte de cet ensemble — on parle plutôt, maintenant, de superfamille — d'enzymes permet de boucler la boucle. L'insulinome, encore une fois, aura beaucoup rendu service. L'avenir, c'est comprendre les mécanismes d'action de ces enzymes, le contrôle de leur expression cellulaire, et repérer bientôt les premières « maturopathies », si je puis me permettre ce néologisme. C'est aussi, peut-être, manipuler et utiliser ces systèmes à volonté. Agir, par exemple, sur les processus de maturation, par des inhibiteurs, pour contrôler les conséquences d'un syndrome d'hypersécrétion, ou encore, à l'ère où naissent les espoirs de la thérapie génique, utiliser ces enzymes pour concevoir une nouvelle stratégie de supplémentation hormonale : faire produire un peptide hormonal par une cellule non endocrine devient, en effet, possible si, à côté de son précurseur, on fait s'exprimer aussi l'enzyme de sa maturation. L'ironie serait alors que, pas à pas, on recrée de façon strictement artificielle, mais à des fins bénéfiques, un véritable syndrome de sécrétion ectopique, un peu atypique, peut-être utopique... mais qui sait ! ■