

# **ENZYMES**

**CATALYSEURS DU MONDE VIVANT**

Jean PELMONT

**Presses Universitaires de Grenoble**

**1995**

### ***La Collection Grenoble Sciences***

La Collection Grenoble Sciences fut créée à l'Université Joseph Fourier avec un triple objectif :

- permettre d'offrir aux étudiants et usagers des ouvrages à des prix convenables,
- constituer une mémoire pour d'excellents documents qui restent souvent chez leurs auteurs,
- réaliser des ouvrages correspondant vraiment à un objectif clair, en contrepoint des ouvrages réalisés par rapport à tel ou tel programme plus ou moins officiel.

Les documents sont, pour la plupart, publiés dans le seul cadre de l'Université Joseph Fourier. Ceux qui sont destinés à un plus vaste public sont sélectionnés, critiqués par un comité de lecture et édités dans cette collection spécifique des Presses Universitaires de Grenoble.

### ***Directeur de la Collection Grenoble Sciences***

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

### ***Comité de lecture de Enzymes, catalyseurs du monde vivant :***

M. BLOCK, Professeur de biologie cellulaire à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

A. COZZONE, Professeur de biochimie à l'Université Claude Bernard - Lyon 1

Membre de l'Institut Universitaire de France

J.P. JOSELEAU, Professeur de biochimie à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

P.V. VIGNAIS, Professeur de biochimie à l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

### ***Déjà parus :***

Chimie. Le minimum vital - J. Le Coarer

Mathématiques pour les sciences de la nature et de la vie - F. et J.P. Bertrandias

Endocrinologie. Fondements physiologiques - S. Idelman

Minimum competence in scientific English - J. Upjohn, S. Blattes et V. Jans

Analyse numérique et équations différentielles - J.P. Demailly

Introduction à la Mécanique statistique - E. Belorizky et W. Gorecki

Exercices corrigés d'Analyse (tomes 1 et 2) - D. Alibert

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques - J. Pelmont

La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites - P. Foster

Listening comprehension for scientific English - J. Upjohn

Electrochimie des solides - C. Déportes *et al.*

La Turbulence - M. Lesieur

Exercices et problèmes corrigés de Mécanique statistique - E. Belorizky et W. Gorecki

La symétrie en mathématiques, physique et chimie - J. Sivardière

La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels - J.P. Franc *et al.*

L'Asie, source de sciences et de techniques - M. Soutif

### ***A paraître :***

L'ergomotricité. Le corps, le travail et la santé - M. Gendrier

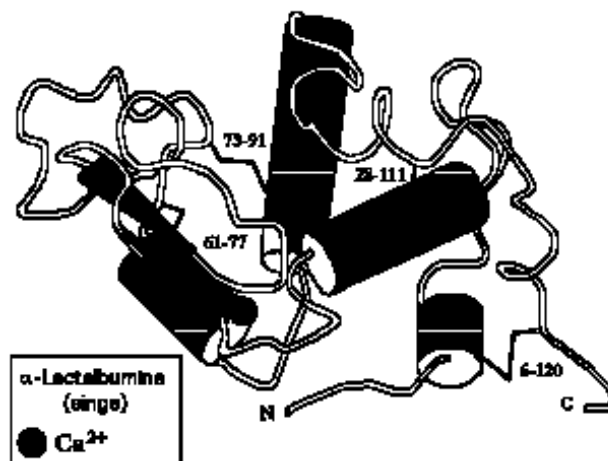
Introduction aux variétés différentielles - J. Lafontaine

# **EXTRAITS**

## DÉNATURATION ET RENATURATION PAR ÉTAPES

Il est clair qu'une protéine dénaturée ne récupère pas d'un seul coup sa structure native sans passer par différents stades intermédiaires. L'idée qui prévaut généralement consiste à voir ces intermédiaires comme des structures très instables, donc non isolables telles quelles, placées sur le chemin des essais successifs effectués par le polypeptide dans la recherche d'une structure compacte d'énergie libre la plus basse possible. La dénaturation suivrait *grosso modo* le cheminement inverse. Cette conception simple se heurte à un nombre grandissant d'exceptions. Placées dans des conditions déterminées des protéines ont certaines propriétés qui rappellent leur état natif compact, alors que d'autres sont caractéristiques de l'état déroulé. Cela fait donc penser à un stade intermédiaire d'enroulement, moins compact que la structure native, sur lequel on continue à s'interroger. On a comparé le passage de l'état natif à cette forme intermédiaire à une sorte de liquéfaction. La protéine est devenue une gouttelette à demi fondue, désignée dans la littérature comme le "**molten globule**"<sup>1</sup> (voir Glossaire). Il est probable qu'il n'y a pas un seul état de ce type, mais plusieurs conformations intermédiaires, qui sont précisément celles que les chaperons reconnaissent. Le molten globule serait généralement très instable en solution, ce qui expliquerait pourquoi on ne peut l'observer directement que dans quelques rares cas.

Une structure aussi "liquide" est beaucoup moins bien définie que celle d'une protéine déterminée par cristallographie. L'analyse en est rendue difficile, à moins d'avoir trouvé le modèle idéal de protéine. L' **$\alpha$ -lactalbumine** bovine est probablement un très bon matériel d'étude<sup>2</sup>. Cette petite protéine fait partie d'un système enzymatique qui synthétise le lactose au cours de la lactation (lactose synthétase), mais sa célébrité vient à l'origine de sa ressemblance au lysozyme par sa séquence et sa structure<sup>3</sup>.



<sup>1</sup> O.B. Ptitsyn & coll. (1990) FEBS Lett. 262, 20-24.

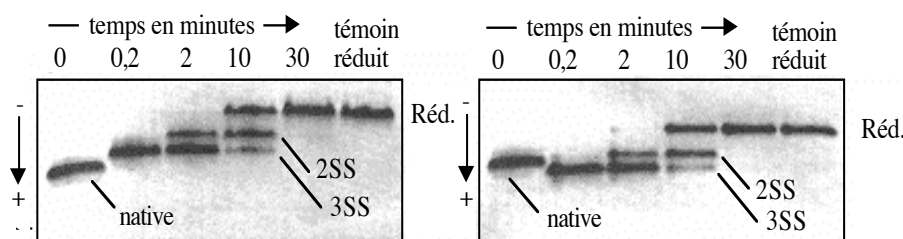
<sup>2</sup> K.R. Acharya & coll. (1991) J. Mol. Biol. 208, 99-127 ; J.J. Ewbank & T.E. Creighton (1993) Biochemistry 32, 3677-3693 et 3694-3707.

<sup>3</sup> K. Nitta & S. Sugai (1989) Eur. J. Biochem. 182, 111-118 ; K.R. Acharya & coll. (1989) J. Mol. Biol. 208, 99-127. L'homologie est essentiellement avec les lysozymes de type c, qui lient le calcium, par l'intermédiaire de 3 résidus aspartate fortement conservés dans l'évolution, Elle traduit une parenté évolutive qui se retrouve au niveau du découpage des gènes en 4 exons et 3 introns.

Le dessin précédent montre la structure générale de l' $\alpha$ -lactalbumine du babouin déterminée par Achyrya et coll., et considérée comme très représentative de l'architecture des protéines de la même famille.

On a indiqué la position des quatre ponts disulfures ainsi que le lieu d'insertion du calcium. Celui-ci est lié avec une forte affinité et contribue à stabiliser la protéine. L'intérêt de l' $\alpha$ -lactalbumine est de montrer des formes déroulées intermédiaires après réduction progressive des ponts disulfures par un agent tel que le DTT. La réduction n'affecte pas à la même vitesse tous les ponts disulfures. Le premier attaqué est le plus exposé entre 6 et 120. Le suivant est le pont 28-111. La rupture de ces deux ponts disulfures entraîne un certain gonflement d'une partie de la molécule qui reste cependant organisée globalement comme dans la conformation native à condition que le calcium soit présent. Les molécules n'ayant plus que 2 ou 3 ponts disulfures continuent à lier un ion calcium et conservent donc une grande partie de leur intégrité physique. Il n'en est plus de même si on enlève le calcium par l'addition d'un complexant (l'EDTA), ce qui provoque l'effondrement d'une grande partie de la molécule.

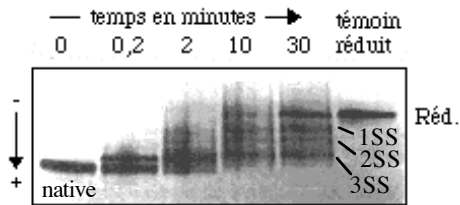
L'image suivante illustre le changement d'état subi par la protéine après réduction des ponts disulfures en présence de calcium<sup>1</sup>. Au bout du temps indiqué les fonctions thiols libres engendrées sur le polypeptide sont bloquées par l'iodoacétamide (à gauche) ou l'acide iodoacétique (à droite). On examine ensuite la migration de la protéine dans un gel de polyacrylamide (sans détergent tel que le SDS). Chaque piste de migration verticale est obtenue avec un échantillon réduit pendant un laps de temps déterminé.



La forme native (4 ponts disulfures) est en principe la plus rapide, car à masse et charge égales elle est plus compacte. C'est bien ce que l'on constate à gauche, la réduction de une liaison (3SS) ou de deux (2SS) ayant entraîné un gonflement partiel qui devient évidemment maximum après réduction complète (Réd.). Dans le résultat de droite la réduction d'un seul pont disulfure entraîne paradoxalement une accélération de la migration par rapport à la protéine native. L'explication est simple. Les deux thiols libres ont été bloqués chacun par l'acide iodoacétique, apportant au polypeptide deux charges négatives supplémentaires. L'augmentation de la charge globale vient renverser l'effet dû à la dénaturation partielle.

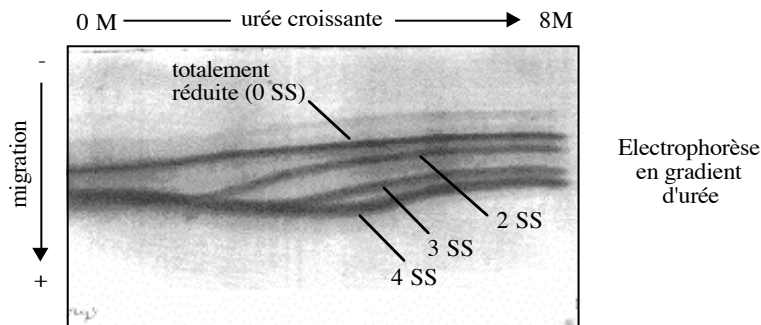
Et si on enlève le calcium ? La réduction entraîne rapidement la désorganisation de la molécule. Le dessin montre la même expérience que plus haut en présence d'EDTA, le blocage final des thiols libres étant fait par l'iodoacétamide (pas de charges supplémentaires introduites).

<sup>1</sup> Ewbank & Creighton, déjà cités.



Observez que la résolution est devenue moins bonne. Les zones devenues "baveuses" traduisent la présence d'une population hétérogène de molécules ayant le même nombre de ponts disulfures mais avec des conformations légèrement différentes les unes des autres.

Que se passe-t-il si on dénature avec l'urée les protéines partiellement réduites ? Une technique intéressante consiste à faire migrer l' $\alpha$ -lactalbumine native sur toute la largeur du gel de polyacrylamide après l'avoir plus ou moins réduite, puis bloquée à l'iodoacétamide. On maintient transversalement un gradient de concentration d'urée comme indiqué sur la figure<sup>1</sup>. Toutes les molécules ont la même charge, mais le tri se fait surtout sur la conformation plus ou moins compacte ou relâchée des polypeptides. L'idée est qu'une ligne nette continue traduit la présence d'une population relativement homogène de molécules ayant à peu près la même conformation, alors que la situation contraire produirait des plages diffuses.



Ce type d'expérience suggère l'existence d'une dénaturation passant par des paliers qui correspondraient aux fameuses gouttelettes à demi fondues, les "molten globules" des articles en anglais.

Et la renaturation ? La même méthodologie peut s'appliquer à une protéine préalablement réduite et dénaturée par l'urée, puis déposée sur la largeur d'un gel où existe un gradient transversal d'urée. Les molécules se renaturent également par paliers, en reconstituant leurs ponts disulfures corrects moyennant quelques erreurs (des associations contre nature entre deux thiols)<sup>2</sup>.

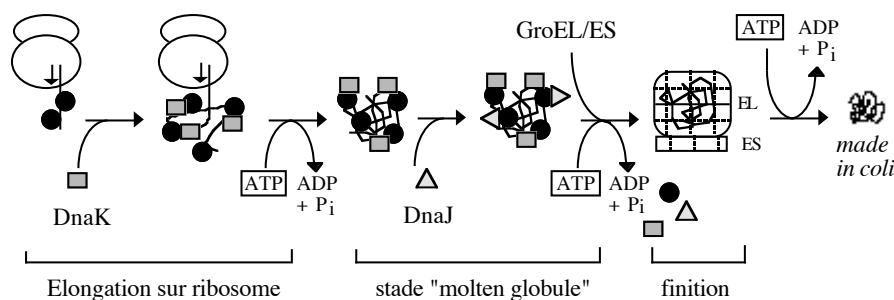
Peut-on en tirer un modèle unitaire capable d'expliquer le cheminement exact de l'enroulement et du déroulement des polypeptides ? Probablement pas, les situations étant trop diverses, et c'est sans doute pour cela que la nature a dû prévoir une série de protéines HSP et chaperons pour faire face à tous les cas de figure et tous les stades d'enroulement. Une vision un peu plus claire du travail de ces protéines de service émerge cependant. Parmi les protéines du choc thermique les **HSP-70** (telles que DnaK) et

<sup>1</sup> La technique, assez délicate, est expliquée dans Golberg & Creighton (1984) Anal. Biochem. 138, 1-18.

<sup>2</sup> Pour une analyse plus complète des concepts utilisés, on consultera avec intérêt l'article de Creighton publié en mars 1991 dans Pour La Science.

**HSP-60** (comme GroEL) n'auraient pas tout-à-fait le même secteur de responsabilité et travailleraient de manière **séquentielle**, au moins dans la mise en pli de l'enzyme rhodanèse faite *in vitro* en présence de HSP du colibacille<sup>1</sup>. Ces dernières œuvrent à grand renfort d'ATP. La protéine DnaK assisté de DnaJ prendraient en charge le polypeptide entièrement déroulé qui émerge du ribosome au cours de son élongation. Ces deux protéines s'associeraient au polypeptide (dans un ordre qui n'est pas certain). L'association de DnaK est raffermissée par la fixation d'ATP. L'**hydrolyse de l'ATP** permet à DnaK de se libérer, mais ne se produirait pas aussitôt, à la manière d'une temporisation laissant le temps à la chaîne naissante de s'allonger suffisamment avant de commencer à se replier. Trop tard, trop tôt ? Il est possible que l'assistant DnaJ empêche la dissociation trop rapide de DnaK au cas où l'ATP aurait été hydrolysé trop précocement. DnaJ servirait donc à mettre le système en attente avant qu'il soit pris en charge par le facteur suivant. Rappelons cependant que cette vision spéculative est bâtie sur la cinétique de renaturation *in vitro* de l' $\alpha$ -lactalbumine, qui n'est jamais qu'une protéine particulière.

Le facteur suivant serait GroEL par l'intermédiaire de GrpE. Celle-ci déclencherait le départ de DnaK/DnaJ et provoquerait la prise en charge par GroEL/ES. DnaK a commencé le travail sur un polypeptide très déroulé, l'amenant peut-être au stade du "molten globule". GroEL/ES finirait le travail, que résume un dessin inspiré du groupe de Hartl (Langer et coll.) :



Ce dessin n'offre qu'une vision simplifiée d'une opération qui doit comporter de nombreuses étapes successives avec une consommation d'ATP encore incertaine, peut-être importante (une mise en pli coûte plus cher qu'une coupe ordinaire, même au rasoir !). Certaines transformations sont probablement réversibles. Par exemple il est tout à fait possible que DnaK, qui préside à l'enroulement, puisse aussi agir comme "déroulase". Ce point précis n'est pas encore éclairci.

La contribution de **DnaJ** à ce processus est quasi certaine. Cette protéine accélère fortement l'hydrolyse de l'ATP par DnaK. Rappelons que celle-ci n'a qu'une action enzymatique très lente lorsqu'elle est toute seule : une molécule d'ATP environ hydrolysée au bout de plusieurs minutes par monomère de DnaK<sup>2</sup>. Le rôle de GrpE serait indépendant du précédent. Elle aiderait DnaK à se débarrasser de l'ADP et à récupérer une nouvelle molécule d'ATP.

Plusieurs cycles d'hydrolyse d'ATP pourraient se produire, permettant à chaque complexe DnaK/DnaJ de desserrer ses liens avec le polypeptide substrat avant de s'y cramponner à

<sup>1</sup> T. Langer & coll. (1992) Nature 356, 683-689.

<sup>2</sup> K. Liberek & coll. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 2874-2878.

nouveau, en se déplaçant un peu plus loin à cette occasion. Ces changements alternés permettraient au polypeptide de se replier par petits coups, le tandem DnaK/DnaJ agissant comme chaperon. Ces mouvements seraient suffisants pour que certaines protéines soient capables d'acquiescer leur structure définitive. D'autres auraient besoin de GroEL. La présence de celle-ci est nécessaire pour que DnaK et DnaJ abandonnent le polypeptide en cours de traitement. Par un mécanisme qu'on s'explique encore mal GrpE est absolument nécessaire au transfert vers GroEL. Une mutation bloquant l'activité de GrpE entraîne une accumulation de peptides incapables de se débarrasser de DnaK/DnaJ. Cette mécanique sophistiquée semble pouvoir faire face à toutes les situations, et l'importance des différentes pièces a toute chance d'être différente d'une protéine à l'autre en fonction de leur problème particulier.

Une confirmation expérimentale des différences qui peuvent exister d'une protéine à l'autre vient d'un travail portant sur la renaturation de l'aspartate aminotransférase<sup>1</sup>. La réaction catalysée par cette enzyme et sa mesure sont expliquées p. 328. Il existe deux variétés de cette protéine dans la cellule (ici des réticulocytes de lapins). L'une d'elles est localisée dans la mitochondrie, l'autre est dans le cytosol. Les deux enzymes présentent de grandes ressemblances par leur séquence et leur structure moléculaire. La protéine mitochondriale, qui est synthétisée comme l'autre enzyme dans le cytosol, a cependant la particularité de posséder une extension N-terminale qui sera éliminée après pénétration dans la mitochondrie (Chapitre 9). Les deux aminotransférases sont dénaturées par le chlorhydrate de guanidine 4 M, mais leur renaturation progressive est possible après dilution avec 40 volumes de tampon : l'apparition de l'activité enzymatique permet de suivre le retour à l'état natif. Ce phénomène est facilité par GroEL et GroES<sup>2</sup>, mais la vitesse et le taux de renaturation dépendent de plusieurs facteurs de façon assez complexe : la température, la présence de GroEL, l'adjonction de GroES et d'ATP-Mg. La renaturation des deux enzymes est inhibée par GroEL seule. Cette inhibition est levée partiellement en présence d'ATP-Mg dans le cas de l'enzyme cytosolique, tandis que l'ATP-Mg et GroES sont nécessaires pour l'aminotransférase mitochondriale. Les deux enzymes se comportent différemment, en dépit de leurs ressemblances, et les écarts sont importants en fonction de la température. On a l'impression que GroEL a des affinités différentes pour les deux protéines en dépit de leur similitude.

D'autres enzymes dénaturées sont piégées efficacement par GroEL et ne sont libérées efficacement qu'en présence de GroES et d'ATP : la Rubisco et plusieurs enzymes mitochondriales sont dans ce cas (rhodanèse, citrate synthase, malate déshydrogénase et ornithine transcarbamylase)<sup>3</sup>. Certaines n'ont pas besoin de GroES et d'ATP pour se libérer. D'autres protéines enfin voient leur renaturation bloquée par GroES et l'inhibition est seulement relâchée par GroES et l'ATP. GroES reconnaît les polypeptides déroulés et les libère ou non par un ou plusieurs cycles impliquant GroES et l'ATP, selon des modalités très variables en fonction du produit traité. Dans l'immensité des cas particuliers, l'enroulement des différentes protéines s'opère un peu ... à la tête du client !!

---

<sup>1</sup> J.R. Mattingly & coll. (1993) J. Biol. Chem. 268, 26320-26327 ; *idem* (1995) J. Biol. Chem. 270, 1138-1148.

<sup>2</sup> Ces protéines bactériennes ne sont donc pas racistes pour les protéines d'eucaryotes, et inversement ! Les polypeptides se replient en fonction de critères physiques qui n'ont rien à voir avec leur origine, et la stratégie de base des chaperonines semble à peu près uniforme chez toutes les espèces vivantes.

<sup>3</sup> J. Martin & coll. (1991) Nature 352, 36-42 ; W. Zhi & coll. (1992) Protein Sci. 1, 522-529 X. Zheng & coll. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7489-7493 ; A.D. Miller & coll. (1993) Biochem. J. 291, 139-144.



Sachez que ces dismutases n'ont absolument pas l'exclusivité de leur affinité pour le superoxyde. Diverses protéines fixent le superoxyde et réagissent avec lui, à commencer par les catalases et peroxydases. Les interférences multiples créées par les ions superoxyde et les divers composants biologiques qui réagissent avec eux compliquent souvent les expériences et sont responsables de nombreuses inexactitudes ou erreurs d'interprétation publiées dans la littérature scientifique.

## L'OXYDASE DES PHAGOCYTES

L'apparition d'un superoxyde omniprésent au cours de la vie des cellules vivantes aérobies constitue un risque permanent contre lequel tous les organismes se sont armés, quitte à retourner la situation à leur profit. Et c'est ce qu'on observe dans le cas des cellules phagocytaires. Ces cellules sont les fantassins des défenses de l'organisme, et se précipitent là où il y a de la bagarre pour éliminer les envahisseurs. A grand renfort de superoxyde. Après contact avec leur cible ou sous l'effet de divers stimuli, les phagocytes produisent brusquement ces radicaux en quantité abondante, grâce à une oxydase spéciale qui oxyde à l'air le NADPH ou le NADH, avec une préférence pour le premier<sup>1</sup>. C'est le phénomène appelé "**explosion respiratoire**" ("respiratory burst"), qui correspond à :



Cette réponse est transitoire, une sorte de crise violente mais brève qui ne persiste pas au-delà de quelques minutes. Les phagocytes particulièrement concernés sont les **polynucléaires neutrophiles** circulants, dont l'action est spécialisée dans la destruction non spécifique de corps étrangers comme des cellules bactériennes<sup>2</sup>. Ils se différencient à partir de cellules de la moelle (voir Glossaire : Phagocytes). Les neutrophiles ont un noyau plurilobé, contiennent de nombreuses granulations lysosomiales appartenant à plusieurs types, et les mitochondries y sont rares. Ils tirent l'essentiel de leur énergie de la glycolyse. Que font les neutrophiles en présence d'une infection ? Leur activité est double : une migration vers le site inflammatoire, la destruction des cellules hostiles par phagocytose.

Les bactéries endommagées libèrent des peptides formylés qui sont captés par des récepteurs portés sur les polynucléaires neutrophiles. Sous l'effet de ce signal, les neutrophiles roulent sur la paroi de l'endothélium, y adhèrent fortement, puis sortent des capillaires par diapédèse pour s'orienter par chimiotactisme vers le foyer. Il y a donc trois étapes dans ce processus, qui est activement examiné par la recherche médicale car tout défaut donne lieu à des pathologies caractérisées par une résistance amoindrie aux infections. Le roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales est favorisé par des interactions faibles entre **sélectines**<sup>3</sup> : les L-sélectines, portées en permanence par les leucocytes, les E- et P-sélectines dont l'expression sur les cellules endothéliales s'accroît au cours de l'inflammation. Le deuxième mécanisme est une association plus forte déterminée par des **intégrines** spéciales portées par les leucocytes. Ces intégrines reconnaissent une protéine de surface de l'endothélium. Cette phase d'adhésion des leucocytes sur

<sup>1</sup> Voir la revue de F. Morel, J. Doussière & P.V. Vignais (1991) Eur. J. Biochem. 201, 523-546.

<sup>2</sup> Les neutrophiles et les monocytes sont parfois appelés les phagocytes professionnels.

<sup>3</sup> L.A. Lasky (1991) J. Cellular Biochem. 45, 139-146. Voir Glossaire. La nomenclature utilisée pour ces protéines, initialement désignées comme LEC-CAM, est en vigueur depuis 1992.

l'endothélium est également favorisée par le fibrinogène<sup>1</sup>. Enfin la troisième phase, extravasation des leucocytes ou diapédèse, est moins bien connue, mais elle est favorisée par une protéine spéciale<sup>2</sup>.

Les leucocytes vont donc se diriger vers le site d'inflammation en remontant le gradient de peptides attracteurs. On sait provoquer expérimentalement ce phénomène à l'aide de peptides artificiels, le plus courant étant le **FMLP** (fMet-Leu-Phe). Le récepteur correspondant ou récepteur du FMLP fait partie de la famille des protéines membranaires à 7 hélices où se rencontrent les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Chapitre 8). La phagocytose des bactéries par ces cellules déclenche une réaction cellulaire conduisant à la formation d'ions superoxydes et autres radicaux. Il en découle une batterie de produits agressifs : peroxydes, radicaux hydroxyle et même dérivés oxydés des halogènes tels que HOCl. Ces derniers sont engendrés par la **myéloperoxydase** (Glossaire) libérée par les granulations lysosomiales (rien de tel qu'un bon nettoyage à l'eau de Javel !)<sup>3</sup>. L'**oxydase** dite de l'explosion respiratoire des phagocytes révèle son importance ... là où elle est absente, c'est-à-dire chez les patients atteints de **granulomatoses chroniques**<sup>4</sup>. Cette maladie héréditaire polymorphe est caractérisée par l'absence d'activation de l'oxydase dans les globules blancs. Une conséquence est le développement continu d'infections bactériennes profondes et graves, qui sont généralement fatales dès l'enfance et dénotent l'absence d'une ligne de défense tout à fait capitale de notre organisme. La pièce maîtresse est une oxydase membranaire flavinique (à FAD) qui abonde dans les cellules phagocytaires. Le 5-déazaFAD agit comme inhibiteur compétitif puissant, ce qui nous ne nous étonne pas car c'est un transporteur d'électrons par paires (p. 729) alors que la production de superoxyde est une réaction radicalaire qui où les électrons sont conduits un à un sur l'oxygène.

On pourrait penser que l'étude enzymologique d'un tel système ne devrait pas poser de difficulté particulière. Il n'en est rien, car y participent un flavocytochrome et au moins 4 facteurs solubles. L'ensemble peut fonctionner comme oxydase dans un système reconstitué en associant au flavocytochrome des protéines du cytosol et du NADPH<sup>5</sup>. Son activation est réalisable *in vitro*. Elle nécessite du GTP et peut être déclenchée par l'acide arachidonique. La production de superoxyde est détectée par réduction du cytochrome c.

Le **flavocytochrome** est facilement repérable par son spectre dans les granules et la membrane plasmique des phagocytes. Une protéine de **22 kDa** qui est un cytochrome **b<sub>558</sub>** à très bas potentiel (-240 mV), s'y trouve étroitement associée avec une glycoprotéine de **91 kDa** où existent des sites pour NADPH et FAD<sup>6</sup>. La partie cytochrome renferme deux

<sup>1</sup> D. Simmons & coll. (1988) Nature 331, 624-627 ; L.R. Languino & coll. (1993) Cell 73, 1423-1434 ; T.M. Carlos & J.M. Harlan (1994) Blood 84, 2068-2101. Les intégrines des leucocytes sont désignées comme Mac-1 et LFA-1. La protéine de surface de l'endothélium est ICAM-1, appartenant à la superfamille des immunoglobulines.

<sup>2</sup> PECAM-1, ou Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, appartenant aussi à la superfamille des immunoglobulines. W.A. Muller & coll. (1993) J. Exp. Med. 178, 449-460.

<sup>3</sup> Une enzyme typiquement leucocytaire (EC 1.11.1.7). Voir Morita & coll. (1986) J. Biochem (Jap.) 99, 761-770. La production d'hypochlorite par 10<sup>6</sup> leucocytes atteindrait 200 nanomoles en 2 h, de quoi tuer 10<sup>8</sup> colibacilles (P. Vignais, communication personnelle).

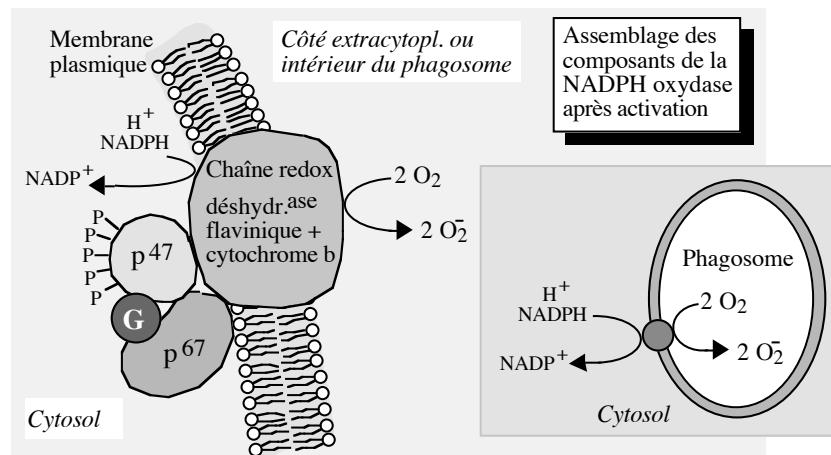
<sup>4</sup> B. Royer-Pokora & coll. (1986) Nature, 322, 32-38 ; A.J. Trasher & coll. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1227, 1-24.

<sup>5</sup> Bromberg & Pick (1984) Cell Immunol. 88, 213-221.

<sup>6</sup> A.W. Segal & coll. (1992) Biochem. J. 284, 781-788 ; J. Doussière & coll. (1993) Biochemistry 32, 8880-8887 ; J. Doussière & coll. (1995) Biochemistry 34, 1760-1770.

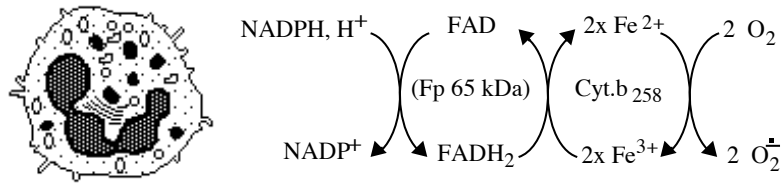
groupes hémiques très proches l'un de l'autre et placés dans la portion transmembranaire de l'hétérodimère. L'un de ces groupes ferait un pont avec la sous-unité de 91 kDa<sup>1</sup>. La structure du flavocytochrome est encore imparfaitement connue et prête à controverse. Certains auteurs observent des analogies de séquence de la glycoprotéine avec d'autres flavoprotéines utilisant le NADPH<sup>2</sup>.

Les **facteurs cytosoliques** sont les protéines **p47** et **p67** (47 et 67 kDa), une petite **protéine G** ou **p21** de type **Rac** (c'est elle qui utilise le GTP), et un constituant **p40** dont la fonction serait surtout structurale. Aucun d'eux ne semble renfermer de cofacteur d'oxydoréduction, et ils n'ont qu'une fonction régulatrice au cours de l'activation. Celle-ci survient après une phosphorylation multiple de p47 qui vient s'associer au flavocytochrome sur la face interne de la membrane. Elle y est rejointe par p67. La formation du complexe ternaire flavocytochrome-p47-p67 semble déterminante pour le fonctionnement de l'oxydase<sup>3</sup>. Les différents polypeptides ont été clonés et séquencés, et le déficit de l'un d'eux suffit à produire la granulomatose chronique.



Le système complet se comporte après activation comme un flavocytochrome de structure complexe capable d'oxyder le NADPH en utilisant l'oxygène de l'air comme accepteur<sup>4</sup>. La réduction monoélectronique de celui-ci engendre du superoxyde qui est déchargé à l'extérieur ou dans la cavité des **phagosomes** (Glossaire). Il y a encore de nombreux points d'interrogation autour du fonctionnement de cette oxydase. On admet provisoirement que la naissance du superoxyde s'effectue au niveau de la partie hémique du cytochrome b<sub>558</sub>.

- <sup>1</sup> A.W. Segal (1986) Nature 326, 88-91 ; T.L. Leto & coll. (1990) Science 248, 727-730 ; M.T. Quinn & coll. (1992) J. Biol. Chem. 267, 7303-7309.
- <sup>2</sup> D. Rotrosen & coll. (1992) Science 256, 1459-1462.
- <sup>3</sup> A. Abo & coll. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16767-16770.
- <sup>4</sup> A.W. Segal & coll. (1992) Biochem. J. 284, 781-788 ; Y. Miura & coll. (1992) FEBS Lett. 297, 171-174 ; J. Doussièrè & coll. (1993) Biochemistry 32, 8880-8887. Le schéma s'inspire de F. Morel, F. Boulay, J. Doussièrè & P.M. Vignais (1992) Médecine/Sciences 8, 912-920.



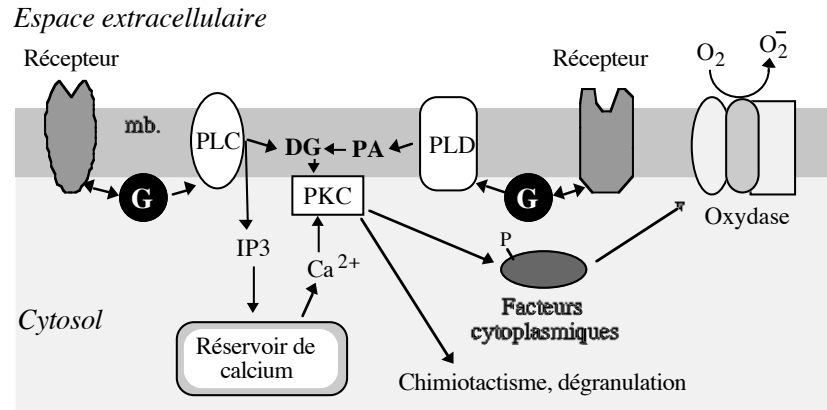
L'activation de l'oxydase leucocytaire sous l'effet d'une agression est un phénomène soigneusement programmé. Elle correspond à une orientation de l'activité cellulaire qui est en compétition avec une autre, le mouvement des leucocytes vers l'élément hostile à travers la paroi des capillaires (diapédèse) sous l'effet d'un chimiotactisme. Ces deux comportements répondent peut-être aux mêmes stimuli, mais une cellule qui migre ne fait pas de superoxyde (ce qui est sans doute préférable pour la santé des cellules endothéliales), flavocytochrome tandis qu'une autre qui en fait ne migre pas.

Le meilleur moyen d'en savoir plus sur l'oxydase de l'explosion respiratoire est probablement de l'observer dans des systèmes reconstitués où on peut reproduire l'activation dont la cellule est le siège quand elle vient au contact d'une cible. Ce procédé consiste à isoler des membranes de neutrophiles bovins contenant l'oxydase à l'état dormant, et à le mettre en présence de différents extraits cytosoliques, voire des protéines purifiées. L'oxydase est dosée par réduction d'un colorant accepteur avec le NADPH comme donneur<sup>1</sup>. On peut aussi mesurer l'apparition du superoxyde. Ces deux méthodologies ne sont pas équivalentes et ont peut-être contribué à donner des résultats contradictoires. Le mécanisme d'activation de l'oxydase en réponse à un stimulus se montre extraordinairement complexe, car il est interconnecté avec d'autres régulations cellulaires<sup>2</sup>. Il est fondé sur une cascade régulatrice fonctionnant à partir d'un récepteur, avec protéine(s) **G**, phospholipase D (**PLD**), phospholipase C (**PLC**), protéine kinase C (**PKC**) sur un principe général déjà décrit au Chapitre 18. On reconnaît sur le diagramme l'intervention des seconds messager, IP<sub>3</sub>, DG (diacylglycérol), PA (acide phosphatidique), la mobilisation du calcium à partir des compartiments extracytosoliques. Les facteurs cytoplasmiques sont les protéines **47** et **67** kDa (ou p47, p67) transmettraient le message activateur (on a détecté maintenant un troisième constituant de **40** kDa qui vient en renfort<sup>3</sup>). On pense que la phosphorylation du facteur 47 par la kinase C est une action déterminante pour la transmission du signal. Il faut ajouter à ces facteurs solubles la petite **protéine G**.

<sup>1</sup> E. Ligeti, J. Doussière & P.V. Vignais (1988) *Biochemistry* 27, 193-200.

<sup>2</sup> B.M. Babior (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 241-243 ; M. Morel & coll. (1991) *Eur. J. Biochem.* 201, 523-546.

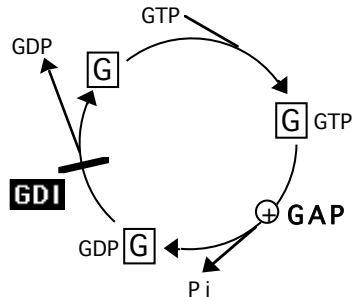
<sup>3</sup> F.B. Wientjes (1993) *Biochem. J.* 296, 557-561.



Des activateurs couramment utilisés *in vivo* sont le peptide **C5a** du complément ou un peptide formylé tel que fMet-Leu-Phe. L'intervention de la phospholipase C dans l'activation de l'oxydase est indiquée par l'action des esters de phorbol qui sont de puissants activateurs non physiologiques de cette phospholipase et déclenchent en même temps l'activation de l'oxydase. Néanmoins la phospholipase C n'apparaît pas comme indispensable<sup>1</sup>, et ne serait qu'une maille d'un réseau de régulation comportant une voie d'activation spécifique pour l'oxydase. Une chose certaine : l'intervention d'une ou plusieurs protéines G. L'activation du système est réalisée en présence d'ions magnésium avec un analogue du GTP, le **GTP $\gamma$ S** dont nous avons eu l'occasion de parler au Chapitre 18. D'autre part l'oxydase cesse d'être activable sous l'action de la toxine botulinique C3, ou des toxines du choléra et de la diphtérie, qui sont connues pour modifier des protéines G par ADP-ribosylation. On sait que ce marquage covalent réalisé par ces différentes toxines est un outil remarquable pour repérer les protéines G. Or leur multiplicité chez les mammifères crée une situation assez épouvantable à démêler. On a reconnu plus d'une soixantaine de petites protéines G (monomériques) chez les mammifères !

La variété de ces protéines a été signalée à la fin du Chapitre 18. Par leur taille réduite (18-26 kDa) elles se distinguent des protéines G trimériques de constitution  $\alpha\beta\gamma$  comme la transducine. Sur un plan général, les petites protéines G se répartissent en plusieurs classes, dont les Ras, Rho, Ran et Rab. Les 4 derniers acides aminés composent une séquence consensus (CAAX dans les Ras) comportant au moins un résidu de cystéine et nécessaire à la poly-isoprénylation. Toutes ces petites protéines sauf les Rab sont **poly-isoprénylées** par une chaîne hydrophobe terminale de 15 ou 20 atomes de carbone et méthylées sur leur carboxyle terminal.

<sup>1</sup> R. Seifert & G. Schultz (1987) Eur. J. Biochem. 162, 563-569.



Il faut se rappeler que ces protéines passent par un cycle de trois états : avec GTP, avec GDP (après lente hydrolyse du GTP) et sans nucléotide. Le cycle est accéléré ou ralenti par interaction avec d'autres protéines (souvent spécifiques d'une protéine G déterminée) : les protéines **GAP** accélèrent l'hydrolyse du GTP, les **GDS** accélèrent l'échange GDP/GTP, tandis que les **GDI** l'inhibent.

Les petites protéines G qui nous intéressent ici sont les **Rho** et **Rac**. L'intervention de petites protéines G dans l'explosion respiratoire leucocytaire est suggérée par un détail intéressant : l'activation ne peut pas avoir lieu dans des cellules en culture (HL-60) si leur métabolisme des composés isoprénoïdes est entravé<sup>1</sup>. Or la **prénylation** terminale est un aspect caractéristique de ces petites protéines. Les protéines Rho sont impliquées dans le fonctionnement de l'actine. Leur intervention est requise dans le chimiotactisme des leucocytes. En première ligne se trouve Rho A, associée avec une GDI spécifique appelée **Rho-GDI**. Le complexe formé est Rho A/Rho-GDI. La GDI est un inhibiteur et empêche Rho de fonctionner puisqu'elle entrave le départ du GDP et empêche la poursuite du cycle<sup>2</sup>. Or l'inhibiteur de Rho, Rho-GDI, s'associe également avec une autre protéine G qui est Rac 1, qui est nécessaire à l'explosion respiratoire. Nous y sommes ! La même protéine GDI (**Rho-GDI**) contrôle à la fois le cycle d'une protéine Rho et celui d'une protéine Rac, formant un complexe avec l'une et avec l'autre : un contrôle sur les mouvements de la cellule (Rho), un autre sur l'activation de l'oxydase (Rac).

On a montré que ces **complexes sont solubles** dans le cytosol parce que la chaîne isoprénoïde portée par les petites protéines G, que l'on croyait nécessaires à l'association avec la membrane, est en fait requise pour la formation du complexe avec Rho-GDI. On subodore qu'il peut y avoir une compétition entre Rho A (polymérisation de l'actine et mobilité cellulaire) et Rac 1 (activation de l'oxydase) pour se lier à Rho-GDI. En somme quand l'une fait tourner son cycle, l'autre a le sien inhibé et vice versa. On pourrait s'expliquer pourquoi une cellule migrante ne fait pas de superoxyde, alors qu'une cellule qui en fait ne change pas de place !

Comment Rac 1 vient-elle à régler l'activation de l'oxydase ? Cette petite protéine G devrait provoquer cette activation quand elle est chargée de GTP, et l'activation devrait cesser quand le GTP est hydrolysé. La célérité avec laquelle survient cette hydrolyse, soit sous l'effet d'une protéine activatrice (GAP), soit dans l'association avec l'oxydase, règle le temps d'action de Rac 1. Ce mode de fonctionnement est caractéristique des protéines G, mais cela ne dit pas comment agit réellement Rac 1, et il existe à ce sujet beaucoup plus d'hypothèses que de certitudes. On peut voir semble-t-il l'activation de l'oxydase par la conjonction de deux mécanismes au moins.

Le premier est fondé sur l'assemblage des facteurs solubles 67 + 47 + 40 kDa, et la réalisation d'un complexe avec le cytochrome  $b_{258}$  comme il a été expliqué plus haut. L'opération serait déclenchée par la phosphorylation de la protéine de 47 kDa. Cette protéine

<sup>1</sup> G.M. Bokoch & F. McCormick (1992) J. Clin. Invest. 89, 402-408 ; J.F. Hancock & A. Hall (1993) EMBO J. 12, 1915-1921.

<sup>2</sup> R. Bourgmeyer & coll. (1992) Biochemistry 31, 12863-12869.

comporte des résidus multiples de sérine, les premiers étant phosphorylés par la **protéine kinase C** (PKC). Ces phosphorylations seraient déterminantes pour l'association des facteurs solubles entre eux et avec le cytochrome  $b_{558}$ . Les phosphorylations seraient alors complétées par une deuxième kinase comme la **MAP kinase** (ou MAPK, voir Glossaire). Il y a peut-être une hiérarchie entre les différentes phosphorylations sur la même protéine. La notion de hiérarchie dans les phosphorylations a été aperçue au Chapitre 18. Le plus extraordinaire est que tous les facteurs destinés à s'associer ( $67 + 47 + 40 +$  cytochrome  $b_{258}$ ) portent deux motifs qui aident à leur reconnaissance mutuelle : un morceau de séquence riche en proline ou **polyproline**, un **module SH3** (voir Glossaire). Autrement dit ces protéines pourraient s'associer les unes aux autres de multiples façons comme dans un jeu de Lego, mais une seule combinaison structurale serait valable pour l'activation de l'oxydase<sup>1</sup>.

Le deuxième mécanisme mettrait en jeu la petite protéine G (**Rac 1**). On a pu montrer que sa prénylation est tout à fait nécessaire, que Rac 1 peut s'associer à la membrane et, lorsqu'elle a du GDP, à la protéine **Rho-GDI**<sup>2</sup>. La combinaison Rac1/Rho-GDI est nécessaire à l'activation de l'oxydation, mais pourrait correspondre à une forme de stockage de la protéine G jusqu'à ce qu'elle arrive à la membrane. C'est à ce niveau que le comportement est le plus obscur. La protéine Rac 1 se répartit peut-être en plusieurs micro-compartiments : associée à la membrane, stockée avec Rho-GDI en phase cytosolique soluble, fixée à l'oxydase. Seule serait déterminante pour l'activation la fixation sur le complexe de l'oxydase de Rac 1 chargée en GTP. Ce serait le déclic final qui déclencherait l'activation du complexe. L'immobilisation de la protéine Rac 1 par Rho-GDI est peut-être un mode de contrôle sur la quantité de Rac 1 effectivement disponible pour donner le feu vert. Comment ? Le mode d'action reste mystérieux.

L'explosion respiratoire dans les leucocytes est un système de défense qu'on espère renforcer ou contrôler par des médicaments appropriés dans les situations pathologiques, notamment dans les granulomatoses chroniques. Sur le plan fondamental, l'étude de ces problèmes révèle des régulations cellulaires extrêmement intéressantes. Cependant les interactions multiples et mouvantes entre des protéines souvent fragiles, éventuellement difficiles à purifier et présentes sous plusieurs formes (par phosphorylation, prénylation, etc.), rendent l'expérimentation délicate, voire acrobatique. Ceci explique les nombreuses incertitudes qui planent encore sur l'activation des leucocytes. Pourtant la production des différents facteurs isolés par des systèmes recombinants et la reconstitution artificielle de l'explosion respiratoire in vitro sont de nature à faire avancer rapidement le problème<sup>3</sup>.

## LA MISE EN ROUTE D'UNE DÉFENSE

*Escherichia coli* est bien armé pour résister aux dégâts de l'oxydation. Parmi les enzymes de défense on enregistre la présence des deux superoxyde dismutases déjà signalées, deux

<sup>1</sup> P. Vignais, Grenoble (Communication personnelle).

<sup>2</sup> C'est encore un point délicat. Certains auteurs ont avancé que Rho-GDI pouvait aussi s'associer avec Rac 1 chargée en GTP : J.F. Hancock & A. Hall (1993) EMBO J. 12, 1915-1921. On continue à appeler la protéine Rho-GDI parce qu'à l'origine elle avait été reconnue comme spécifique de Rho.

<sup>3</sup> A. Fuchs & coll. (1994) Eur J. Biochem. 226, 587-595 ; A. Fuchs (1995, thèse, Grenoble) ; P. Vignais (communication personnelle).

catalases, une alkyl-hydroperoxyde réductase et la glutathion réductase. A cela s'ajoutent une dizaine d'enzymes de réparation chargées de remettre de l'ordre dans l'ADN et une enzyme à laquelle on pense moins, la glucose-6P déshydrogénase, qui a son utilité car elle engendre du NADPH alors que celui-ci est très facilement détruit par oxydation. Autres interventions : des protéines du choc thermique (GroEL, GroES, DnaK) dont nous connaissons la signification.

Les bactéries travaillent à l'économie. Il n'est pas question de faire une ribambelle de protéines qui ne servent à rien. Par contre toute agression nécessite un réajustement, et provoque l'accélération de la synthèse de protéines dites de stress.

*E. coli* peut se voir soumis à deux types d'agression par oxydation. Le premier est la présence d'ions superoxyde. Comment peuvent-ils apparaître dans le milieu ? Nous savons qu'ils sont produits par certaines oxydases mais leur origine peut être différente. De nombreux composés organiques s'oxydent spontanément à l'aide de O<sub>2</sub> dissous et engendrent un radical accompagné de superoxyde. On peut accentuer artificiellement ce phénomène en ajoutant au milieu un herbicide comme le **paraquat**. Il appartient à la famille des viologènes et fonctionne comme accepteur d'électrons à bas potentiel pour diverses oxydoréductions biologiques (notamment la photosynthèse, d'où son action comme herbicide à la lumière). L'ennui est que le paraquat réduit s'oxyde en présence de faibles quantités de O<sub>2</sub> et engendre du superoxyde. En somme l'addition de paraquat à une culture de colibacille est une façon de créer un stress par superoxyde, et c'est comme cela que le système de défense des bactéries a été découvert à l'origine. Deuxième type d'agression : les peroxydes. Les bactéries réagissent en fabriquant des protéines différentes, dont les catalases que nous étudierons plus loin.

Limitons nous l'**agression par superoxyde**. Comment l'ennemi est-il détecté ? On sait maintenant que c'est par une protéine spéciale dite **SoxR** (le produit du gène *soxR*) associée à l'ADN. C'est une protéine fer-soufre renfermant ce qu'on croit être un centre [4Fe-4S]. On admet provisoirement que ce centre est maintenu à l'état réduit par une réductase fonctionnant avec NADPH<sup>1</sup>. Quand la source de NADH est tarie, ou lorsque le centre fer-soufre est oxydé, SoxR activerait la transcription d'un deuxième gène : *soxS*. La protéine SoxS est un activateur de transcription. Elle se lie à l'ADN et à l'ARN-polymérase, et serait responsable de la synthèse accélérée des protéines du stress par superoxyde. Le dessin est une interprétation tout à fait hypothétique, où on suppose que l'oxydation du centre fer-soufre provoque un changement de conformation dans SoxR et par contrecoup une modification de ses relations avec l'ADN<sup>2</sup>. L'oxydation serait susceptible, soit de dégrader le noyau fer-soufre, soit de rompre certaines de ses liaisons avec la protéine en libérant une ou plusieurs fonctions thiol.

<sup>1</sup> C'est peut-être pour cela que la chute du NADPH consécutive à une oxydation déclenche l'activation de SoxR. La protéine complète n'aurait qu'un seul centre fer-soufre lié aux deux sous-unités. C'est encore une disposition hypothétique, mais on connaît un cas de centre fer-soufre faisant le pont entre deux sous-unités identiques : la dinitrogénase réductase (Chapitre 24).

<sup>2</sup> G. Storz & coll. (1990) Science 248, 189-194 ; J. Wu & B. Weiss (1992) J. Bacteriol. 174, 3915-3920 ; E. Hidalgo & B. Dimple (1994) EMBO J. 13, 138-146. L'activateur provoque probablement une déformation importante de l'ADN qui est fonctionnellement importante.