

Master : Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Matière : Dynamique structurale des macromolécules

Chapitre IV : REPLIEMENT DES PROTEINES ET MALADIES CONFORMATIONNELLES

I. Déterminants du repliement des protéines

a. Présence des hélices et des feuilletts

Les interactions hydrophobes sont responsables de la nature compacte et non polaire du cœur des protéines. *La formation des hélices et des feuilletts est la conséquence* de contraintes stériques au sein des protéines compactes. Ces éléments de structure secondaire s'organisent via des liaisons hydrogène, des interactions ioniques et des forces de van der Waals.

b. Le repliement des protéines se fait essentiellement sous l'influence de résidus internes

Le repliement des protéines est sous la dépendance de forces hydrophobes et ce sont *les résidus internes d'une protéine qui déterminent son repliement.*

c. La structure des protéines s'établit selon une hiérarchie

Les grosses sous-unités des protéines sont constituées de domaines, qui à leur tour sont composés de sous-domaines

II. Le paradoxe de LEVINTHAL (1961)

Il énonce que pour un polypeptide de 100 résidus, il y a *2100 conformations possibles* mais une seule existe au sein de la cellule. S'ajoute en plus de ce paradoxe des modèles théoriques différents.

- ❖ Le modèle de *la condensation hydrophobe* dit que les résidus hydrophobes s'enfouissent et ensuite la chaîne évolue en structure secondaire puis tertiaire.
- ❖ Le modèle *de diffusion-collision* évoque la naissance de microdomaines diffusant et entrant en collision créant des structures secondaires transitoires, celles-ci menant aux structures tertiaires.

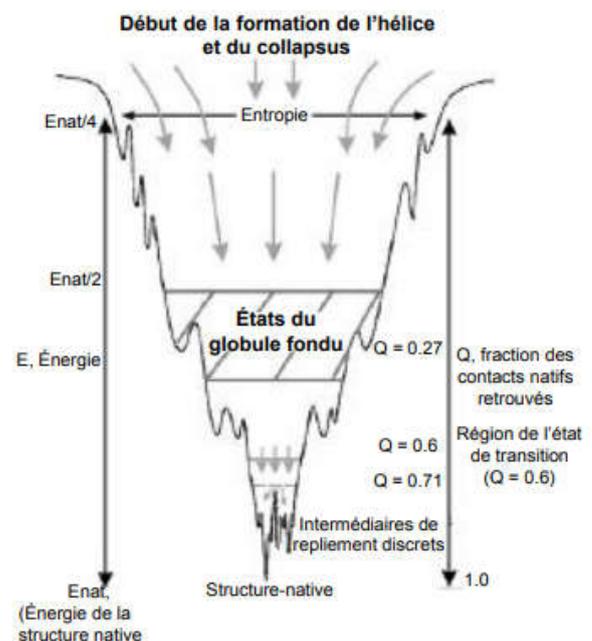
Actuellement, il est dit que l'enroulement des protéines globulaires commence par la formation locale de structure secondaire. Celles-ci interagissent et s'ajustent afin d'aboutir à la structure tertiaire finale. Tout ceci est influencé par les résidus hydrophobes souhaitant vivement exclure l'eau, la formation

d'hélice α de certaines chaînes polypeptidiques et la nécessité de stabilité en développant le plus de liaisons hydrogènes et ioniques.

Le postulat de LEVINTHAL peut aussi être illustré en termes de paysages énergétiques (Energy Landscape) par le concept de repliement en entonnoir (Folding Funnel) proposé par le groupe de Wolynes (Bryngelson *et al.*, 1995 ; Socci *et al.*, 1998) et repris plus récemment par Chan et Dill (1998). Dans ce concept, les auteurs décrivent le comportement thermodynamique et cinétique de la transformation d'un ensemble de structures correspondant à l'état dénaturé d'une protéine vers son état natif unique.

Repliement en entonnoir schématique d'une protéine.

La largeur de l'entonnoir représente l'entropie (caractérise l'état de désordre), la profondeur, l'énergie — "Folding funnel" of a protein.



LEVINTHAL a proposé que le repliement d'une protéine doit donc faire intervenir une série de mécanismes séquentiels au cours desquels l'évolution vers l'état natif s'accompagne d'une augmentation très importante de la stabilité conformationnelle (**diminution d'énergie libre**).

Puisque les protéines globulaires ont un cœur hydrophobe compact, il est probable que ce qui déclenche leur repliement soit un "**effondrement hydrophobe**", au cours duquel les groupements hydrophobes se rassemblent pour expulser la majorité des molécules d'eau.

L'état initial "affaissé" ou "compressé" d'une protéine qui se replie est appelé **globule fondu** ou "**molten globule**"

Le globule fondu contiendrait des surfaces accessibles hydrophobes non natives. Ptitsyn *et al.* (1990) ont suggéré que **le globule fondu puisse être un intermédiaire** général du chemin de repliement des protéines. Cet intermédiaire particulier du repliement (Ptitsyn, 1995 ; Roder, 1995 ; Vidugiris *et al.*, 1995 ; Ptitsyn, 1996) a été retrouvé dans le chemin de repliement de plusieurs protéines, comme

l'apomyoglobine (Vidugiris, Royer, 1998), l' α -lactalbumine (Kuwajima, 1989; 1996), l'anhydrase carbonique (Jagannadham, Balasubramanian, 1985), ou l'hormone de croissance bovine (Kuwajima, 1996).

De nombreuses méthodes de biophysique permettent d'obtenir des informations sur les intermédiaires de repliement (Tableau).

Propriétés	Techniques	Résolution	Mesures
Compactage du cœur de la protéine	Fluorescence intrinsèque	< 1 ms	Orientation et environnement de la chaîne latérale du tryptophane (Engelhard, Evans, 1996a)
	Absorption aux UV	1 ms	Orientation et environnement de la chaîne latérale de la tyrosine (Udgaonkar, Baldwin, 1995)
	Fluorescence extrinsèque (ANS)	1 ms	Formation et interruption de segments hydrophobes (Engelhard, Evans, 1996b)
	Extinction de fluorescence	1 ms	Localisation de la chaîne latérale du tryptophane (Engelhard, Evans, 1996a)
	"Quenching CysteinyI"	10 s	Protection des chaînes latérales des cystéines (Ballery <i>et al.</i> , 1993)
Dimensions moléculaires	Anisotropie de fluorescence	1 ms	Mobilité de la chaîne du tryptophane et dimensions moléculaires globales (Jones <i>et al.</i> , 1995)
	Transfert d'énergie de fluorescence	1 ms	Distance scalaire entre un tryptophane et un fluorophore attachés covalamment (Rischel, Poulsen, 1995)
	Diffusion des rayons X aux petits angles	< 100 ms	Rayon de giration moyen (Eliezer <i>et al.</i> , 1995)
	Diffusion de la lumière quasi élastique	1 s	Rayon de giration moyen (Feng, Widom, 1994)
Structures secondaires et liaisons hydrogènes persistantes	Dichroïsme circulaire dans l'UV lointain	1 ms	Conformation du squelette, moyennée sur la séquence et la population étudiée (Evans, Radford, 1994)
	RMN en marquage pulsé	5–10 ms	Formation de liaisons hydrogènes stables du squelette peptidique (Baldwin, 1993)
	Spectroscopie de masse en marquage pulsé	5–10 ms	Formation de liaisons hydrogènes persistantes pour les intermédiaires du repliement (Miranker <i>et al.</i> , 1996)
Contacts tertiaires et structure native	Activité biologique	1 ms–1 s	Formation de la structure tertiaire native et du site actif (Evans, Radford, 1994)
	Repliement interrompu	10 ms	Vitesse de dépliement des intermédiaires discrets (Schreiber, Fersht, 1993)
	Dichroïsme circulaire en proche UV	1 ms	Formation de contacts tertiaires stables (entre aromatiques, pont disulfures) (Evans, Radford, 1994)
	RMN en temps réel	1 s	Formation de contacts tertiaires entre chaînes latérales spécifiques (Balbach <i>et al.</i> , 1995)
	Ingénierie des protéines		Contribution énergétique des chaînes latérales aux intermédiaires (Fersht, 1995c)

III. Dogme de ANFINSEN

"La structure secondaire des polypeptides comme l'hélice α ou la configuration β est le résultat spontané et automatique de son contenu et de sa séquence en acides aminés. La structure secondaire d'une protéine est sa forme la plus stable dans des conditions biologiques données."

Selon ANFINSEN

Le repliement des protéines est sous contrôle thermodynamique, le seul déterminant est la séquence, la forme pliée est celle qui présente l'énergie libre la plus basse.

Certaines protéines nécessitent l'aide de **protéines chaperons** pour accéder à un repliement correct.

Deux raisons possibles à cela:

- soit parce que la séquence ne contient pas les informations nécessaires,
- soit parce que la séquence contient des informations ne pouvant s'exprimer dans un milieu aqueux salin tel que le cytoplasme.

Les chaperons vont agir en entourant les chaînes polypeptidiques, les protégeant du milieu cytoplasmique, de la polarité et des auto agrégations. Il peut arriver que pour le repliement correct d'une protéine, plusieurs chaperonnes soient nécessaires.

Des conditions ou agents déstabilisants l'environnement cellulaire altèrent souvent le repliement des protéines. Suivant son intensité, ce phénomène peut induire une agrégation irréversible des protéines et entraîner la mort des cellules. Un mécanisme cellulaire de défense contre cette atteinte à l'intégrité des protéines existe, qui est conservé au cours de l'évolution. En effet, la cellule réagit aux stress altérant le repliement des protéines en activant l'expression d'un petit nombre de gènes codant pour des protéines spécialisées, **les Hsp (*heat shock proteins*)**.

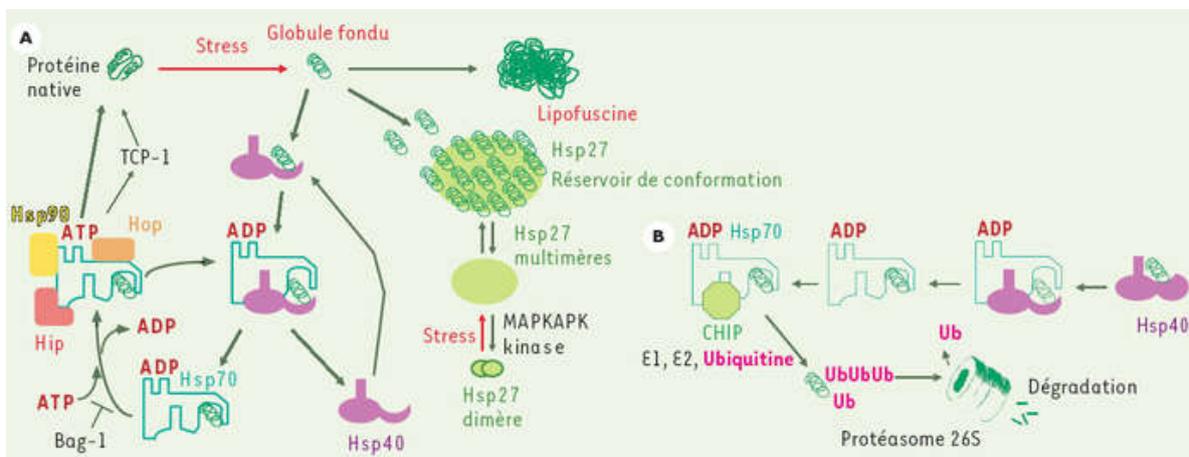
D'autres molécules accessoires peuvent jouer un rôle dans le repliement, comme la **protéine disulfide isomérase**, la **peptidyl proline cis-trans isomérase**. Ces enzymes accélèrent ledit processus (qui peut aussi avoir lieu en leur absence *in vitro* sous des conditions précises). D'autres modifications, comme les glycosylations, ne semblent pas changer le chemin de repliement, ni *in vivo*, ni *in vitro*, par contre elles augmentent la stabilité de la protéine et modifient son adressage.

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis de vérifier l'existence de la famille de protéines à activité chaperon, au sein de laquelle **les Hsp occupent une place prépondérante**.

Principales protéines chaperons impliquées dans la réponse cellulaire au choc thermique

Chaperons	Fonctions
Hsp90	Protéine constitutivement exprimée dans les cellules. Stimulation de l'expression en conditions de stress Chaperon ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines Peut agir comme cochaperon de Hsp70 Transport intracellulaire des protéines (exemple : récepteurs nucléaires stéroïdes et glucocorticoïdes) Masquage des mutations
Hsp70	Protéine dont l'expression est induite en conditions de choc thermique Chaperon majeur ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines après un stress
Hsc70	Protéine de la famille Hsp70, constitutivement exprimée ; son expression n'est pas stimulée par le choc thermique Chaperon ATP-dépendant impliqué dans le repliement des protéines dans la cellule non stressée
Hsp40	Protéine constitutivement exprimée dans les cellules. Stimulation de l'expression en conditions de stress Interagit avec les protéines mal conformées Cochaperon présentant le polypeptide à replier au chaperon Hsc70/Hsp70 (via son domaine J) Stimule l'hydrolyse de l'ATP associé à Hsc70/Hsp70
Hsp27	Protéine souvent constitutivement exprimée, dont l'expression est stimulée en conditions de stress Activité chaperon ATP-indépendante, moins intense que celle de Hsp70 et Hsp90 Forme des structures oligomériques avec des protéines dépliées : inhibition de l'agrégation et présentation à Hsp40 Stimule la dégradation ubiquitine-dépendante de certaines protéines
CHIP	Protéine constitutivement exprimée dans les cellules Liaison à Hsc70/Hsp70 et activité ubiquitine ligase (E3) : dirige les protéines mal repliées vers la voie de dégradation
Hip	Cochaperon stabilisant la forme ADP de Hsc70/Hsp70
Hop	Cochaperon impliqué dans le couplage de Hsc70/Hsp70 avec Hsp90
Bag-1	Cochaperon déstabilisant la forme ATP du complexe Hsc70/Hsp70-substrat

Les différentes étapes de renaturation des protéines à l'issue d'un choc thermique, impliquant Hsp40, Hsp70 et la participation de polypeptides co-chaperons tels que Hip, Hop et Hsp90. On perçoit très bien que la machinerie Hsp40/Hsp70 puisse être facilement saturée lors d'un afflux massif de protéines ayant une conformation aberrante. Afin d'éviter une agrégation irréversible, l'excès de protéines altérées s'associe aux structures oligomériques de Hsp27, avec une production de réservoirs d'intermédiaires de repliement.



A. Repliement des protéines altérées au cours d'un stress.

B. Couplage du repliement et de la voie de dégradation des protéines ubiquitine-protéasome

IV. Rôle protecteur des Hsp : exemple des maladies neurodégénératives

La plupart des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, *Huntington*...) sont caractérisées par des dépôts intra- ou extracellulaires de protéines agrégées. Cette caractéristique cytopathologique résulte d'une déficience de dégradation d'une protéine neuronale dont la structure est devenue anormale, en général après une mutation. Cet état de fait induit l'accumulation de la protéine concernée, souvent sous une forme ubiquitinylée, oxydée et agrégée.

Le protéasome est incapable de dégrader les séquences répétées de glutamine qui caractérisent la mutation dans l'exon 1 du *polypeptide huntingtine* responsable de la chorée de Huntington. Des expériences effectuées dans des systèmes cellulaires génétiquement modifiés, exprimant des protéines pathologiques, ont clairement montré, en particulier dans le cas de la huntingtine, que l'expression des Hsp diminuait la taille des agrégats protéiques.

Huntington: Rare et héréditaire, elle se manifeste par des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques qui évoluent en dents de scie et s'aggravent progressivement jusqu'à la grabatisation et la détérioration intellectuelle des malades. Le décès survient en moyenne vingt à trente ans après le début des symptômes.

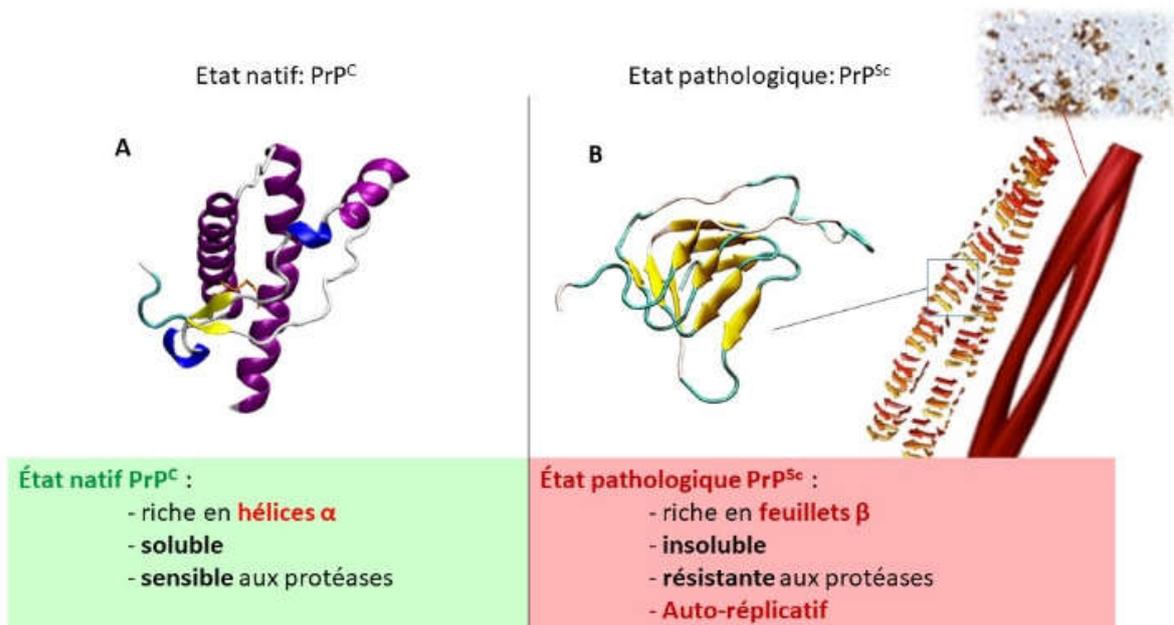
V. Présentation des maladies à prions (Encéphalopathies spongiformes transmissibles)

Le prion (acronyme de *proteinaceous infectious particles*) (Prusiner, 1982) est l'agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prion. Ces maladies neurodégénératives touchent la plupart des mammifères notamment les bovins (ESB pour encéphalopathie spongiforme bovine ou maladie de la vache folle), les petits ruminants (tremlante) et l'Homme (maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)).

Dans les maladies à prions, une protéine normale appelée protéine prionique cellulaire (**PrP^C**) change de conformation (« mauvais repliement ») pour devenir une protéine anormale. Cette protéine anormale est appelée protéine prion de la tremlante du mouton (**PrP^{Sc}**) ou prion. La « tremlante du mouton » fait référence à une maladie prionique décrite pour la première fois chez la brebis. La tremlante du mouton est ainsi appelée parce que les moutons se grattent sur les arbres, les clôtures ou sur d'autres structures, en arrachant leur laine. La maladie pousse les moutons à se comporter de manière étrange, et elle est fatale.

Certains des prions nouvellement formés résistent à la dégradation par les enzymes du cerveau. Ainsi, ils s'accumulent lentement. Les prions provoquent aussi la transformation de PrP^C voisines en prions, et le processus se poursuit. Quand les prions atteignent un certain nombre, la maladie se déclare. Les prions ne peuvent plus redevenir des PrP^C normales.

La maladie de la vache folle (encéphalopathie spongiforme bovine) est ainsi appelée, car le bétail devient visiblement agité. La maladie peut se transmettre des moutons aux bovins par une alimentation à base de produits fabriqués à partir de moutons atteints de la tremblante du mouton.



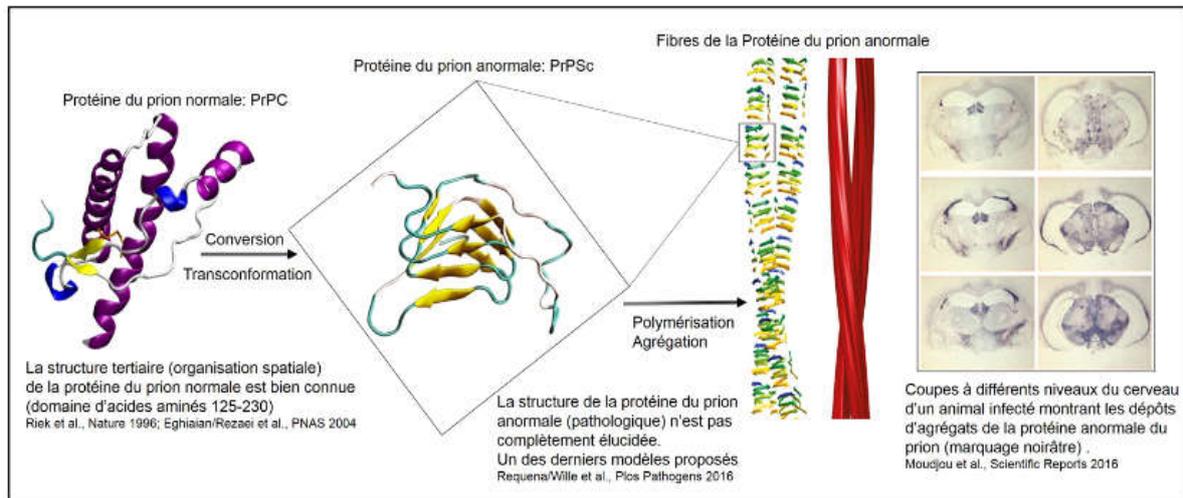
A. Structure tertiaire du domaine globulaire de la PrP^C (résidus 125-230). Les hélices α sont représentées en violet et les feuillets antiparallèles en jaune. **B.** Modèle de la structure tertiaire de la protéine PrP^{Sc} (à gauche) qui présente un tonneau β . En s'agréant, les protéines PrP^{Sc} donnent naissance à des structures quaternaires (à droite) : les fibres amyloïdes.

Prion: de l'état natif à l'état pathologique

Le domaine globulaire perd ses hélices alpha et forme des feuillets bêta. Ce changement conformationnel est lourd de conséquences d'un point de vue physico-chimique. Alors que la protéine dans son état natif est soluble et sensible aux protéases, elle devient insoluble et résistante aux protéases. Mais surtout, les feuillets β confèrent à la protéine une forte propension à s'agréger et à former des assemblages fibrillaires amyloïdes comme ceux observés dans les tissus atteints. Le point le plus remarquable, est que la forme pathologique (*notée PrP^{Sc} pour « PrP scrapie », terme anglais désignant la tremblante du mouton*), à elle seule, est capable de forcer le mauvais repliement de la forme native vers la forme pathogène. On dit que ce processus de repliement est **auto-réplicatif** et c'est ce caractère qui a donné naissance au concept de prion.

L'adaptation du prion à son nouvel hôte au cours d'une transmission s'appuierait sur **l'ajustement structural** entre la PrP^{Sc} infectante et la PrP^C de l'hôte. Ainsi, la détermination à l'échelle atomique de la structure de la PrP^{Sc} se trouverait être la clé pour comprendre le fonctionnement du prion.

Le problème est que les propriétés physico-chimiques des prions rendent cette tâche pour le moment difficile. En effet, la cristallographie aux rayons X nécessite un échantillon très homogène, cristallin, pour déterminer précisément la structure d'une protéine, ce qui est loin d'être possible pour les prions. D'autres techniques indirectes comme la cryo-microscopie recoupée avec des données de RMN (résonance magnétique nucléaire) suggèrent une structuration de la protéine PrP^{Sc} en tonneau β



La propagation du prion se fait par contact entre la forme anormale et la forme normale. Ceci induit un changement de l'architecture de la protéine normale qui devient pathogène. Par un effet domino, ce phénomène se propage de protéine en protéine, par un mécanisme autorépliatif au sein du tissu nerveux et conduit, à une mort neuronale.

Une piste thérapeutique à l'étude passe par l'utilisation d'oligonucléotides antisens qui interagissent avec l'ARN messager de la protéine prion humaine, pour en limiter la synthèse. Une approche d'immunothérapie, qui se fonde sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine prion est quant à elle en cours d'évaluation clinique chez un nombre très limité de patients, au Royaume-Uni.