



HAL
open science

La protéine Hsp60 : Chaperon moléculaire de la symbiose intracellulaire

Hubert Charles, Paul Nardon

► **To cite this version:**

Hubert Charles, Paul Nardon. La protéine Hsp60 : Chaperon moléculaire de la symbiose intracellulaire. *Regard sur la biochimie*, 1997, 3, pp.17-23. hal-02686732

HAL Id: hal-02686732

<https://hal.inrae.fr/hal-02686732v1>

Submitted on 6 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La protéine Hsp60 : chaperon moléculaire de la symbiose intracellulaire

Hubert Charles et Paul Nardon,

Laboratoire de Biologie Appliquée, INSA 406, UA-INRA 203, SDI-CNRS 5128,
20, Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex

Les Auteurs



H. Charles et P. Nardon

*H. Charles, Ingénieur biochimiste de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (INSA), il a effectué un DEA d'analyse et modélisation des systèmes biologiques à l'Université Claude Bernard de Lyon I, puis une thèse (Juin 1997) intitulée "Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et études de ses interactions avec l'hôte" dans le Laboratoire de Biologie Appliquée de l'INSA de Lyon sous la direction du Pr Paul Nardon.*

P. Nardon, D'abord assistant à la Faculté des Sciences de Lyon, puis à l'INSA, il est actuellement professeur, directeur du laboratoire de Biologie Appliquée et ancien directeur (jusqu'au 31 mai 97) du département de Biochimie. Depuis 1975 ses travaux portent essentiellement sur l'étude de la symbiose chez le charançon des céréales, redoutable ravageur répandu dans le monde entier et qui doit sa nuisibilité à la présence de bactéries symbiotiques. Celles-ci accroissent la fertilité, la vitesse de développement et permettent une meilleure assimilation de la nourriture. Il est lauréat du prix Foulon 1993.

Introduction : diversité et ubiquité de la symbiose

C'est le lichénologue Franck, en 1877, qui définit pour la première fois le terme de symbiose (cité dans [1]). Deux années plus tard, De Bary [2] précisera ce concept : "Le parasitisme, le mutualisme, le lichénisme sont chacun un cas spécial de cette tendance à l'association pour laquelle le terme symbiose est proposé comme désignation générale". Au début du XX^{ème} siècle, l'importance de la symbiose fut reconnue par quelques auteurs [3-5] qui postulèrent l'origine symbiotique de la cellule eucaryote. Toutefois, insuffisamment argumentée, cette théorie sombra bientôt dans l'oubli. Il fallut attendre 1965 pour que Buchner [6], Professeur à l'Université de Munich, relance l'intérêt pour la symbiose grâce à son célèbre ouvrage "Endosymbiosis of animals with plants and microorganisms"¹. Depuis, et grâce au développement de la biologie moléculaire qui fournit les preuves de l'origine symbiotique des plastides et

des mitochondries, de très nombreux ouvrages ont été publiés (pour revue voir [7]).

Les modèles de symbiose sont extrêmement variés et concernent l'ensemble des organismes vivants, des unicellulaires procaryotes aux organismes supérieurs animaux ou végétaux. Lorsque les partenaires sont extérieurs l'un à l'autre, on parle d'*ectosymbiose*. Les exemples des lichens, des fourmis et des termites champignonnistes ou du couple poisson clown - anémone de mer montrent la diversité de ce genre d'association. L'*endosymbiose* est une relation dans laquelle les symbiotes sont à l'intérieur de leur hôte, généralement dans le tube digestif, comme c'est le cas chez les termites et chez les ruminants, ou dans une poche spécialisée à l'exemple de l'organe bioluminescent de certains poissons. Finalement, l'*endocytobiose* caractérise une symbiose intracellulaire. Les symbiotes (appelés endocytobiotiques) peuvent être des virus comme chez la drosophile, des bactéries comme chez les mollusques ou chez de nombreux insectes, ou encore des levures comme chez les Cerambycidae ou chez les Anobiidae. Les exemples de symbiose sont si nombreux dans la nature que les

symbiologistes s'interrogent même sur l'existence d'individus non-symbiotiques. C'est ce que Nardon et Grenier [7] définissent en ces termes : "La tendance à l'association (plus ou moins intime) est une loi biologique fondamentale, plus généralement même une loi de nature". C'est la notion même d'individu qui est alors remise en question : l'individu symbiotique formé par l'association (et l'interaction) des deux ou plusieurs génomes qui le composent a ainsi été renommé *symbiocosme* [7, 8].

La symbiose est chargée d'un point de vue culturel de connotations positives (entraide, entente pacifiste), mais il ne faut pas oublier que, dans sa définition la plus large, elle englobe les relations de type parasitisme qui aboutissent généralement à la mort de l'un des partenaires. De plus, il est probable que la plupart des endocytobiotiques soient d'anciennes bactéries parasites dont la virulence a été peu à peu atténuée par l'hôte. Cette hypothèse a été émise dès 1933 par Paillot [9], puis a été reprise ensuite par plusieurs auteurs [7, 10]. Ainsi, l'intervention de protéines de stress pour le maintien de l'équilibre symbiotique n'est-elle pas surprenante. La survie d'un organisme procaryote à l'inté-

1. En fait 1965 est la date de la version anglaise de l'ouvrage allemand de Buchner (1953) intitulé "Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen".

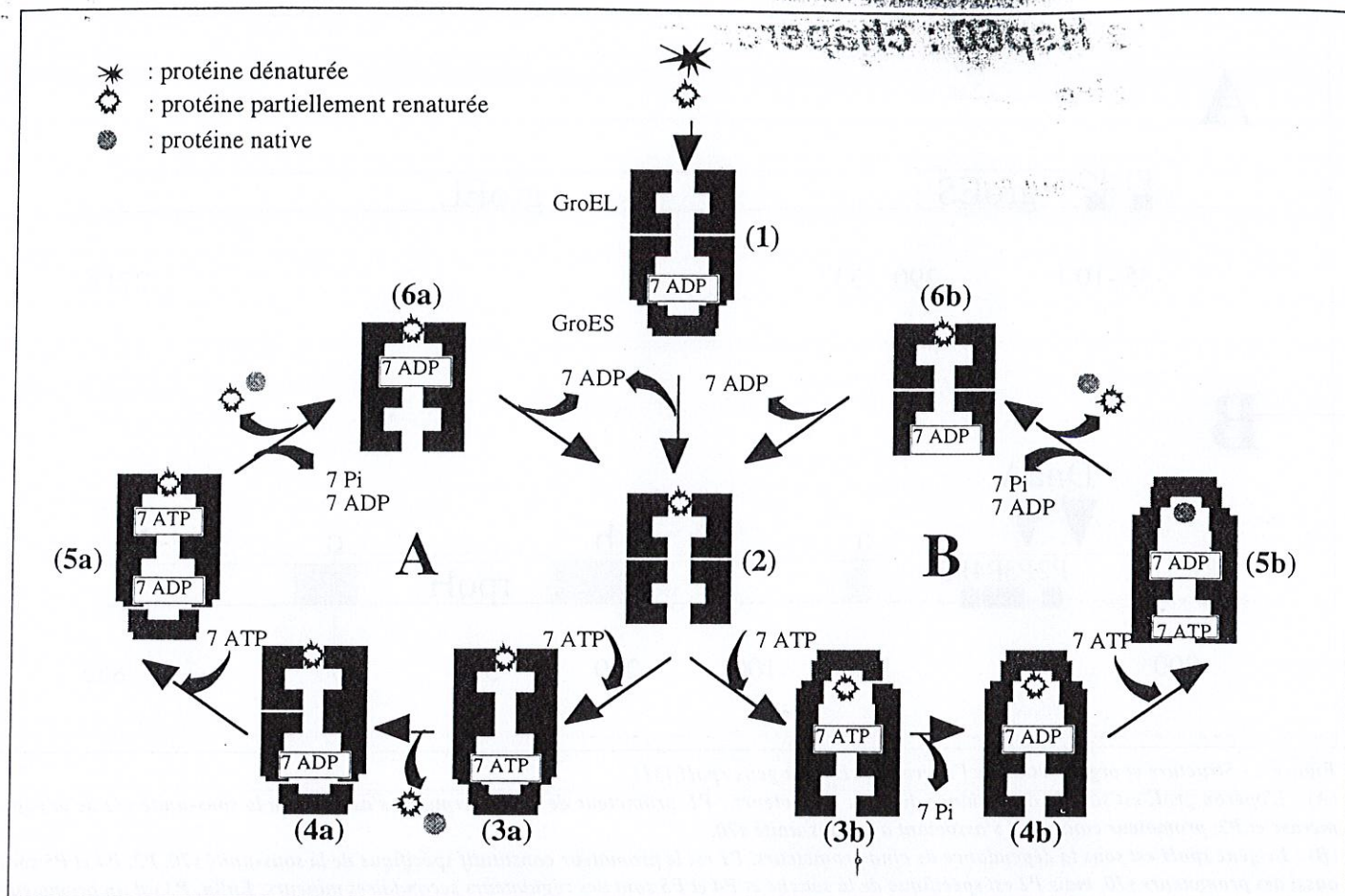


Figure 1 - Modèle d'interactions ATP-dépendantes entre GroEL, GroES et le polypeptide substrat (d'après [65])

(1) : le complexe GroE est asymétrique, un seul anneau est lié à GroES et à l'ADP, la fixation du substrat induit la dissociation de GroES et de l'ATP (2) et initie le processus de repliement selon deux schémas possibles (A et B). En A, la fixation de GroES et de l'ATP (3a) se fait sur l'anneau opposé à l'anneau ayant fixé le substrat. L'hydrolyse de l'ATP permet le relargage de la protéine native ou d'un intermédiaire partiellement renaturé (4a). La fixation de sept autres molécules d'ATP sur le deuxième anneau (5a) déclenche un second cycle d'hydrolyse et de relargage du substrat (6a). Enfin, la dissociation de l'ADP permet le retour à l'état (2). Le cycle B est similaire, mais la fixation de GroES a lieu sur l'anneau ayant fixé le substrat si bien que le relargage de la protéine native ne peut donc se faire qu'au deuxième cycle d'hydrolyse d'ATP.

rieur du cytoplasme d'un eucaryote nécessite, de la part de l'endocytobionte, le contournement des mécanismes hôtes de la reconnaissance du non-soi et, de la part de l'hôte, un contrôle rigoureux de la multiplication des endocytobiontes pour éviter une invasion fatale.

La production de protéines de stress de la famille des Hsp60 (60 kDa Heat shock protein) a été observée chez de nombreuses bactéries intracellulaires. Mais avant de décrire plus précisément les implications de cette protéine dans les relations hôte-symbiotes, les principales propriétés biochimiques des Hsp60 et la régulation de l'expression de leurs gènes chez les bactéries libres seront présentées.

Principales propriétés biochimiques de la protéine Hsp60

Dans la famille des Hsp60, la protéine la plus étudiée est la protéine d'*Escheri-*

chia coli appelée GroEL [11, 12]. D'autres protéines Hsp60 ont été caractérisées dans les chloroplastes [13] et dans les mitochondries [14]. Plus récemment, une protéine appelée TF55, possédant des homologies structurales et génétiques avec la famille des Hsp60, a été identifiée chez les Archéobactéries [15] et une autre appelée Tcp1 dans le cytoplasme des cellules eucaryotes [16]. La localisation de ces protéines est généralement cytoplasmique, néanmoins quelques auteurs ont montré une localisation membranaire, par exemple chez *Helicobacter pylori* et *Neisseria gonorrhoeae* [17, 18].

GroEL est un complexe protéique composé de deux fois sept sous-unités identiques de 57 kDa arrangées en deux tores superposés. Cette structure caractéristique, de 14 nm de diamètre extérieur et 15 nm de hauteur, délimite un canal central de 4,5 nm de longueur. Chaque monomère est composé d'un domaine apical, d'un domaine intermédiaire et d'un domaine équatorial [19]. Le domaine équatorial

est le plus grand des trois, il est responsable des liaisons entre les différentes sous-unités du complexe. Il contient également le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Le domaine intermédiaire est le plus petit, il sert probablement de charnière mobile lors des cycles d'association et de dissociation du substrat. Enfin, le domaine apical forme la paroi de la cavité centrale, véritable "banc de travail" de la protéine [20].

La protéine GroEL a la particularité de se lier à une autre molécule chaperon de la famille des Hsp10 appelée GroES chez *Escherichia coli* [21]. La forme native de GroES est un heptamère qui peut venir se fixer sur le tétradécamère GroEL pour former le complexe GroE. La liaison s'effectue au niveau d'un site particulier de GroES, une boucle de 17 acides aminés sans structure secondaire fixe et ayant une grande flexibilité [22]. La fixation et le relargage de cette protéine interviennent dans les mécanismes de régulation de l'activité de GroEL.

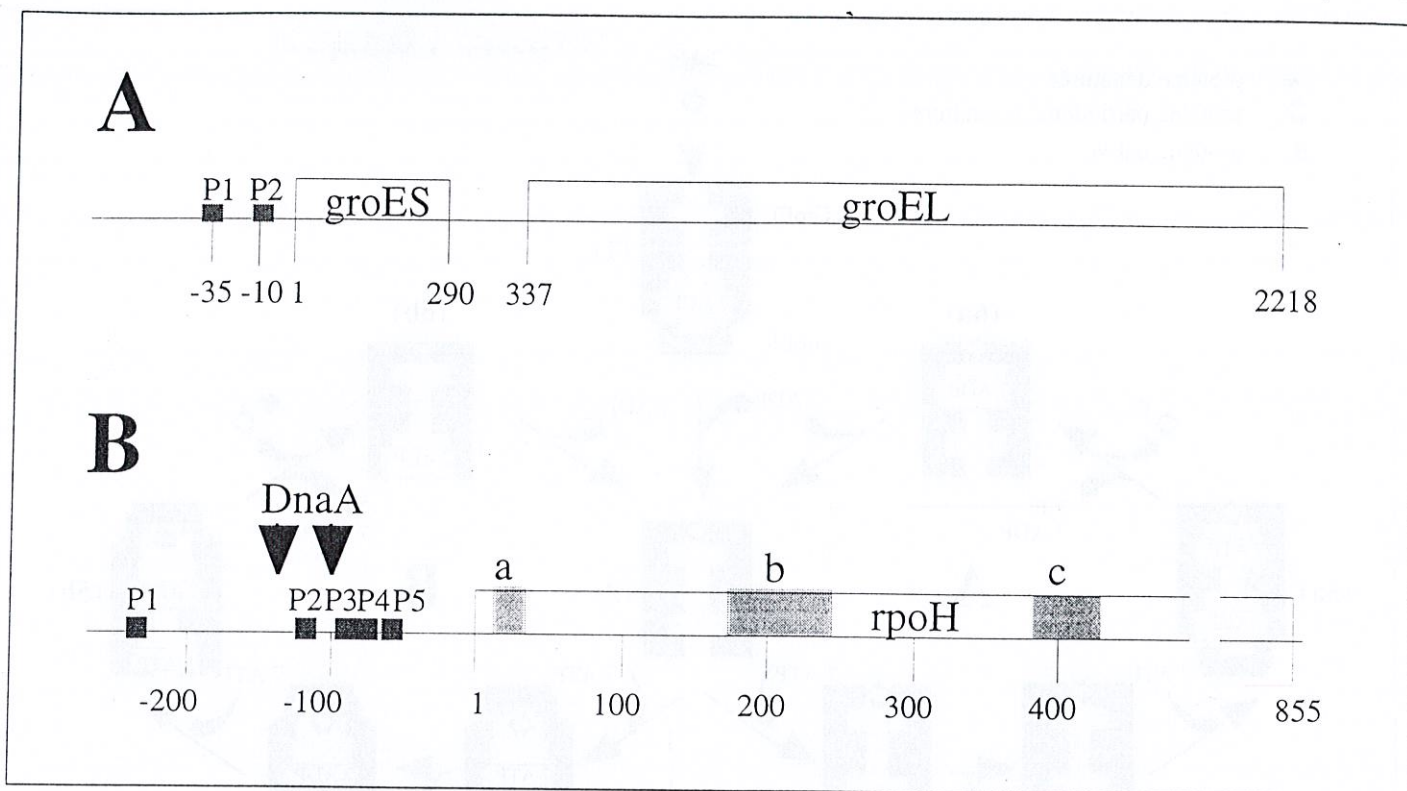


Figure 2 - Structure et organisation de l'opéron *groE* et du gène *rpoH* [31]

(A) : L'opéron *groE* est sous la dépendance de deux promoteurs : P1, promoteur de choc thermique s'associant à la sous-unité σ_{32} de la polymérase et P2, promoteur constitutif s'associant à la sous-unité σ_{70} .

(B) : Le gène *rpoH* est sous la dépendance de cinq promoteurs. P1 est le promoteur constitutif spécifique de la sous-unité σ_{70} . P2, P4 et P5 sont aussi des promoteurs σ_{70} , mais P2 est spécifique de la souche et P4 et P5 sont des régulateurs secondaires mineurs. Enfin, P3 est un promoteur spécifique de la sous-unité σ_{24} . Il n'entre en jeu qu'aux conditions extrêmes de température (supérieure à 50°C). La protéine DnaA possède deux sites de fixation (repérés par des flèches) et agit en répresseur de la transcription. Les régions cis-régulatrices (a, b et c) de l'ARNm sont indiquées par des rectangles hachurés.

Le complexe GroE est essentiel pour la croissance d'*Escherichia coli* à toutes les températures [23], mais historiquement sa première fonction étudiée a été celle de l'assemblage de la tête des phages λ et T4 [24]. Les mutants GroE⁻ sont facilement isolables puisqu'ils restent viables après infection par un de ces phages. L'observation de leur phénotype a alors permis aux chercheurs d'étudier le champ d'action du complexe GroE sur la physiologie générale d'*Escherichia coli*.

Ainsi, il a été observé chez ces mutants une réduction du taux d'ARN, un blocage de la division cellulaire et une altération de l'activité protéasique [12]. L'interaction de GroEL avec la synthèse d'ADN et la division cellulaire semble liée à la protéine DnaA responsable de l'initiation de la réplication du chromosome. En effet, la surexpression des protéines GroEL et GroES dans une souche mutée sur le gène *DnaA* (*dnaA46*), restaure le phénotype sauvage alors que la même surproduction de GroEL et GroES n'entraîne aucun effet sur la réplication de la souche sauvage [25]. Le rôle des chaperons dans la dégradation des protéines a été suggéré par de nombreux travaux (cités dans [26]) ; ainsi le complexe GroE pourrait, par exemple,

stimuler l'activité de la protéase Clp.

Enfin, la purification de la protéine GroEL [11] et l'étude de ses propriétés *in vitro* ont permis de définir son activité principale : l'aide au repliement de nombreuses protéines dénaturées ou nouvellement synthétisées. Cette renaturation requiert tout d'abord la reconnaissance du substrat dénaturé, puis la fixation et l'hydrolyse d'ATP, ainsi que la présence de cofacteurs cationiques (Mg^{2+} , Ca^{2+}). C'est ainsi qu'en 1991, Ellis [27] définit en ces termes le rôle physiologique du complexe GroE : "Les protéines chaperons (Hsp60 et Hsp70 essentiellement) se lient à de nombreux polypeptides non repliés au cours de processus comme la synthèse, le transport protéique ou la dénaturation thermique. Cette liaison maintient le polypeptide en un état qui l'empêche de mal se replier, l'assiste jusqu'à son repliement inter et intra-moléculaire final, lui permet un transport plus rapide vers son lieu d'excrétion ou de translocation et peut éventuellement permettre aux protéases de le dégrader".

Différents modèles moléculaires ont été proposés pour tenter d'expliquer le fonctionnement du complexe chaperon GroE. Le modèle présenté Figure 1 intè-

gre non seulement la stoechiométrie des molécules d'ATP fixées et hydrolysées, mais également la possibilité d'un relargage du substrat sous forme partiellement renaturée à chaque étape du cycle de renaturation.

Parmi les aspects encore mal définis de la régulation du complexe GroE figure la fixation éventuelle de deux heptamères GroES sur chacun des anneaux GroEL, de façon à former une structure symétrique. En effet, la fixation de GroES sur un anneau GroEL inhibe fortement la fixation d'un autre GroES sur l'anneau opposé. Mais à forte concentration en Mg^{2+} (15 à 20 mM) ou à pH élevé (7,7 à 8,0), il est possible de former des complexes symétriques GroES₇:GroEL₁₄:GroES₇ [28]. De telles structures ont été observées en microscopie électronique [29] mais leur rôle dans la régulation du complexe chaperon est encore discuté.

Régulation de l'expression des gènes *hsp60*

Les gènes codant les protéines chaperons Hsp10 et Hsp60 sont regroupés en un opéron (*groE*) unique chez la plupart des bactéries (Figure 2A). Néanmoins,

chez *Bradyrhizobium japonicum*, une famille multigénique d'au moins cinq opérons *groE* a été trouvée sur des mégaplasmides [30]. Chez *Mycobacterium*, *Synecocystis* et *Streptomyces*, il existe en plus de l'opéron *groE*, un autre gène *hsp60* surnuméraire et non précédé du gène *hsp10* [31]. Enfin, les gènes *hsp60* et *hsp10* mitochondriaux sont codés par le noyau ils ne sont pas structurés en opéron et possèdent chez *Zea mais* de nombreux introns [32].

De nombreuses formes de stress peuvent induire la réponse au choc thermique : une élévation ou une baisse de température, des rayonnements UV ou divers agents chimiques [33]. Chez *Escherichia coli*, une augmentation de température de 37°C à 46°C provoque la multiplication par dix du taux de protéines GroEL et l'essentiel de la régulation de l'opéron *groE* est effectué à un niveau transcriptionnel, via le promoteur de choc thermique P σ 32 [34].

A température normale, la concentration cellulaire en facteur de transcription σ 32 est très faible (10 à 30 molécules par cellule), car cette protéine est très instable (demi-vie d'une minute) et son expression est réprimée au niveau traductionnel. La majorité de la transcription de l'opéron *groE* est alors assurée par l'ARN polymérase (E σ 70) qui vient se fixer sur le promoteur aval P σ 70. Pendant le choc thermique, la stabilité et la synthèse du facteur σ 32 augmentent considérablement. L'expression de l'opéron est alors assurée par l'ARN polymérase E σ 32 qui vient se fixer sur le promoteur amont P σ 32. Ce système de régulation à double promoteur est classique pour toutes les protéines à la fois synthétisées constitutivement et inductibles par choc thermique [35].

La sous-unité σ 32 de l'ARN polymérase est codée par le gène *rpoH* (Figure 2B). C'est la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de ce gène qui est à l'origine de la réponse au choc thermique chez les bactéries [31]. En cas de choc thermique, le taux de facteur σ 32 augmente très fortement car sa transcription augmente et son ARNm est stabilisé. Une élévation de la température de 30°C à 42°C induit la multiplication par 17 du taux de facteur σ 32 chez *Escherichia coli* par exemple [31]. Cette stabilisation fait intervenir des éléments cis-régulateurs : la partie A de l'ARNm (codon 6 à 20) interagit avec l'ARN ribosomal 16S et favorise sa traduction. La partie B (codon 153 à 247) est un élément de régulation négatif à basse température

et, sa délétion entraîne une augmentation importante de l'expression. A et B semblent interagir sur la structure secondaire de l'ARNm en séquestrant le codon Start à basse température [36]. Enfin, la région C (codon 364 à 433) est un site de fixation de la protéine Hsp70 (DnaK). La fixation de ce chaperon sur l'ARNm bloque la traduction sur le ribosome et facilite la dégradation du nouveau polypeptide par les protéases [37].

Il apparaît ainsi que la protéine DnaK est l'acteur principal de la régulation de la réponse au choc thermique dans la cellule bactérienne. En effet, à température normale, cette protéine, associée aux protéines DnaJ et GrpE, est fixée sur le facteur σ 32. La transcription des gènes *hsp* se fait donc essentiellement grâce au facteur σ 70. Lors d'une élévation de température, le taux de protéines dénaturées augmente dans la cellule. Du fait de la très forte affinité de la protéine DnaK pour les substrats dénaturés, le facteur σ 32 se trouve libéré. Le recrutement de la protéine DnaK par les protéines dénaturées aura également pour effet de libérer l'ARNm du gène *rpoH* et d'augmenter sa traduction. L'action combinée de l'élévation de température, agissant directement sur les éléments cis-régulateurs de l'ARNm du gène *rpoH*, et du recrutement des protéines DnaK par les protéines dénaturées va permettre l'induction de l'expression de tous les gènes de choc thermique. La production de molécules chaperons qui en résulte permettra l'autorégulation de la réponse au choc thermique en éliminant peu à peu le taux de protéines dénaturées dans la cellule.

Ce système de régulation est conservé chez un grand nombre de bactéries, mais il n'est cependant pas universel. Chez *Bradyrhizobium japonicum*, un facteur σ 54 codé par le gène *rpoN*, régule l'activité de l'opéron *groE* [38]. Un autre système de régulation a enfin été décrit chez certaines bactéries et notamment chez *Bacillus subtilis* [39], *Clostridium acetobutylicum* [40] et *Mycobacterium leprae* [41]. Ce système appelé CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) fait intervenir des éléments répétés inversés très conservés et ayant une structure de deux fois neuf nucléotides séparés par neuf nucléotides. Les CIRCE sont généralement localisés entre le promoteur et le codon Start du gène *hsp60* et des mutations sur une des deux branches des séquences ont un effet activateur de la transcription. Il semble donc que les CIRCE soient des éléments répresseurs de la transcription, soit par effet

stérique sur l'ADN (en formant une boucle qui bloque l'ARN polymérase), soit par fixation d'un répresseur spécifique [31]. Chez *Bacillus subtilis*, Schulz *et al.* [42] ont mis en évidence des mutants ayant une délétion sur le gène *orf39* et synthétisant de façon importante les protéines Hsp60 et Hsp70. Il est probable que le produit de ce gène soit effectivement l'élément répresseur des séquences CIRCE [43].

La protéine Hsp60 des bactéries symbiotiques intracellulaires

Le stress cellulaire, responsable de la surproduction de la protéine Hsp60

La production de protéines de stress de la famille des Hsp60 a été observée chez de nombreuses bactéries parasites : *Salmonella typhi* [44] ; *Chlamydia trachomatis* [45] ; *Mycobacterium paratuberculosis* [46] et *Pasteurella multocida* [47]. Il est possible que ces protéines permettent la survie des parasites dans l'environnement intracellulaire hostile des cellules hôtes, soit en maintenant la structure des protéines bactériennes essentielles, soit en participant à la production et à l'excrétion des facteurs de virulence [48].

Chez le charançon *Sitophilus oryzae*, les endocytobiotés produisent en quantité très importante une protéine Hsp60. Cette protéine représente jusqu'à 40 % des synthèses des endocytobiotés lorsqu'ils sont dans les bactériocytes hôtes [49].

Chez le puceron *Schizaphis graminum*, Baumann *et al.* [50] ont suivi le taux de protéines Hsp60 des endocytobiotés au cours du développement de l'insecte. Un taux relativement constant de 1,6 10⁵ molécules de Hsp60 par μm^3 a été trouvé. Cette concentration (environ 10 % des protéines totales) correspond au taux de protéines Hsp60 trouvé chez *Escherichia coli* cultivée en condition de stress thermique à 46°C. Une telle production de protéines de stress a également été observée chez les endocytobiotés de l'amibe *Amoeba proteus* [51] et chez ceux de la mouche tsé-tsé *Glossina sp.* [52].

Chez un autre puceron, *Acyrtosiphon pisum*, les endocytobiotés primaires (*Buchnera aphidicola*) produisent également une protéine Hsp60 en quantité importante [53]. Cette protéine, appelé symbionine, a été purifiée et a montré *in vitro* des propriétés de molécule chaperon, des activités d'ATPase et de renaturation de substrats dénaturés [54].

Afin de découvrir un éventuel rôle spécifique de cette protéine dans la relation symbiotique, Morioka et Ishikawa [55] ont recherché les différences existant entre la symbionine et la protéine GroEL. Il est ainsi apparu que les sous-unités de la symbionine se dissociaient plus facilement en présence d'urée que les sous-unités GroEL. De plus, leur réassociation n'est pas influencée par la présence de symbionine native. Il semble donc que des différences existent entre ces deux molécules au niveau de leur structure quaternaire. La symbionine possède de plus une activité d'autophosphorylation qui lui permet de transférer l'énergie de la liaison phosphate de l'ATP à d'autres composés. *In vitro*, elle peut reformer du GTP et de l'ATP à partir du GDP et de l'ADP [54]. La protéine GroEL est également capable d'autophosphorylation [56], mais pour le moment aucune activité phosphotransférase a été découverte. Ainsi la symbionine, en plus de son rôle de chaperon, pourrait avoir un deuxième rôle comparable à celui des protéines à histidine kinase des bactéries et pourrait participer aux échanges énergétiques entre l'hôte et ses endocytobiotés.

Enfin, un rôle très original pour la symbionine a été décrit chez les pucerons *Myzus persicae* [57] et *Rhopalosiphum padi* [58]. La symbionine est excrétée par les endocytobiotés dans l'hémolymphe de ces deux insectes et participe au cycle de transmission de différents virus circulants en protégeant les particules virales de la protéolyse, depuis le tube digestif jusqu'aux glandes salivaires. Il est à noter qu'une protéine homologue des Hsp60 a été trouvée, associée aux particules du virus HIV, dans des cellules humaines [59].

Il n'est pas surprenant d'observer la présence de protéines Hsp60 dans les divers endocytobiotés et bactéries parasites étudiés puisque cette protéine possède un rôle physiologique essentiel à toutes les températures. Mais il est par contre plus étonnant que cette protéine de stress soit surproduite même dans des relations endosymbiotiques très anciennes et apparemment très stables. On peut noter à ce titre que les mitochondries stockent également une quantité importante de protéine Hsp60. L'induction de l'expression de protéine Hsp60 est peut-être liée à l'effort d'importation et d'exportation (échanges de métabolites) auquel la cellule symbiotique doit continuellement faire face. Mais elle correspond peut-être simplement à une réponse au stress induit par le milieu intracellulaire qui malgré la longue co-évolution, est resté hostile à ces cellules étrangères.

Régulation des gènes *hsp60* des bactéries intracellulaires

Chez les endocytobiotés du puceron du pois [60], ainsi que chez *Legionella pneumophila* [61], la régulation des gènes *hsp60* semble se faire sur le modèle classique à double promoteurs σ_{32} et σ_{70} . Il existe en plus chez *Buchnera aphidicola* deux séquences inversées répétées (IR) de sept paires de bases, séparées par sept autres paires de bases. Cet ensemble est localisé entre les gènes *hsp60* et *hsp10*. Ces IR pourraient être des éléments de régulation positifs qui permettraient la synthèse préférentielle de *hsp60* par rapport à *hsp10* [60]. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, le même type de régulation est observé mais les séquences inversées et répétées possèdent 21 nucléotides chacune et sont séparées par cinq nucléotides [62].

Chez *Bradyrhizobium japonicum* la régulation des gènes *hsp60* est à la fois du type CIRCE et σ_{32} . Cette régulation est extrêmement complexe et très partiellement élucidée. Non seulement les gènes *hsp60* sont multiples et localisés sur des mégaplasmides, mais les gènes *rpoH* appartiennent également à une famille multigénique [38]. Chez *Agrobacterium tumefaciens*, il a été montré que, lors d'un choc thermique, le taux de protéine Hsp60 augmente de façon très importante alors que le taux de Hsp10 reste faible dans la cellule. Une stabilité différentielle des deux ARNm *hsp10* et *hsp60*, obtenus après clivage de l'ARNm polycistronique, a été suggérée pour expliquer ce phénomène [63].

Enfin, chez les endocytobiotés de l'amibe *Amoeba proteus*, l'opéron *xgroE* est sous le contrôle d'un promoteur classique P σ_{32} , mais un autre type de promoteur extrêmement fort et fonctionnel chez *Escherichia coli* induit l'expression préférentielle de la protéine XGroEL par rapport à la protéine XGroES [64]. Ce type de promoteur, situé à l'intérieur du gène *groES*, n'a pour le moment pas été trouvé chez d'autres organismes.

Il apparaît donc que la régulation des gènes des bactéries symbiotiques possède au moins une caractéristique propre : l'induction préférentielle du gène *hsp60* par rapport au gène *hsp10*. Les organismes ont apparemment tous développé des mécanismes très diversifiés pour atteindre ce même but. Les modèles de fonctionnement du complexe GroE les plus récents montrent la nécessité d'un rapport stoechiométrique de 2:1 respectivement pour les molécules GroEL et GroES dans la cellule. Néanmoins il a été montré que la

protéine GroEL seule est capable d'une activité chaperon *in vitro* [65]. De plus la surproduction de la protéine GroES s'est avérée toxique pour la cellule [12]. Il est probable que cet effet toxique de GroES soit responsable de la sélection de ces mécanismes de régulation chez les organismes intracellulaires.

Conclusion : rôle des protéines Hsp60 dans la symbiose intracellulaire

Il est remarquable que dans toutes les symbioses intracellulaires étudiées à ce jour, la surproduction de protéines de stress soit observée. Cette surproduction semble de plus avoir été conservée au cours de l'évolution puisque même les mitochondries et les chloroplastes dont l'âge de l'intégration symbiotique est estimé à environ 1 milliard d'années, produisent en quantité importante ce chaperon moléculaire dont le gène a été transféré dans le noyau. Ainsi, ces protéines pourraient avoir un rôle prépondérant dans le maintien de l'équilibre symbiotique. La découverte de ces protéines dans la symbiose a dévoilé un fait important : la symbiose est génératrice de stress pour les deux partenaires. Mais il est légitime de se demander "Qu'est-ce que représente véritablement le stress intracellulaire pour une bactérie qui cohabite avec son hôte depuis plusieurs millions d'années ?" Six hypothèses non exclusives ont ainsi été formulées pour tenter de définir le rôle de cette protéine chez les bactéries symbiotiques intracellulaires :

(1) La protéine Hsp60 participe à la translocation membranaire et aux repliements des protéines hôtes importées depuis le cytoplasme hôte à l'intérieur des endocytobiotés.

(2) Elle participe aux échanges énergétiques entre l'hôte et les endocytobiotés via ses propriétés de phosphorylation.

(3) Elle est excrétée dans le cytoplasme de l'hôte où elle assure sa fonction de molécule chaperon.

(4) Elle participe à la formation et à l'excrétion de facteurs de virulence qui permettent aux endocytobiotés de contourner la barrière immunitaire de l'hôte.

(5) Elle compense les dommages causés sur la séquence d'ADN par l'accumulation de mutations délétères (décrites chez les petites populations d'endocytobiotés à reproduction asexuée et évoluant à travers des goulots d'étranglement) en aidant le repliement des protéines ayant leurs structures tertiaires ou quaternaires altérées.

(6) Enfin, l'hôte induit l'expression quasi-élective de cette protéine afin de diminuer la virulence de la bactérie symbiotique en limitant son potentiel global de synthèse et évite ainsi l'envahissement.

La symbiose intracellulaire se traduit par une augmentation de la fitness de l'hôte qui, grâce à ses symbiotes, parvient mieux à exploiter son substrat alimentaire et à survivre sur des milieux relativement pauvres. C'est le cas par exemple des insectes phloémophages (pucerons et aleurodes). L'intégration des endocytobiotés dans la physiologie de leur hôte nécessite des mécanismes très sophistiqués d'échanges de métabolites. Il a été montré que les endocytobiotés d'insectes fournissent à leurs hôtes de nombreuses vitamines, acides aminés et lipides. Lorsque l'intégration est encore plus poussée (plus ancienne), il est vraisemblable qu'un système d'interactions génétiques se mette en place et aboutisse à une réorganisation complète du génome symbiotique par délétions et transferts de gènes [66]. La protéine Hsp60 pourrait alors participer à ces mécanismes d'échanges et d'interactions (Hypothèses 1 à 3). Néanmoins, aucune preuve directe de cette intervention n'a pu être fournie à ce jour dans la littérature.

Si la participation aux échanges n'est pas le rôle principal de cette protéine dans la relation symbiotique, on peut supposer qu'elle intervient dans les mécanismes de tolérance des endocytobiotés vis-à-vis de l'hôte (Hypothèses 4 à 6). En effet, pour perdurer, l'association doit faire face à un certain nombre de problèmes : les endocytobiotés ne doivent pas être éliminés par le système de défense de l'hôte, mais leur démographie doit tout de même être rigoureusement contrôlée pour éviter une invasion fatale. Cette fois encore aucune preuve directe de l'intervention de la protéine Hsp60 dans l'un de ces mécanismes de "défense" n'a pu être fournie pour le moment.

Outre ces aspects fondamentaux de biologie cellulaire et moléculaire, l'étude de la symbiose chez les insectes revêt aussi une importance économique non négligeable. En effet, de nombreux ravageurs doivent leur extraordinaire potentiel d'invasion et de multiplication à l'apport énergétique fourni par leurs symbiotes. Une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction hôte/symbiotes permettra alors peut-être un jour d'envisager le développement de nouveaux moyens de lutte contre ces ravageurs.

Références

- Sapp, J. (1991) Living together : symbiosis and cytoplasmic inheritance. In : Symbiosis as a source of evolutionary innovation speciation and morphogenesis. Edited by Margulis L. and Fester R., Cambridge : MIT Press, p. 15-25.
- De Bary, H.A. (1879) De la symbiose. *Rev. Intern. Sci.* 3, 301-309.
- Portier, P. (1918) Les symbiotes. Paris : Masson.
- Mereschkowski, C. (1920) La plante considérée comme un complexe symbiotique. *Bull. Soc. Sci. Nat. Ouest France* 6, 17-21.
- Wallin, D.E. (1927) Symbiogenesis and the origin of species. Baltimore : Williams and Wilkins.
- Buchner, P. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York : Interscience, 909 p.
- Nardon, P. et Grenier, A.M. (1993) Symbiose et évolution. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 29, 113-140.
- Nardon, P. (1995) Rôle de la symbiose dans l'adaptation et la spéciation. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 120, 397-406.
- Paillot, A. (1933) L'infection chez les insectes. Trévoux : G. Patissier.
- Léon, K.W. (1983) Integration of bacterial endosymbionts in *Amoebae*. *Intern. Rev. Cyt.* 14, 29-47.
- Hendrix, R.W. (1979) Purification and properties of GroE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* 129, 375-392.
- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. & Georgopoulos, C. (1991) The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 301-325.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., Van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. & Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.
- Gupta, R.S., Picketts, D.J. & Ahmad, S. A. (1989) Novel ubiquitous protein chaperonin supports the endosymbiotic origin of mitochondrion and plant chloroplast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163, 780-787.
- Trent, J.D. (1996) A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 249-258.
- Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U. & Horwich, A.L. (1991) A molecular chaperone from a thermophilic Archaeobacterium is related to the eucaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* 354, 490-493.
- Yamaguchi, H., Miura, H., Ohsumi, K., Ishimi, N., Taguchi, H., Ishiyama, N., Shiraiishi, Y., Yamamoto, T. & Ogata, S. (1994) Detection and characterization of antibodies to bacterial heat-shock protein 60 in sera of patients with primary biliary cirrhosis. *Microbiol. Immunol.* 38, 483-487.
- Pannekoek, Y., Dankert, J. & Vanputten, J.P.M. (1995) Construction of recombinant neisserial Hsp60 proteins and mapping of antigenic domains. *Mol. Microbiol.* 15, 277-285.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. & Sigler, P.B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 angströms. *Nature* 371, 578-586.
- Hendrick, J.P. & Hartl, F.U. (1995) The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.* 9, 1559-1569.
- Tilly, K. & Georgopoulos, C. (1982) Evidence that the two *Escherichia coli* groE morphogenetic gene products interact *in vivo*. *J. Bacteriol.* 149, 1082-1088.
- Landry, S.J., Zeilstraryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C. & Gierasch, L.M. (1993) Characterization of a functionally important mobile domain of GroES. *Nature* 364, 255-258.
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T. & Georgopoulos, C. (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171, 1379-1385.
- Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R. & Kaiser, A.D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 76, 45-60.
- Fayet, O., Louarn, J.M. & Georgopoulos C. (1986) Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by amplification of the groES and groEL genes. *Mol. Gen. Genet.* 202, p. 435-445.
- Hayes, S.A. & Dice, J.F. (1996) Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J. Cell. Biol.*, 132, 255-258.
- Ellis, R.J. & Van der Vies, S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-347. †
- Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R. & Saibil, H.R. (1994) Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* 371, 261-264.
- Harris, J.R., Pluckthun, A. & Zahn, R. (1994) Transmission electron microscopy of GroEL, GroES, and the symmetrical GroEL/ES complex. *J. Struct. Biol.* 112, 216-230.
- Fischer, H.M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F. & Hennecke, H. (1993) One member of a groESL-Like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium Japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.*, 12, 2901-2912.
- Van der Vies, S. & Georgopoulos, C. (1996) Regulation of chaperonin gene expression. The chaperonin, New York : Academic Press p. 137-165.
- Pose, P.S. (1993) Molecular characterization of two nuclear genes encoding *Zea mays* mitochondrial chaperonin 60. GenBank data base release 82.0 April 1994, locus: MZECPN60A.
- Welch, W. (1993) Les cellules et le stress. *Pour la science*, 189, 70-77.
- Langer, T. & Neupert, W. (1991) Heat shock proteins Hsp60 and Hsp70 : Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. In : Current topics in microbiology and immunology. Heatshock proteins and immune response. Berlin : Springer-Verlag p. 3-30.
- Lathigra, R.B., Butcher, P.D., Garbe, T.R. & Young, D.B. (1991) Heat shock protein as virulence factors of pathogens. In : Current topics in microbiology and immunology. Heatshock proteins and immune response. Berlin : Springer-Verlag, p. 125-144.
- Yura, T., Nogai, H. & Mori, H. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 321-350.
- Mccarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J.,

- Schneidermergener, J., Nakahigashi, K., Yura, T. & Bukau, B. (1996) Regulatory region c of the *E. coli* heat shock transcription factor, sigma(32), constitutes a DnaK binding site and is conserved among Eubacteria. *J. Mol. Biol.* **256**, 829-837.
38. Babst, M., Hennecke, H. & Fisher, H.M. (1996) Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **19**, 827-839.
39. Li, M. & Wong, S.L. (1992) Cloning and characterization of the groESL operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3981-3992.
40. Narberhaus, F. & Bahl, H. (1992) Cloning, sequencing, and molecular analysis of the groESL operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**, 3282-3289.
41. Mehra, V., Sweetser, D. & Yong, R.A. (1986) Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7013-7017.
42. Shultz, A., Tzschaschel, B. & Schumann, W. (1995) Isolation and analysis of mutants of the DnaK operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **15**, 421-429.
43. Schumann, W. (1996) Regulation of the heat shock response in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biosciences* **21**, 133-148.
44. Lindler, L.E. & Hayes, J.M. (1994) Nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* groEL heat shock gene. *Microb. Pathology* **17**, 271-275.
45. Ho, Y. & Zhang, Y.X. (1994) The sequence of the groES and groEL genes from the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*. *Gene* **141**, 143-144.
46. Colston, A., McConnell, I. & Bujdoso, R. (1994) Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology-UK* **140**, 3329-3336.
47. Love, B.C., Hansen, L.M. & Hirsh, D.C. (1995) Cloning and sequence of the groESL heat-shock operon of *Pasteurella multocida*. *Gene* **166**, 179-180.
48. Jacquier-Sarlin, M.R. & Polla, B.S. (1994) Protéines de stress : soi, non soi et réponse immunitaire. *Médecine/sciences* **10**, 31-41.
49. Charles, H., Ishikawa, H. & Nardon, P. (1995) Presence of a protein specific of endocytobiosis (symbionin) in the weevil *Sitophilus*. *C. R. Acad. Sci. Paris* **318**:35-41.
50. Baumann, P., Baumann, L. & Clark, M.A. (1996) Levels of *Buchnera aphidicola* chaperonin GroEL during growth of the aphid *Schizaphis graminum*. *Current Microbiology* **32**, 279-285.
51. Ahn, T.I., Hyon, K.L., Kwak, I.H. & Jéon, K.W. (1991) Nucleotide sequence and temperature-dependent expression of xgroEL gene isolated from symbiotic bacteria of *Amoeba proteus*. *Endocytobiosis and cell. res.* **8**, 33-44.
52. Aksoy, S. (1995) Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies: 16S rDNA locus and over-expression of a chaperonin. *Insect Mol. Biol.* **4**, 23-29.
53. Ishikawa, H. (1989) Biochemical and molecular aspects of the aphid endocytobiosis. *Insect Endocytobiosis : morphology, physiology, genetics, evolution*. Edited by W. Schwemmler and G. Gassner, Washington : CRC Press. p. 123-143.
54. Morioka, M., Hiromichi M. & Ishikawa H. (1993) Chaperonine produced by an intracellular symbiont is an energy-coupling protein with phosphotransferase activity. *J. Biochem.* **114**, 246-250.
55. Morioka, M. & Ishikawa H. (1993) Self-assembly of symbionin, a chaperonin of intracellular symbiont. *J. Biochem.* **114**, 468-472.
56. Sherman, M.Y. & Goldberg, A.L. (1992) Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin GroEL by inducing its phosphorylation. *Nature* **357**, 167-169.
57. Van den Heuvel, J.M., Verbeek, M. & Van der Wilk, F. (1994) Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Vir.* **75**, 2559-2565.
58. Filichkin, S.A., Brumfield, S., Filichkin, T.P. & Young, M.J. (1997) *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with Barley yellow dwarf virus. *J. Virology* **71**, 569-577.
59. Bartz, S.R., Pauza, C.D., Ivanyi, J., Jindal, S., Welch, W.J. & Malkovsky, M. (1994) An Hsp60 related protein is associated with purified HIV and SIV. *J. Med. Primatol.* **23**, 151-154.
60. Ohtaka, C., Nakamura, H. & Ishikawa, H. (1992) Structures of chaperonins from an intracellular symbiont and their functional expression in *Escherichia coli* GroE mutants. *J. Bacteriol.* **174**, 1869-1874.
61. Hoffman, P.S., Houston, L. & Butler, C.A. (1990) *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect. Immun.* **58**, 3380-3387.
62. Baird, P.N., Hall, L.M. & Coates, A.R. (1989) Cloning and sequencing analysis of the 10 kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microb.* **135**, 931-939.
63. Segal, G. & Ron, E.Z. (1995) The groESL operon of *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for heat shock-dependent mRNA cleavage. *J. Bact.* **177**, 750-757.
64. Ahn, T.I., Lim, S.T., Leeu, H.K., Lee, J.E. & Jéon, K.W. (1994) A novel strong promoter of the operon of symbiotic bacteria in *Amoeba proteus*. *Gene* **128**, 43-49.
65. Hendrick, J.P. & Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
66. Charles, H., Condemine, G., Nardon, C. & Nardon, P. (1997) Genome size characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*, using pulsed field gel electrophoresis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 345-350.