

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

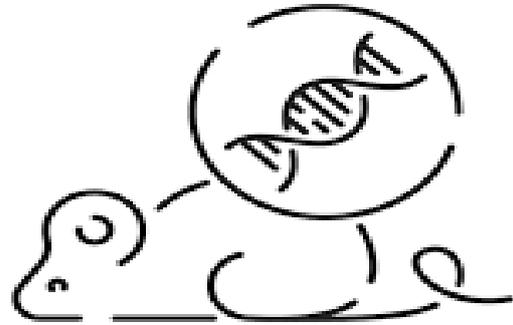
Polycopié de cours de :

# Génie Biochimie

Niveau : 3<sup>ème</sup> Année Licence (LMD)  
Biotechnologie et santé

Préparé par :

Dr. BETTIHI Sarra



2023-2024

## Table des matières

<b>I. Topologies et dynamique membranaire.....</b>	<b>1</b>
I.1 Bicouche lipidique .....	1
I.1.1 Phospholipides .....	1
I.1.2 Glycolipide.....	2
I.1.3 Cholestérol .....	2
I.2 Asymétrie de composition et de répartition des lipides membranaires.....	3
I.2.1 Asymétrie de composition membranaires .....	3
I.2.2 Arrangement des lipides .....	3
I.3 Fluidité membranaire, rafts lipidiques .....	7
I.3.1 La fusion membranaire et infection virale.....	8
I.3.2 Infection viral .....	14
I.4 Trafic vésiculaire intracellulaire .....	16
I.4.1 Recyclage d'antigènes .....	16
I.4.2 Phagocytose .....	17
I.4.3 Macropinocytose Constitutive.....	18
I.4.4 Endocytose dépendante de la clathrine.....	19
I.4.5 Autophagie.....	21
I.4.6 Maturation cellulaire .....	21
I.4.7 Activation des cellules dendritiques .....	21
I.4.8 Signaux inducteurs de la maturation et capture de l'antigène.....	22
I.5 Recyclage de récepteurs, désensibilisation et régulation de la réponse cellulaire.....	22
I.6 Vésiculation et sécrétion hormonale (insuline et neurotransmetteurs).....	24
I.6.1 L'insuline .....	24
I.6.2 Neurotransmetteurs .....	26
<b>II. Protéines membranaires.....</b>	<b>28</b>
II.1 Maturation des protéines et importance fonctionnelle .....	28
II.1.1 Le peptide signal induit le passage vers le RER : acheminement co-translationnel.	29
II.1.2 La structure de la SRP et la fixation de la SRP sur le canal de translocation. ....	30
II.1.3 Protéines entrant dans le RER .....	32
II.1.4 Un premier transit : du RER au Golgi par l'intermédiaire du compartiment ERGIC.....	33
II.1.5 Un deuxième transit : passage au travers du Golgi.....	37
II.1.6 Glycosylation des récepteurs, lipidation des facteurs de couplage .....	39

II.1.7	Lipidation des facteurs de couplage.....	42
II.2	Expression d'antigènes, marqueurs de virulence et de récepteurs cellulaires.....	47
II.2.1	Expression d'antigènes .....	47
II.2.2	Conséquences de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T.....	49
II.3	Anomalie dans l'expression protéique et pathologie (ex : EGF-R, p21ras et oncogène).....	52
II.3.1	RAS .....	52
II.3.2	BRAF .....	54
II.4	Anomalies de tri protéiques et pathologies héréditaires (Mitochondries, lysosomes, noyau, Mitochondries) .....	56
II.4.1	Anomalies mitochondriales .....	56
II.4.2	Anomalies de Lysosome .....	57
II.4.3	Noyau .....	58
<b>III.</b>	<b>Bases moléculaires de l'homéostasie cellulaire.....</b>	<b>60</b>
III.1	Récepteurs et ligands .....	61
III.1.1	Récepteurs et leurs ligands .....	63
III.2	Transducteurs et Facteurs de couplage .....	70
III.2.1	Cycle d'activation des protéines G trimériques G.....	70
III.2.2	Activation des effecteurs intracellulaires par les protéines G.....	71
III.2.3	Protéines scaffolds.....	74
III.3	Amplification du signal et seconds messagers.....	75
III.3.1	Cascade phospholipases C et D/DAG/IP3/Ca <sup>2+</sup> (cellule cardiaque).....	75
III.3.2	Cascade phospholipase A <sub>2</sub> / Eicosanoides .....	77
III.3.3	AMP cyclique (AMPc, adénosine monophosphate cyclique) .....	77
III.3.4	Cascade NO/GMPc (neurone, cellule endothéliale) .....	79
III.4	Génomique biochimique : Anomalies de signalisation et pathologies.....	90

# Chapitre 1 : Topologies et dynamique membranaire

# I. Topologies et dynamique membranaire

La topologie et la dynamique des membranes font référence à deux aspects essentiels de la structure et de la fonction des membranes biologiques, comme les membranes cellulaires. La topologie membranaire se rapporte à la disposition spatiale des protéines et des lipides au sein d'une membrane biologique. Elle concerne l'organisation et l'orientation des différentes molécules par rapport à la membrane. Plusieurs éléments doivent être pris en compte en matière de topologie membranaire, notamment

## I.1 Bicouche lipidique

Une bicouche lipidique est une structure essentielle des membranes biologiques présentes dans les cellules et les organismes vivants. Elle est principalement formée de lipides, des molécules amphiphiles, c'est-à-dire possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. La bicouche lipidique est constituée de deux couches de lipides alignées de façon spécifique, avec les parties hydrophobes dirigées vers l'intérieur et les parties hydrophiles orientées vers l'extérieur (figure 1). Cette structure est principalement composée de:

### I.1.1 Phospholipides

Les phospholipides se caractérisent par une tête hydrophile (constituée d'un groupement phosphate et d'un groupement spécialisé) et une queue hydrophobe (composée de glycérol et d'acides gras). On distingue deux types de phospholipides.

Les glycérophospholipides résultent de l'association de glycérol, de deux acides gras, d'un acide phosphorique, et d'alcools ou d'acides aminés. L'identité et les caractéristiques spécifiques du glycérophospholipide sont déterminées par ces alcools ou acides aminés. Par exemple, parmi les acides aminés, on trouve la sérine, tandis que parmi les alcools, on trouve l'inositol, l'éthanolamine et la choline. Cela donne naissance à des composés tels que la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine (figure 1).

Les sphingophospholipides, quant à eux, sont formés par l'association de sphingosine, d'acide gras, d'acide phosphorique et d'alcool ou d'acides aminés, ce qui conduit à la formation de la sphingomyéline (par association avec la choline).

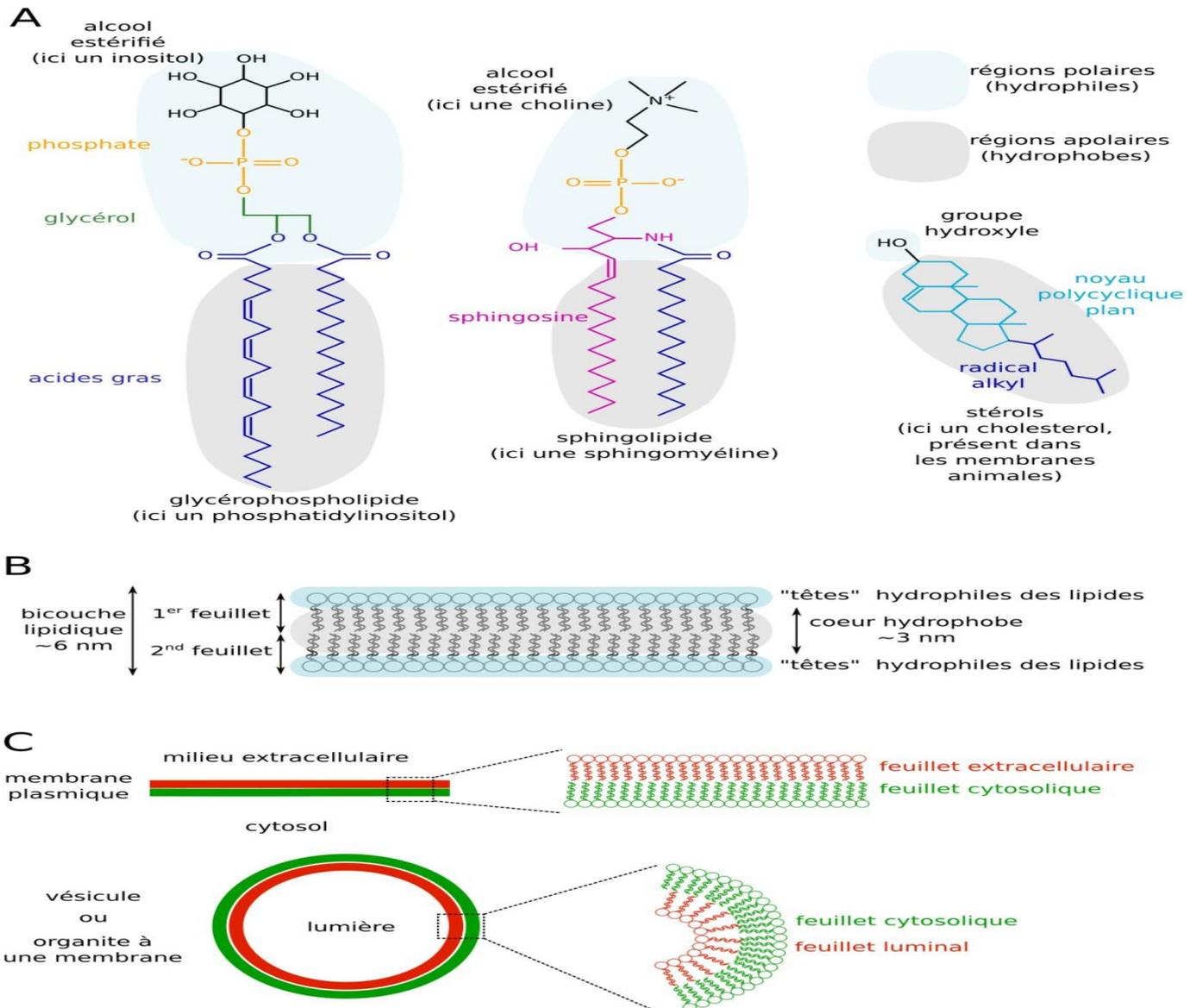


Fig 1. Les lipides membranaires forment des bicouches lipidiques.

### I.1.2 Glycolipide

Les glycolipides, présents sur les membranes cellulaires, jouent principalement un rôle dans la signalisation cellulaire. Par exemple, certains glycolipides présents sur la membrane des globules rouges déterminent les antigènes des groupes sanguins. Il existe deux types de glycolipides : les glycéroglycolipides et les sphingoglycolipides.

### I.1.3 Cholestérol

Le cholestérol est présent exclusivement dans les membranes des cellules animales, et il est absent des cellules végétales et des bactéries. Cette molécule est composée d'un noyau stéroïde hydrophobe, d'une queue hydrophobe, et d'un groupe hydroxyle hydrophile, ce qui en fait une molécule

amphiphile. Le cholestérol se trouve uniquement sous une forme non estérifiée, insérée entre les molécules de phospholipides. Il est plus abondant dans le feuillet externe de la membrane et constitue environ un quart des lipides membranaires, influençant ainsi la fluidité de la membrane.

### **I.2 Asymétrie de composition et de répartition des lipides membranaires**

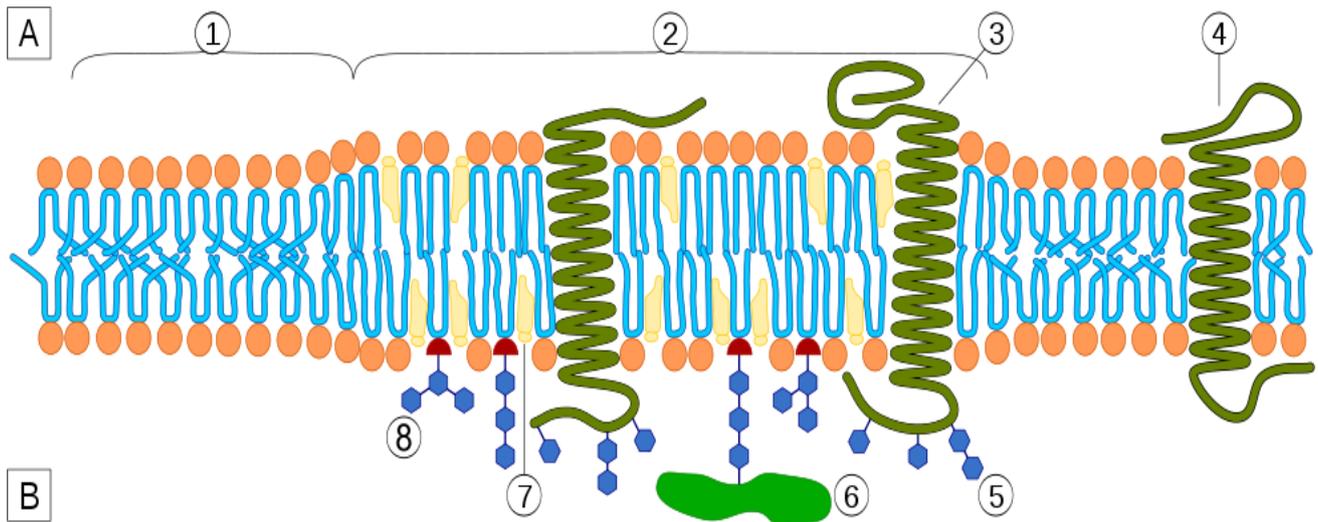
Chaque composant de la membrane cellulaire possède une orientation spécifique par rapport au cytoplasme, ce qui explique les propriétés distinctes des deux faces de la membrane. Cette caractéristique est connue sous le nom d'asymétrie membranaire, et elle est déterminée par plusieurs facteurs :

#### **I.2.1 Asymétrie de composition membranaires**

La membrane cellulaire est composée de lipides, de protéines, et de glucides. Sur la face externe de la membrane, on trouve souvent des sucres et des protéines spécifiques impliqués dans la communication cellulaire et la reconnaissance. En revanche, la composition interne est différente. Les phospholipides sont distribués de manière asymétrique, ce qui signifie que la composition lipidique d'un côté de la membrane peut être très différente de l'autre. Cette asymétrie est cruciale pour de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la régulation de la fluidité membranaire, les interactions avec d'autres cellules, et la signalisation cellulaire.

#### **I.2.2 Arrangement des lipides**

Les phospholipides s'organisent en deux couches parallèles, où les têtes hydrophiles sont orientées vers l'extérieur de la bicouche, en interaction avec l'eau, tandis que les queues hydrophobes se regroupent à l'intérieur de la bicouche pour éviter l'eau (figure 2)



**Fig 2.** Membrane plasmique et structures protéiques. : [A] cytosol ; [B]milieu extracellulaire ; (1) Bicouche lipidique; (2) Radeau lipidique; (3) Radeau lipidique association à les protéines transmembranaires ; (4) transmembranaires protéiques; (5) glycosylation des glycolipides et glycoprotéines par modification post-traduction ; (6) protéines à Augmenter la teneur en lipides d'une molécule de GPI ; (7) le cholestérol ; (8) glycolipide.

De nombreuses membranes biologiques présentent une asymétrie, ce qui signifie que la composition en lipides et en protéines diffère entre les deux côtés de la membrane. Un exemple de structure montrant cette asymétrie est:

### I.2.2.1 Liposome

Les liposomes, également appelés vésicules lipidiques, sont des structures sphériques délimitées par une bicouche lipidique. Ils se forment lorsqu'un lipide est mis en suspension dans une solution aqueuse, puis agité. En mesurant le taux d'efflux des substances de l'intérieur du liposome vers la solution environnante, on peut évaluer la perméabilité de la membrane à divers composés. Les liposomes peuvent être chargés en ions ou en petites molécules provenant de la solution externe, et il est possible d'intégrer des protéines dans leur membrane en utilisant des détergents pour les solubiliser. Cette méthode permet d'étudier les fonctions des protéines membranaires (figure 3).

Dans un environnement aqueux, les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes. Ces structures ont une taille à l'échelle nanométrique, avec un diamètre variant de 20 à plus de 1000 nm. La bicouche phospholipidique sépare le milieu intravésiculaire du milieu extérieur aqueux. Les têtes polaires des phospholipides se situent à l'extérieur de la bicouche, tandis que les

queues apolaires sont orientées vers l'intérieur, minimisant ainsi les interactions hydrophobes (Fig 3).

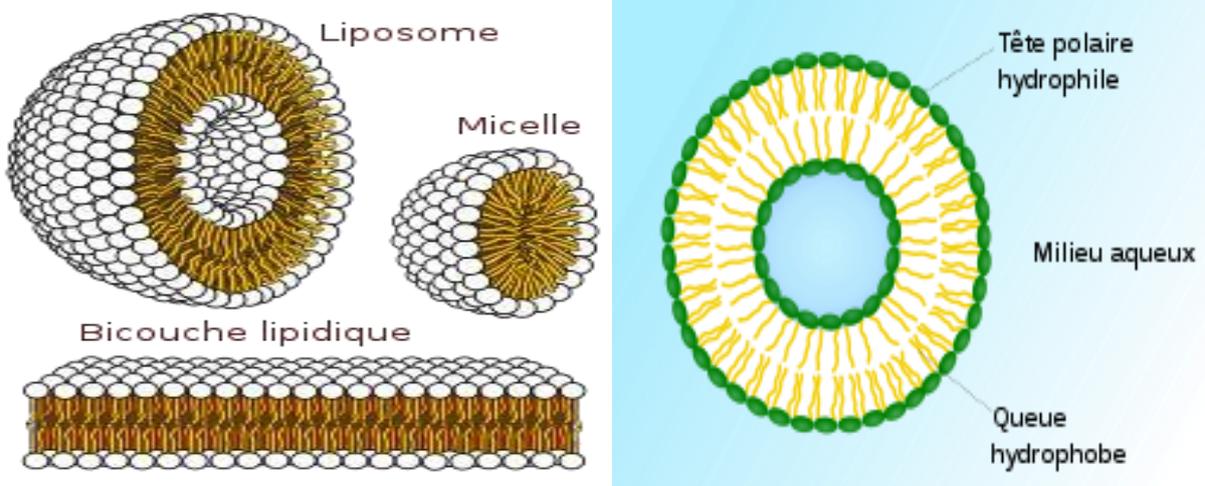


Fig 3. Les liposomes, ou vésicules lipidiques

### I.2.2.2 La membrane mitochondriale

La membrane mitochondriale est une composante essentielle des mitochondries, les centrales énergétiques des cellules. Cette structure est formée de deux membranes distinctes : la membrane externe et la membrane interne.

**La membrane externe** enveloppe la mitochondrie et joue un rôle protecteur, contribuant à préserver l'intégrité structurale de l'organelle. Elle est dotée de canaux, appelés porines, qui permettent le passage de petites molécules.

**La membrane interne** est plus complexe et se distingue par de nombreuses invaginations, appelées crêtes mitochondriales, qui augmentent la surface disponible pour les réactions chimiques. Cette membrane abrite des protéines spécialisées dans la production d'énergie, telles que les complexes de la chaîne respiratoire et les enzymes responsables de la synthèse d'ATP (figure 4).

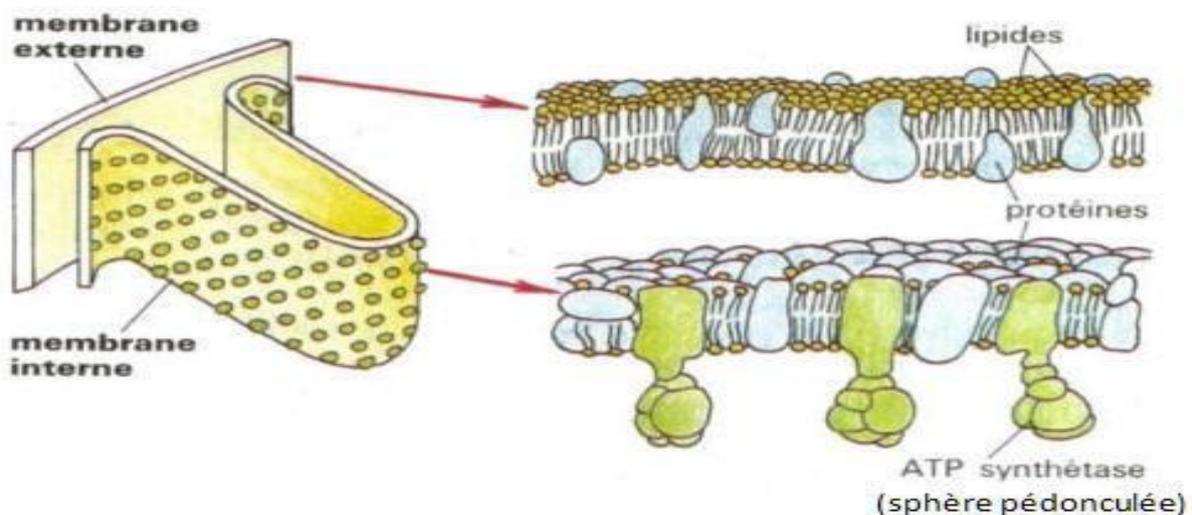


Fig 4. La structure de la membrane mitochondriale, interne et externe.

### **I.2.2.3 Réticulum endoplasmique**

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle fondamental dans les cellules et se décline en deux types principaux : le réticulum endoplasmique lisse (REL) et le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Le REL est spécialisé dans la synthèse des lipides, tandis que le RER, parsemé de ribosomes, est responsable de la synthèse des protéines (tableau 1).

### **I.2.2.4 Réticulum Endoplasmique Rugueux (RER)**

Le RER doit son apparence rugueuse aux ribosomes attachés à sa surface externe, visibles au microscope électronique. Ce réticulum est généralement situé près du noyau cellulaire et est principalement impliqué dans la synthèse des protéines.

**Tableau 1.** La composition biochimique des différentes structures mitochondriales.

Structure étudiée	Composition chimique remarquable.	Protéines catalysant des réactions particulières.
Membrane externe	Protéines (62%), Lipides (38%)	Protéines similaires à celles de la membrane plasmique.
Membrane interne	Protéines (80%), Lipides (20%)	ATP synthétase (production d'ATP), Complexes d'oxydoréduction.
Matrice	Présence de pyruvate, d'ATP, d'ADP et de Pi. Des transporteurs oxydés (R') ou réduits (R'H <sub>2</sub> )	Enzymes d'oxydation de molécules carbonées (production de CO <sub>2</sub> ). Complexes d'oxydoréduction. (déshydrogénases).

### **I.2.2.5 Réticulum Endoplasmique Lisse (REL)**

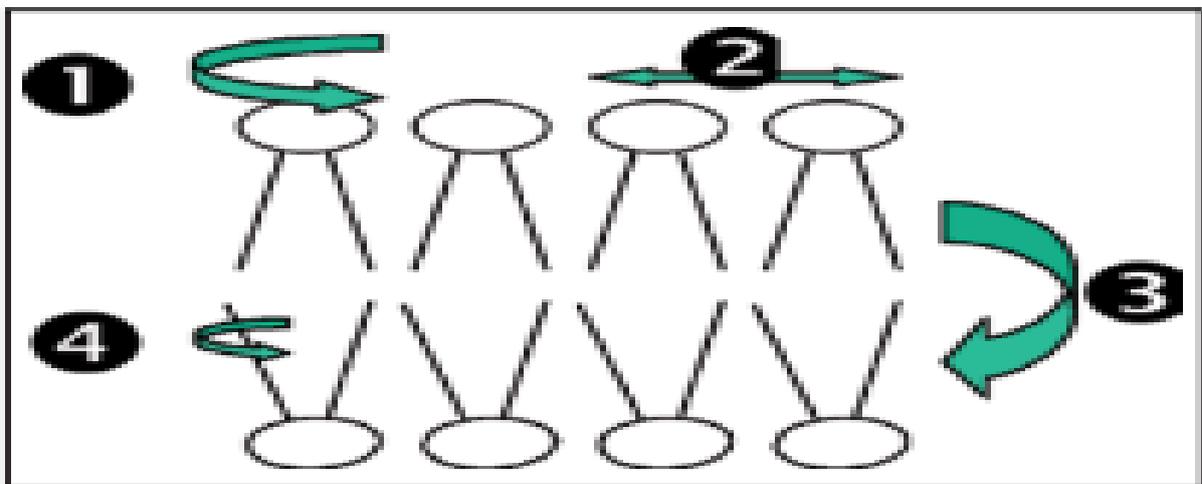
Le REL, dépourvu de ribosomes sur sa surface, présente une apparence lisse. Les membranes lipidiques qui composent le REL forment des sacs empilés et des tubules qui s'étendent dans tout le cytoplasme. Bien que le REL puisse être réparti dans toute la cellule, il est particulièrement abondant dans les cellules spécialisées, comme les cellules hépatiques. Le REL est impliqué dans la synthèse des lipides, la détoxification des médicaments, et la régulation du métabolisme des glucides. Il joue également un rôle dans le transport intracellulaire et la communication cellulaire, agissant comme une voie pour le transport des protéines nouvellement synthétisées.

### I.3 Fluidité membranaire, rafts lipidiques

La fluidité membranaire décrit le mouvement des constituants au sein d'une membrane biologique. Les lipides effectuent des rotations autour de leur axe perpendiculaire au plan de la membrane, et les chaînes hydrocarbonées, grâce à leur flexibilité, adoptent un mouvement de balancier. Ces mouvements à petite échelle sont responsables de la fluidité de la membrane.

La figure 5 illustre les différents types de mouvements des constituants membranaires. Ces mouvements incluent la rotation et le balancement, qui ne provoquent pas de déplacement des molécules dans la membrane. Cependant, une molécule peut se déplacer latéralement au sein de la même hémi-membrane par diffusion latérale, ou passer d'une hémi-membrane à l'autre par un mécanisme appelé "flip-flop". Ces déplacements montrent que la membrane n'est pas une structure figée, mais plutôt une structure dynamique où les molécules peuvent se mouvoir librement.

La fluidité membranaire est influencée par plusieurs facteurs, notamment la température. À des températures plus élevées, les lipides tendent à se séparer davantage, rendant la membrane plus fluide. À des températures plus basses, les lipides se rapprochent, ce qui rend la membrane plus rigide.



**Fig 5.** Mouvements des phospholipides au sein de la bicouche membranaire. La diffusion en translation (2) peut être décrite par des mouvements latéraux (dans le plan) ou verticaux (en dehors du plan). La diffusion par rotation (1) peut être décrite par des mouvements de rotations uniaxiales (dans le plan) ou de type « flip flop » (3) (en dehors du plan) plus rares (1 par mois ou par semaine). Les flexions d'acides gras (4) présentent des mouvements, au niveau des queues des phospholipides, dont l'amplitude est d'autant plus importante que l'on se rapproche du centre de la bicouche membranaire.

### I.3.1 La fusion membranaire et infection virale

#### I.3.1.1 La fusion membranaire

La **fusion** membranaire est un processus essentiel dans de nombreux événements cellulaires. Elle implique le mélange des composants de deux membranes, entraînant leur fusion en une seule membrane continue. Parmi les exemples biologiques de ce phénomène figurent la fusion des vésicules de transport du réticulum endoplasmique avec les membranes du Golgi, ainsi que la fusion des virus enveloppés avec la membrane plasmique des cellules cibles.

À l'inverse, la **fission** membranaire est le processus où une membrane se divise en deux, formant une nouvelle vésicule à partir d'une membrane existante. Ce processus est crucial pour l'endocytose et la formation de vésicules intracellulaires.

#### I.3.1.2 Le mécanisme la fusion membranaire

La fusion membranaire repose sur trois mécanismes principaux : le bourgeonnement des vésicules depuis un compartiment donneur, leur transport vers un compartiment accepteur, et la fusion avec ce dernier. Ce processus réunit deux structures membranaires en une seule et mélange le contenu des compartiments délimités par ces membranes. Par exemple, lors de l'exocytose, la membrane de la vésicule de sécrétion fusionne avec la membrane plasmique, libérant ainsi son contenu dans le milieu extracellulaire. Les cellules possèdent un réseau complexe de membranes intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes, lysosomes, membrane plasmique), qui communiquent via des vésicules bourgeonnantes. Les protéines SNARE jouent un rôle crucial dans ce trafic membranaire.

#### I.3.1.3 Les protéines SNARE

Les protéines SNARE sont des éléments clés de la machinerie de fusion membranaire. Leur rôle a été mis en évidence par les travaux de James Rothman et de ses collaborateurs dans les années 1980 sur le trafic membranaire au sein de l'appareil de Golgi. Leur étude a révélé que le transport des molécules dans l'appareil de Golgi in vitro était sensible au N-éthyl-maléimide, un inhibiteur puissant de certaines ATPases. Cela a conduit à l'identification de la N-ethyl-maleimide sensitive factor (NSF) comme une protéine cytosolique essentielle pour la fusion membranaire. NSF se lie aux membranes avec l'aide d'autres protéines cytosoliques, appelées NSF attachment proteins (SNAP). La recherche de récepteurs membranaires pour le complexe NSF-SNAP a permis d'isoler les protéines SNAP récepteurs, également connues sous le nom de SNARE.

Le cerveau, étant riche en processus de fusion membranaire, comme la libération des neurotransmetteurs, a servi de modèle pour l'étude des protéines SNARE. Parmi les principales protéines SNARE identifiées, on trouve la synaptobrevine (ou VAMP), la syntaxine, et SNAP-25. Les SNARE vésiculaires, comme la synaptobrevine, sont appelées v-SNARE, tandis que les SNARE cibles, comme la syntaxine et SNAP-25, sont appelées t-SNARE.

### I.3.1.4 La structure du complexe SNARE

La synaptobrevine et la syntaxine sont de petites protéines transmembranaires de type II, intégrées par leur extrémité C-terminale, tandis que SNAP-25 est associée à la membrane via des palmitoylations sur des cystéines centrales. Les protéines SNARE sont caractérisées par une séquence très conservée (motif SNARE) dans la région C-terminale de leur domaine cytoplasmique. Le complexe SNARE synaptique est une structure en tresse composée de quatre hélices  $\alpha$  : une provenant de la synaptobrevine, une de la syntaxine, et deux de SNAP-25.

Les extrémités N-terminales de ces hélices étant du même côté dans le complexe, leur formation rapproche les surfaces de la vésicule et de la membrane plasmique, facilitant ainsi la fusion des membranes. Cette formation du complexe SNARE semble libérer une partie de l'énergie nécessaire pour surmonter la barrière énergétique de la fusion des bicouches lipidiques. Les propriétés thermodynamiques du complexe SNARE montrent une grande stabilité, avec des interactions hydrogène au centre du complexe, entre une arginine de la synaptobrevine et trois glutamines (de la syntaxine et de SNAP-25).

Avant l'amarrage, les protéines d'enveloppe sont libérées pour que la vésicule atteigne sa destination. La direction de la vésicule vers la membrane cible est médiée par les protéines RAB, de fixation, et SNARE. L'amarrage de la vésicule implique la liaison de protéines à une protéine RAB active liée au GTP dans la membrane de la vésicule. La fusion suivante se produit par la formation d'un complexe SNARE entre les protéines SNARE des deux membranes. Les protéines RAB sont activées par la conversion du GDP en GTP par un facteur d'échange de nucléotides guanine (GEF). Le RAB activé se lie à diverses protéines effectrices, et l'hydrolyse du GTP est catalysée par une protéine activatrice de RAB GTPase (GAP), conduisant à l'inactivation du RAB.

La liaison d'un inhibiteur de dissociation du RAB GDP (GDI) empêche l'activation du RAB. Un facteur de déplacement RAB GDI (GDF) lié à la membrane libère le RAB du GDI, permettant sa réactivation par échange de GDP en GTP. Après l'attachement et l'amarrage de la vésicule à la membrane cible, un complexe SNARE est formé par un R-SNARE dans la membrane de la vésicule

et trois Q-SNARE dans la membrane cible. Les protéines SNARE forment un faisceau en hélice  $\alpha$  appelé complexe trans-SNARE, permettant aux membranes de se rapprocher pour la fusion. Après fusion, le facteur sensible à l'ATPase N-éthylmaléimide (NSF) et sa protéine de fixation NSF (SNAP) sont impliqués dans le démontage du complexe cis-SNARE, suivi du tri du R-SNARE vers la membrane du donneur (figure 6 et 7).

Le complexe NSF / $\alpha$ -SNAP demantèle le complexe coiled-coil de quatre SNAREs Informations. Une fois sa fonction accomplie et pour être recyclé, le complexe SNARE doit être démantelé. Ceci est réalisé par une ATPase hexamérique, NSF, associée à trois protéines SNAP

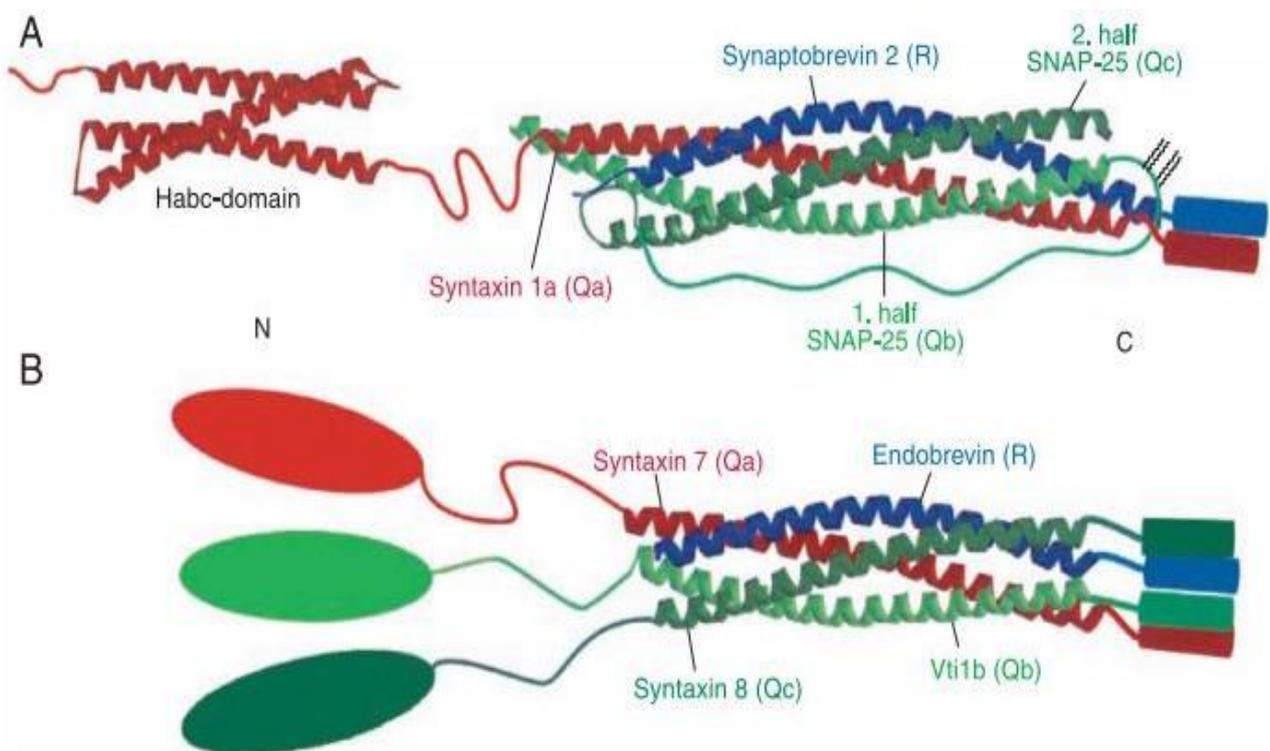


Fig 6. La structure des protéines SNARE.

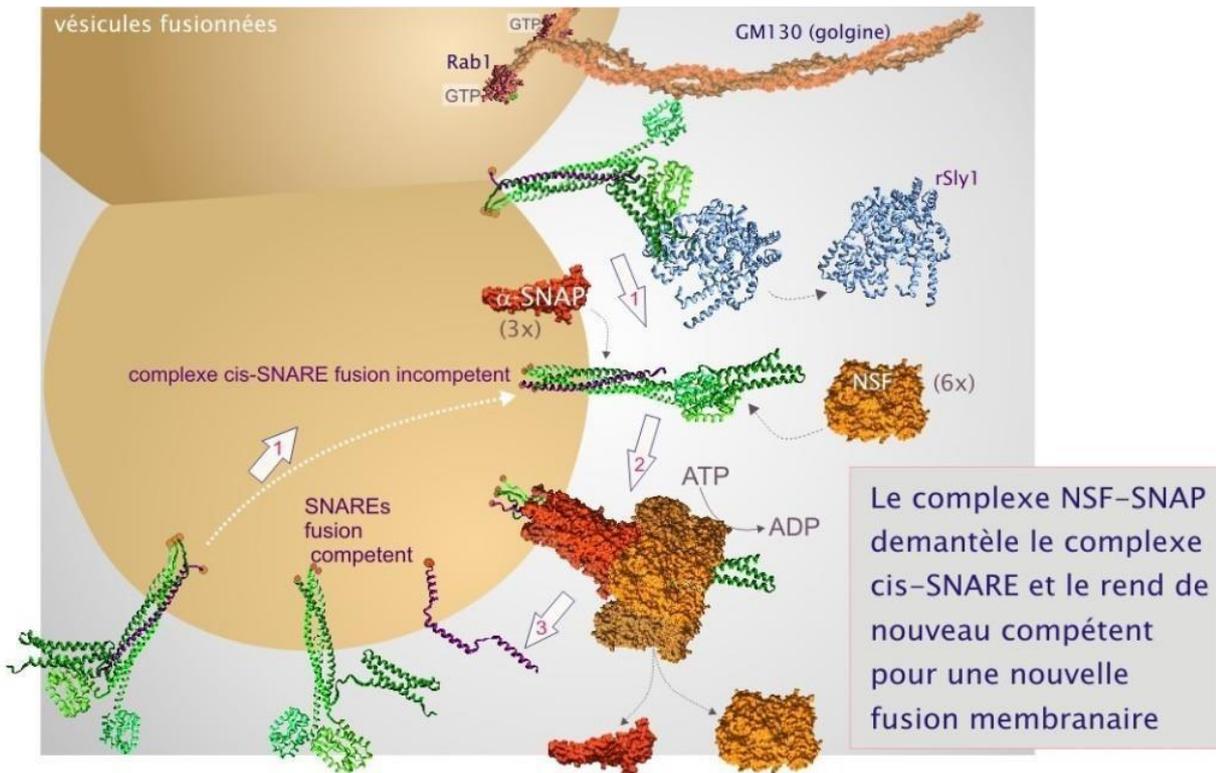


Fig 7. Le complexe NSF /alpha-SNAP demantèle le complexe coiled-coil de quatre SNAREs

#### I.3.1.4.1 Exemple du cycle de fusion des vésicules synaptiques.

L'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique peut dépendre du complexe de protéines exocystes (étape 1). Lors de l'amorçage, Munc18 se dissocie de la syntaxine-1, permettant à cette dernière d'interagir avec Munc13 et de prendre une conformation propice à la fusion (étape 2). Rab3 et Rim jouent également un rôle à cette étape. La syntaxine ainsi activée se lie à ses partenaires SNAP-25 et synaptobrevine pour former un complexe SNARE, qui reste dans un état d'assemblage incomplet (étape 3 : assemblage du complexe).

Suite à une stimulation, l'entrée de calcium active la synaptotagmine, laquelle se fixe au complexe SNARE et à la membrane plasmique, facilitant la fusion des membranes et la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (étape 4). Le complexe SNARE, désormais présent en cis sur la membrane plasmique, devient alors le site de fixation des protéines NSF et SNAP. Ces protéines, après hydrolyse des molécules d'ATP, dissocient le complexe SNARE, rendant chaque partenaire à nouveau disponible (étape 5). Enfin, le mécanisme d'endocytose recycle les vésicules synaptiques et leurs composants membranaires (étape 6). Après ce recyclage, les vésicules subissent une maturation qui leur permet d'être rechargées en neurotransmetteurs, prêtes ainsi pour un nouveau cycle de fusion.

Un processus similaire est probablement appliqué à d'autres types de fusion membranaire. Les

protéines actives sont représentées par un contour plein, tandis que celles inactivées sont en pointillé.

L'arrimage des vésicules, une étape préalable à la fusion membranaire, implique la fixation des vésicules à leur membrane cible (figure 8). Il est peu probable que les protéines SNARE jouent un rôle significatif dans cette phase précoce. D'autres protéines, appelées facteurs d'arrimage (ou tethering factors), sont impliquées. Par exemple, le complexe protéique exocyste (composé de Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10, Sec15p, Exo70p, Exo84p) est essentiel pour l'arrimage des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique chez la levure, en marquant des domaines spécifiques de cette membrane. L'importance de ce complexe est soulignée par les déficits de la voie de sécrétion observés lors de mutations.

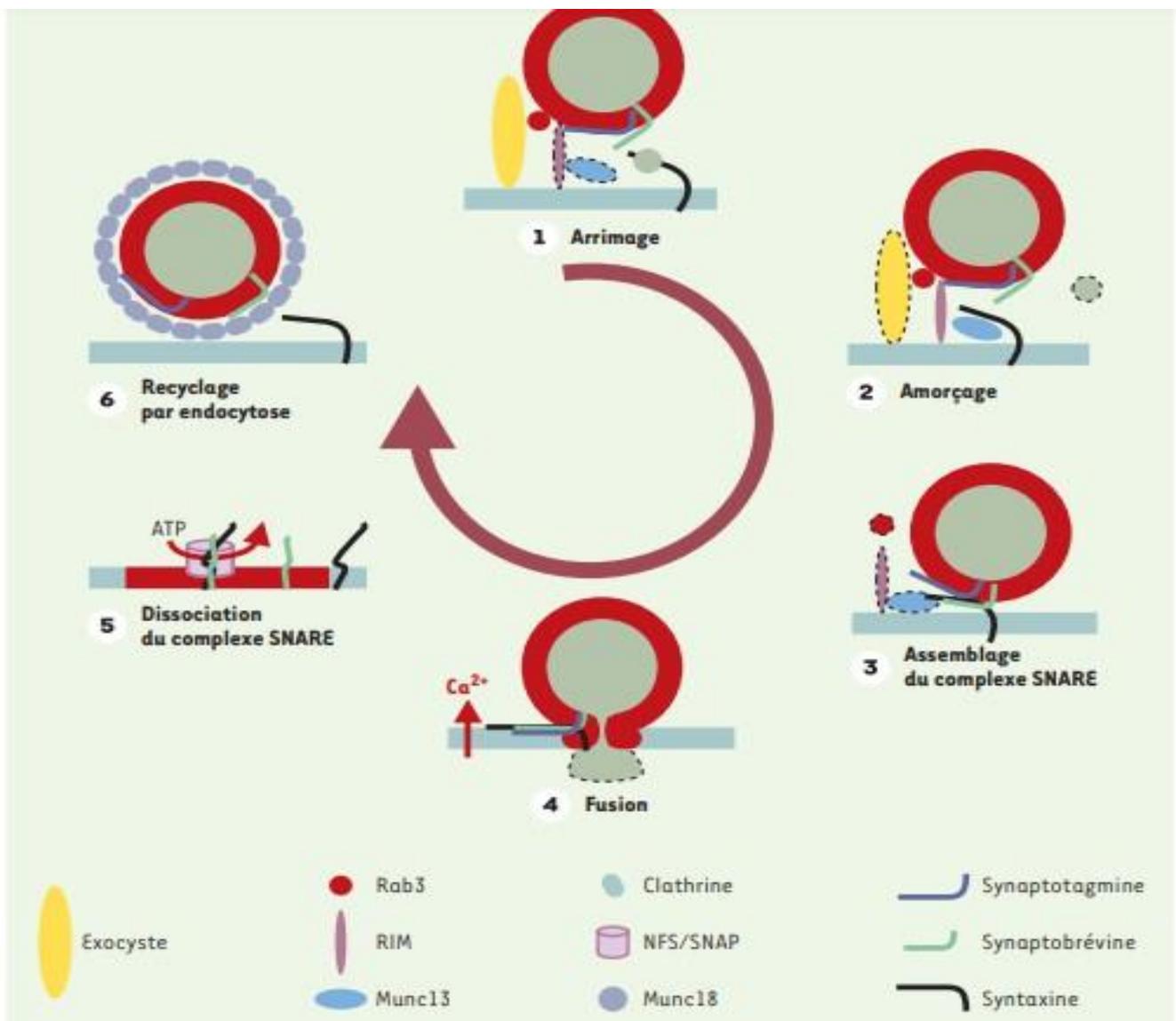


Fig 8. Modèle du cycle de fusion des vésicules synaptiques.

### I.3.1.5 La régulation de la fusion membranaire

La fusion membranaire est un processus hautement régulé. Pour l'exocytose, qui entraîne la libération de neurotransmetteurs ou d'hormones, la fusion est déclenchée par une élévation de la concentration intracellulaire en calcium. La synaptotagmine, une protéine membranaire des vésicules synaptiques, joue un rôle clé en tant que capteur de calcium. La synaptotagmine possède deux domaines C2, homologues au domaine C2 de la protéine kinase C. L'augmentation du calcium stimule l'interaction de la synaptotagmine avec le complexe SNARE, les phospholipides, et les canaux dépendants du calcium, tout en réduisant son affinité pour SV2, une autre protéine des vésicules synaptiques. La sensibilité de la libération des neurotransmetteurs au calcium est directement liée à l'affinité de la synaptotagmine pour cet ion. Ces données suggèrent que la synaptotagmine est essentielle pour la dépendance au calcium de la libération des neurotransmetteurs. Elle pourrait, avant l'entrée du calcium, bloquer la fusion en maintenant le complexe SNARE partiellement assemblé ; après l'entrée du calcium, elle se lierait au complexe SNARE pour permettre la fusion (figure 9).

### I.3.1.6 Le recyclage des SNARE

Une fois que le complexe SNARE a rempli sa fonction, il doit être démantelé pour permettre son recyclage. Ce processus se déroule en plusieurs étapes.

### I.3.1.7 Dissociation du complexe SNARE

La protéine NSF, initialement isolée comme un facteur crucial pour la fusion membranaire, est maintenant reconnue comme jouant un rôle dans la dissociation des complexes SNARE, plutôt que dans la fusion elle-même. Dans les modèles *in vitro* de fusion des vacuoles de levure, la dissociation des complexes SNARE est une étape précoce essentielle.

Chaque vacuole possède des v-SNARE et t-SNARE qui s'associent en complexes en cis. La fusion des vacuoles, appelée homotypique, se fait entre deux organites de composition identique. NSF et les protéines SNAP agissent pour dissocier ces complexes SNARE en cis, permettant ainsi aux v-SNARE et t-SNARE de se reformer en trans et d'induire la fusion des vacuoles.

Dans la terminaison nerveuse, NSF et SNAP dissocient le complexe SNARE formé lors de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Le complexe SNARE, initialement formé en trans, devient un complexe en cis. La dissociation par NSF et SNAP libère la synaptobrevine de son interaction avec la syntaxine et SNAP-25, facilitant ainsi son recyclage (figure 9).

### I.3.1.8 Retour des v-SNARE vers le compartiment donneur

Après dissociation du complexe SNARE, les v-SNARE sont renvoyées vers leur compartiment donneur d'origine. Dans la synapse, la synaptobrevine est recyclée par endocytose, de manière dépendante du calcium, dans de nouvelles vésicules synaptiques prêtes pour les prochaines vagues de libération des neurotransmetteurs (figure 9). Ce recyclage perpétuel des protéines SNARE maintient l'homéostasie cellulaire et assure la spécificité de localisation décrite précédemment.

### I.3.2 Infection viral

Le cycle d'infection d'une cellule par un virus se compose de trois grandes étapes : l'attachement, la pénétration, et la décapsidation, qui permettent l'internalisation du génome viral dans la cellule cible. Ensuite, l'expression des gènes viraux et la réplication assurent la synthèse des protéines virales et la multiplication du génome viral. Enfin, l'assemblage et la sortie conduisent à la production et la libération de particules virales infectieuses, prêtes à infecter d'autres cellules.

Au début de l'infection, le virus rencontre la cellule cible (adsorption). Le virus se fixe à la cellule par la reconnaissance d'un récepteur spécifique, généralement une protéine de surface de la cellule cible. Ce récepteur est souvent spécifique à certains types de cellules ou tissus, ce qui détermine le tropisme du virus. Pour les virus enveloppés, la reconnaissance du récepteur cellulaire se fait via les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Pour les virus nus, cela se fait par les protéines de la capsid.

#### I.3.2.1 Exemple de Infection viral le cycle du VIH

Le VIH, présent dans le sang, se fixe aux cellules spécifiques du système immunitaire, comme les lymphocytes TCD4 (qui portent la protéine CD4). La fixation du virus se fait grâce à la reconnaissance entre la protéine virale gp120 et la protéine CD4 du lymphocyte, ainsi que d'autres co-récepteurs. Après cette fixation, le matériel génétique du VIH entre dans le lymphocyte (figure 9).

Le cycle du VIH commence par l'attachement, où le virus se fixe sur le lymphocyte T CD4 via la gp120 et le CD4 (et un co-récepteur). Les membranes du virus et du lymphocyte fusionnent, permettant à la nucléocapside (les deux capsides et le matériel génétique) de pénétrer dans le cytoplasme. Les capsides se dissocient, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme. La transcriptase inverse virale rétrotranscrit cet ARN en ADN double brin, qui pénètre ensuite dans le noyau et s'intègre au génome du lymphocyte. L'ADN viral est transcrit en ARN par l'ARN polymérase de la cellule.

Les ARN messagers viraux sont traduits en précurseurs protéiques, qui sont ensuite clivés par

des protéases pour former les protéines virales. Les protéines virales et l'ARN sont assemblés pour reformer des virions, sans la membrane. Les protéines virales membranaires sont intégrées dans la membrane du lymphocyte, et les nouveaux virions bourgeonnent, emportant un fragment de la membrane plasmique du lymphocyte. Ces nouveaux virions sont libérés dans le milieu intérieur et peuvent infecter d'autres lymphocytes T CD4 (figure 10).

Le VIH peut infecter divers types cellulaires, mais ici, nous nous concentrons sur les lymphocytes T CD4. Une fois dans le cytoplasme, l'ARN du virus est rétrotranscrit en ADN complémentaire double brin, intégré au génome de la cellule hôte. L'expression des gènes viraux permet la fabrication de nouvelles protéines virales. Ces protéines, associées à l'ARN viral, forment de nouveaux virions qui bourgeonnent de la cellule en s'entourant d'une membrane dérivée de la cellule infectée. Les nouveaux virions sont ainsi libérés dans le sang, prêts à infecter d'autres cellules. L'expression du génome viral se fait grâce à la machinerie de transcription et de traduction de la cellule hôte.

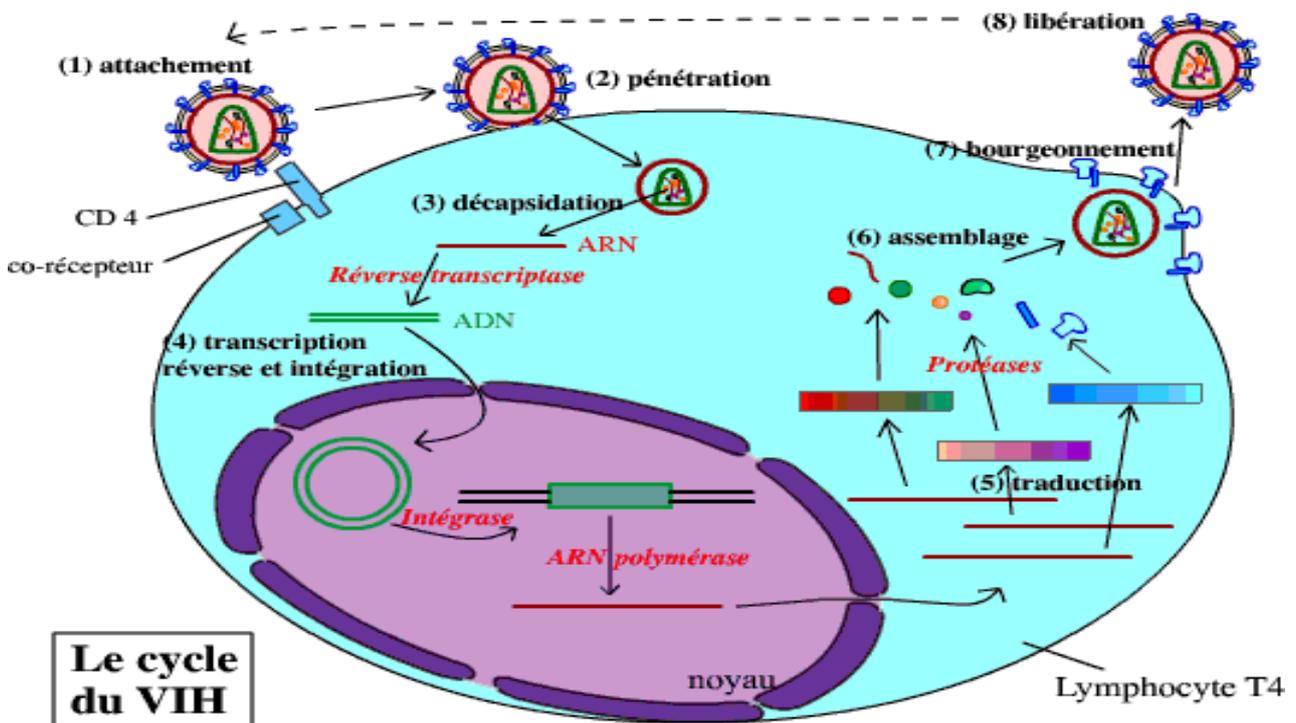


Fig 9. Le cycle du VIH.

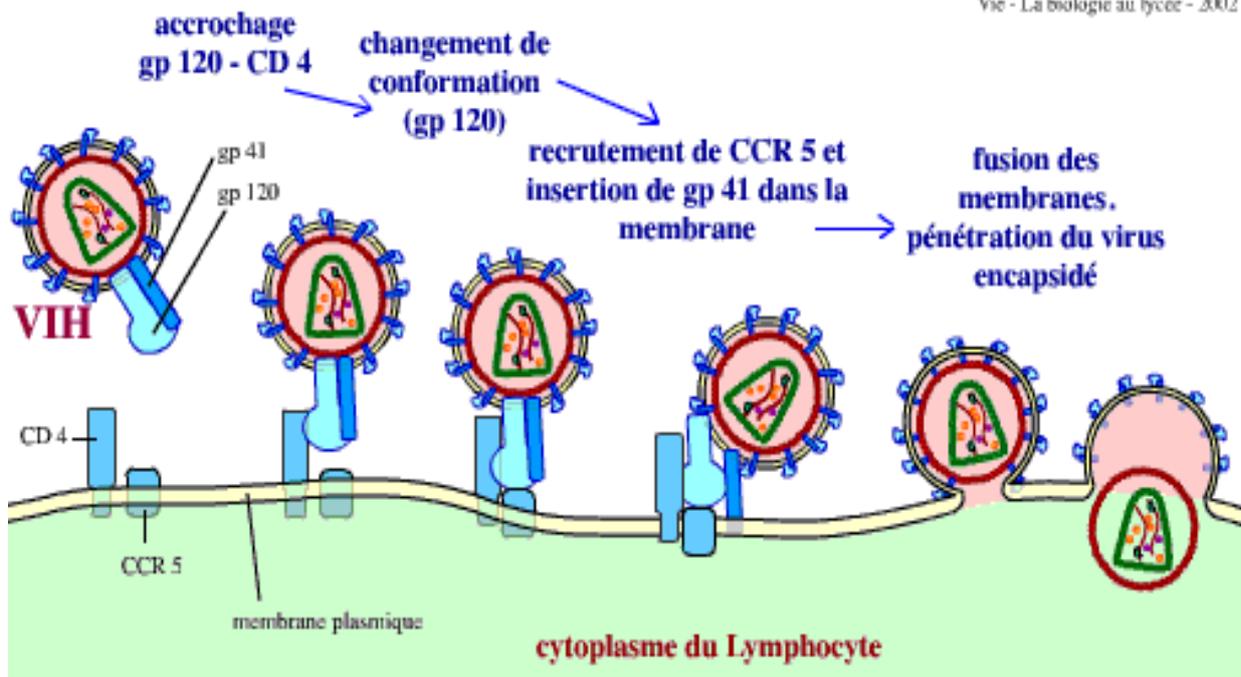


Fig 10. Les étapes de l'entrée du VIH dans le lymphocyte

## I.4 Trafic vésiculaire intracellulaire

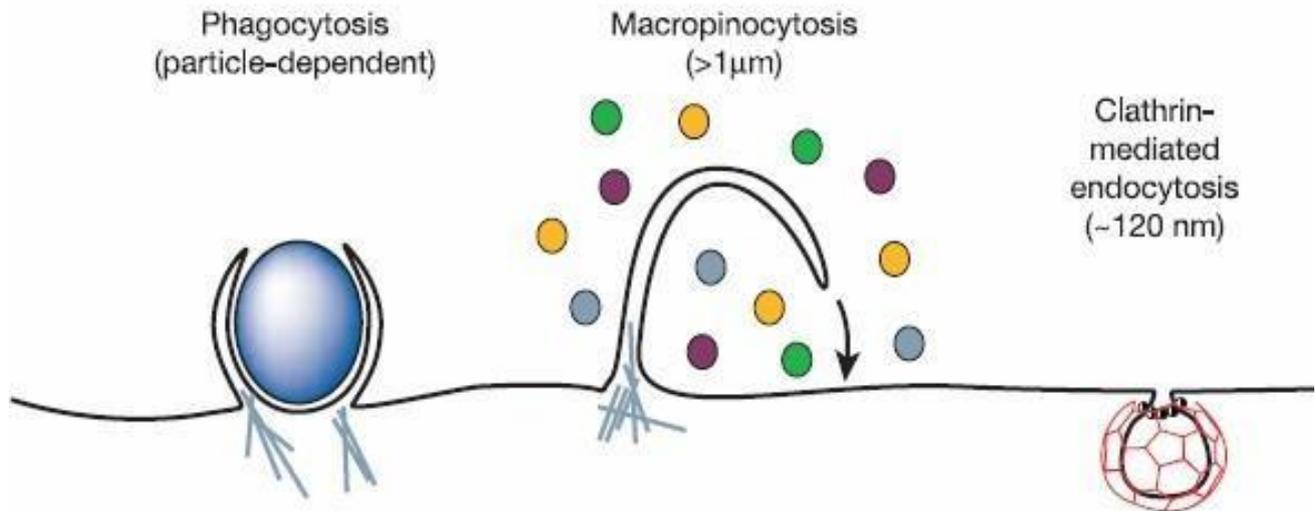
Le transport intracellulaire des macromolécules, des organelles et des vésicules est un processus complexe qui régle de nombreuses réactions biochimiques, ainsi que la croissance et le fonctionnement des cellules vivantes. Ce transport implique une combinaison de diffusion thermique passive dans un cytoplasme dense et encombré, ainsi que de transport actif assuré par des protéines motrices associées aux microtubules.

### I.4.1 Recyclage d'antigènes

Les cellules dendritiques (DC) sont spécialisées dans la présentation des antigènes et utilisent diverses stratégies pour capturer ces antigènes par endocytose. Il existe trois mécanismes principaux d'endocytose pour la capture des antigènes, qui varient selon la taille des particules à ingérer et la présence ou non d'un récepteur de surface :

1. **Phagocytose** : Ce mécanisme est utilisé pour ingérer des particules de grande taille, telles que des pathogènes ou des débris cellulaires.
2. **Macropinocytose** : Ce processus capture de grandes quantités de liquide extracellulaire et de particules dissoutes à l'aide de formations de membrane en forme de bulbe.

3. **Endocytose médiée par la clathrine** : Ce mécanisme implique la formation de vésicules recouvertes de clathrine, qui permettent la capture de petites particules et de récepteurs spécifiques à la surface de la cellule (figure 11).



**Fig 11.** Les différentes voies d'endocytose de la cellule dendritique. Les voies d'endocytose diffèrent en fonction de la taille de la particule à internaliser, de la reconnaissance par un récepteur cellulaire et du mécanisme de formation de la vésicule.

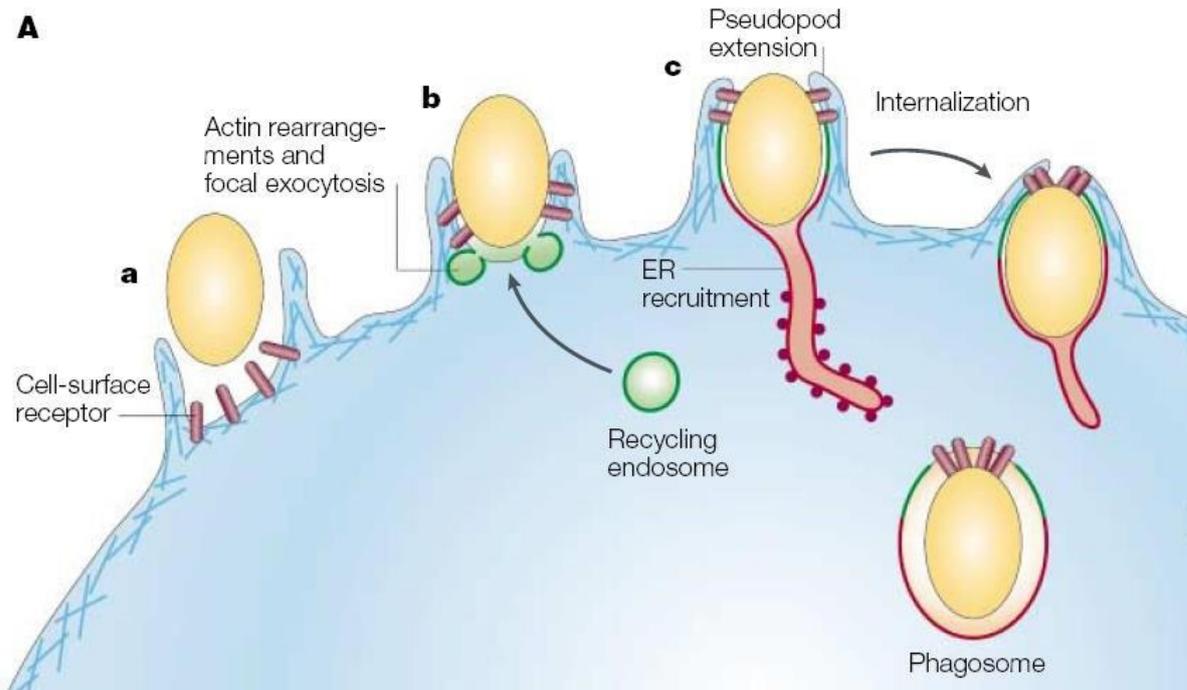
### I.4.2 Phagocytose

La phagocytose est le processus par lequel les cellules internalisent des particules de grande taille, telles que les bactéries, les levures, les débris cellulaires ou les cellules mortes. Chez les mammifères, ce processus est principalement effectué par les polynucléaires, les macrophages et les cellules dendritiques. Dans un premier temps, la particule se fixe à son récepteur spécifique à la surface de la cellule (figure 12).

Actuellement, une douzaine de récepteurs impliqués dans la phagocytose sont identifiés, y compris les récepteurs FcR, MR, CR, les récepteurs scavenger, et les intégrines. L'activation de ces récepteurs déclenche une série de signaux qui induisent un remodelage important de la membrane cellulaire au site d'internalisation. L'actine est réorganisée, formant des excroissances de membrane qui enveloppent la particule et permettent son ingestion.

Des recherches menées par Werb et Cohn ont montré que la membrane nécessaire pour l'ingestion de particules pouvait dépasser la surface de la cellule phagocytaire elle-même. En effet, les macrophages peuvent englober des billes de latex plus grandes qu'eux, suggérant que la membrane plasmique seule ne suffirait pas pour former les phagosomes. De plus, les travaux de Holevinsky et Nelson ont révélé que la surface cellulaire augmente au cours de la phagocytose, ce qui est dû au

recrutement d'endomembranes. Ce phénomène, appelé exocytose focale, implique l'utilisation d'endosomes recyclés, tardifs ou de lysosomes. D'autres études ont également suggéré une participation probable du réticulum endoplasmique (RE) dans la formation des phagosomes (figure 12).



**Fig 12.** La phagocytose. (a) La phagocytose d'une particule (matériel inerte, micro-organismes, cellules mortes) est initiée par la reconnaissance par un récepteur cellulaire. (b) La liaison des récepteurs induit la réorganisation du cytosquelette, et ainsi l'allongement des pseudopodes de la cellule de part et d'autre de la particule. Des endomembranes (endosomes, RE) participent à la formation du phagosome. (c) Les pseudopodes se referment et la particule est endocytée.

### I.4.3 Macropinocytose Constitutive

La macropinocytose est un processus d'endocytose qui ne nécessite pas de récepteurs spécifiques de surface et permet l'internalisation de molécules de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$ . Les cellules dendritiques forment de grandes vésicules hétérogènes, appelées macropinosomes, par évagination de la membrane plasmique. Ce processus permet à la cellule de prélever un échantillon des solutés présents dans le milieu extracellulaire.

Le processus débute par la formation d'une protubérance de la membrane plasmique grâce aux filaments d'actine, qui se referme pour former un macropinosome. Ce phénomène dépend de la PI3K.

Les macropinosomes fusionnent ensuite avec plusieurs renflements voisins pour former un macropinosome mature, qui rétrécit en expulsant l'eau par des aquaporines et se déplace vers la région périnucléaire. À ce stade, plusieurs voies sont possibles :

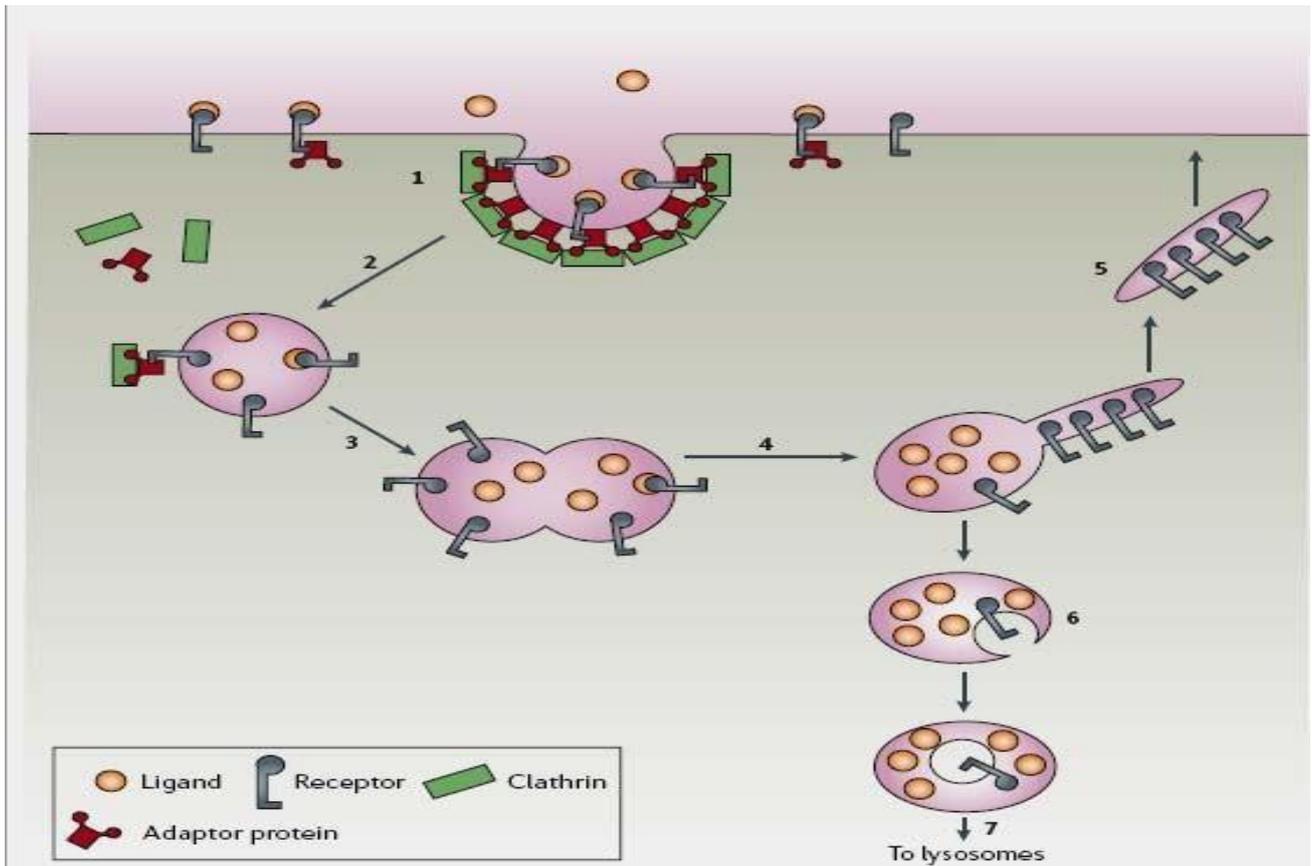
1. Les macropinosomes peuvent être recyclés vers la surface cellulaire, libérant leur contenu dans le milieu extracellulaire.
2. Ils peuvent fusionner avec des endosomes et rejoindre des compartiments riches en molécules du CMH de classe II.
3. Leur contenu peut être libéré directement dans le cytosol où il sera dégradé par le protéasome, avec les peptides résultants rejoignant le réticulum endoplasmique pour s'associer aux molécules du CMH de classe I.

### **I.4.4 Endocytose dépendante de la clathrine**

L'endocytose dépendante de la clathrine implique des récepteurs spécifiques de surface et permet l'internalisation de molécules de moins de 150 nm. Les récepteurs spécifiques se concentrent dans des zones de la membrane et se lient à leur ligand dans des cavités recouvertes de clathrine, une protéine cytosolique formant des trimères (triskelons) (figure 13). La cavité s'élargit et se referme pour former une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine.

Ces vésicules fusionnent pour former des endosomes précoces, dont l'acidification entraîne la libération du ligand, qui peut ensuite être dégradé après fusion de l'endosome avec le lysosome. Parmi les récepteurs spécifiques, on trouve les lectines et le récepteur au mannose. Après endocytose, le MR libère son ligand sous l'effet de l'acidification, dirigeant ce dernier vers des vésicules riches en molécules du CMH de classe II, et jouant un rôle dans la cross-présentation.

Ce mécanisme d'endocytose est également exploité par certains virus, comme le virus de la grippe (Influenza), qui détourne ce processus pour pénétrer et infecter les cellules.



**Fig 13.** Endocytose dépendante de la clathrine. (1) Les ligands lient les récepteurs cellulaires qui sont concentrés dans de petits domaines membranaires, grâce à l'association de leur queue cytoplasmique avec des protéines endocytiques qui constituent un réseau. Ces protéines adaptatrices sont liées à la clathrine. (2) Après internalisation, la clathrine se sépare et (3) la vésicule fusionne avec d'autres vésicules endocytées pour former des endosomes précoces. (4) Une partie des récepteurs sont séparés et (5) recyclés vers la membrane cellulaire. (6, 7) Les ligands sont dirigés vers les lysosomes.

### I.4.5 Autophagie

La macroautophagie, ou autophagie, est un processus cellulaire crucial pour la maintenance et le renouvellement du cytoplasme. Ce mécanisme permet aux cellules de digérer des portions de leur cytoplasme en les enfermant dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome. Le contenu de l'autophagosome, comprenant des fragments de cytosol et des organelles, est ensuite livré aux lysosomes pour être dégradé.

En plus de son rôle dans la régulation cellulaire, l'autophagie est également impliquée dans l'immunité innée en éliminant des bactéries intracellulaires et des virus. Elle influence la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II et est régulée par des cytokines, ce qui étend son rôle à l'immunité adaptative. Le terme « immunophagie » est utilisé pour décrire les fonctions spécialisées de l'autophagie dans le système immunitaire. L'autophagie est également impliquée dans la reconnaissance de certains virus et l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) via les récepteurs Toll-like (TLR).

### I.4.6 Maturation cellulaire

Les cellules dendritiques résidant dans les tissus sont souvent immatures et présentent une morphologie variée, incluant parfois des dendrites (prolongements cytoplasmiques). Elles jouent un rôle essentiel dans la présentation des antigènes et l'activation de l'immunité adaptative. En tant que cellules présentatrices d'antigènes du système phagocytaire mononucléaire, les cellules dendritiques remplissent deux fonctions principales:

1. **Capture de l'antigène** : Elles internalisent les antigènes par divers mécanismes comme la phagocytose ou la macropinocytose.
2. **Présentation aux lymphocytes T naïfs** : Elles présentent les antigènes capturés aux lymphocytes T pour initier une réponse immunitaire.

### I.4.7 Activation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont cruciales pour l'initiation des réponses immunitaires adaptatives et l'induction de la tolérance périphérique. Elles capturent les antigènes et les présentent aux lymphocytes T naïfs, tout en intégrant des signaux périphériques qui orientent les lymphocytes T vers des états de différenciation spécifiques (Th1, Th2, T régulateur, etc.).

### I.4.8 Signaux inducteurs de la maturation et capture de l'antigène

Les cellules dendritiques immatures détectent les signaux inflammatoires et les motifs moléculaires associés aux pathogènes via des récepteurs de reconnaissance de motifs, tels que les récepteurs de type Toll. La réception de ces signaux de maturation provoque une augmentation temporaire de l'activité phagocytaire, permettant l'internalisation et la dégradation des antigènes. Ces antigènes sont ensuite présentés sous forme de peptides sur les molécules du CMH. Les différentes sous-populations de cellules dendritiques possèdent des récepteurs variés, ce qui leur permet de répondre à différents types de signaux.

#### I.4.8.1 Maturation des cellules dendritiques

Après la capture d'antigènes, les cellules dendritiques subissent une maturation caractérisée par plusieurs changements :

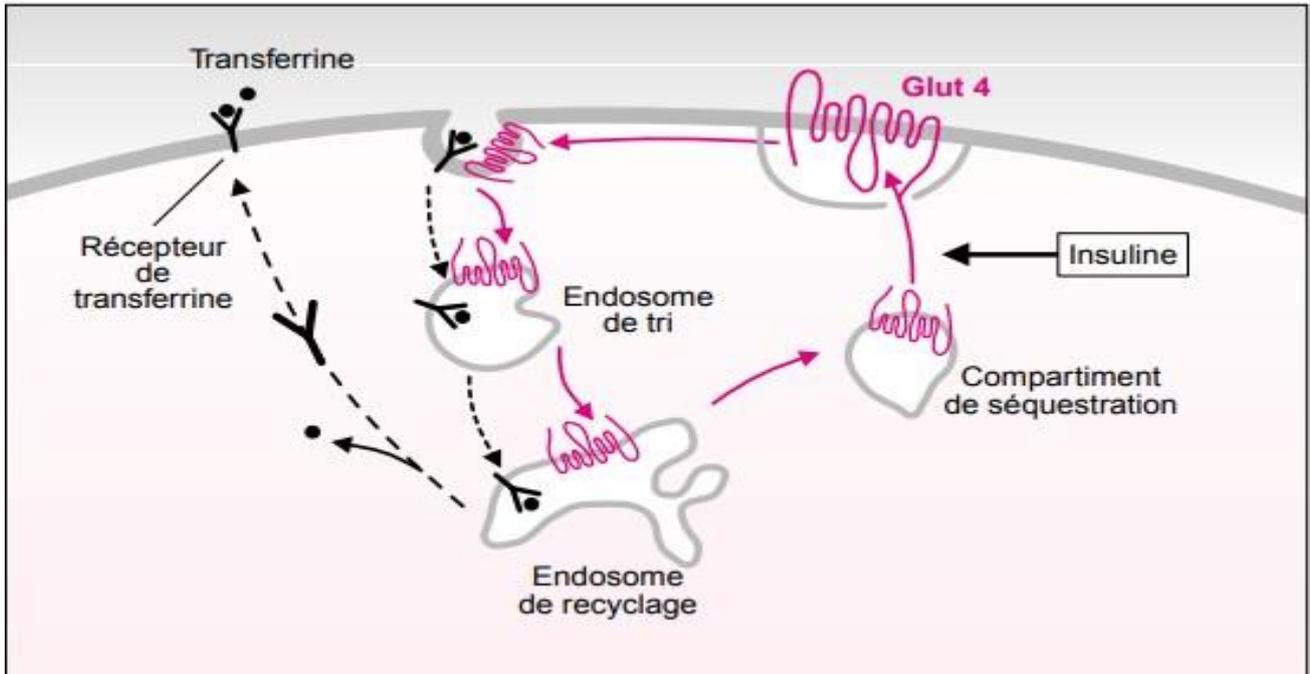
- **Changement de morphologie** : Réorganisation du cytosquelette, permettant la motilité accrue et une interaction plus efficace avec les lymphocytes.
- **Perte de capacité phagocytaire** : Diminution de l'expression des molécules impliquées dans la phagocytose.
- **Augmentation de la présentation antigénique** : Augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40), ainsi que sécrétion de cytokines.
- **Acquisition de capacités migratoires** : Modification de l'expression des récepteurs de chimiokines, comme le récepteur CCR7, permettant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

### I.5 Recyclage de récepteurs, désensibilisation et régulation de la réponse cellulaire

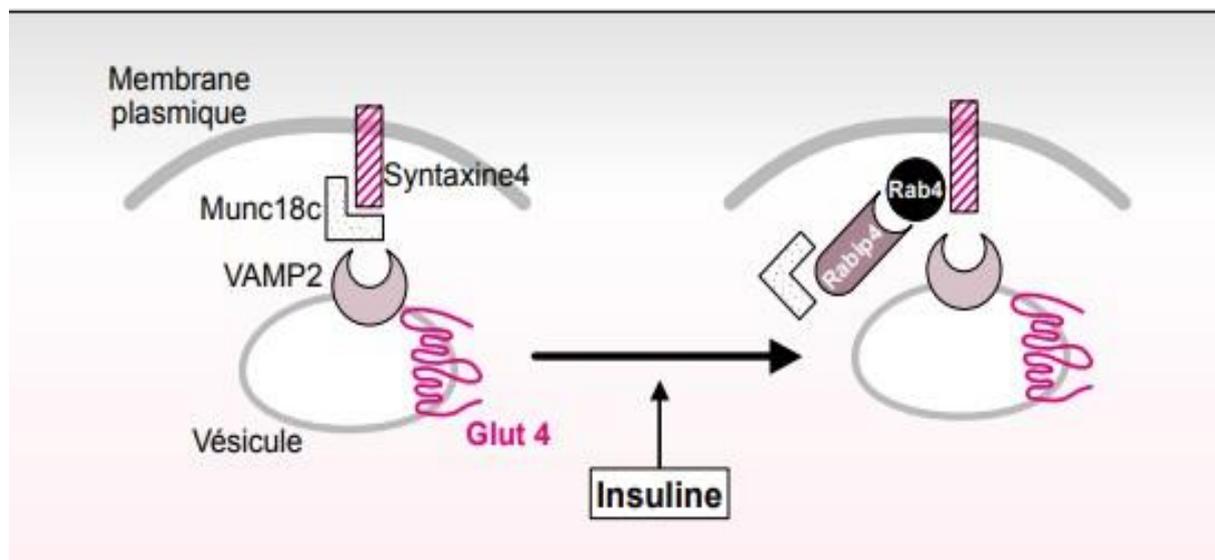
#### ❖ Recyclage de récepteurs

La quantité de récepteurs à la surface cellulaire est régulée par un équilibre dynamique entre la synthèse, le transport vers la membrane plasmique, l'internalisation, le recyclage, et la dégradation des récepteurs. Par exemple, le récepteur GLUT4 pour le glucose est stocké dans des vésicules intracellulaires en l'absence d'insuline. L'insuline stimule la translocation de ces vésicules vers la membrane plasmique, facilitant l'entrée du glucose dans la cellule. GLUT4 est ensuite internalisé par des vésicules recouvertes de clathrine dans le compartiment endosomal et est dirigé vers son compartiment de séquestration pour un recyclage ultérieur. La petite GTPase Rab joue un rôle clé

dans ces mouvements vésiculaires, en association avec les endosomes précoces et les vésicules de séquestration (figure14 et 15).



**Fig 14.** Représentation schématique du trafic intracellulaire de Glut4 Le transporteur de glucose Glut4 est recyclé par les endosomes de tri et de recyclage avant d'être dirigé vers un compartiment de séquestration qui n'existe pas, par exemple, pour la transferrine. C'est à partir de ce compartiment de séquestration que l'insuline recrute Glut4 pour provoquer sa translocation vers la membrane plasmique.



**Fig 15.** Mécanismes de translocation de Glut 4. À l'état basal, Munc18c interagit avec la Syntaxine 4, empêchant son interaction avec VAMP2 (Vesicle-associated membrane protein 2). En présence d'insuline, Munc18c se dissocie de la Syntaxine 4 sous l'action de Rab4 et/ou Rabip4, permettant la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique.

### I.6 Vésiculation et sécrétion hormonale (insuline et neurotransmetteurs)

#### I.6.1 L'insuline

L'insuline est une hormone clé produite dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, qui représentent environ 75% de ces structures endocrines. Les cellules  $\alpha$  des îlots sécrètent le glucagon, tandis que les cellules  $\delta$  produisent la somatostatine.

L'insuline est synthétisée initialement sous forme de préproinsuline, une chaîne polypeptidique précurseur. La préproinsuline est ensuite convertie en proinsuline, qui est à son tour transformée en insuline mature et en peptide C par l'action des protéases appelées furines. L'insuline mature est associée à deux atomes de zinc et stockée dans des granules sous forme de polymères, probablement un hexamère.

##### I.6.1.1 Sécrétion

L'insuline, ainsi que le peptide C, est libérée par exocytose dans la veine pancréatico-duodénale, qui dirige l'hormone directement vers le foie. Environ 50% de l'insuline est conservée ou détruite par le foie, tandis que le reste est distribué dans le reste de l'organisme. La sécrétion d'insuline suit un rythme continu d'environ 40 unités par heure pendant le jeûne, avec des augmentations liées aux repas et des sécrétions pulsatives (figure 16).

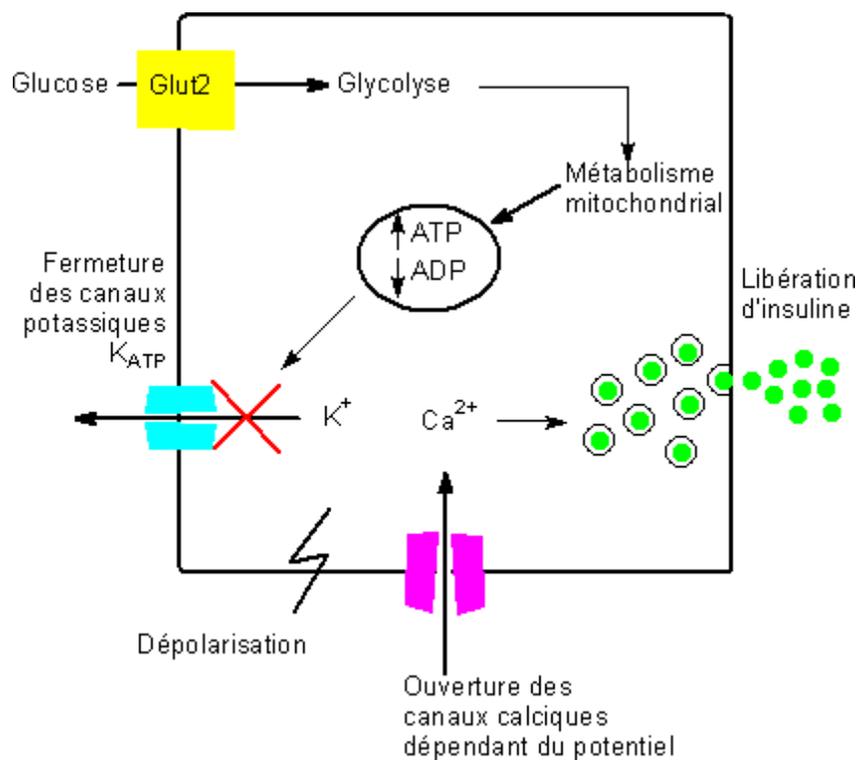
## Chapitre 1 : Topologies et dynamique membranaire

Le principal stimulant de la sécrétion d'insuline est le glucose. La réponse au glucose est biphasique : une phase immédiate de courte durée suivie d'une phase prolongée. Les canaux jonctionnels, permettant le passage d'ions, de métabolites et de messagers secondaires entre les cellules, jouent un rôle crucial dans la synchronisation de la sécrétion d'insuline.

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose implique plusieurs étapes :

1. **Pénétration du glucose dans les cellules  $\beta$**  : Le glucose entre dans les cellules  $\beta$  via les transporteurs GLUT2, de manière indépendante de l'insuline.
2. **Phosphorylation et métabolisation** : Le glucose est phosphorylé par une glucokinase présente dans les cellules  $\beta$ , puis métabolisé, ce qui augmente la concentration intracellulaire d'ATP.
3. **Réponse électrophysiologique** : L'augmentation de l'ATP entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants, réduisant la sortie de potassium et provoquant la dépolarisation de la membrane cellulaire.
4. **Activation des canaux calcium** : La dépolarisation ouvre les canaux calcium voltage-dépendants, permettant l'entrée de calcium dans la cellule.
5. **Sécrétion d'insuline** : L'entrée de calcium déclenche l'activation des phospholipases A2 et C, conduisant finalement à la sécrétion d'insuline.

Le traitement substitutif par insuline exogène vise à imiter la courbe de sécrétion physiologique pour réguler efficacement la glycémie chez les personnes diabétiques.



**Fig 16.** La stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose.

### I.6.1.2 Distribution

Après une injection intraveineuse, l'insuline a une demi-vie plasmatique d'environ six minutes, tant chez les individus sains que chez ceux atteints de diabète. Son volume de distribution correspond au volume du liquide extracellulaire, soit environ 20 % du poids corporel total. La forme monomère de l'insuline est principalement responsable de sa diffusion dans les tissus. L'insuline a également la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique grâce à des transporteurs spécifiques.

### I.6.1.3 Catabolisme

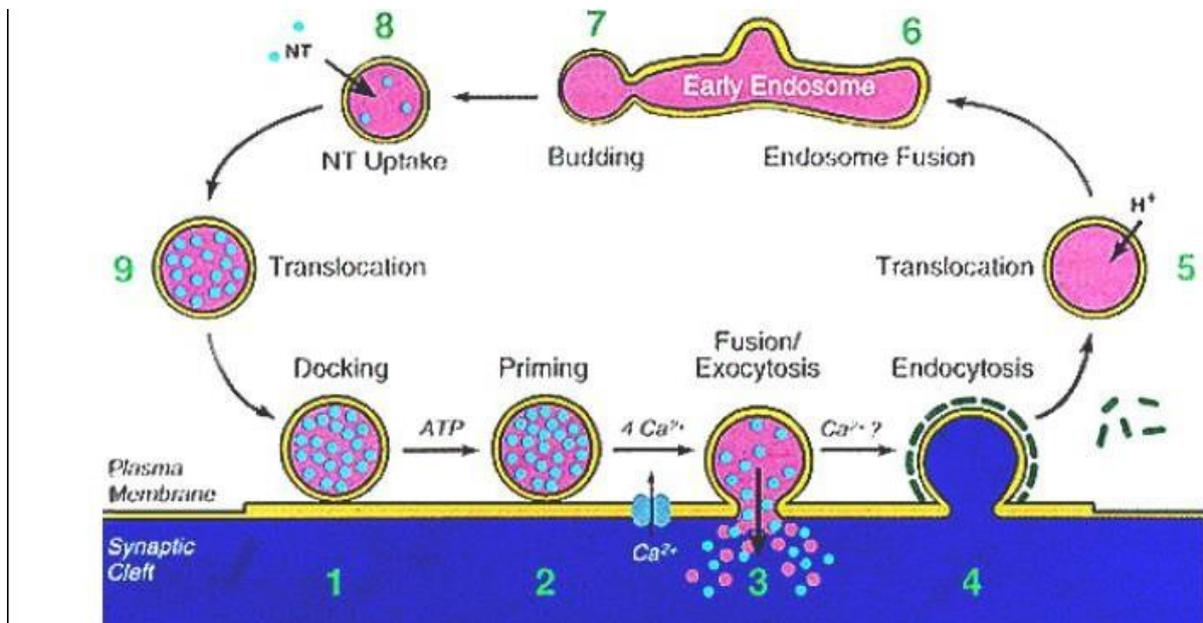
L'insuline est inactivée par des processus enzymatiques, incluant l'hydrolyse par des métalloprotéinases et la réduction des liaisons disulfure (S-S). L'élimination rénale de l'insuline est limitée car, après filtration, elle est généralement réabsorbée par le tubule rénal.

## I.6.2 Neurotransmetteurs

Les vésicules synaptiques (VS) jouent un rôle crucial dans la transmission synaptique, tout comme les granules sécrétoires (GS) le font pour la libération des hormones. Ces organites suivent un cycle complexe, impliquant leur formation, transport, fusion avec la membrane présynaptique, et recyclage. Ce cycle est probablement orchestré par une multitude de molécules spécialisées. Certaines de ces molécules sont directement intégrées dans les VS ou

## Chapitre 1 : Topologies et dynamique membranaire

les GS et exercent divers rôles à chaque étape du cycle, contribuant à la régulation de la transmission synaptique et de la sécrétion hormonale (figure 17).



**Fig 17.** Les étapes du cycle des VS à la terminaison synaptique. Les VS seraient formées à la présynapse par bourgeonnement depuis des endosomes précoces. Après remplissage en NT par l'activité de transporteurs vésiculaires ad hoc et translocation vers la membrane plasmique, les VS sont arrimées à celle-ci ("tethering" puis "docking"). Les VS doivent alors subir une maturation fonctionnelle nécessitant la présence de  $Ca^{2+}$  et d'ATP (amorçage, ou "priming") afin d'acquérir la compétence à la fusion. Lors de la fusion, déclenchée par un influx de  $Ca^{2+}$ , le contenu vésiculaire est déversé dans la fente synaptique, par fusion complète de la VS avec la membrane plasmique. Les composants de la VS (lipides, protéines) sont ensuite recyclés par la voie d'endocytose, aboutissant aux compartiments endosomaux.

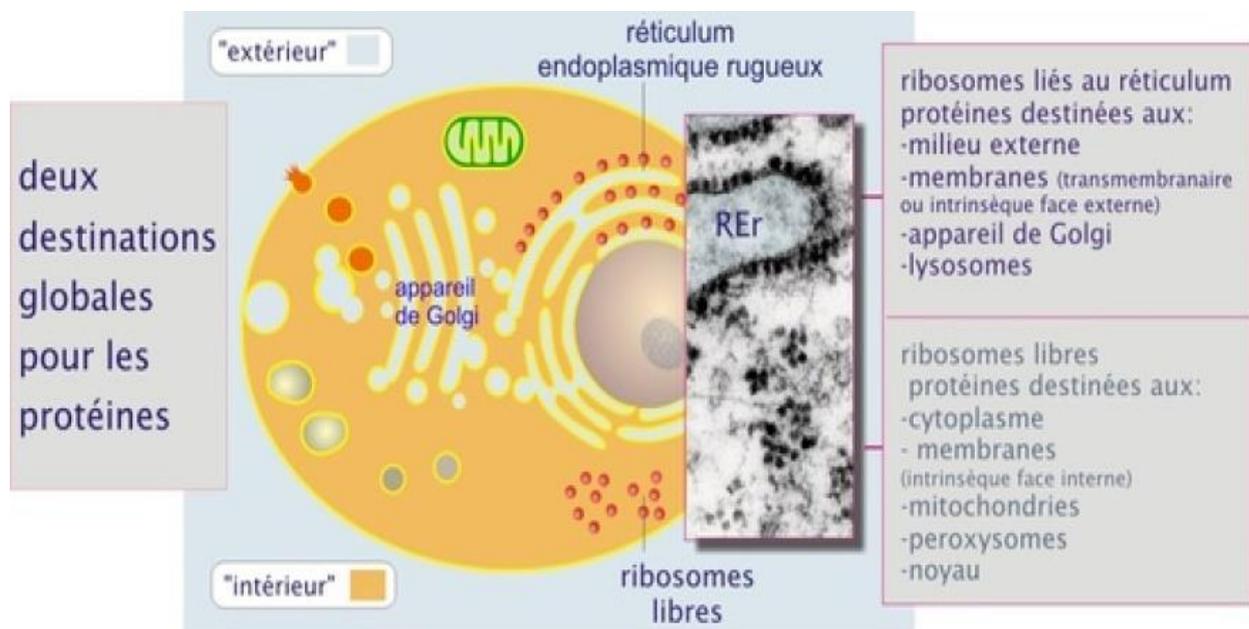
# Chapitre 2 : Protéines membranaires

## II. Protéines membranaires

Les protéines membranaires sont des protéines actives dans les membranes lipidiques qui enveloppent les cellules biologiques et leurs compartiments. En étant en contact à la fois avec l'intérieur et l'extérieur de ces compartiments, elles sont essentielles pour le transport et la signalisation cellulaires, après avoir subi une maturation cellulaire complexe.

### II.1 Maturation des protéines et importance fonctionnelle

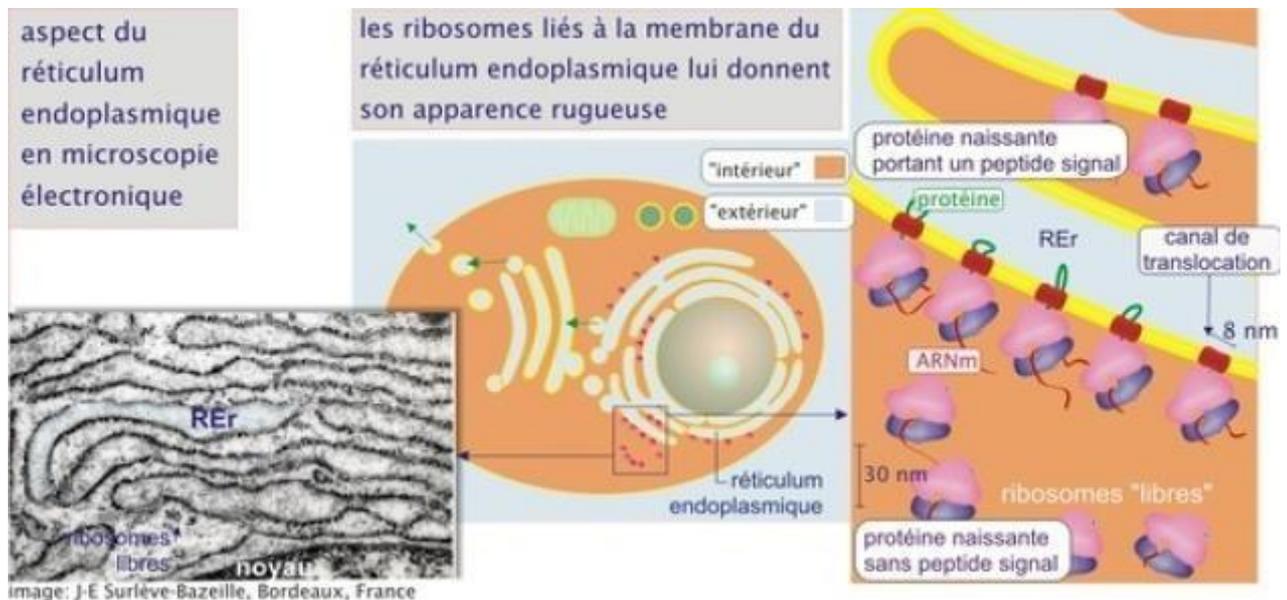
Les protéines synthétisées par les ribosomes doivent se diriger vers divers sites au sein de la cellule et son environnement. Un système de tri et de transport est donc nécessaire pour s'assurer que ces nouvelles protéines atteignent leur destination correcte. Leur contenu peut ainsi être assimilé au milieu extracellulaire (figure 18). Lors du processus de protéosynthèse, un premier tri crucial se produit, déterminant quelles protéines traverseront la membrane du réticulum endoplasmique rugueux via le canal de translocation pour emprunter « la voie extracellulaire » et lesquelles resteront dans le cytoplasme. Un second tri affiné oriente ensuite les protéines vers leur destination spécifique, que ce soit un organe ou un compartiment cellulaire particulier.



**Fig 1.** Les compartiments cellulaires.

Les protéines se divisent en deux catégories selon la présence ou l'absence d'un peptide signal : celles destinées au cytosol et aux organites strictement intracellulaires tels que la mitochondrie, le noyau et le peroxysome, et celles destinées aux membranes et aux lumières du réticulum

endoplasmique rugueux, de l'appareil de Golgi, du lysosome, ainsi que des vésicules de sécrétion (figure 19).



**Fig 2.** Ribosomes libres ou liés au RE.

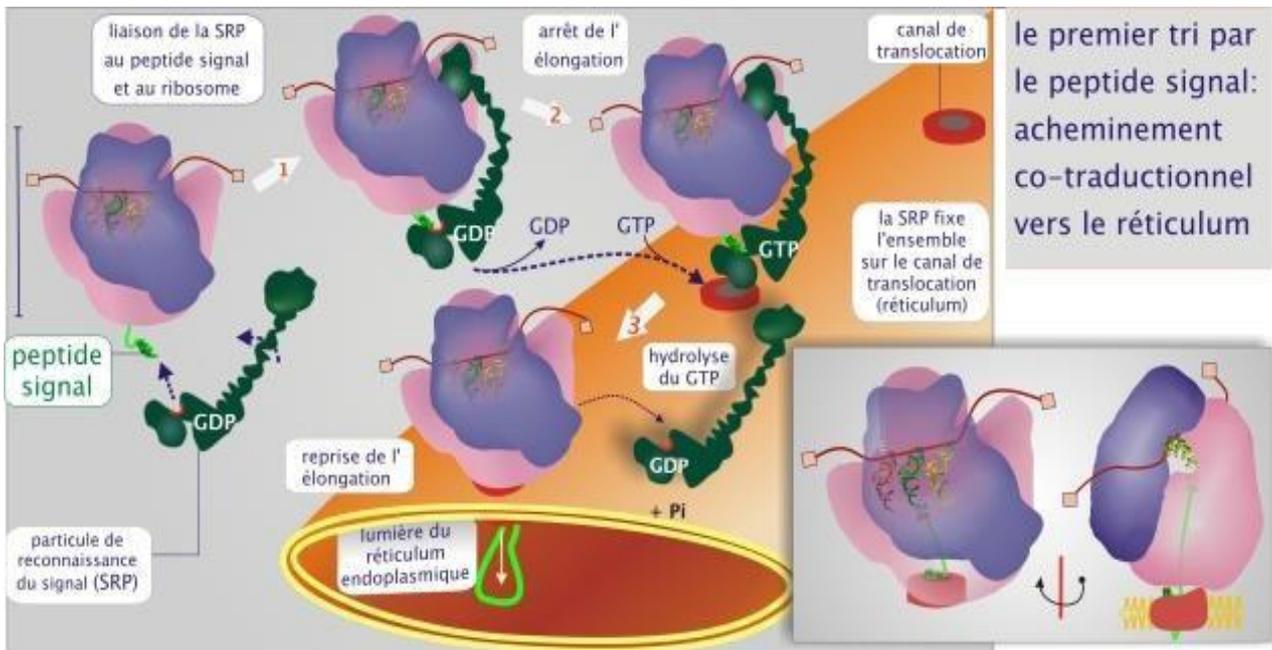
La destination d'une protéine est déterminée par sa propre nature, grâce à la présence de séquences peptidiques spécifiques, appelées étiquettes, dont la longueur varie de 3 à 30 acides aminés. Un premier étiquetage concerne la présence éventuelle d'une séquence linéaire hydrophobe en position N-terminale, qui permet à la protéine en cours de synthèse de s'ancrer au réticulum endoplasmique rugueux (REr) et la classe ainsi dans la catégorie 2 (figure 19). Les protéines dépourvues de cette séquence appartiennent à la catégorie 1. Cette étiquette N-terminale, responsable d'un tri appelé co-translationnel, est connue sous le nom de « peptide signal » (signal peptide ou Signal P).

Un second étiquetage, porte sur l'éventuelle présence d'autres séquences (non obligatoirement N-terminales, hydrophobes ou linéaires) qui serviront à déterminer, de plus en plus précisément, la place de la protéine en cours d'acheminement vers son site définitif. Cette étiquette responsable d'un tri qualifié de post-translationnel, est nommée « peptide de destination » (Target peptide ou Target P).

### II.1.1 Le peptide signal induit le passage vers le REr : acheminement co-translationnel

Le premier tri est effectué par un récepteur appelé « particule de reconnaissance du signal » (SRP), qui reconnaît le peptide signal. Cette SRP est composée de protéines, d'ARN, et de GTP. Elle se fixe à la fois au peptide signal (par liaison récepteur-ligand) et au ribosome d'où émerge le peptide signal (figure 20). Le complexe SRP/ribosome est ensuite recruté à la surface du réticulum

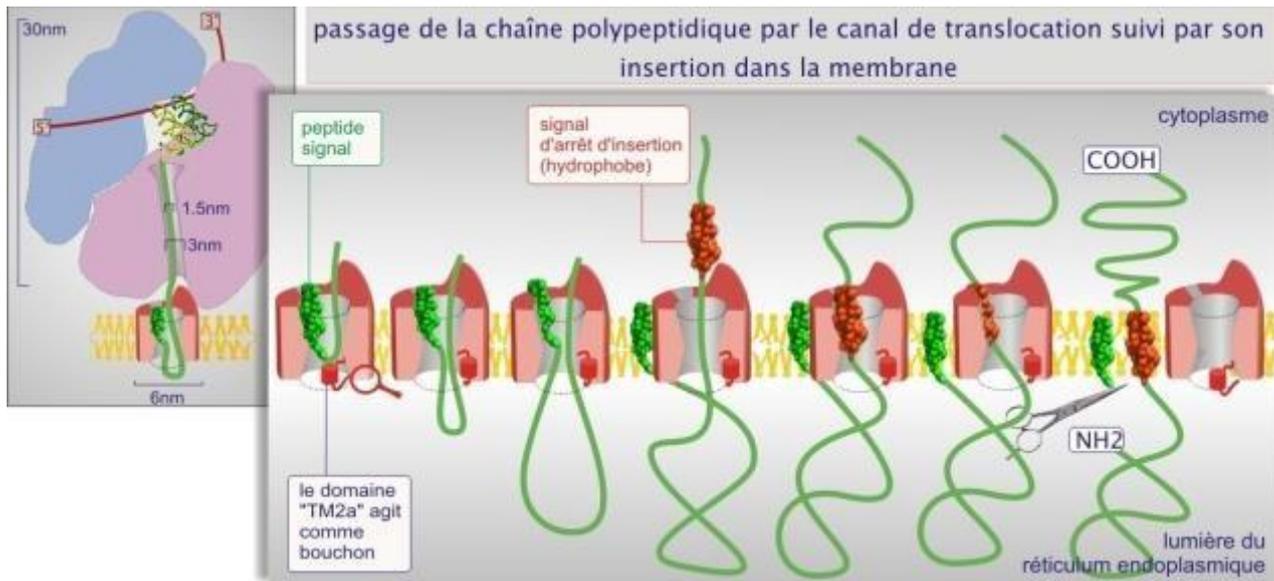
endoplasmique par un récepteur membranaire, le récepteur du SRP, qui est lui-même associé au canal de translocation (PCC). Durant cet événement, la synthèse de la protéine est temporairement suspendue car la SRP bloque l'accès aux facteurs d'élongation, EF-1 et EF-2, empêchant ainsi la libération de la protéine destinée au réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. Ce recrutement est suivi par l'hydrolyse du GTP en GDP et Pi, ce qui libère la particule SRP.



**Fig 3.** Le peptide signal, son récepteur SRP et la translocation vers le RER.

### II.1.2 La structure de la SRP et la fixation de la SRP sur le canal de translocation.

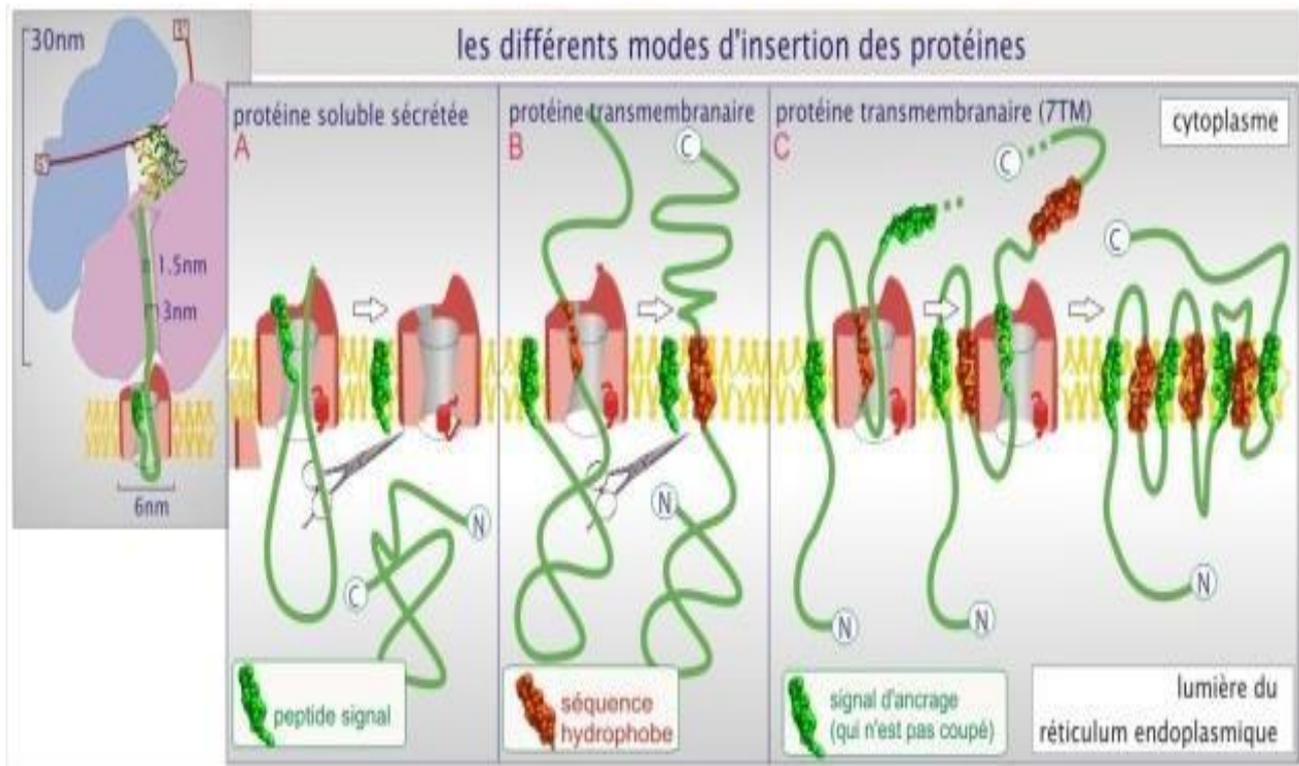
Le canal de translocation, composé de plusieurs protéines dont Sec61p, se lie ensuite au « peptide signal ». À mesure que la protéine se forme, elle traverse le canal pour être entièrement acheminée dans la lumière du réticulum (si elle est destinée à être sécrétée) ou pour être progressivement intégrée à la membrane (si elle est une protéine transmembranaire) (figures 21 et 22). La nature hydrophobe du peptide signal, en forme d'hélice, favorise également son interaction avec les phospholipides de la membrane.



**Fig 21.** Le canal de translocation du RER.

Pendant la translocation, le canal de translocation, qui forme un pore d'environ 4 nm de diamètre, empêche le passage des solutés. Une fois la translocation terminée, le canal se ferme. Lors de la synthèse des protéines sécrétoires destinées à la lumière du réticulum endoplasmique rugueux, du Golgi ou du lysosome, le peptide signal est clivé par une peptidase associée au canal de translocation. Pour les protéines transmembranaires, deux scénarios sont possibles : celles dont le C-terminal est intracellulaire et le N-terminal extracellulaire perdent leur peptide signal, tandis que pour les autres protéines, le peptide signal est conservé et demeure sous forme d'hélice comme site d'insertion dans la membrane.

L'entrée de la chaîne polypeptidique dans le RER ne se fait que lorsqu'elle compte au moins 70 acides aminés (40 se trouvant encore dans le ribosome et 30 transitant par le canal de translocation) (figure 22).



**Fig22. Différents passages membranaires dans le REr.**

### II.1.3 Protéines entrant dans le REr

Les composants de la membrane externe incluent les canaux ioniques, les transporteurs, les molécules d'adhérence et les récepteurs membranaires, qui jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire et dans l'absorption de certains composants du milieu extracellulaire, tels que le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL-R) et le récepteur de la transferrine.

La matrice extracellulaire contient des éléments tels que les protéoglycanes, les collagènes, les fibronectines et la laminine, ainsi que diverses protéases, comme l'élastase. Les hormones peptidiques, comme l'insuline, y sont également présentes. De plus, le plasma sanguin est riche en protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, les facteurs du complément, les facteurs de coagulation, la protéine C, la fibrine et les lipoprotéines. Enfin, il est important d'inclure les nombreux facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que les facteurs de croissance, ainsi que ceux liés à l'inflammation et à la réponse immunitaire, comme les interleukines.

Les composants des lysosomes : protéases (les cathepsines), lipases, phospholipases, glycosidases et nucléases.

Les autres protéines, non encore évoquées dans les ressources précédentes, sont : les

nombreuses chaperonnes, qui participent au repliement des protéines nouvellement synthétisées, les enzymes impliquées dans les modifications post traductionnelles telles que la formation de ponts disulfure, la glycosylation (glycosyltransférases, glycosidases et protéines de transport nucléotide-glucide) et la protéolyse partielle (furines), les nombreux récepteurs nécessaires au tri des protéines destinées aux différents compartiments cellulaires (récepteur du mannoside-6-phosphate, Sec24, récepteur KDEL etc.) Certaines de ces protéines opèrent uniquement dans le RER et y résident. D'autres continuent leur voyage et opèrent dans le Golgi.

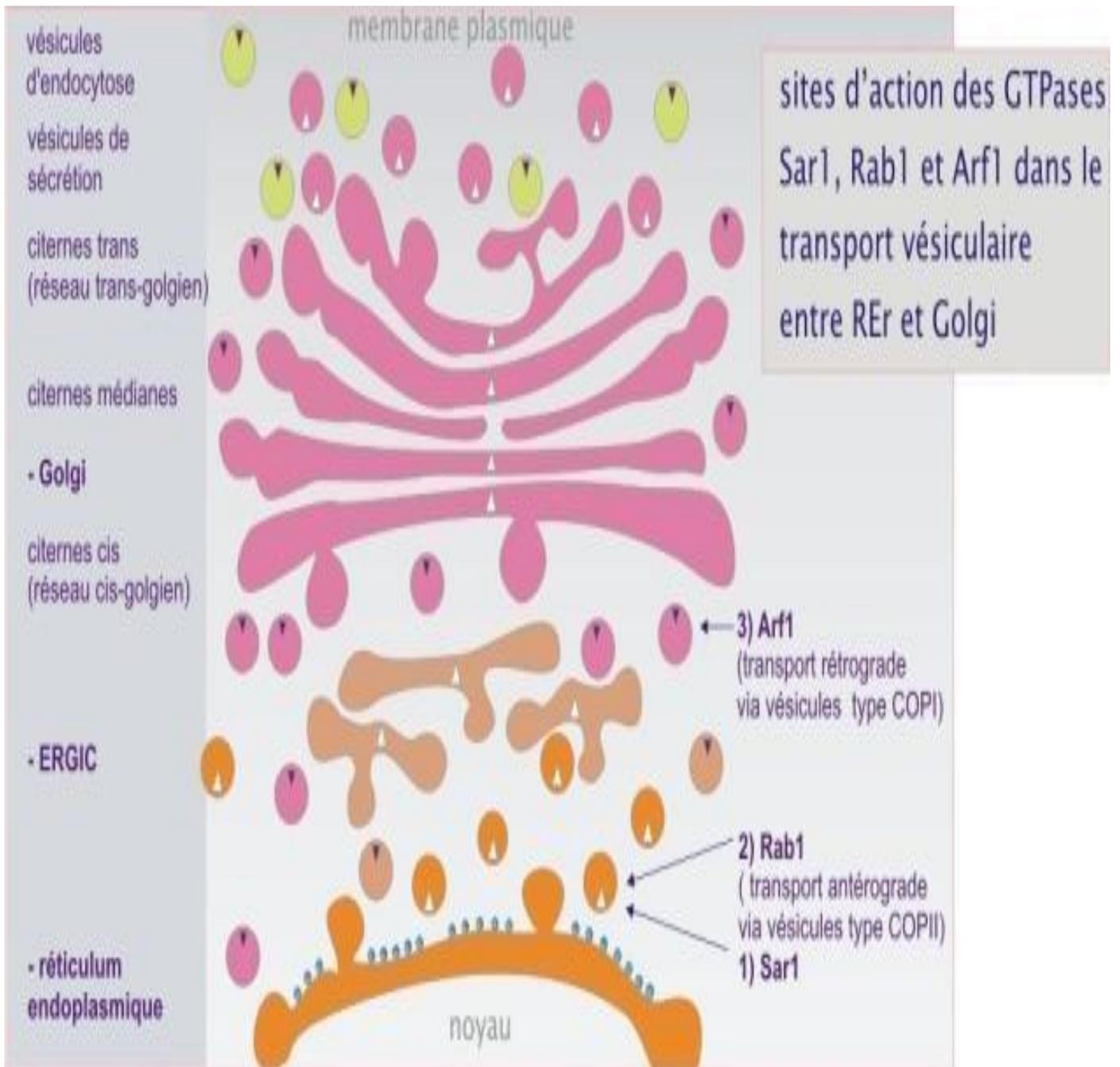
### II.1.4 Un premier transit : du RER au Golgi par l'intermédiaire du compartiment ERGIC

Les rôles des protéines liant le GTP (GTPases) dans la formation de vésicules bourgeonnantes provenant du RER et leur fusion subséquente qui donne naissance aux citernes cis-golgiennes, après passage par un intermédiaire : le compartiment ERGIC.

#### ➤ **Première GTPase : Sar1 et son rôle dans le recrutement des protéines du manteau et de la charge**

La GTPase Sar1 (pour « secretion associated ras-superfamily gene1 »), qui reste attachée à la membrane, est chargée de GTP par le facteur d'échange Sec12p. Lorsque Sar1 est lié au GTP, elle initie le processus de tri en concentrant certaines protéines dans une région membranaire appelée « site de sortie » (qui se transforme progressivement en tube ou vésicule, figure 23). Sar1-GTP recrute ensuite deux complexes majeurs, Sec23/24p et Sec13/31p. Leur fixation et leur agglutination sur la membrane entraînent la formation d'un manteau de type COPII. Cette structure commence à courber la membrane du réticulum endoplasmique rugueux, marquant le

premier stade de la formation du bourgeon.

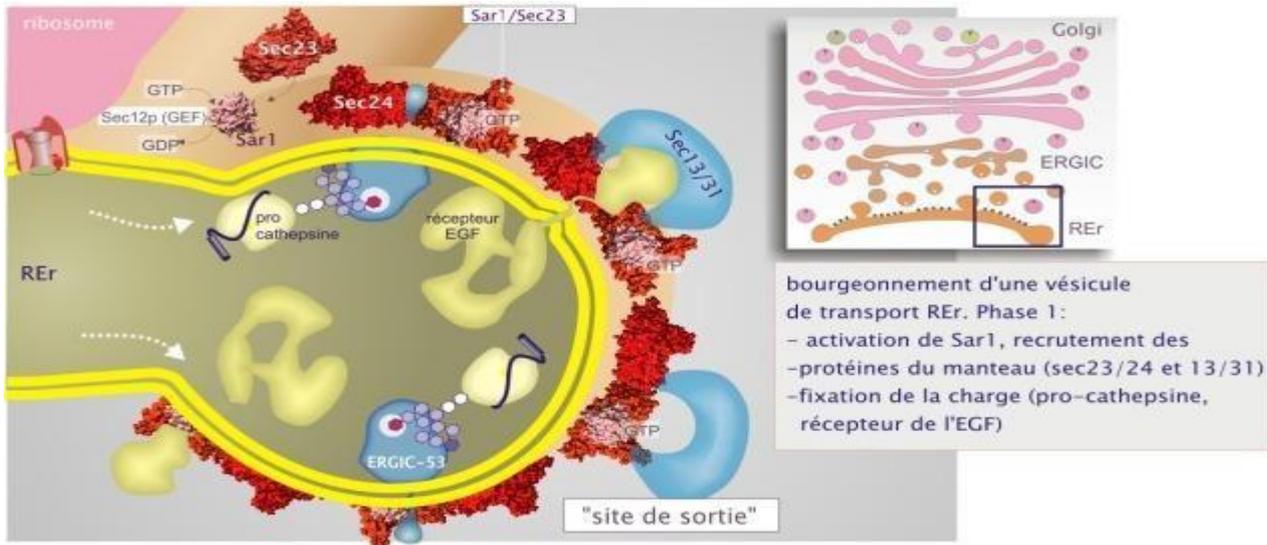


**Fig 23.** ERGIC et les le premier transit.

### ➤ **Deuxième GTPase : Rab1 et son rôle dans le recrutement des protéines accessoires de fusion**

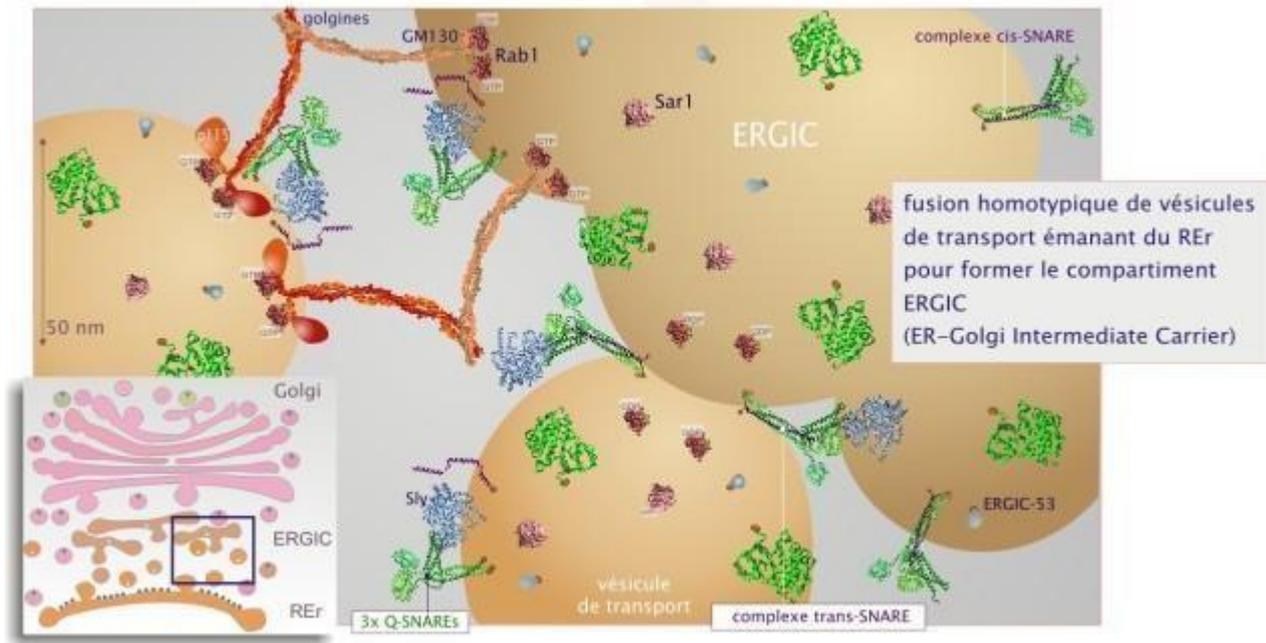
Rab1 (« Rat brain1 ») s'insère dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux au niveau d'un « site de sortie ». Après avoir été chargé en GTP par RabGEF, Rab1 recrute les golgines (p115, GM130 et giantine, des protéines d'arrimage de 50 nm de long) ainsi que l'ATPase NSF (figure 24). Bien que le rôle précis de ces protéines dans la biogenèse du Golgi ne soit pas encore entièrement compris, il est établi que NSF est essentiel pour le démantèlement du complexe Q- et R-SNAREs sur la même membrane (dans sa conformation

« cis »). Le recrutement de p115 conduit à l'attachement d'autres protéines au site de sortie, telles que les enzymes phospholipase-C1 et phospholipase D (qui modifient la composition lipidique de la membrane de la vésicule en formation) ainsi que le facteur d'échange d'Arf1, GBF1 (Golgi-specific Brefeldin A-resistant factor)..



**Fig 4.** Bourgeoisement d'une vésicule de transport du REr ; recrutement de Rab1 et des protéines d'arrimage.

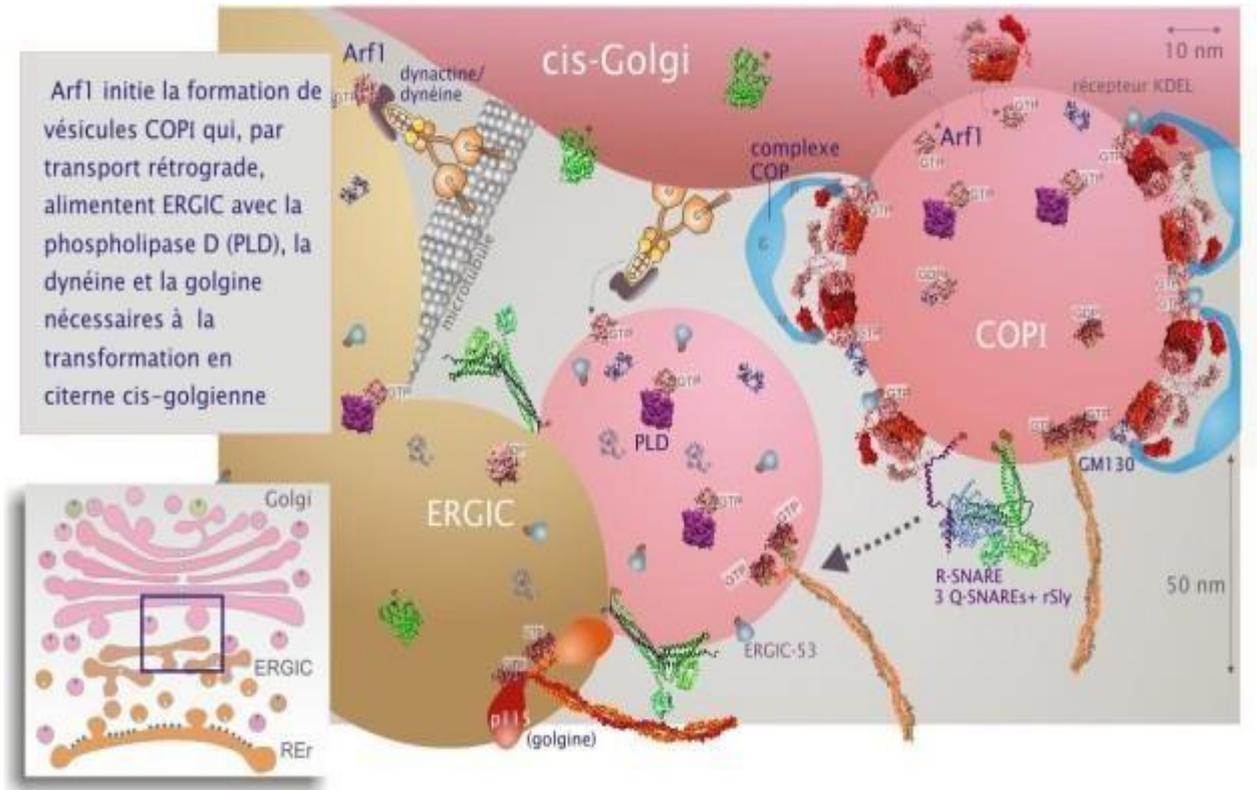
Les structures vésiculaires (et tubulaires) formées, chargées des protéines destinées au Golgi, se détachent ensuite du réticulum endoplasmique rugueux par un processus de fission. Presque simultanément, le GTP de Sar1 est hydrolysé, entraînant la dislocation du manteau COPII, tout en préservant la machinerie de fusion. Les vésicules libérées, d'environ 60-90 nm de diamètre, fusionnent entre elles par un processus dirigé par Rab1, p115 et les SNAREs. Cette fusion, appelée fusion homotypique, conduit à la formation de cavités irrégulières, d'une taille d'environ 0,4-1,0  $\mu\text{m}$ , constituant le compartiment ERGIC (ER Golgi Intermediate Carrier) (figure 25).



**Fig 25.** Formation du compartiment ERGIC

➤ **Troisième GTPase: Arf1 et son rôle dans la transformation du compartiment ERGIC en citerne cis-golgienne**

Le compartiment ERGIC est également alimenté par des vésicules provenant de la face cis-golgienne (transport rétrograde), au cours d'un processus impliquant les SNAREs et les golgines (GM130, giantine et p115). Ces vésicules cis-golgiennes apportent une troisième GTPase, Arf1 (ADP ribosylation factor), qui présente une forte similarité de séquence avec Sar1. Après avoir été chargé en GTP par le facteur d'échange GBF1, Arf1 est crucial pour la transformation du compartiment ERGIC en une citerne cis-golgienne. Arf1-GTP recrute diverses protéines cytosoliques, telles que la phospholipase-D (PLD) et les phosphatidylinositol kinases (PI kinases), qui modifient les lipides membranaires et confèrent au compartiment une composition lipidique caractéristique du Golgi, distincte de celle du réticulum endoplasmique rugueux (figure 26).



**Fig 5.** Arf1 et la transformation d'ERGIC en citerne cis-golgienne.

La protéine Arf1 lie aussi le compartiment ERGIC aux microtubules (cytosquelette) en recrutant la protéine dynéine-1 (protéine motrice qui migre vers l'extrémité moins du microtubule), l'adaptateur dynactine et la protéine non-motrice GMAP-210 (figure 27). Ces protéines sont nécessaires à la fois au déplacement du compartiment ERGIC et à la stabilisation des citernes cis-golgiennes.

### II.1.5 Un deuxième transit : passage au travers du Golgi

#### ➤ Passage de la charge au travers du Golgi : transport antérograde

Le processus de traversée du Golgi par la charge fait encore l'objet de discussions. Nous adoptons le modèle de la « maturation des citernes » aussi connu comme le « modèle de progression des citernes ».

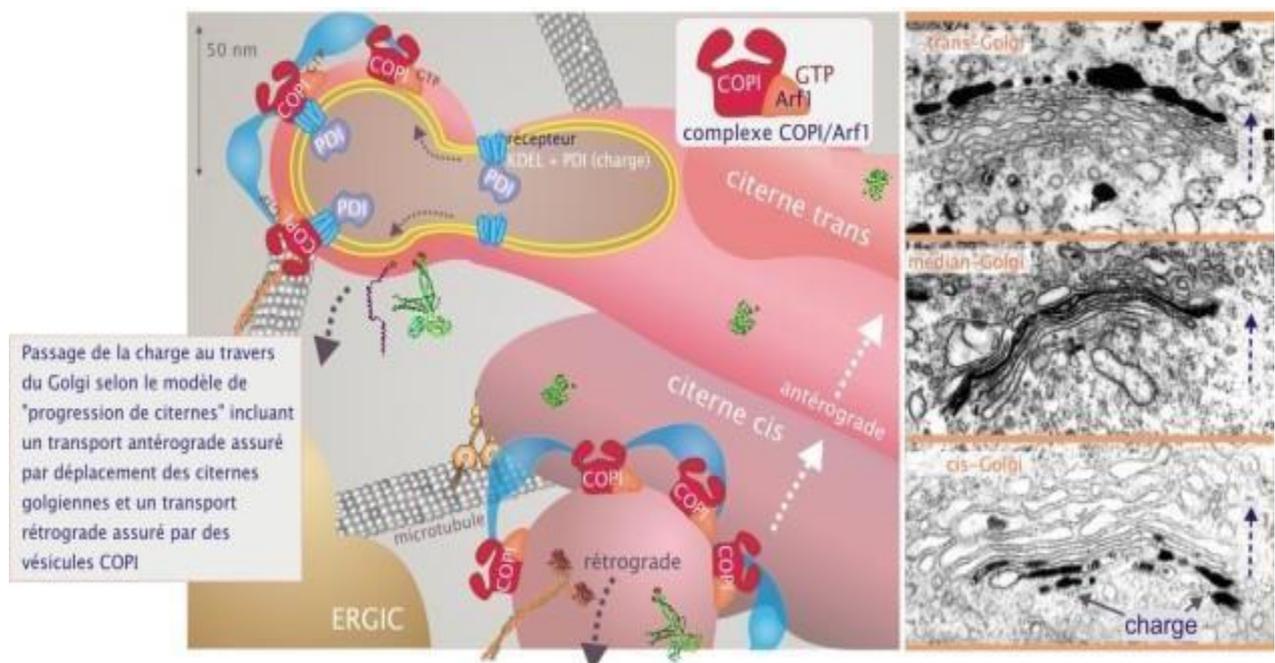
Dans ce modèle, les citernes cis-golgiennes fournies par le compartiment ERGIC se déplacent progressivement vers la région trans-golgienne. Au cours de ce mouvement, les N-glycanes sont modifiés et les O-glycanes sont ajoutés, entraînant ainsi la « maturation » des glycoprotéines. Pour conserver leur position spécifique dans l'empilement des citernes, les enzymes et les transporteurs d'oses sont capturés dans des vésicules qui bourgeonnent des citernes en transit. Ces vésicules retournent ensuite à la citerne précédente par

un processus de transport rétrograde.

### ➤ **Passage de la charge au travers du Golgi : transport rétrograde par des vésicules COPI**

Le transport rétrograde, effectué par des vésicules recouvertes de COPI (coat proteins type I), se produit à tous les niveaux de l'empilement golgien. La formation des vésicules COPI suit un processus similaire à celui des vésicules COPII. L'assemblage du manteau est initié par Arf1, qui, lorsqu'il est lié au GTP, recrute deux complexes protéiques appelés « coatomer » : le complexe F, constitué de COPI et le complexe B. Certains composants de COPI fonctionnent comme des récepteurs, bien que les motifs qu'ils reconnaissent soient encore peu connus.

Le manteau en formation recrute ensuite les Q-SNAREs (syntaxine-5, membrine, Rbet) et la R-SNARE (Sec22b), ainsi que les protéines d'arrimage, les protéines accessoires de fusion et la GTPase Rab1. Avec l'augmentation de la sphéricité de la vésicule, Arf1 est hydrolysé, ce qui entraîne la dissociation du manteau et prépare la vésicule, désormais dénudée, à fusionner avec le compartiment précédent (figure 27).



**Fig 27.** Transport dans le Golgi

Le transport rétrograde atteint également le réticulum endoplasmique rugueux (REr) pour compenser la perte de membrane liée au transport antérograde et pour retourner au REr les protéines spécifiques. Trois protéines sont particulièrement concernées : la disulfure isomérase PDI, la protéine chaperonne BiP, et le

récepteur des glycoprotéines ERGIC-53. COP-I reconnaît le motif dilysine (KKxx ou KxKxx) présent : dans le récepteur KDEL, qui se lie aux protéines solubles BiP et PDI, et dans la protéine membranaire ERGIC-53. Grâce aux processus antérograde et rétrograde, ces protéines circulent entre le RER et le Golgi. De plus, le transport rétrograde permet également l'élimination des protéines « usées » du Golgi, qui, une fois arrivées dans le RER, sont dirigées vers le canal de translocation pour être envoyées vers les protéasomes.

### II.1.6 Glycosylation des récepteurs, lipidation des facteurs de couplage

La glycosylation est l'une des modifications essentielles des protéines et des lipides. Elle s'effectue principalement dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et fait appel à une machinerie moléculaire spécifique, associant plusieurs centaines de glycosyltransférases, de glycosidases, de transporteurs et de protéines régulatrices.

#### ➤ La glycosylation dans le Golgi

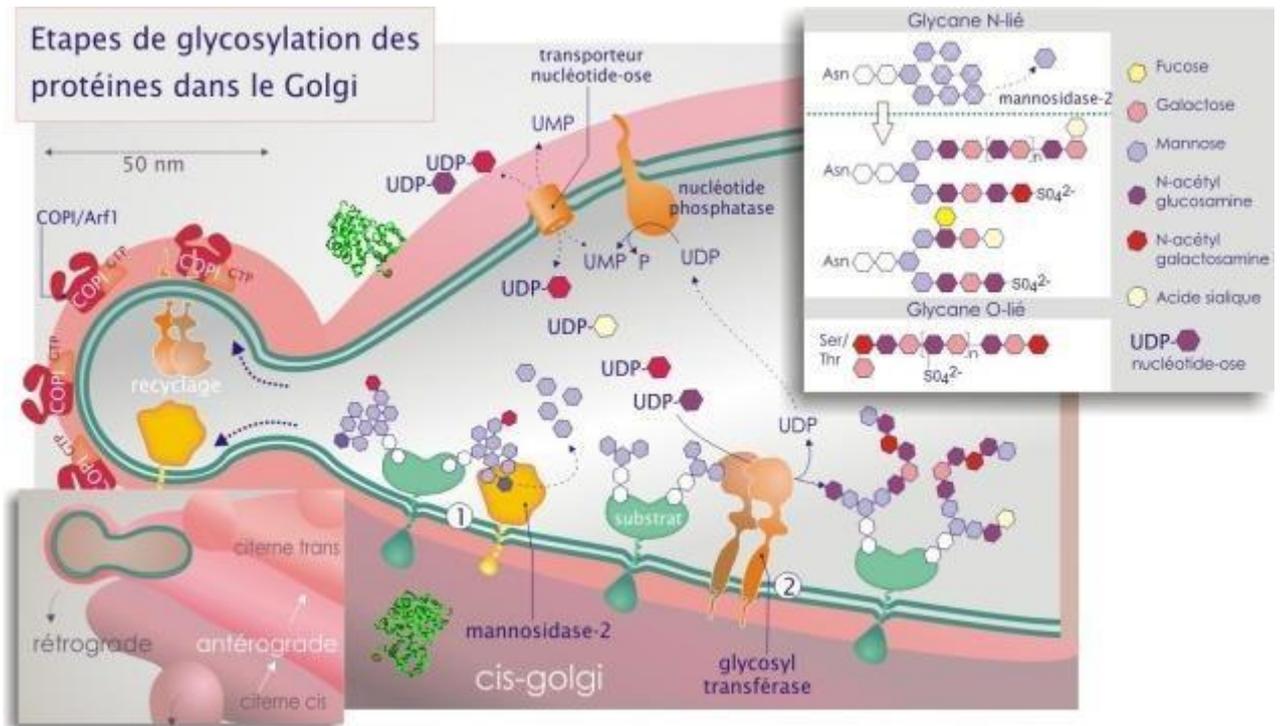
Les protéines traversent le Golgi en 30 minutes dans le sens cis vers trans. Au cours de ce passage, la plupart d'entre elles subissent un remaniement de leur portion glucidique, de leurs ponts disulfures et quelquefois une protéolyse partielle. Ici nous nous attarderons surtout sur le remaniement glucidique.

La plupart des protéines membranaires sont des glycoprotéines, généralement N-glycosylées, mais parfois aussi O-glycosylées (par des branches oligosaccharidiques attachées à des résidus de thréonine ou de sérine). La N-glycosylation commence dans le réticulum endoplasmique rugueux, où une cupule glucidique est ajoutée, puis subit des modifications substantielles dans le Golgi. Parmi les enzymes impliquées dans la N-glycosylation, on trouve les glycosidases (comme la glucosidase I et II, ainsi que la mannosidase I) et les glycosyltransférases (telles que la glucosyltransférase, UGGT). Il est également important de mentionner deux autres protéines : le transporteur de nucléotide-ose, qui échange un ose lié à un nucléotide diphosphate contre un nucléotide monophosphate par un mécanisme d'antiport (comme le transporteur d'UDP-galactose), et la nucléotide phosphatase, qui convertit le nucléotide diphosphate en nucléotide monophosphate ( $\text{UDP} \rightarrow \text{UMP} + \text{Pi}$ ) (figure 27).

Toutes ces enzymes (et les transporteurs) sont produits dans le RER et transportés en tant que charges vers les citernes golgiennes. Il est important de réaliser que les substrats et leurs enzymes sont déjà ensemble dans le RER mais que leurs activités respectives ne s'expriment que dans des citernes golgiennes spécifiques. Cette régulation spatiale et temporelle demeure encore énigmatique.

### ➤ Elaboration de glycoprotéines et de protéoglycanes

Après la N-glycosylation, la majorité des protéines entrant dans le Golgi possèdent une cupule glucidique (GlcNac<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>) qui va être élaguée par la mannosidase-2, ne laissant que 3 à 5 résidus mannose (en plus des deux GlcNac) (figure 27). La N-acétylglucosaminetransférase qui agit ensuite, dicte le type de branchement des nouveaux oses greffés. Après le rajout des acétylglucosamines, les branches sont allongées par des di-saccharides composés de galactose-N-acétylglucosamine (en



formant des chaînes polylactosamine). Après une ou plusieurs additions de ces di-saccharides, les chaînes sont terminées par l'ajout de galactose, de N-acétylgalactosamine, de L-fucose, d'acide sialique ou d'un groupement sulfate.

**Fig 6. Les étapes de glycosylation dans le Golgi.**

Un autre processus consiste en la formation de très longues chaînes par répétition d'un motif disaccharidique du type galactose et N-acétylglucosaminesulfate (kératane) ou du type acide-D-glucuronique et N-acétylglucosaminesulfate (chondroïtine sulfate). On parle alors de protéoglycanes au lieu de glycoprotéines.

La glycosylation se fait sans matrice préexistante. Cependant, le nombre limité de séquences oligosaccharidiques présentes sur les protéines et les lipides, suggère qu'un ordre existe.

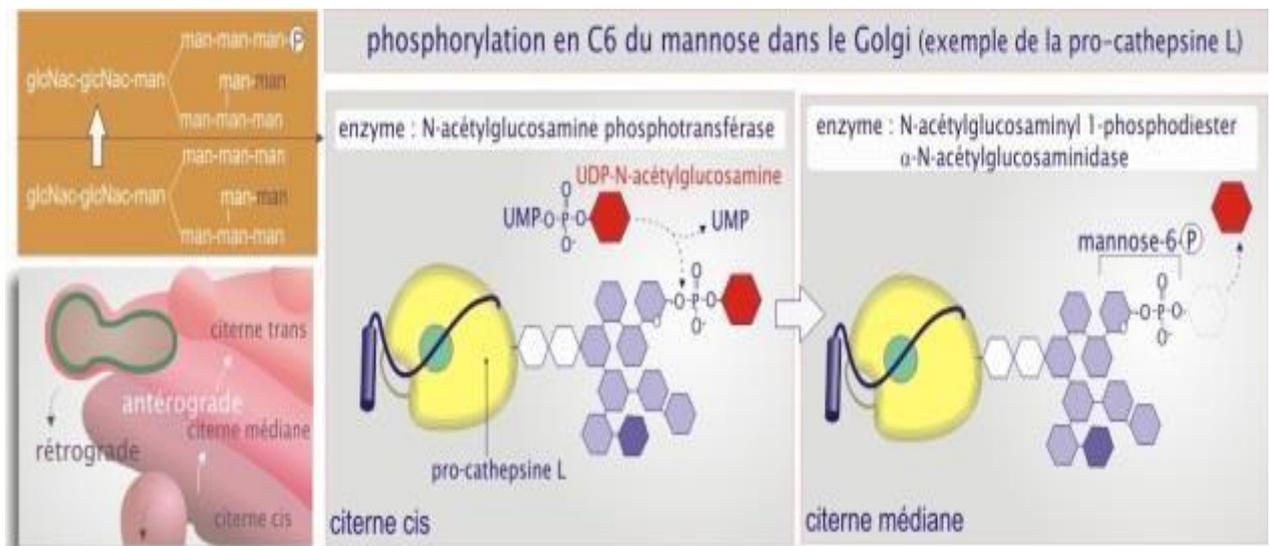
Cet ordre est probablement dû à deux mécanismes au moins : séquestration de

glycosyltransférases, glycosidases et de transporteurs de nucléotide–sucres dans certaines citernes golgiennes (compartmentation des activités enzymatiques résultant en une véritable chaîne de montage), et amas d'enzymes et transporteurs de nature spécifique, assurant simultanément une séquence précise (et probablement définitive) de modifications d'une seule chaîne glucidique.

La présence de ces mécanismes est bien établie. Certaines glycosyltransférases sont localisées uniquement dans des citernes golgiennes spécifiques ; par exemple, la N-acétylglucosaminyl transférase se trouve uniquement dans les citernes médianes. En revanche, les trois types de N-acétylgalactosyl transférases sont présents dans toutes les citernes golgiennes. De plus, on observe des associations d'enzymes, telles que la mannosidase-2 avec la N-acétylglucosyl transférase, ou la sialyl-transférase-1 avec la galactosyl-transférase-1 et la sialyl-transférase-2. Il semble que le signal de rétention spécifique soit probablement situé dans la région N-terminale cytoplasmique de ces enzymes, bien que les mécanismes exacts restent encore à clarifier (figure 28).

Une modification spécifique : la formation de mannose–6–phosphate, « glucide de destination » des enzymes lysosomiques

La glycosylation de la protéase cathepsine L (38 kDa sans glucides), ci-après la modification particulière de la cupule glucidique, spécifique aux enzymes à destination du lysosome : la C6–phosphorylation du mannose.



**Fig 7.** Phosphorylation du mannose en position 6 sur pro-cathepsine L.

La cathepsine quitte le réticulum endoplasmique rugueux sous forme de pro-enzyme, appelée pro-cathepsine, portant une cupule de N-glycosylation sur l'asparagine-221. Dans le cis-Golgi, un mannose de la branche interne est retiré par la mannosidase de type-2. Ensuite, la pro-cathepsine est reconnue, probablement

grâce à la présence de deux lysines en positions 54 et 99 (pour la pro-cathepsine L murine), par la N-acétylglucosamine-1 phosphotransférase. Cette enzyme ajoute un groupe N-acétylglucosamine-phosphate (à partir d'un UDP-GlcNAc) sur le carbone-6 d'un ou plusieurs mannoses de la cupule glucidique (figure 28). Les mannoses concernés ne sont pas précisément définis en raison de la grande mobilité des chaînes glucidiques. Enfin, dans le compartiment golgien médian, les groupements N-acétylglucosamine sont éliminés par une phosphodiesterase, laissant uniquement le groupe phosphate sur les mannoses. Ce processus est commun à toutes les enzymes lysosomales, si bien que le mannose-6-phosphate agit comme un « marqueur de destination » lysosomal.

### II.1.7 Lipidation des facteurs de couplage

Les modifications covalentes des protéines par des lipides étaient initialement considérées comme un simple moyen d'ancrage à la membrane. Cependant, il a été découvert que ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle crucial dans l'activité biologique de nombreuses protéines. Il existe deux principaux types de ces modifications : la palmitoylation et l'isoprénylation.

- **Palmitoylation** : Réversible, elle permet aux protéines de se localiser à la face interne de la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique.
- **Isoprénylation** : Irréversible, elle se retrouve dans divers compartiments cellulaires, notamment la membrane plasmique et le noyau.

Ces deux modifications jouent un rôle important dans la régulation de protéines telles que le récepteur beta-adrénergique et les protéines de la famille des produits des protéines de ras.

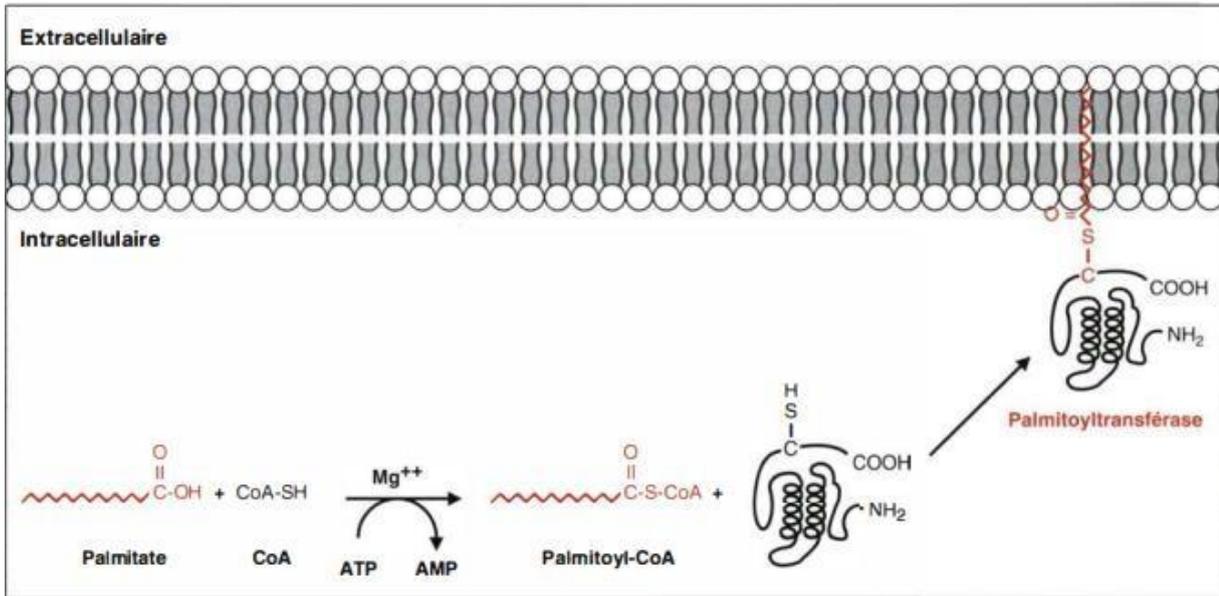
#### ➤ **Palmitoylation des protéines**

L'acide palmitique, un acide gras saturé à 16 carbones, peut être transféré sur les cystéines de certaines protéines par l'action d'une palmitoyltransférase (figure 29). La liaison de l'acide palmitique aux protéines se fait généralement par une liaison thioester, sensible à l'hydroxylamine et à la potasse méthanolique. Ce processus de palmitoylation se produit post-traductionnellement, environ 10 à 20 minutes après la synthèse de la protéine. Les protéines palmitoylées sont principalement ciblées vers la face interne de la membrane plasmique.

L'enzyme responsable de cette modification a d'abord été identifiée dans le Golgi, puis partiellement purifiée à partir de la muqueuse gastrique, où elle reste associée à la fraction du Golgi. Toutefois, une palmitoyltransférase a également été détectée au niveau de la membrane plasmique. La spécificité de la palmitoyltransférase n'est pas absolue pour le palmitate ; elle peut également transférer

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

des acides gras ayant des chaînes carbonées plus longues ou plus courtes. Une autre enzyme, une acylestérase, catalyse la réaction inverse.



**Fig 29.** Palmitoylation des protéines. Pour qu'une protéine soit palmitoylée, le palmitate doit d'abord être activé en palmitoyl-coenzyme A (palmitoyl-CoA). Cette activation est effectuée par une acyl-CoA synthétase qui combine le palmitate au CoA en présence d'ATP et de magnésium. Le palmitoyl-CoA ainsi formé réagit avec les cystéines de certaines protéines par l'intermédiaire d'une palmitoyltransférase. Le palmitate est relié aux cystéines par une liaison thioester. Une fois palmitoylées, les protéines peuvent s'associer à la membrane où elles exerceront leurs actions.

### ➤ **Recyclage et modulation**

La présence de deux enzymes qui catalysent des réactions inverses peut expliquer le recyclage rapide du palmitate observé pour de nombreuses protéines, y compris celles des membranes érythrocytaires. Dans ces cellules, la demi-vie de la liaison de l'acide palmitique varie de 30 minutes à 3 heures. Plus précisément, la demi-vie de liaison de l'acide palmitique à l'ankyrine est de 50 minutes, tandis que pour les protéines de la famille des ras, dont l'expression est ubiquitaire, elle est de 20 minutes. Ces exemples illustrent la nature réversible de la liaison de l'acide palmitique.

### ➤ **L'isoprénylation**

Les isoprènes se lient aux cystéines des protéines par une liaison thioéther, qui peut être hydrolysée à l'aide du nickel de Raney. Ces isoprènes proviennent du mévalonate, qui, après activation en isoprényl pyrophosphate (5 carbones), peut se combiner avec d'autres molécules similaires sous l'action de plusieurs enzymes. En plus de la palmitoylation, l'isoprénylation joue un rôle crucial dans divers processus dynamiques de régulation des fonctions protéiques.

L'isoprénylation des protéines implique généralement l'ajout d'un isoprène de 15 ou 20 carbones à une

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

cystéine située près de l'extrémité C-terminale de certaines protéines synthases. Les isoprènes, dérivés du mévalonate, sont d'abord transformés en isopentényl-pyrophosphate (isopentényl-PP) à travers une série de trois phosphorylations. Ensuite, une isomérase convertit l'isopentényl-PP en diméthylallyl-PP. Ces deux molécules à 5 carbones se combinent sous l'action d'une prényltransférase pour former le géranyl-PP (10 carbones). Des ajouts successifs d'isopentényl-PP conduisent à la formation du farnésyl-PP (15 carbones) et du géranylgéranyl-PP (20 carbones), qui sont les principales formes d'isoprènes attachées aux protéines. Les farnésyltransférases et géranylgéranyltransférases reconnaissent des séquences spécifiques d'acides aminés contenant une ou deux cystéines, sur lesquelles les isoprènes sont transférés. Une fois isoprénylées, ces protéines peuvent ensuite s'associer aux membranes ou interagir avec d'autres protéines.

Pour la protéine Ras, en plus des transformations déjà mentionnées, une palmitoylation est également ajoutée (figure 30). L'isoprénnylation semble être un processus irréversible, car la durée de liaison des isoprènes correspond à celle des protéines modifiées. De plus, comme les produits des proto-oncogènes ras subissent une protéolyse qui élimine le site de reconnaissance des isoprényltransférases, il est peu probable que ces protéines soient recyclées via des cycles d'isoprénnylation et de déisoprénnylation. Les isoprényltransférases sont des enzymes cytoplasmiques classées en deux types principaux: les farnésyltransférases et les géranylgéranyltransférases.

Il n'existe qu'un seul type de farnésyltransférase, qui interagit avec des protéines contenant un motif CXXX, où "C" représente une cystéine et "X" peut être n'importe quel acide aminé. Cette enzyme cible principalement les protéines de la famille des proto-oncogènes Ras. Cependant, d'autres protéines sont également farnésylées, notamment la rhodopsine kinase, la sous-unité  $\gamma$  de la transducine, la sous-unité  $\alpha$  de la GMPc phosphodiesterase de la rétine, ainsi que le facteur  $\alpha$  de la levure.

La farnésyltransférase est un hétérodimère composé de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  se lie à la protéine cible, tandis que la sous-unité  $\alpha$  est probablement responsable de la liaison avec le farnésyl-pyrophosphate. Contrairement à la farnésyltransférase, il existe deux classes de géranylgéranyltransférases. La classe I, tout comme la farnésyltransférase, reconnaît les protéines possédant un motif CXX en position C-terminale. Parmi les protéines modifiées par cette classe de géranylgéranyltransférases, on trouve la sous-unité  $\gamma$  de certaines protéines G trimériques, plusieurs membres de la famille des protéines G de faible poids moléculaire, comme la protéine Rap1A, et la sous-unité  $\beta$  de la GMPc phosphodiesterase de la rétine. La classe II, quant à elle, reconnaît les protéines avec un motif XCC (comme Rab1A) ou CXC (comme Rab3A) en position C-terminale. Il est intéressant de noter que la protéine Rab3A est également carboxylée au niveau de sa méthyle, avec la cystéine modifiée se trouvant déjà en position C-terminale.

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

Étant donné qu'il n'y a pas de protéolyse, le site de reconnaissance par l'enzyme reste intact, ce qui laisse supposer que le transfert de géranylgeranyl catalysé par la classe II pourrait être potentiellement réversible. Tout comme la farnésyltransférase, les géranylgeranyltransférases sont des hétérodimères composés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Il a également été démontré que la farnésyltransférase et la géranylgeranyltransférase de classe I partagent des sous-unités  $\alpha$  identiques.

Ces deux enzymes catalysent le transfert de leur isoprène spécifique sur des protéines portant un motif CXX en position C-terminale. Le choix de l'isoprène est déterminé par la nature de l'acide aminé situé à la fin de la séquence CXXX : si ce motif se termine par un résidu Gly, Thr, His, Asn, Gln, Ser, Ala ou Cys, la protéine sera farnésylée, tandis que si le motif se termine par un résidu Leu, la protéine sera géranylgeranylée. Les motifs se terminant par Val, Ile, Phe ou Met sont reconnus par les deux enzymes. Toutefois, bien que les farnésyltransférases et les géranylgeranyltransférases I aient des préférences pour leurs isoprènes respectifs, si la concentration d'accepteurs est suffisante, ces enzymes peuvent catalyser le transfert de l'un ou l'autre des substrats. Des études quantitatives ont révélé qu'il existe plus de protéines géranylgeranylées que farnésylées (figure31).

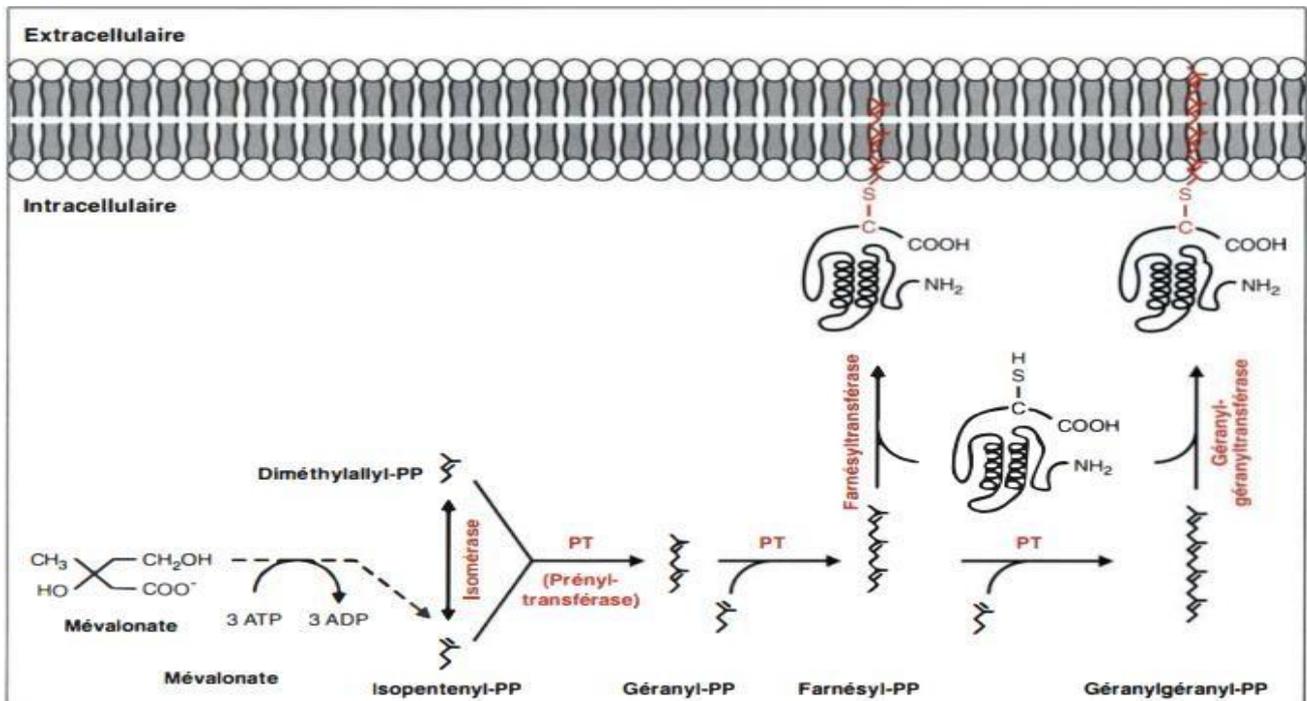
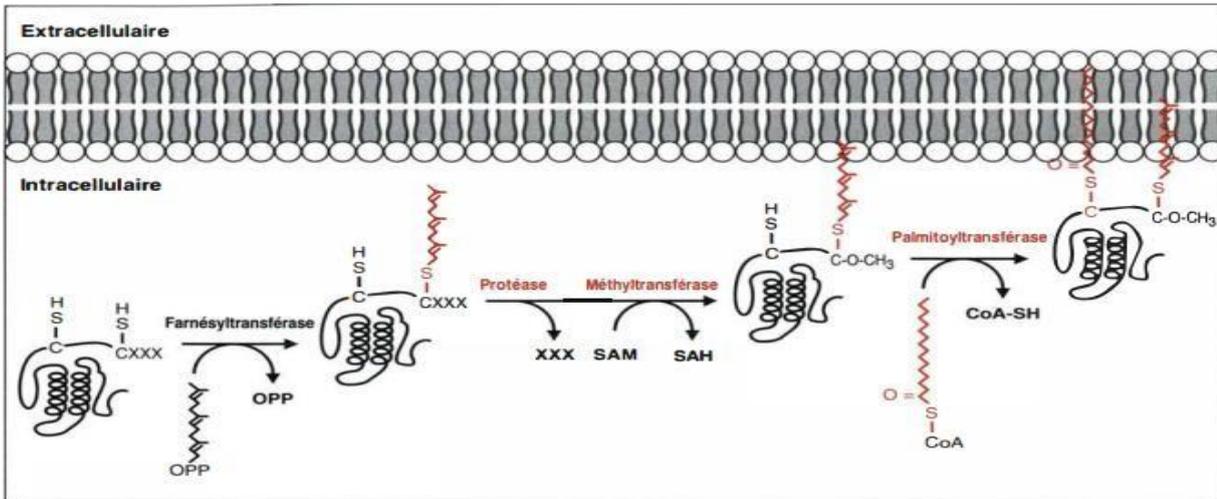


Fig30. Isoprénylation des protéines.



**Fig 8.** Les protéines de la famille des produits des proto-oncogènes Ras subissent une modification post-traductionnelle par l'ajout d'isoprènes. Dans le cas de p21Ras, cette protéine est également palmitoylée, une modification essentielle pour son activité. Une farnésyltransférase ajoute d'abord un groupement farnésyl sur une cystéine dans la région C-terminale de p21Ras. Ensuite, une protéase retire les trois derniers acides aminés, et la cystéine farnésylée est méthylée par une carboxyle-méthyltransférase. Bien que cette modification permette une faible association avec la membrane plasmique, c'est l'ajout d'un palmitate sur une autre cystéine qui assure une liaison complète à la membrane et maximise l'activité de p21Ras. Le palmitate est recyclé rapidement, ce qui permet une régulation dynamique de l'activité de la protéine.

### II.2 Expression d'antigènes, marqueurs de virulence et de récepteurs cellulaires

#### II.2.1 Expression d'antigènes

Une cellule présentatrice d'antigène (CPA), ou antigen-presenting cell (APC), fait partie du système immunitaire et a pour rôle de présenter des fragments d'éléments étrangers aux lymphocytes T. Parmi ces CPA, on trouve des monocytes, des macrophages, des lymphocytes B et des cellules dendritiques.

Le processus de présentation est centré sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les antigènes, qui sont des chaînes polypeptidiques issues d'organismes étrangers, sont affichés par le CMH de classe II, en lien constant avec le CMH de classe I, qui agit comme une carte d'identité du corps. En d'autres termes, le CMH de classe II est « un ami montrant une identité ennemie ». Les classes I et II du CMH diffèrent quant à l'origine des antigènes qu'elles présentent ainsi que leur mécanisme de chargement.

Les lymphocytes T reçoivent l'information et peuvent déclencher une réponse ciblée grâce à la reconnaissance de signatures spécifiques. Cela permet de passer d'une réponse immunitaire non spécifique, qui implique la destruction de tout élément étranger, à une réponse immunitaire spécifique, ciblant un élément précis du non-soi. La réponse spécifique des lymphocytes T dépend de l'interaction entre le CMH et l'antigène présenté, influencée par le type de CMH et la nature de l'antigène.

La présentation de l'antigène joue un rôle crucial dans l'éducation des lymphocytes T lors de leur développement dans le thymus, dans l'identification et l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques, et dans le recrutement des lymphocytes T auxiliaires au sein de la réponse immunitaire adaptative.

Les cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles », qu'elles soient d'origine extracellulaire (exogène) ou intracellulaire (endogène), possèdent trois caractéristiques essentielles :

1. La présentation de l'antigène exogène aux lymphocytes T CD4 via les molécules du CMH de classe II.
2. La présentation de l'antigène endogène aux lymphocytes T CD8 via les molécules du CMH de classe I.
3. L'expression de molécules de co-stimulation, qui permettent d'amplifier la réponse des lymphocytes T.

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

Ces cellules médiatrices participent à la réponse inflammatoire (par exemple, IL-1, interférons de type I), expriment des molécules de co-stimulation (comme CD40, CD80, CD86), et produisent des cytokines qui modulent les fonctions effectrices (comme IL-4, IL-12).

Les antigènes présentés par les molécules de CMH de classe I proviennent principalement du cytosol (intracellulaire). Dans chaque cellule, les protéines sont régulièrement dégradées par le protéasome, un complexe catalytique qui coupe ces protéines en courts peptides. Ces peptides sont ensuite transportés du cytosol vers le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP, appartenant à la famille des transporteurs ABC. Simultanément, les molécules de CMH de classe I, nouvellement synthétisées par la cellule, sont stabilisées dans le réticulum endoplasmique par des protéines chaperonnes appelées calnexines, qui les maintiennent dans un état partiellement replié. Une fois la conformation finale atteinte, notamment grâce à l'association avec la microglobuline  $\beta 2$ , la molécule de CMH I se détache de la calnexine et rejoint un complexe protéique appelé Peptide Loading Complex (PLC). Ce complexe, composé de la calréticuline, ERp57 et tapasine (qui relie les transporteurs TAP), maintient la molécule de CMH I prête à recevoir un peptide, jusqu'à ce qu'un antigène adapté s'y fixe.

En revanche, les antigènes présentés par les molécules de CMH de classe II proviennent principalement de sources exogènes. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) peuvent internaliser des éléments extracellulaires par divers mécanismes d'endocytose : l'endocytose à récepteur (où des protéines spécifiques sont reconnues par des récepteurs), la phagocytose (qui englobe des pathogènes entiers ou des fragments de cellules apoptotiques), et la macropinocytose (qui capture des protéines solubles). À mesure que les vésicules d'endocytose progressent dans la cellule, leur acidification entraîne la digestion des éléments internalisés par des protéases.

Les molécules de CMH de classe II, associées à une protéine membranaire appelée chaîne invariante (Ii), sont protégées de l'association avec d'autres protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique et sont dirigées vers la membrane plasmique. La chaîne invariante est ensuite clivée progressivement, ne laissant qu'une petite séquence peptidique appelée CLIP fixée sur la molécule de CMH. La fusion des endosomes riches en molécules de CMH II avec les vésicules d'endocytose contenant les peptides internalisés permet l'échange du peptide CLIP contre un antigène d'origine extracellulaire, grâce à l'intervention des molécules HLA-DM et HLA-DO.

### II.2.2 Conséquences de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T.

L'activation du lymphocyte T par une cellule présentatrice d'antigène nécessite la formation d'une synapse immunologique entre les deux cellules, ainsi que l'engagement de trois signaux d'activation.

Le premier signal est l'interaction entre les complexes moléculaires CMH/antigène et les récepteurs des cellules T (TCR). Le deuxième signal est fourni par l'interaction des molécules de co-stimulation (comme CD28, CTLA-4) avec leurs récepteurs correspondants sur la cellule T. Enfin, le troisième signal provient de la synthèse de cytokines, telles que l'IL-2, qui joue un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T activés.

#### II.2.2.1 Présentation « professionnelle »

Les molécules de CMH de classe II portant un antigène sont spécifiquement reconnues par les lymphocytes T CD4+ (également appelés lymphocytes T auxiliaires). Lorsque le complexe CMH de classe II/antigène étranger est reconnu par un lymphocyte CD4+ naïf, cela déclenche une réponse immunitaire adaptative spécifique contre l'élément d'origine de l'antigène reconnu.

#### II.2.2.2 Présentation non professionnelle

Les molécules de CMH de classe I portant un antigène sont spécifiquement reconnues par les lymphocytes T CD8+ (appelés aussi lymphocytes T cytotoxiques). Le complexe CMH de classe I/antigène sert de « carte d'identité » cellulaire, affichant l'état de la cellule à sa surface. Ce mécanisme permet aux lymphocytes T cytotoxiques de reconnaître et d'éliminer principalement les cellules infectées.

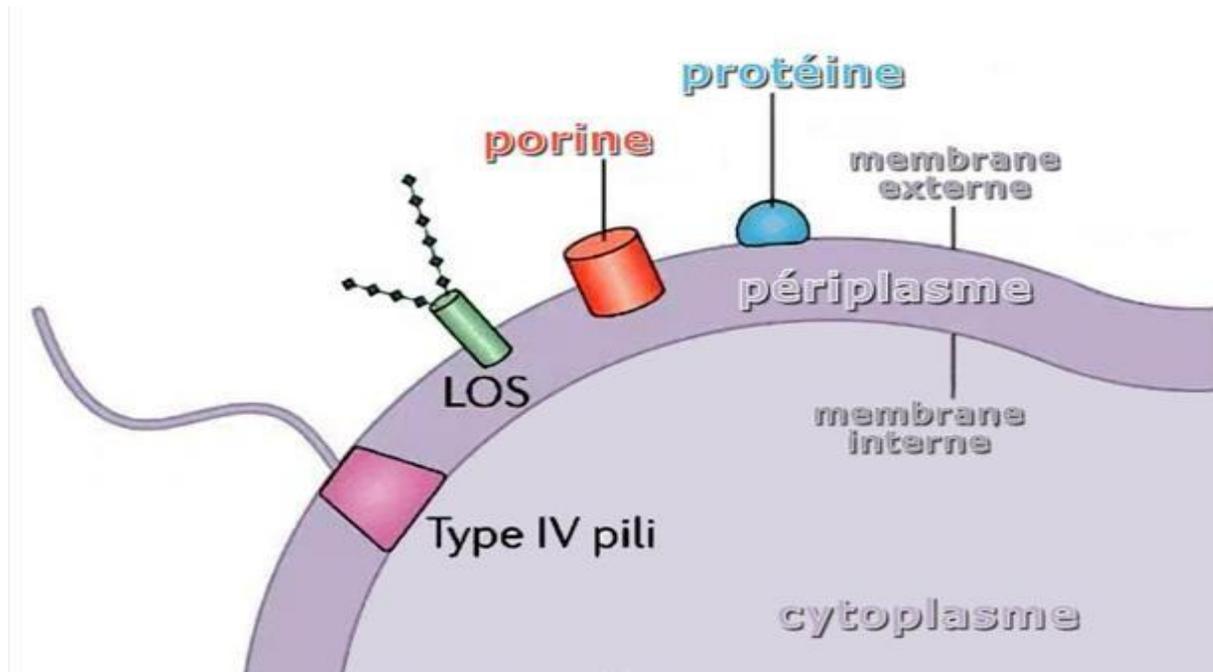
#### II.2.2.3 Cas du développement lymphocytaire

La présentation d'antigènes joue un rôle crucial dans le développement des lymphocytes T dans le thymus. La reconnaissance des antigènes du "soi" par les thymocytes double positifs (CD4+/CD8+) à la surface des molécules de CMH entraîne une sélection positive de ces cellules. En revanche, les thymocytes dont les récepteurs ne reconnaissent pas les complexes moléculaires CMH/antigène du "soi" sont éliminés par apoptose au bout de 3 à 4 jours. De plus, la nature des molécules de CMH rencontrées détermine la différenciation des thymocytes en lymphocytes T naïfs CD4+ ou CD8+.

### II.2.2.4 Les marqueurs de virulence et de récepteurs cellulaires

Un facteur de virulence est une molécule produite par un micro-organisme qui augmente sa capacité à nuire à l'hôte. Ces facteurs facilitent l'infection, la propagation de la maladie, et permettent au micro-organisme d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Il existe divers types de facteurs de virulence, dont plusieurs exoenzymes, qui sont couramment utilisées par les bactéries pour ce rôle. Les molécules produites par un micro-organisme et impliquées dans le déclenchement d'une maladie sont désignées comme des facteurs de virulence (figure 32).

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires



**Fig 9.** Les facteurs de virulence de *Neisseria gonorrhoeae* : pili est le principal facteur de virulence des gonocoques, comme ici avec *Neisseria gonorrhoeae*.

Les facteurs de virulence sont des enzymes extracellulaires ou des composants structuraux produits par des agents pathogènes qui facilitent leur colonisation, multiplication, invasion, et évitement de la réponse immunitaire de l'hôte.

Parmi ces enzymes :

- **Hyaluronidase** : Dégrade l'acide hyaluronique, permettant aux pathogènes de se propager dans les tissus tout en évitant d'être reconnus comme étrangers grâce à une capsule d'acide hyaluronique.
- **Collagénase** : Décompose le collagène qui soutient les tissus, facilitant l'invasion.
- **Streptokinase** : Enzyme fibrinolytique qui dissout les caillots sanguins, permettant aux pathogènes de se propager dans l'organisme.
- **Coagulase** : Provoque la coagulation de la fibrine, aidant le pathogène à se localiser dans un site spécifique, comme une plaie.
- **Hémolysines** : Lysent les globules rouges, provoquant une anémie et affaiblissant le système immunitaire de l'hôte.

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

### II.3 Anomalie dans l'expression protéique et pathologie (ex : EGF-R, p21ras et oncogènèse)

Les protéines anormales ou mal repliées peuvent s'accumuler dans les tissus, perturbant ainsi leur fonctionnement normal. Ces dépôts peuvent être intracellulaires, extracellulaires, ou les deux. Ces agrégats peuvent causer, directement ou indirectement, des anomalies tissulaires et des maladies, comme celles associées aux protéines RAS et RAF.

#### II.3.1 RAS

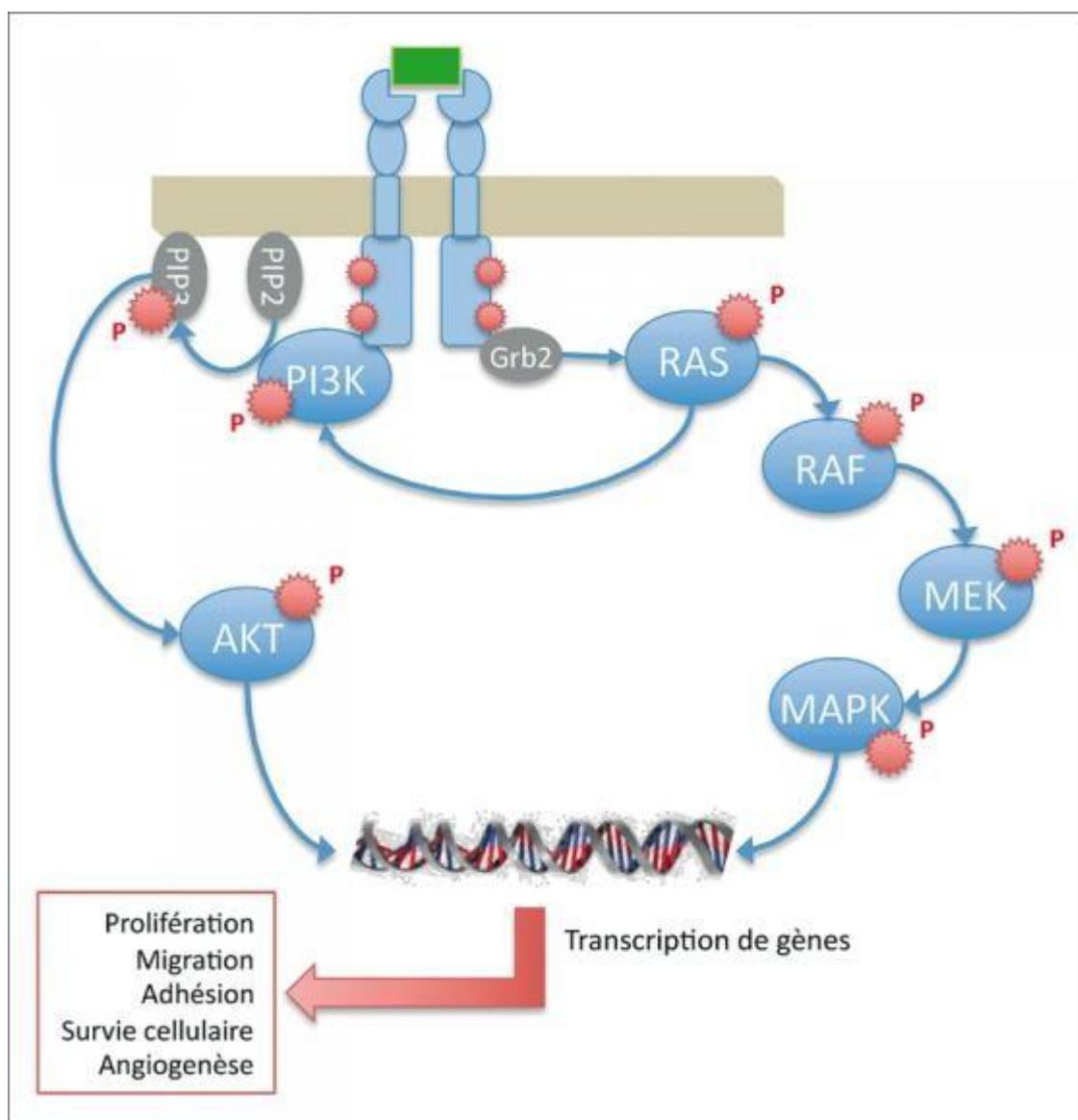
Les protéines RAS appartiennent à la famille des GTPases et se déclinent en quatre isoformes codées par trois gènes : KRAS, HRAS, et NRAS. Ces protéines sont essentielles pour la transmission des signaux extracellulaires vers le noyau, notamment ceux provenant des récepteurs membranaires comme le récepteur de l'EGF (EGF-R) (figure 33).

RAS sont des protéines cytosoliques qui doivent se transloquer sur la face interne de la membrane cellulaire pour être activées. Leur activation est principalement induite par les récepteurs à tyrosine kinase, dont l'EGF-R. Une fois activées, les protéines RAS activent les voies de signalisation en aval, entraînant des phénomènes tels que la prolifération, l'invasion et la migration cellulaires.

RAS fonctionne comme un « interrupteur » qui oscille entre un état actif et inactif. Dans son état actif, RAS recrute et active deux principales voies de signalisation de l'EGFR :

1. La voie des MAP kinases (RAS / RAF / MEK / MAPK) via la protéine RAF.
2. La voie PI3K / AKT (qui peut aussi être activée directement par l'EGFR sans l'intermédiaire de RAS).

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires



**Fig33.** Voies RAS/RAF/MAK/MAPK et PI3K/AKT.

Dans les cancers colorectal (CCR), le gène KRAS est souvent muté, avec des mutations observées dans 40 à 50 % des cas. La majorité de ces mutations (environ 40 %) se trouvent dans l'exon 2 du gène KRAS, principalement au niveau des codons 12 et 13. Moins de 10 % des mutations affectent l'exon 3 (codons 61 et 59) et l'exon 4 (codons 117 et 146). Les mutations du gène NRAS sont beaucoup plus rares, se manifestant dans environ 5 à 8 % des cas, tandis que les mutations du gène HRAS ne sont pas observées dans les CCR. En somme, environ 50 à 60 % des CCR présentent une mutation RAS.

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

Ces mutations sont des mutations faux-sens qui entraînent une forme de RAS constamment activée. Cette activation continue active les voies de signalisation en aval, stimulant ainsi la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire et l'angiogenèse.

### II.3.1.1 Facteur pronostique

Il ne semble pas que le statut mutationnel RAS ait une valeur pronostique. Cependant la question fait encore débat, les résultats d'études étant contradictoires tant dans les formes localisées que dans les formes métastatiques.

### II.3.1.2 Facteur prédictif

Depuis 2006, il a été démontré que les mutations des codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS sont associées à une résistance au cetuximab. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études et essais cliniques, conduisant à ce qu'en 2008, l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) des anti-EGFR soit conditionnée par le génotypage KRAS. Les traitements sont alors limités aux CCR sans mutations KRAS aux codons 12 et 13 de l'exon 2.

En 2013, une avancée importante a été réalisée avec la validation de l'impact prédictif d'autres mutations dans les gènes KRAS et NRAS. Des études récentes, telles que l'étude PRIME avec FOLFOX + panitumumab et l'étude FIRE-3 avec FOLFIRI + cetuximab, ont montré que les mutations supplémentaires dans KRAS (codons 61, 117, et 146) et dans NRAS (codons 12, 13, 61, 117, et 146) étaient également prédictives de l'inefficacité des traitements. Cela a conduit à une modification de l'AMM, restreignant l'indication aux CCR dits « RAS sauvages », c'est-à-dire sans mutations dans les gènes KRAS et NRAS sur les codons précités.

Un meilleur ciblage, en excluant plus de 50 % des CCR clairement résistants aux anti-EGFR, améliore les résultats thérapeutiques pour les patients sans mutations RAS, tout en limitant les effets indésirables des traitements. L'étude PRIME montre que l'ajout de panitumumab au FOLFOX pour les patients avec des CCR mutés RAS ne seulement n'améliore pas les résultats par rapport au FOLFOX seul, mais est également préjudiciable en termes de survie sans progression (10,1 mois contre 7,9 mois) et de survie globale (26 mois contre 20,2 mois). De même, l'étude FIRE-3 indique que l'association FOLFIRI-cetuximab est moins efficace que FOLFIRI-bevacizumab pour les patients avec mutations RAS.

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

### II.3.2 BRAF

Les protéines RAF, qui sont des sérine/thréonine kinases, comprennent trois isoformes codées par les gènes A-RAF, B-RAF, et C-RAF. La protéine BRAF joue un rôle crucial dans la voie de signalisation RAS / RAF / MEK / MAPK activée par le récepteur de l'EGF (EGFR). Elle est située en aval de RAS et, après activation par RAS, active MEK, qui à son tour active ERK. ERK induit l'expression de gènes liés à la prolifération et à l'apoptose.

Les mutations du gène BRAF sont présentes dans 5 à 10 % des CCR. Plus de 95 % de ces mutations sont de type transversion T > A, appelées BRAF V600E, ce qui entraîne une forme activée de la protéine BRAF. Cette mutation active la voie RAS / MAPK de manière similaire aux mutations des gènes RAS.

La mutation BRAF V600E est généralement mutuellement exclusive des mutations RAS, probablement parce que chacune de ces mutations active la même voie de signalisation. Elle est plus fréquente dans les tumeurs colorectales proximales (25 à 30 %) par rapport aux tumeurs distales (moins de 5 %) et est plus courante dans les cancers sporadiques avec instabilité microsatellite (IMS) (50-80 %) que dans les tumeurs avec stabilité microsatellite (MSS) (5-10 %).

#### II.3.2.1 Facteur pronostique

La valeur pronostique de la mutation BRAF V600E dans les CCR métastatiques est bien établie au travers de nombreuses études : elle confère à la tumeur un très mauvais pronostic, et ce quels que soient les traitements reçus. Sa présence est associée à une nette diminution de la survie globale (au moins deux fois plus de risque de décès), particulièrement pour les tumeurs MSS.

Son rôle pronostique reste plus discuté pour les formes localisées de CCR, les résultats des études ne sont pas concordants mais il pourrait être aussi un facteur de mauvais pronostic induisant une diminution de la survie sans récurrence. Il apparaît avoir un impact pronostique au moins au sein du sous-groupe des CCR localisés de phénotype IMS : sa valeur pronostique péjorative impacte la valeur pronostique favorable de IMS (cf. chapitre « Facteur pronostique de l'IMS »).

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

### II.3.2.2 Facteur prédictif

Le rôle prédictif de résistance aux anti-EGFR de mutations BRAF dans le traitement des CCR est largement suspecté par un rationnel préclinique fort et des analyses rétrospectives de séries cliniques non randomisées et non contrôlées. Néanmoins, ces données n'ont pas pu être clairement confirmées par les analyses issues des essais de phase III ayant évalué les anti-EGFR en situation métastatique, les résultats de ces différentes analyses étant discordants. Une des raisons pourrait être liée aux faibles effectifs de patients mutés au sein des études. De plus, l'impact pronostique péjoratif de cette mutation est tel qu'il « écrase » les résultats et pourrait masquer un éventuel impact prédictif. En effet, avant d'avoir une valeur prédictive potentielle de la réponse aux Ac anti-EGFR, les mutations BRAF ont surtout une valeur pronostique péjorative dans le CCR métastatique.

En pratique à l'heure actuelle, il n'y a donc pas de contre-indication de prescription des anti-EGFR en présence d'une mutation BRAF.

### II.3.2.3 Thérapies ciblées anti-BRAF

Les thérapies spécifiquement ciblées anti-BRAF (vemurafenib, dabrafenib...), utilisées en monothérapie au cours d'études de phase précoce, ont donné jusqu'à présent des résultats assez décevants dans le traitement des CCR avec mutation BRAF par rapport à ces mêmes thérapies utilisées pour le traitement des mélanomes BRAF mutés (plus de 50 % d'entre eux) où elles ont obtenu l'AMM. De même le sorafenib, thérapie multicible incluant BRAF (et anti-angiogène), a donné des résultats décevants en phase II.

Les études doivent néanmoins se poursuivre, notamment en association avec les inhibiteurs de MEK, d'EGFR ou d'AKT au vu de données précliniques et d'études de phase I encourageantes.

### II.3.2.4 Conséquences cliniques

À ce jour, il n'y a pas de recommandation de prise en charge spécifique des patients porteurs CCR métastatiques avec mutation BRAF. Notamment la prescription d'Ac anti-EGFR n'est pas contre-indiquée, contrairement aux CCR avec mutations RAS. Cependant, la connaissance de ce statut tumoral peut influencer la prise en charge en incitant à un traitement de chimiothérapie intensifiée dès la 1<sup>re</sup> ligne, compte tenu de l'agressivité de la maladie et peut-être à privilégier une trithérapie de type FOLFOXIRI. De plus, elle incite à adresser

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

précocement les patients vers des essais évaluant des thérapies ciblées anti-BRAF.

### II.4 Anomalies de tri protéiques et pathologies héréditaires (Mitochondries, lysosomes, noyau, Mitochondries)

#### II.4.1 Anomalies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont un ensemble de maladies génétiques, souvent héréditaires. On estime qu'il y a environ 200 nouveaux cas par an en France. Ces maladies peuvent impacter fortement le pronostic vital du patient, et il n'existe pas actuellement de traitement qui permette d'en guérir. Les symptômes sont très variés, ce qui rend l'identification de ces maladies difficile.

Les **maladies mitochondriales** sont un ensemble de maladies, le plus souvent **héréditaires**, caractérisées par un dysfonctionnement des mitochondries, des organites présents dans toutes les cellules. Elles possèdent leur propre génome et jouent un rôle indispensable dans le fonctionnement cellulaire puisqu'elles permettent la production d'énergie, grâce au processus de **respiration cellulaire**.

Les maladies mitochondriales sont dues à des mutations génétiques qui impactent cette production d'énergie. La compréhension des causes des maladies mitochondriales est d'autant plus complexe que le génome mitochondrial n'est pas suffisant pour assurer le bon fonctionnement des mitochondries, et que ce dernier est associé au génome de la cellule (appelé génome nucléaire car contenu dans le noyau). Ainsi les maladies mitochondriales peuvent être dues à des mutations dans le génome mitochondrial ou nucléaire.

Le diagnostic clinique des maladies mitochondriales est compliqué et les personnes atteintes vont souvent développer des **symptômes extrêmement variés impliquant différents organes ou tissus**. Cependant, les manifestations les plus typiques des maladies mitochondriales correspondent à un dysfonctionnement des mitochondries dans les tissus à forte demande énergétique, à savoir **le cœur, le cerveau et les muscles**.

Selon le nombre de mitochondries et d'organes atteints, ces pathologies peuvent se déclarer de façon très variable. Il peut s'agir de formes limitées à l'œil, comme la **neuropathie optique héréditaire de Leber**, ou de défaillances multisystémiques avec atteinte neurologique au premier plan, comme dans le **syndrome d'Alpers**. On retrouve cependant souvent une atteinte neurologique ou musculaire. La variété des symptômes fait que les patients peuvent

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

être initialement pris en charge par des médecins de nombreuses spécialités : neurologues, réanimateurs, pédiatres, généticiens, endocrinologues, diabétologues, néphrologues, cardiologues, hépato-gastro entérologues, ophtalmologistes, ORL ...

### II.4.2 Anomalies de Lysosome

Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) sont des maladies héréditaires du métabolisme regroupant environ 70 pathologies différentes dont l'incidence globale est estimée à 1 pour 5000 naissances, et un certain nombre d'entre elles présentent des anomalies cytologiques au frottis sanguin. Elles sont dues le plus souvent à un déficit en une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation de molécules complexes, ou plus rarement à une anomalie d'un transporteur, d'une protéine membranaire ou d'un cofacteur.

L'orientation clinique est essentielle à la démarche diagnostique de ces pathologies à présentation très hétérogène. Le diagnostic biologique est réalisé dans un laboratoire spécialisé : tests d'orientation par étude du métabolite accumulé dans le plasma ou l'urine, souvent par spectrométrie de masse en tandem, et/ou des mesures d'activités enzymatiques dans le sang principalement. L'analyse du gène impliqué est réalisée en confirmation du diagnostic biochimique mais elle peut être réalisée en première intention pour certaines MSL. Le diagnostic de ces maladies de transmission le plus souvent autosomique récessive permet de réaliser un conseil génétique adapté et de proposer un diagnostic prénatal pour les couples à risque. Le but du diagnostic est de pouvoir prendre en charge précocement ces pathologies pour lesquelles un traitement spécifique est parfois disponible.

### II.4.3 Noyau

Il est crucial de comprendre la signalisation dans le développement numérique et inverseur, notamment en ce qui concerne l'embryon et les morphogènes. Ces processus jouent un rôle majeur dans l'orientation des cellules, leur régénération et leur différenciation. Certains composants de ces signaux sont associés à diverses pathologies et peuvent influencer l'expression de gènes pertinents dans ces conditions.

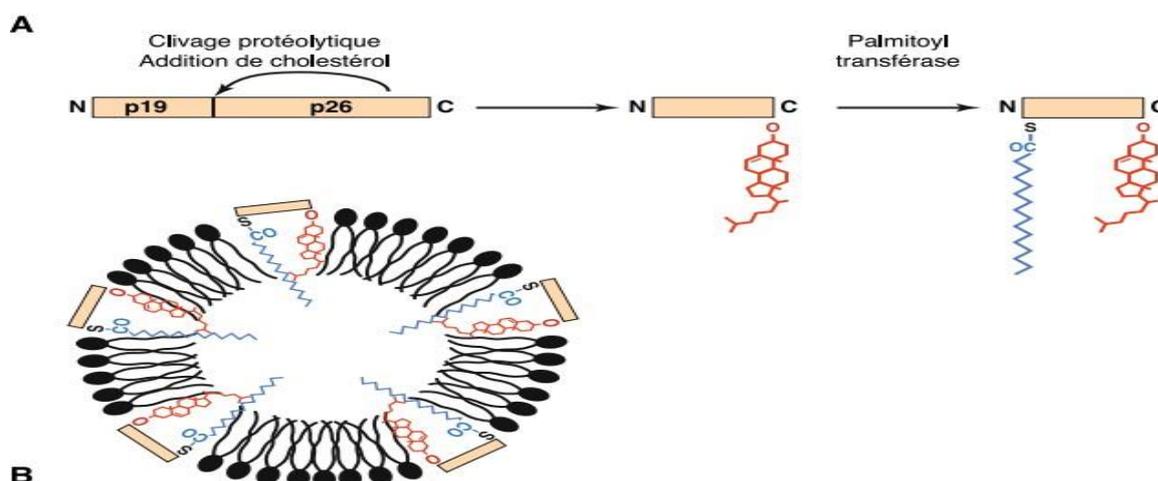
Les signaux protéiques peuvent être émis à proximité ou à distance des cellules cibles équipées de récepteurs spécifiques. Les ligands, initialement identifiés chez la drosophile et appelés Hedgehog (en référence à la forme de la larve de drosophile présentant une mutation invalidante du gène), ont également été découverts chez les mammifères. Le récepteur

## II. Chapitre 2 : Protéines membranaires

membranaire sur les cellules cibles est nommé Patched (PTCH1). Lorsque le ligand active ce récepteur, il lève l'inhibition qu'il exerce sur une autre protéine membranaire, Smoothed (SMO). Cela déclenche une cascade d'événements qui mène à l'activation des facteurs de transcription GLI (Glial cells) et à la transcription de gènes cibles.

Les protéines Hedgehog (HH) subissent des modifications post-transcriptionnelles cruciales pour leur activité. Côté C-terminal, elles sont covalamment liées à une molécule de cholestérol, tandis qu'un acide palmitique est attaché au niveau d'un résidu cystéine par une palmitoyltransférase spécifique, HHAT (Hedgehog acyltransferase) ou SKI (Skinny Hedgehog). Ces modifications hydrophobes permettent aux protéines HH de s'insérer dans la couche phospholipidique périphérique des lipoprotéines et de former des complexes multimériques.

Le mécanisme de sécrétion des ligands HH n'est pas entièrement compris, mais il implique une protéine appelée Dispatched (DISP), qui possède douze domaines transmembranaires et joue un rôle clé en tant que transporteur transmembranaire des protéines HH. DISP contient un domaine de reconnaissance des stérols, suggérant son implication dans la reconnaissance et la sécrétion des protéines Hedgehog (figure 34).



**Fig 10.** Les ligands HH et leurs modifications post-traductionnelles. A. Les protéines HH natives (45 000 Da) sont clivées de façon autocatalytique pour générer un fragment de signalisation (19 000 Da) couplé de façon covalente à une molécule de cholestérol en C- terminal. Une palmitoyltransférase HHAT ajoute ensuite un acide palmitique à une cystéine située du côté N-terminal. B. La protéine doublement substituée par un groupement lipidique est susceptible de s'insérer dans des micelles de nature phospholipidique constitutives de lipoprotéine

Chapitre 3 : Bases  
moléculaires de l'homéostasie  
cellulaire

### **III. Bases moléculaires de l'homéostasie cellulaire**

La signalisation cellulaire est le processus de communication entre les cellules, assuré par diverses molécules informatives. Ces premières molécules messagères peuvent inclure des neurotransmetteurs, des hormones, des cytokines (y compris les facteurs de croissance) et des composants de la matrice extracellulaire, selon leur localisation et leur fonction principale.

Une molécule informative est appelée premier messenger lorsqu'elle se lie à un récepteur, soit à la surface, soit à l'intérieur de la cellule. Cette interaction déclenche un "signal intracellulaire" dans la cellule porteuse du récepteur. Les récepteurs et les signaux qu'ils transmettent permettent à la cellule de maintenir une représentation symbolique de son environnement.

La conversion de la fixation du messenger en un signal intracellulaire est appelée "transduction du signal". Ce processus est essentiel pour les espèces, notamment les métazoaires comme l'Homme, où environ 20 % des gènes sont impliqués dans la transduction du signal (figure 35).

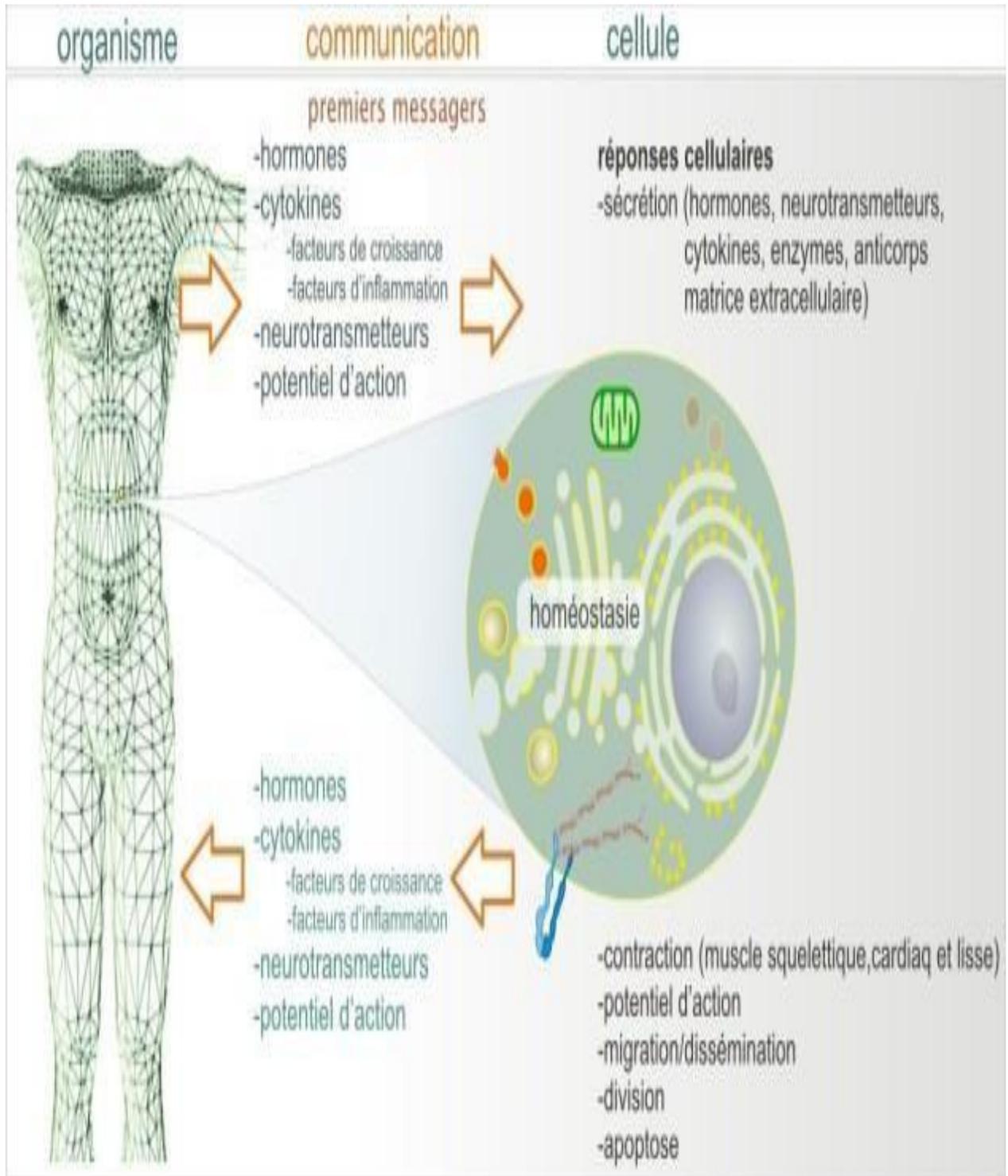
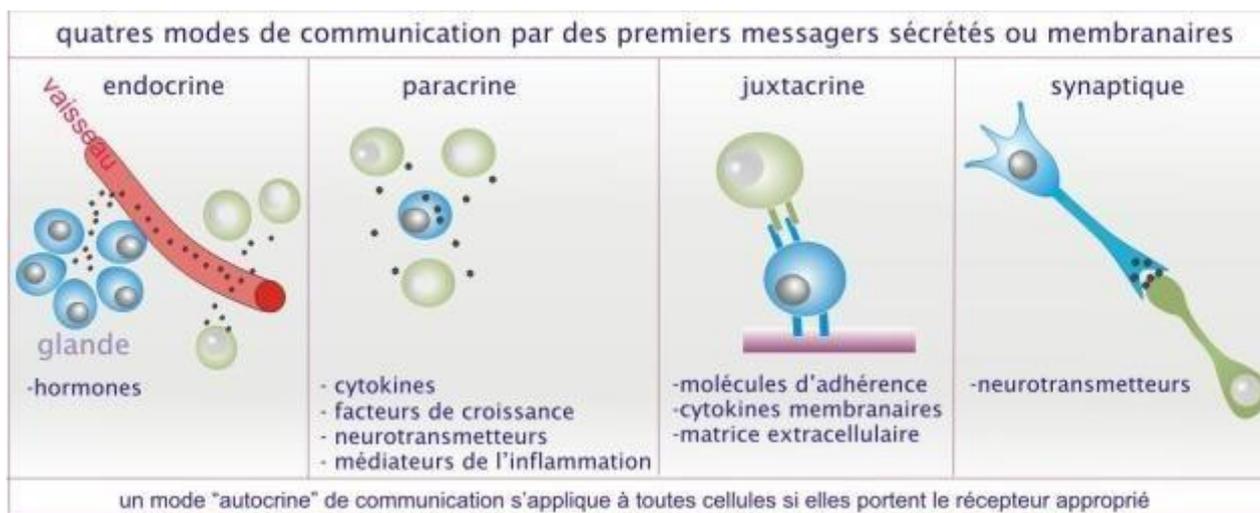


Figure 1. Flux de communication entre la cellule et l'organisme.

### III.1 Récepteurs et ligands

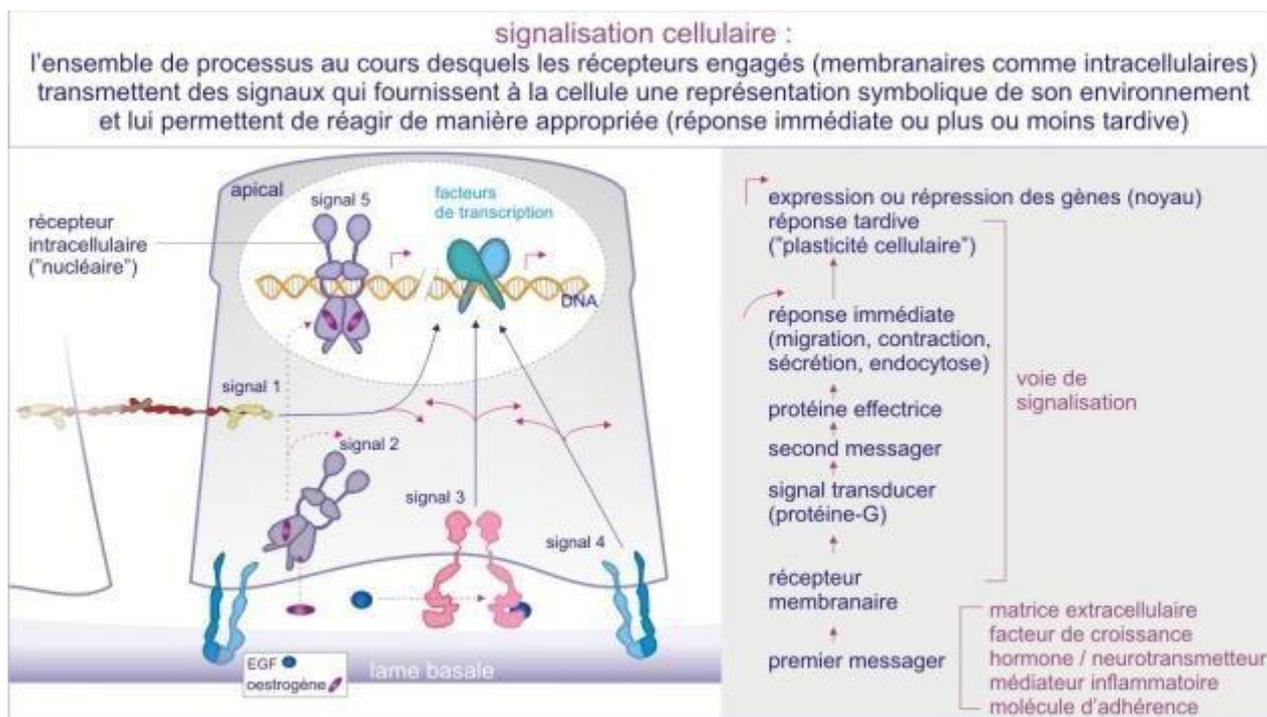
Toutes les cellules produisent des messagers, qu'elles soient spécialisées ou non. Certaines cellules, regroupées en glandes, sont particulièrement dédiées à la sécrétion endocrine. Plus fréquemment, les cellules libèrent des messagers qui agissent dans leur environnement immédiat, un processus appelé sécrétion paracrine.

La spécificité de l'action du premier messager dépend de sa concentration (gradient), de l'orientation de ce gradient, et de la présence de son récepteur sur ou dans la cellule cible. Certaines cellules peuvent ignorer un messager, même en forte concentration, si le récepteur spécifique est absent. Dans le système nerveux, la communication est plus précise, utilisant les neurotransmetteurs au niveau des synapses entre neurones ou entre un neurone et un élément effecteur (comme les jonctions neuro-musculaires et neuro-glandulaires), ce qui est connu sous le terme de communication « synaptique ». Enfin, la communication juxtacrine se produit lorsque les messagers sont liés à la membrane cellulaire ou sont des composants de la matrice extracellulaire.



**Fig 2.** Endocrine, paracrine, juxtacrine et synaptique.

La plupart des premiers messagers sont hydrosolubles et ne traversent pas la membrane plasmique, leurs récepteurs étant donc situés à la surface de la cellule. En revanche, certaines hormones lipophiles, comme les stéroïdes, rétinoïdes et hormones thyroïdiennes, peuvent traverser la membrane et possèdent des récepteurs intracellulaires, appelés « récepteurs nucléaires ». De plus, le monoxyde d'azote (NO), un messager récemment découvert, traverse également la membrane et se fixe à une enzyme intracellulaire, provoquant des effets tels que la relaxation des muscles lisses des vaisseaux, entraînant ainsi une vasodilatation (figure 36).



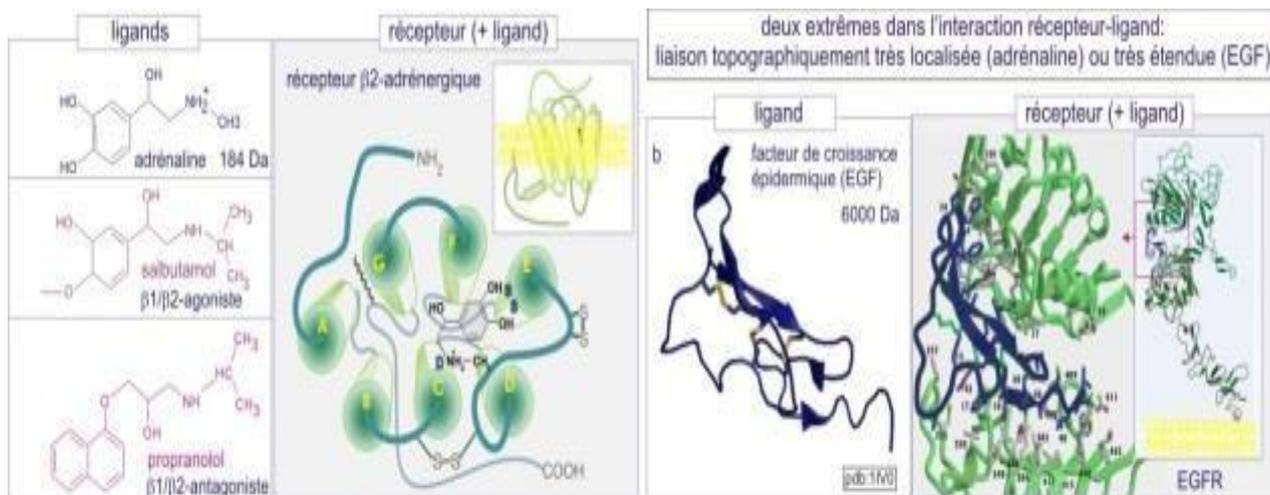
**Fig 3.** Les récepteurs membranaires et intracellulaires.

Les premiers messagers semblent également nombreux mais ne sont pas toujours de nature protéique. Ils peuvent avoir plusieurs récepteurs différents, si bien que les récepteurs sont beaucoup plus nombreux que les premiers messagers. Un bon exemple est fourni par l'amine biogène sérotonine (5-HT) pour laquelle on a identifié à ce jour 13 récepteurs. On reconnaît environ 200 protéines qualifiées de facteurs de croissance, une centaine de molécules possédant le statut de neurotransmetteur (ou neuromodulateur), quelques dizaines d'hormones et quelques dizaines de cytokines.

### III.1.1 Récepteurs et leurs ligands

Un ligand est une molécule qui se fixe de manière spécifique et saturable sur son récepteur. Il peut s'agir de diverses molécules endogènes, allant d'acides aminés simples à des protéines complexes, ainsi que de substances naturelles ou synthétiques (exogènes) interagissant avec le même récepteur. Les substances qui imitent l'action du ligand endogène sont appelées « agonistes », tandis que celles qui n'ont aucun effet mais bloquent la fixation du ligand endogène sont appelées « antagonistes ».

Les agonistes et antagonistes sont essentiels en pharmacologie et ont transformé le traitement de maladies chroniques graves. Par exemple, l'agoniste du récepteur 2-adrénergique est utilisé pour traiter la bronchoconstriction (comme dans l'asthme), et l'antagoniste du récepteur 1/2-adrénergique est également un bon exemple de leur application (figure 38).



**Fig 4.** Les récepteurs et leurs ligands, deux extrêmes dans l'interaction récepteur-ligand : liaison topographiquement très localisée, adrénaline, taille d'environ un acide aminé (pareil pour salbutamol (son agoniste) ou propranolol (son antagoniste)) ou très étendue, le facteur de croissance épidermique (EGF, protéine d'environ 53 acides aminés). Adrénaline, insuline, PAF, peptides bactériens, phorbol esters, facteurs de croissance, mitogènes.

### III.1.1.1 Adrénaline

Les hormones, substances sécrétées par des glandes, sont transportées par le flux sanguin de leur organe de production vers l'organe cible, où elles exercent leur effet. Elles sont généralement libérées en petites quantités par des glandes éloignées de leurs cibles, se diluant dans la circulation sanguine et étant exposées à des enzymes lytiques. La plupart des hormones circulent associées à des protéines porteuses, ce qui les protège mais réduit leur efficacité biologique. En raison de leur faible concentration au niveau de l'organe cible, les récepteurs doivent avoir une très haute affinité pour leur ligand, et les cellules expriment souvent ces récepteurs en excès. Les hormones hydrosolubles, par exemple, sont listées comme premiers messagers

- Endocrine implique "action à distance" d'une hormone qui se répand dans l'organisme entier à la rencontre des cibles tissulaires spécifiques
- Paracrine implique l'action à très courte distance d'un premier messager libéré par une cellule du voisinage.

Quand le premier messager agit sur la cellule qui l'a produit on utilise le terme autocrine (constituant souvent une boucle de rétrocontrôle).

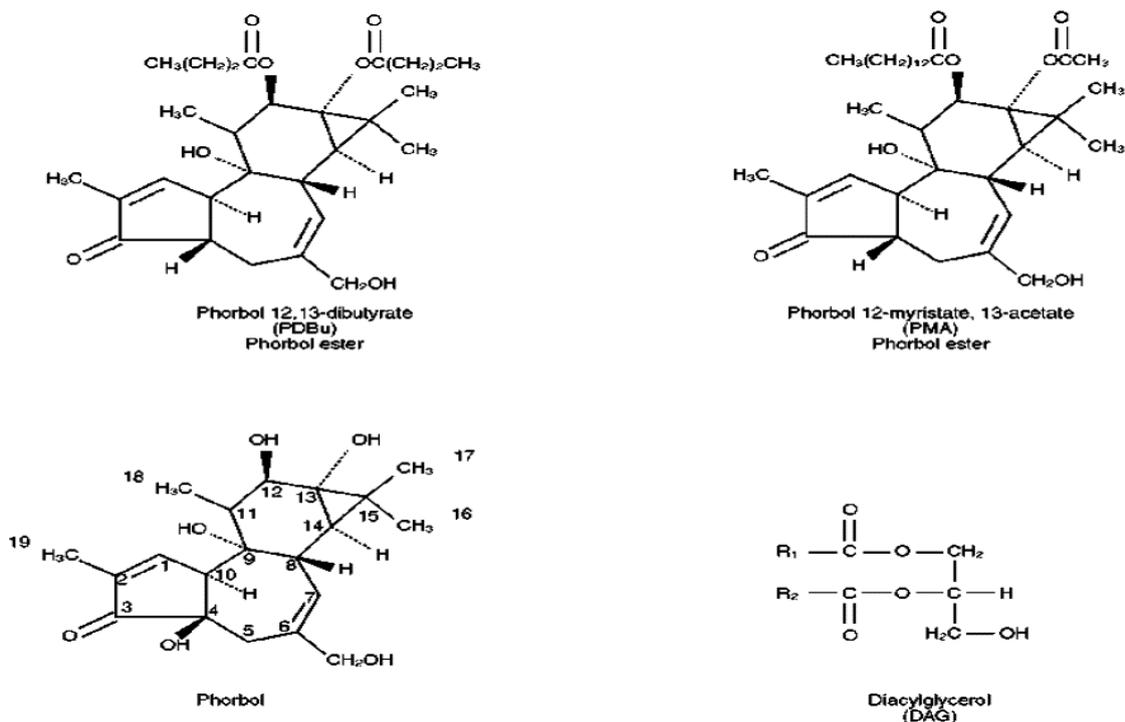
### III.1.1.2 Insuline

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans dans le pancréas, ainsi que dans les corps de Brockmann de certains poissons téléostéens. Elle joue un rôle crucial dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines en facilitant l'absorption du glucose sanguin par les cellules adipeuses, les cellules hépatiques et les cellules des muscles squelettiques. Le glucose absorbé est ensuite converti en glycogène ou en triglycérides, ou les deux, dans le foie. Un taux élevé d'insuline dans le sang limite fortement la libération de glucose par le foie. Avec le glucagon, l'insuline est essentielle à la régulation des substrats énergétiques, dont les principaux sont le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. Chez les mammifères, l'insuline est la principale hormone régulatrice, son absence étant fatale en quelques mois. En revanche, chez certaines espèces, comme les oiseaux, le glucagon joue un rôle prépondérant.

### III.1.1.3 Peptides bactériens

Les peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs) sont des molécules clés dans la défense des organismes multicellulaires. Ce sont des peptides amphiphiles et cationiques, de 12 à 50 acides aminés, avec une grande variété de structures. Leur large spectre d'action, ainsi que leurs propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices, les rendent prometteurs en infectiologie. Contrairement aux antibiotiques, leur efficacité n'est pas affectée par les mécanismes de résistance bactérienne. Cependant, leur développement est limité par leur coût de production élevé et leur courte demi-vie, ainsi que par le besoin d'études supplémentaires sur leur innocuité et résistance.

Les esters de phorbol, dérivés de plantes de la famille des Euphorbiacées, ont suscité un grand intérêt en raison de leur puissante activité de promotion des tumeurs cutanées chez la souris. Ils influencent divers systèmes biologiques, affectant la différenciation cellulaire, le mimétisme cellulaire, la stimulation des réponses sécrétoires et les activités membranaires. Les études ont révélé que ces esters se lient à des récepteurs spécifiques, identifiés comme la protéine kinase C (PKC). Les esters de phorbol, tels que le PDBu et le PMA, stimulent l'activité de la PKC, et leur activité enzymatique se copurifie avec celle de la PKC (figure 39).



**Fig 39.** Structure du phorbol, des esters de phorbol et du diacylglycérol. Le phorbol, la molécule mère non tumorigène des esters de phorbol, est représenté avec des atomes de carbone numérotés dans le format standard. La propriété tumorigène des esters de phorbol est associée à l'ajout de fragments hydrophobes aux carbones 12 et 13, formant ainsi des molécules de structure similaire au diacylglycérol, un activateur naturel de la protéine kinase C.

### III.1.1.4 Facteurs de croissance

Les premiers travaux sur la culture de tissus biologiques *in vitro*, initiés par Alexis Carrel en 1912, ont montré la possibilité de maintenir des fragments de tissus vivants. Toutefois, la culture de cellules individuelles ne s'est répandue qu'à partir des années 1950. Le succès de ces cultures dépend de la composition du milieu, qui doit contenir des nutriments (glucides, acides aminés, acides gras, vitamines) dissous dans une solution saline tamponnée. Le sérum sanguin, souvent d'origine foétale bovine, est crucial, car sans lui, la prolifération cellulaire est compromise.

Le sérum est obtenu par coagulation du sang, où les plaquettes et le fibrinogène forment un réseau de fibrine qui piège les éléments sanguins et crée un caillot. Ce processus libère des facteurs de croissance comme le PDGF (platelet-derived growth factor), essentiels pour la culture cellulaire. Le plasma, obtenu après centrifugation, est moins efficace car il contient moins de ces facteurs.

Les facteurs de croissance, comme le PDGF, sont des premiers messagers variés en taille et en fonction, allant de 5,7 kDa pour l'insuline à 78 kDa pour la transferrine. Ils se lient à des récepteurs spécifiques sur les cellules et jouent des rôles importants au-delà de la simple croissance, incluant la différenciation, la migration et l'apoptose.

### III.1.1.5 . Cytokines

Parallèlement à la découverte des facteurs de croissance, plusieurs autres premiers messagers furent identifiés pour leur interaction avec les cellules du système immunitaire. Parce qu'ils activent ou modulent les propriétés prolifératives de ces types de cellules, ils furent d'abord dénommés « immunocytokines ». Mais, quand il apparut qu'ils agissaient également en dehors de ce contexte (immunité et inflammation), on les appela plus simplement « cytokines ». Exemples de cytokines : les interférons, les TNFs (TNF, TNF $\alpha$ , FASL etc), les nombreuses interleukines (IL-1, 2b etc), les facteurs de stimulation des colonies hématopoïétiques (CSF) et les nombreuses chimiokines (facteurs qui recrutent les leucocytes aux sites d'inflammation. On peut dire que la distinction entre facteur de croissance et cytokine est arbitraire (voir excursion « nomenclature »). TNF $\alpha$ , cytokine typique, est par exemple également qualifié de facteur de croissance.

### III.1.1.6 Agents vasoactifs

Le dommage tissulaire mécanique ou causé par un agent infectieux, déclenche une réponse inflammatoire. C'est un mécanisme de défense dans lequel des cellules spécialisées (surtout les leucocytes) sont recrutées sur le site et agissent de façon concertée pour éliminer l'agent infectieux et initier la réparation des dommages tissulaires. Le processus est complexe, impliquant de nombreuses interactions entre les cellules et de nombreux premiers messagers. Parmi les molécules impliquées on trouve : 1) les cytokines dites « inflammatoires » (responsables de l'expression et de l'activation de molécules d'adhérence et de production d'autres cytokines) ; 2) les chimiokines (pour recruter les leucocytes) et 3) les agents vasoactifs.

Ces derniers jouent un rôle vasodilatateur, qui d'une part augmente localement le volume du sang (et facilite donc l'accumulation des leucocytes) et d'autre part augmente la perméabilité vasculaire (et facilite l'entrée du plasma dans le tissu). On peut citer : l'histamine (libérée par les mastocytes et les basophiles), la sérotonine (libérée par les plaquettes), la bradykinine (libérée à partir d'un précurseur présent dans le plasma) et la famille des eicosanoïdes. Les eicosanoïdes dérivent tous d'un acide gras polyinsaturé, l'acide arachidonique (5, 8, 11, 14 acide eicosatétraenoïque). Le nom générique « eicosanoïdes » vient du fait qu'ils possèdent 20 atomes de carbone. Cette famille comprend les

prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes. Les eicosanoïdes agissent à courte distance (donc sur un mode auto- ou paracrine) et sont responsables des symptômes apparents de l'inflammation : rubor, calor, dolor et tumor. L'action anti-inflammatoire et anti- douleur de l'aspirine s'explique par le fait que cette substance inhibe une enzyme clé (cycloxygénase) de la voie de synthèse des prostaglandines (figure 40).

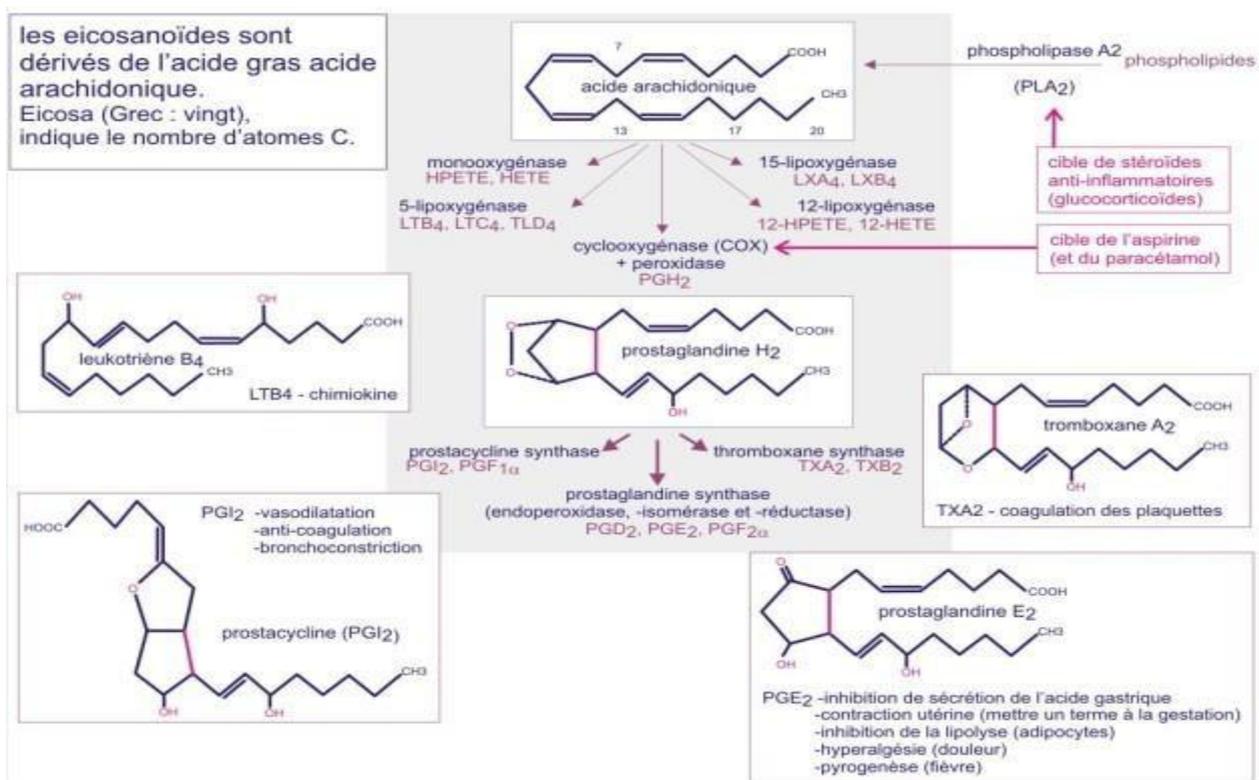


Fig 5. Acide arachidonique et les eicosanoïdes.

### III.1.1.7 Protéines kinases activées par les mitogènes

Les MAPK jouent un rôle crucial dans les voies de signalisation cellulaire. Elles sont activées par divers stimuli et participent à un large éventail de fonctions cellulaires, tant physiologiques que pathologiques. La voie MAPK constitue une cascade de signalisation reliant les signaux de croissance et de différenciation à l'expression génique. Les récepteurs des facteurs de croissance et les tyrosine kinases activent Ras, qui à son tour déclenche l'activation de c-Raf, de MEK (protéine kinase activée par les mitogènes) et de MAPK. Une fois activée, la MAPK p44/42 migre vers le noyau, où elle favorise la transcription en phosphorylant des kinases comme p90 RSK (kinase ribosomale), MSK (protéine kinase activée par les mitogènes et le stress), ainsi que des facteurs de transcription tels que ELK1 (facteur de transcription de type ETS) et STAT3.

Les voies MAPK, qui sont en constante évolution, se composent de quatre groupes principaux et de nombreuses protéines apparentées formant des cascades interdépendantes. Ces cascades sont activées par divers stimuli, tels que les facteurs de croissance, le stress, les cytokines et l'inflammation. Les quatre principaux groupes sont les cascades ERK, JNK ou SAPK (protéine kinase activée par le stress) et les cascades Big MAPK ou ERK5. Les signaux provenant de récepteurs de surface cellulaire, comme les GPCR et les récepteurs des facteurs de croissance, sont transmis à travers plusieurs protéines kinases, souvent via des petites protéines G comme Ras et Rac.

Le module MAPK assure la transmission du signal entre les récepteurs tyrosine-kinase activés et la signalisation nucléaire. L'activation de MAPK (ERK) est impliquée dans les effets tumorigènes de certaines hormones, agissant comme un pont entre les événements primaires et la signalisation en aval. La voie MAPK est ainsi considérée comme un réseau clé pour détecter les molécules impliquées dans la transformation tumorale, faisant d'elle une cible thérapeutique prometteuse, plusieurs inhibiteurs ayant montré un potentiel dans le traitement de certains sous-types de tumeurs hypophysaires (figure 41).

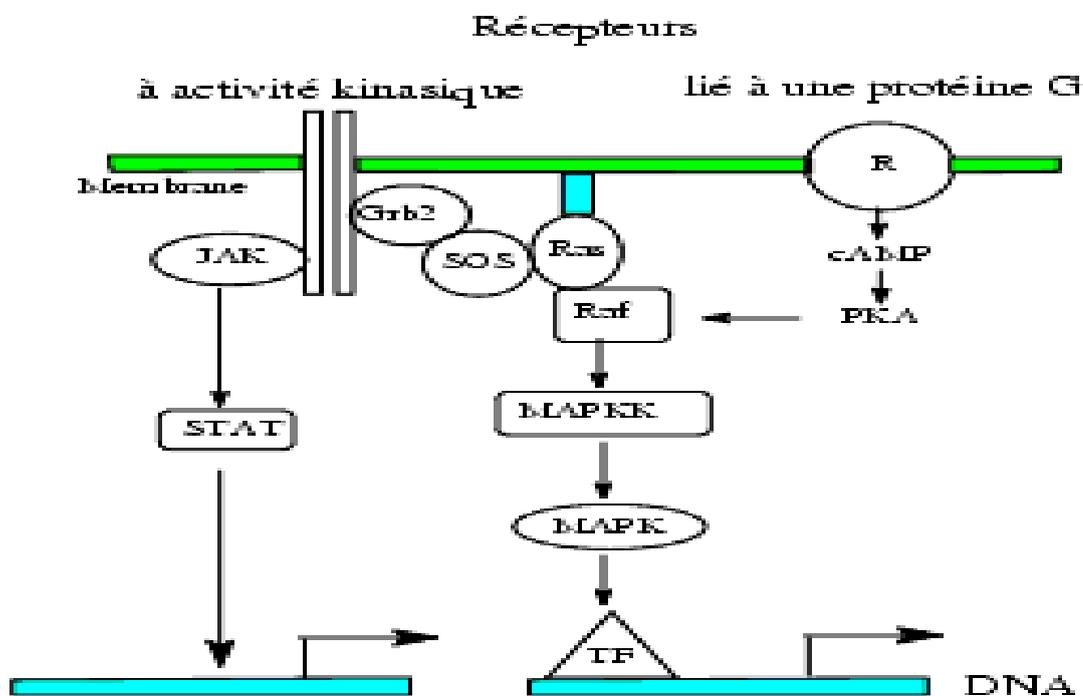


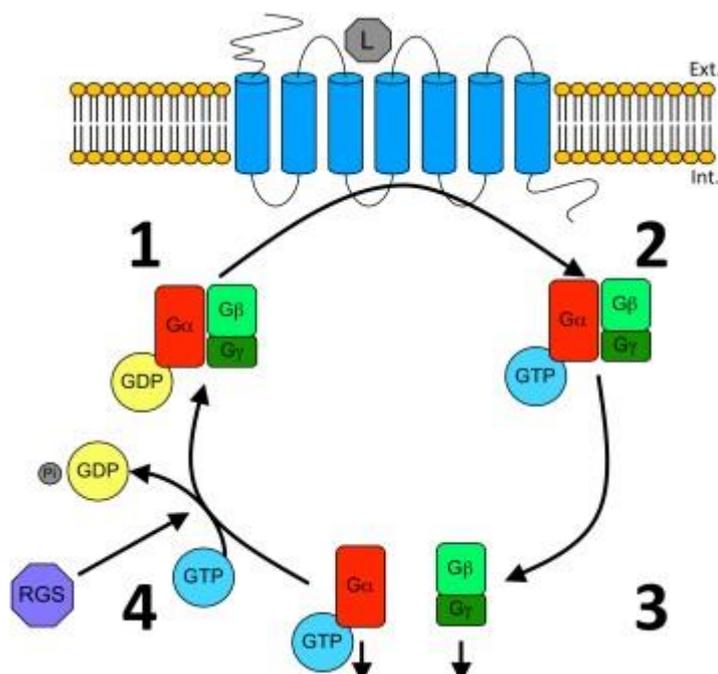
Fig 41. Voies de signalisation STAT et MAPK

## III.2 Transducteurs et Facteurs de couplage

La communication entre les cellules dans les organismes multicellulaires est cruciale car elle permet aux cellules de synchroniser leurs actions. Cette communication est généralement médiée par des molécules messagères extracellulaires, telles que les hormones, les facteurs de croissance et de différenciation, les interleukines et les neurotransmetteurs. Ces messagers extracellulaires sont principalement détectés par des récepteurs situés à la surface des cellules réceptrices. La transduction du signal est le mécanisme par lequel la liaison d'un messager extracellulaire à un récepteur de surface cellulaire induit des modifications biochimiques, cellulaires et génétiques qui permettent à la cellule de répondre aux informations reçues.

### III.2.1 Cycle d'activation des protéines G trimériques G

Une fois qu'un ligand s'est lié à son récepteur, le RCPG va subir des modifications conformationnelles conduisant notamment à l'activation d'une protéine, la protéine G. Une fois activée, la protéine G va transmettre le signal véhiculé par le ligand en déclenchant une cascade d'activation protéique au sein de la cellule, aboutissant le plus souvent à la transcription de gènes (figure42).



**Fig 6.** Cycle d'activation de la protéine G hétérotrimérique. Au repos, le cycle catalytique de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G hétérotrimérique est occupé par une molécule de GDP (1). L'activation du récepteur par la fixation d'un ligand (L), conduit au recrutement de la protéine G par le RCPG, amenant une baisse d'affinité de la protéine G pour le GDP au profit du GTP (2). S'en suit la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  et du complexe  $\beta/\gamma$  permettant l'activation d'effecteurs intracellulaires (3). Le retour à l'état de repos de la protéine G est assuré par l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  (4). En accélérant l'hydrolyse du GTP, les RGS permettent la régulation de l'activité des RCPG.

### III.2.2 Activation des effecteurs intracellulaires par les protéines G

Les protéines G n'ont pas un rôle direct dans la régulation des fonctions cellulaires. Cependant, elles sont essentielles pour la transduction du signal déclenchée par la liaison d'un ligand à un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), en activant divers effecteurs intracellulaires. La grande variété de sous-unités  $\alpha$ , le nombre théorique de combinaisons trimériques et les nombreux effecteurs intracellulaires des protéines G contribuent à expliquer la diversité, l'implication et la spécificité des RCPG dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

#### III.2.2.1 Effecteurs de la sous-unités $\alpha$ Les adénylates cyclases (AC)

Cet effecteur est une enzyme qui catalyse la production d'AMP cyclique (AMPc) à partir d'ATP en formant une liaison phosphodiester. Cette réaction nécessite la présence de magnésium et entraîne la libération de pyrophosphate. Une fois généré, l'AMPc active principalement les protéines kinases A (PKA). Les adénylate cyclases (AC) sont activées par les sous-unités  $\alpha_s$  et  $\alpha_{olf}$  et inhibées par la sous-unité  $\alpha_i$ .

#### III.2.2.2 Les phosphodiesterases (PDE) :

Ces enzymes, présentes dans les cellules de la rétine et dans les cellules gustatives, hydrolysent les liaisons phosphodiesters. Elles permettent donc l'hydrolyse de l'AMP cyclique (AMPc) et du guanosine monophosphate cyclique (GMPc). En convertissant l'AMPc en AMP, les phosphodiesterases (PDE) inhibent l'action des adénylate cyclases. Le GMPc, quant à lui, a pour fonction de maintenir les canaux  $\text{Na}^+$  ouverts. Son hydrolyse entraîne la fermeture de ces canaux, ce qui conduit à une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Les PDE sont activées par les sous-unités  $\alpha_{t1}$ ,  $\alpha_{t2}$  et  $\alpha_{gust}$ .

#### III.2.2.3 Les phospholipases C $\beta$ (PLC)

L'activation des PLC vont conduire à la transformation du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG est un activateur de la protéine kinase C qui catalyse, en présence de calcium, la phosphorylation de nombreux substrats intervenant dans la différenciation cellulaire, la mitose ou l'exocytose entre autres. L'IP<sub>3</sub> lui va provoquer la libération des stocks de calcium intracellulaire en activant les canaux calciques du réticulum endoplasmique. Les PLC sont activées par les sous-unités  $\alpha$  de la famille Gq.

#### III.2.2.4 Canaux ioniques

Certains canaux sélectifs au sodium, au calcium ou au chlore peuvent être activés par la sous-

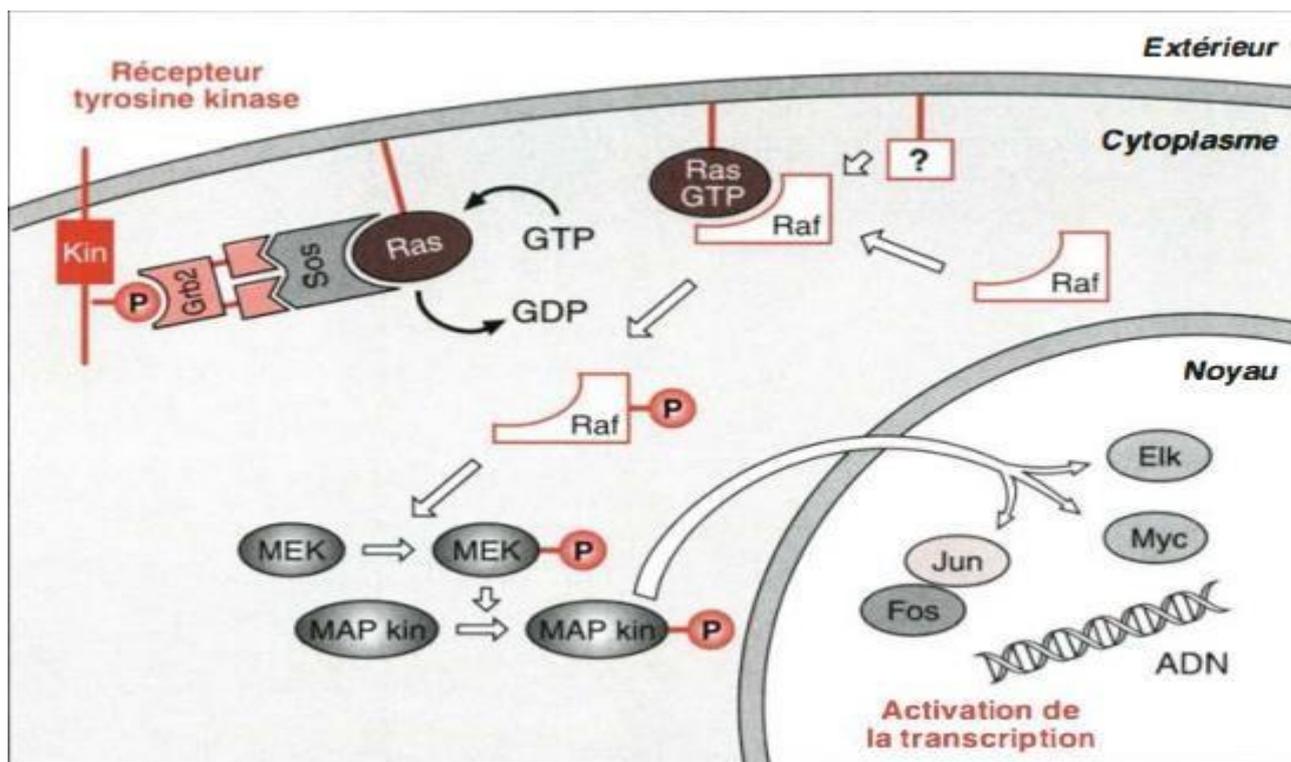
unité  $\alpha$ s et inhibé par les sous-unités  $\alpha$ i et  $\alpha$ o alors que les canaux potassiques  $KM$  et  $KAch$  sont activés par les sous-unités  $\alpha$ i et  $\alpha$ o. Les petites protéines G monomériques : Ce sont de petites protéines homologues de la 37 sous-unité  $\alpha$  des protéines G, qui ont la capacité de se lier au GTP. Ces protéines sont des régulateurs de la signalisation des RCPG car elles sont capables d'hydrolyser le GTP à l'aide des protéines GAP (GTPase-Activating Proteins), favorisant ainsi le re-formation du trimère  $\alpha/\beta/\gamma$ . Bien qu'elles puissent fonctionner de manière totalement indépendante, elles peuvent être activées par les sous-unités  $\alpha$ 12 et  $\alpha$ 13.

### III.2.2.5 Cycle d'activation des protéines monomériques (ras)

Dans les cellules au repos, la majorité des protéines Ras sont associées au GDP (plus de 90 %). La stimulation par des facteurs de croissance comme l'EGF, le PDGF, le NGF, l'insuline, l'IL2, l'IL3 et le GM-CSF, ou par le récepteur des cellules T, entraîne une augmentation de la forme liée au GTP (entre 20 % et 50 % de Ras-GTP, selon les conditions). Cette activation est due à une stimulation du facteur d'échange de Ras. Une fois activé, Ras active la cascade Raf/MAP kinase, reliant les récepteurs tyrosine kinase au noyau.

Lorsque l'EGF se fixe à son récepteur, cela provoque la dimérisation et la transphosphorylation du récepteur sur plusieurs tyrosines. Une tyrosine phosphorylée est reconnue par le domaine SH2 de Grb2, entraînant la formation du complexe Grb2/Sos près de Ras sous la membrane plasmique. Sos favorise alors l'échange GDP-GTP sur Ras. Ras-GTP active Raf, qui est ensuite activé par une autre protéine associée à la membrane. Raf phosphoryle MEK, qui phosphoryle à son tour la MAP kinase.

La MAP kinase phosphorylée entre dans le noyau et phosphoryle des facteurs de transcription comme Elk-1 et/ou Sap-1, qui régulent la transcription du gène c-fos et d'autres gènes précoces du cycle cellulaire. La protéine c-Fos, formant un complexe avec c-Jun, stimule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la division cellulaire. La MAP kinase peut également directement réguler l'activité de c-Jun, Mye et d'autres facteurs de transcription par phosphorylation. En résumé : récepteur tyrosine kinase  $\rightarrow$  Grb2/Sos  $\rightarrow$  Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK  $\rightarrow$  MAP kinase  $\rightarrow$  Elk-1 et facteurs de transcription (figure 43).



**Fig 43.** Rôle de Ras dans la transmission des signaux mitogènes. La fixation du facteur de croissance provoque la phosphorylation de son récepteur (tyrosine kinase) sur de nombreux résidus tyrosine. Une des tyrosines phosphorylées du récepteur activé est spécifiquement reconnue par le domaine SH2 de Grb2, le complexe Grb2/Sos se retrouve donc à proximité de Ras sous la membrane plasmique, ce qui permet à Sos de promouvoir l'échange GDP - GTP sur Ras. Ras-GTP permet à son tour de transloquer >> Raf sous la membrane plasmique, où une autre kinase comme la PKCa ou Src pourrait contribuer à l'activer. Après activation, Raf peut phosphoryler MEK (MAP kinase kinase), qui à son tour phosphoryle la MAP kinase. Cette MAP kinase phosphorylée peut ensuite pénétrer dans le noyau et phosphoryler des facteurs de transcription comme Elk (appartenant à la famille Ets), Jun ou Myc qui contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la division cellulaire.

### III.2.2.6 Adaptateurs Grb2/Sos (domaines SH2, SH3)

Grb2 est l'une des protéines adaptatrices les mieux caractérisées. Elle possède un domaine SH2 entouré de deux domaines SH3, ce qui lui permet d'interagir avec des protéines phosphorylées en tyrosine via son domaine SH2 et avec des protéines riches en proline via ses domaines SH3. Grb2 peut se lier aux sites d'autophosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres protéines adaptatrices phosphorylées en tyrosine, comme Shc ou la phosphatase SHP-2.

Shc, un autre adaptateur avec un domaine SH2 et un domaine PTB pour les séquences phosphorylées en tyrosine, se phosphoryle en réponse aux facteurs de croissance comme le PDGF, ce qui permet la liaison de Grb2. La phosphatase SHP-2, qui possède deux domaines SH2, est également phosphorylée en tyrosine en réponse au PDGF.

D'autres membres de la famille Grb2, comme Grap et Gads, possèdent des domaines SH2 avec une spécificité de liaison similaire à celle de Grb2, mais leurs domaines SH3 ont des effecteurs différents.

Grb2 est associée de manière constitutive à Sos, le facteur d'échange de la petite protéine GTPasique Ras. Ce complexe Grb2/Sos se lie aux sites d'autophosphorylation des récepteurs aux facteurs de croissance, comme le récepteur à l'EGF, et catalyse l'échange GDP-GTP sur Ras. La forme Ras-GTP active plusieurs effecteurs, dont la kinase Raf et la PI3-K, et déclenche la voie MAP kinase, transmettant le signal au noyau. Cette cascade de signalisation conduit à des réponses cellulaires telles que la prolifération ou la différenciation.

### III.2.3 Protéines scaffolds

Les protéines d'échafaudage jouent un rôle essentiel en fournissant une plateforme pour l'assemblage des molécules de signalisation, en favorisant leur localisation spécifique et en régulant les signaux de rétroaction pour moduler les voies de signalisation. Plusieurs protéines d'échafaudage ont été identifiées dans la régulation des voies JNK et de leurs activateurs en amont.

Dans les cellules de mélanome, la filamine agit comme une protéine d'échafaudage en interagissant avec SEK1 en réponse au TNF- $\alpha$ . La protéine POSH (avec de nombreux domaines SH3) facilite l'activation de la voie JNK en interagissant directement avec RAC1 lié au GTP et en recrutant séquentiellement RAC1, MLK, SEK1, MKK7 et JNK. Les protéines JIP1 (JNK-interacting protein 1) et JIP3 recrutent divers activateurs et JNK. JIP1 recrute DLK, MKK7 et JNK pour former un complexe, tandis que JIP3 se lie à SEK1 et MEKK1 pour activer JNK3.

La  $\beta$ -Arrestin-2 contient un site d'accueil pour les MAP kinases et joue un rôle crucial dans l'activation de JNK3 en reliant ASK1, SEK1 et JNK3. Crk II active HPK1 et recrute JNK1 dans un complexe multiprotéique, dépendant de SEK1. DUSP19 (phosphatase 19 à double spécificité) est une phosphatase MAPK (MKP) identifiée comme protéine d'échafaudage, interagissant avec MKK7 pour réguler JNK indirectement. DUSP22 a également été identifié comme un MKP interagissant avec ASK1, MKK7 et JNK1 pour favoriser l'activation de JNK.

Dans les neurones, GRASP-1 (protéine associée à GRIP1) se lie à JNK1 et MEKK1. Après clivage par la caspase-3, le domaine C-terminal de GRASP1 favorise l'activation de JNK. En réponse au stress génotoxique, RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) active JNK1 et MTK1, tandis que WDR62 (domaine de répétition WD 62) est impliqué dans l'activation non canonique de JNK. D'autres protéines d'échafaudage participent également à l'activation des voies p38 et ERK, mais les mécanismes précis de cette régulation nécessitent encore des éclaircissements.

### III.3 Amplification du signal et seconds messagers

#### III.3.1 Cascade phospholipases C et D/DAG/IP3/Ca<sup>2+</sup> (cellule cardiaque)

Les ligands hydrophiles, qui ne traversent pas la membrane cellulaire, transmettent leur message par l'intermédiaire de seconds messagers à l'intérieur de la cellule. Plusieurs voies de seconds messagers existent, chacune ayant un mécanisme spécifique de transmission de l'information.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent activer les voies des seconds messagers du phosphoinositol et de l'AMP cyclique (AMPc). Dans la voie du phosphoinositol, l'activation du récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C, qui hydrolyse le biphosphate de phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) en deux seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG active la protéine kinase C (PKC), tandis que l'IP<sub>3</sub> provoque l'ouverture des canaux d'ions calcium sur le réticulum endoplasmique, libérant du calcium dans le cytoplasme.

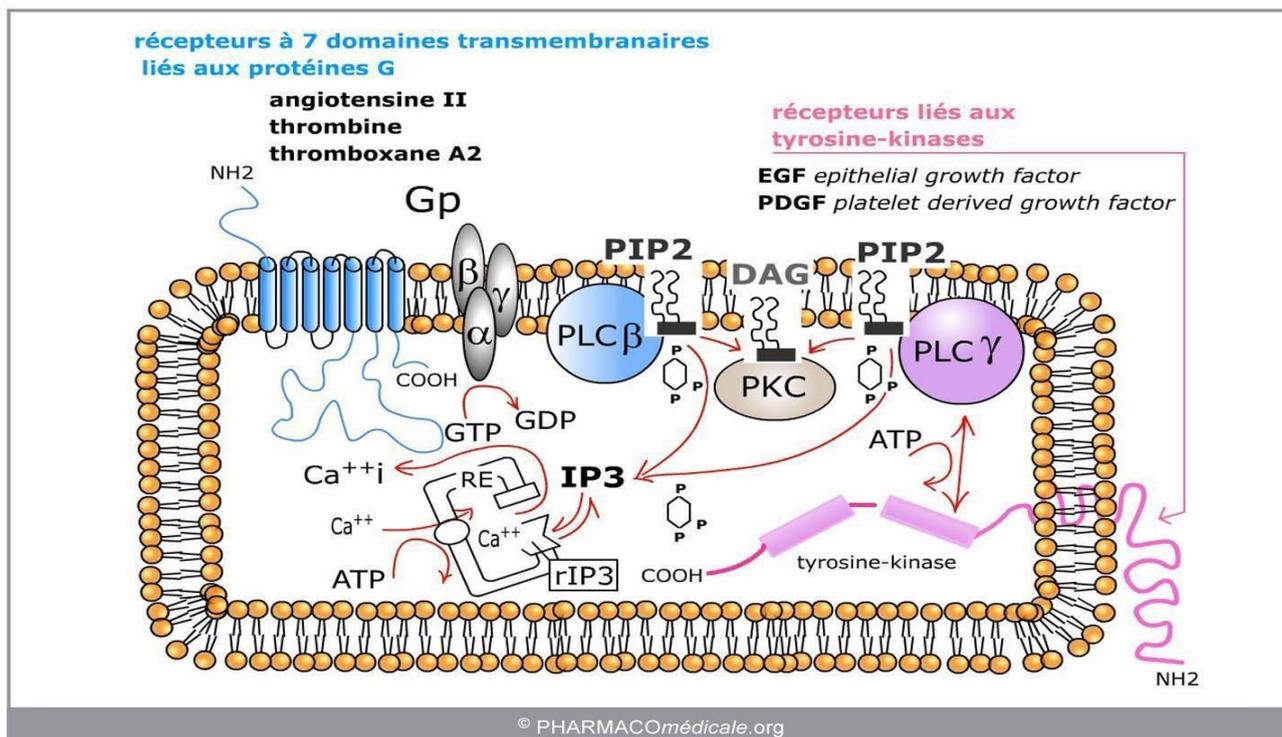
Dans la voie de l'AMPc, le récepteur activé stimule l'adénylate cyclase, qui produit de l'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), ouvre les canaux d'ions calcium et initie l'enzyme Epac. La guanosine monophosphate cyclique (GMPc) est un autre second messenger, produit par la guanylyl cyclase à partir du GTP. La GMPc active la protéine kinase G (PKG), qui a des fonctions similaires à celles de la PKA mais est exprimée principalement dans les tissus vasculaires, les poumons et le cerveau.

Le triphosphate de phosphatidylinositol (PIP<sub>3</sub>), dérivé de la phosphorylation du PIP<sub>2</sub>, est un second messenger activé par les récepteurs de tyrosine kinase (RTK) en réponse aux facteurs de croissance. Le PIP<sub>3</sub> recrute Akt (ou protéine kinase B) à la membrane, impliquée dans la régulation des voies de survie cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose et la migration.

Dans les cellules myocardiques, un agoniste  $\beta$ -adrénergique active l'adénylate cyclase via une protéine G hétérotrimérique, augmentant l'AMPc, ce qui entraîne la phosphorylation active de la PKA.

Cette activation modifie l'activité des canaux calciques voltage-dépendants, augmentant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et provoquant la contraction myocardique. En revanche, dans le muscle lisse, l'augmentation de l'AMPc due à un agoniste  $\beta$ -adrénergique entraîne la phosphorylation et l'inactivation de la myosin light chain kinase (MLCK), empêchant la phosphorylation de la myosine et inhibant l'interaction actine-myosine, ce qui entraîne la relaxation musculaire lisse (figure44).

### ➤ Récepteurs couplés à la phospholipase C



**Fig 44 :** Récepteurs couplés à la phospholipase C et seconds messagers

Lorsqu'un agoniste tel que l'angiotensine II ou la thrombine se lie à son récepteur à 7 domaines transmembranaires (7 TM), il active la phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) via les protéines G $\alpha\beta\gamma$ . La PLC $\beta$  hydrolyse le phosphatidyl-inositol diphosphate (PIP $_2$ ) en deux seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP $_3$ ).

Le DAG reste ancré dans la membrane et active la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium. Cette activation entraîne la translocation de la PKC du cytoplasme vers la membrane plasmique, où elle effectue des phosphorylations qui induisent divers effets cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation de l'expression génique.

L'IP3 diffuse dans le cytosol et se lie à des récepteurs spécifiques sur la membrane du réticulum endoplasmique (ou sarcoplasmique), entraînant la libération de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytoplasme. Le calcium libéré active des protéines spécifiques, comme la calmoduline et la troponine, qui sont responsables de la contraction musculaire.

De manière parallèle, la liaison de facteurs de croissance, comme le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), aux récepteurs à activité tyrosine kinase entraîne l'auto-phosphorylation des récepteurs et leur dimérisation. Cette auto-phosphorylation modifie la structure des récepteurs et permet une interaction directe avec la phospholipase  $\text{C}\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma$ ), sans passer par les protéines G. La  $\text{PLC}\gamma$  hydrolyse également le  $\text{PIP}_2$ , produisant les seconds messagers DAG, IP3 et  $\text{Ca}^{2+}$ , qui continuent de réguler les réponses cellulaires.

### III.3.2 Cascade phospholipase A2/ Eicosanoïdes

#### III.3.2.1 Phospholipase A2

Les enzymes PLA2 catalysent l'hydrolyse de la liaison ester sn-2 des phospholipides (PLs). Cette réaction produit des acides gras libres (FFAs) et des lysophospholipides (PLs sans acide gras à la position sn-2), chacun ayant des fonctions biologiques et/ou pathologiques. Les lysophospholipides peuvent varier en fonction du groupe polaire attaché à la troisième position du squelette de glycérol, du type d'acide gras à la position sn-1, et du type de liaison à la position sn-1. Les acides gras libérés par l'hydrolyse de PLA2 peuvent être saturés (sans doubles liaisons), monoinsaturés (une double liaison), ou polyinsaturés (deux doubles liaisons ou plus). La famille des enzymes PLA2 comprend plus de 20 isoformes, différant par leurs exigences en  $\text{Ca}^{2+}$ , leur fonction biologique et leur localisation.

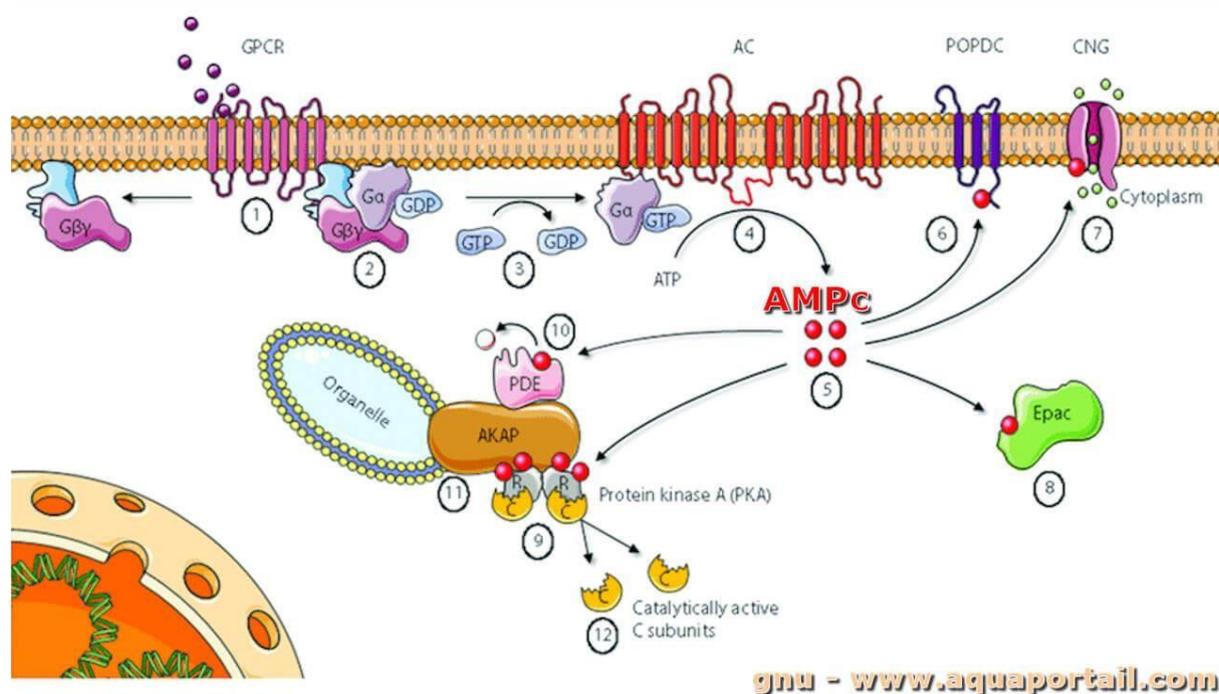
Deux systèmes de dénomination et de classification des PLA2 existent dans la littérature. Traditionnellement, les PLA2 étaient classées en PLA2 sécrétoires (sPLA2), PLA2 cytosoliques/dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (cPLA2), phospholipases A2 indépendantes du calcium (iPLA2), acétylhydrolases du facteur d'activation des plaquettes (PAF-AHs) ou PLA2 lysosomales (LPLA2), selon leurs exigences en  $\text{Ca}^{2+}$ , leur localisation et/ou leur fonction. Plus récemment, Dennis et ses collègues ont proposé un système de regroupement basé sur l'homologie des séquences nucléotidiques et d'autres caractéristiques conservées, qui comprend 15 groupes, certains regroupant plusieurs sous-groupes ou isoformes individuelles.

### III.3.3 AMP cyclique (AMPC, adénosine monophosphate cyclique)

L'AMP cyclique (AMPC) est un messenger intracellulaire formé à partir de l'ATP, où le groupe phosphate est cyclique. Dans l'intestin, l'AMPC joue un rôle clé en stimulant la sécrétion de liquide en augmentant la libération de NaCl dans la lumière intestinale. Cette augmentation de NaCl provoque une ouverture des canaux Cl apicaux, permettant l'entrée d'eau par osmose et contribuant à l'excrétion de l'eau avec les matières fécales. La toxine cholérique perturbe ce processus en augmentant le taux d'AMPC dans les cellules intestinales. Elle bloque la conversion du GTP lié à la protéine G en GDP, maintenant ainsi l'adénylate cyclase active et provoquant une diarrhée sévère.

L'AMPC est un amplificateur efficace des effets hormonaux; chaque récepteur peut activer plusieurs protéines G, ce qui conduit à une production massive d'AMPC. Les cellules peuvent également être régulées par des hormones antagonistes qui inhibent la production d'AMPC, comme la prostaglandine E1 et l'adénosine. La phosphodiesterase, une enzyme qui dégrade l'AMPC en AMP, régule également le niveau d'AMPC, et elle est inhibée par des substances comme la caféine et la théophylline.

Les récepteurs hormonaux varient dans leur effet: les récepteurs alpha provoquent généralement une vasoconstriction, tandis que les récepteurs bêta augmentent la fréquence cardiaque et mobilisent le glucose. Les sous-types de récepteurs alpha et bêta, tels que alpha 1, alpha 2, bêta 1 et bêta 2, ont des effets distincts, influençant la production d'AMPC de différentes manières. La pharmacologie vise à développer des agonistes et des antagonistes spécifiques pour ces récepteurs afin de moduler leurs effets de manière ciblée. Par exemple, les bêta-bloquants peuvent ralentir la fréquence cardiaque, mais peuvent aussi avoir des effets secondaires indésirables en affectant les voies respiratoires (figure 45).



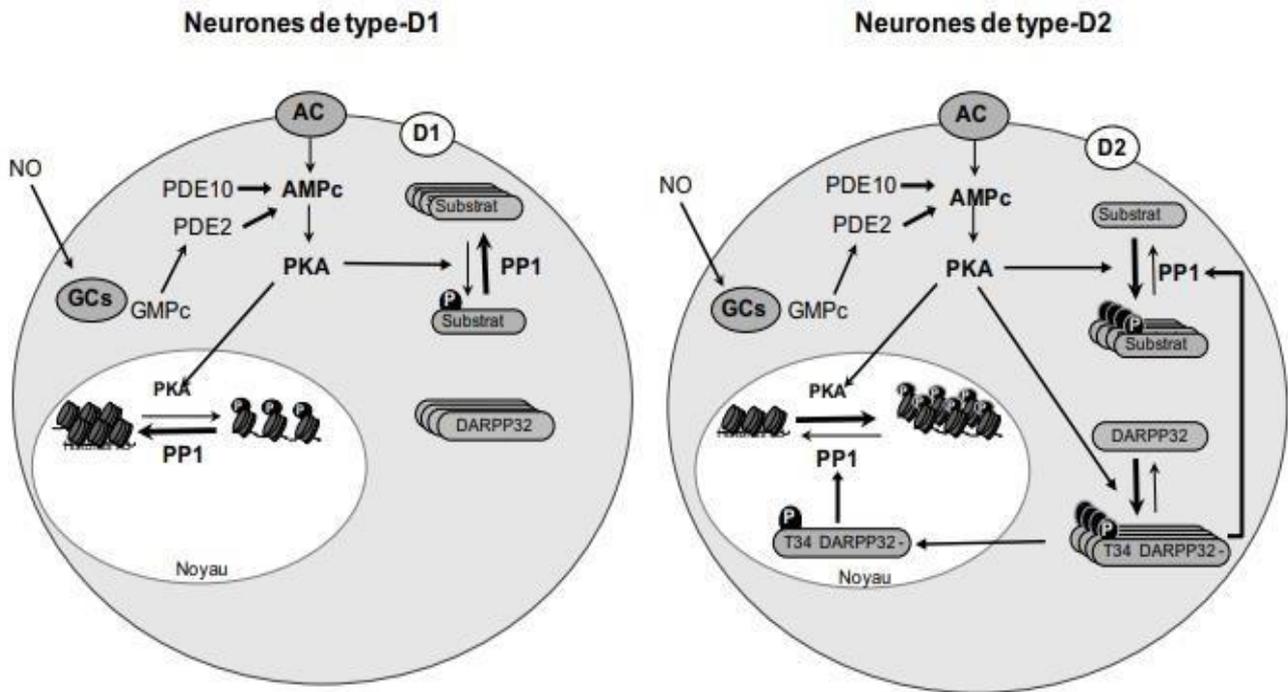
**Fig 45.** Voies de signalisation AMP cycliques. Epac, protéine d'échange directement activée par l'AMPc; AKAP, une protéine d'ancrage de kinase; PDE, phosphodiesterase. Voir le texte principal pour plus de détail.

### III.3.4 Cascade NO/GMPc (neurone, cellule endothéliale)

La cascade de signalisation de l'AMPc est bien documentée dans le striatum, tandis que le rôle du cGMP reste moins connu. Le cGMP est produit par la guanylyl cyclase soluble (GCs) en réponse à l'oxyde nitrique (NO) et régule divers processus neurobiologiques. Dans le striatum, le NO, produit par les interneurons striataux, diffuse et augmente la transmission synaptique dopaminergique. Le cGMP joue un rôle dans la plasticité synaptique cortico-striatale, mais les effecteurs spécifiques du cGMP restent incertains, notamment parce que la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) est faiblement exprimée dans ces neurones.

Les régions cérébrales comme l'hippocampe et le striatum, qui expriment beaucoup de guanylyl cyclase soluble, ont également des niveaux élevés de phosphodiesterase 2 (PDE2). Cela suggère que le GMPc régule principalement l'AMPc en activant la PDE2 plutôt que d'activer directement la PKG. La PDE2, lorsqu'elle est activée par le GMPc, augmente fortement son activité phosphodiesterase vis-à-vis de l'AMPc. Cette interaction entre l'AMPc et le GMPc via la PDE2 est bien caractérisée dans le système cardiovasculaire et a été démontrée également dans les neurones du thalamus et du striatum.

En particulier, des études utilisant des biosenseurs ont montré que la cascade NO/cGMP réduit fortement les niveaux transitoires d'AMPc dans les neurones D1 et D2 du striatum. Cette réduction est due à l'activation de la PDE2 par le GMPc, ce qui affecte la réponse PKA induite par la dopamine (figure 46).



**Fig46.** Rôle des phosphodiésterases 2 et 10 (PDE2 et PDE10) dans les neurones épineux moyens de type D1 et de type D2 du striatum. L'inhibition de la PDE10A augmente l'AMPc et active la PKA à des niveaux similaires dans les deux types de neurones. Dans les neurones de type D2, la phosphorylation de la DARPP-32 inhibe la protéine phosphatase PP-1 : les substrats de la PKA restent donc dans l'état phosphorylé, à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Dans les neurones de type D1, la DARPP-32 est dans un état déphosphorylé : PP-1 est pleinement active et déphosphoryle les substrats de la PKA. En parallèle, la PDE2 apparaît comme un effecteur important de la signalisation par l'oxyde d'azote (NO), en modulant indirectement le signal AMPc via le GMPc.

### III.3.4.1 Amplification du signal via les cascades de MAP kinases

#### III.3.4.1.1 Protéines kinases (A, B/Akt, C, CAM, MAP)

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire progressive, principale cause des infarctus du myocarde (IM), impliquant divers types de cellules et de kinases dans sa progression.

**1. Cellules musculaires lisses vasculaires (SMCs) :** Ces cellules sont abondantes dans les parois des vaisseaux sanguins et jouent un rôle clé dans l'épaississement des parois vasculaires par leur croissance et leur accumulation. La caséine kinase 2, lorsqu'elle est inhibée, peut freiner la progression du cycle cellulaire des SMCs et leur accumulation. De plus, la kinase p38 stimule l'apoptose des SMCs, ce qui peut conduire à la déstabilisation des plaques athéroscléreuses et à une augmentation du risque de rupture.

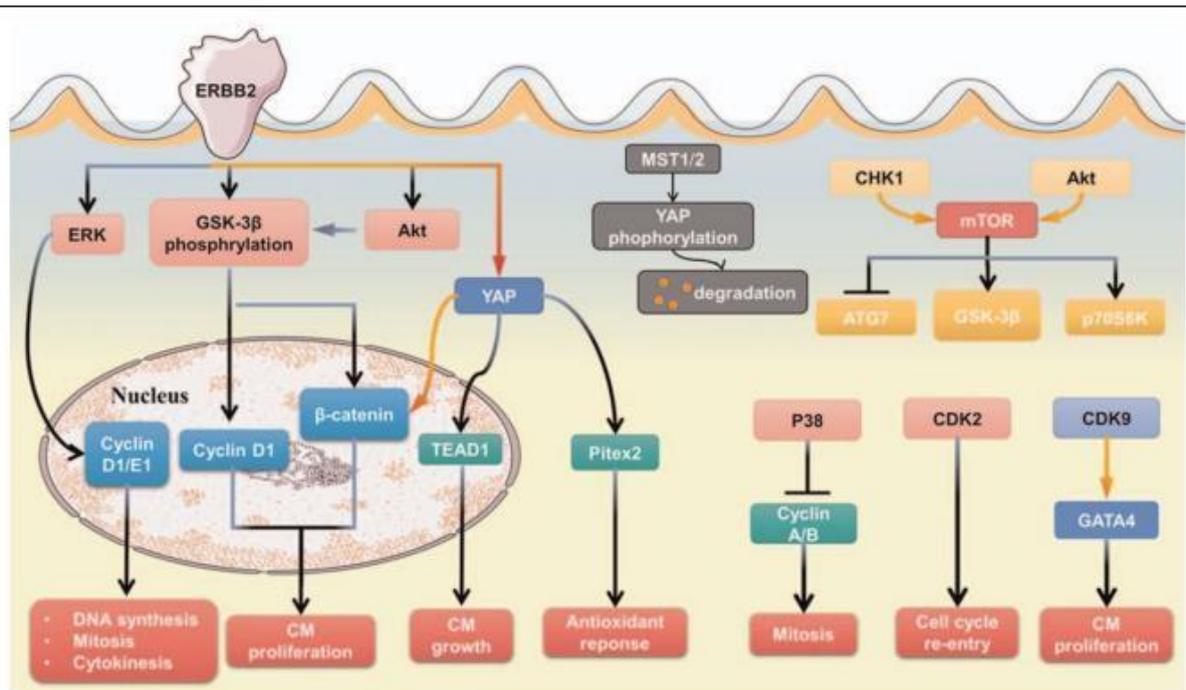
**2. Cellules endothéliales :** La kinase p38 est aussi critique pour ces cellules. Sa surexpression augmente l'expression des molécules d'adhésion comme l'E-sélectine et la protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1, renforçant l'attachement des cellules inflammatoires à l'endothélium et la réponse inflammatoire. p38 régule également la perméabilité des cellules endothéliales en augmentant l'expression de l'interleukine-6. Le gallate d'hydroxytyrosol et l'épicatéchine ont été montrés pour inhiber la phosphorylation de p38, réduisant ainsi les processus inflammatoires et prévenant l'athérosclérose.

**3. Macrophages :** Ces cellules jouent un rôle crucial dans les lésions athéroscléreuses précoces et les plaques instables. Leur régulation est principalement médiée par la voie PI3K-AKT-mTOR. Les macrophages peuvent se polariser en deux phénotypes fonctionnels : M1, qui favorise l'initiation et la progression de la plaque, et M2, qui a un effet protecteur. AKT active mTOR dans les macrophages, stimulant l'expression de gènes favorisant le phénotype M2 et inhibant le phénotype M1. Un déficit en AKT1 favorise les macrophages M1. De plus, AKT joue un rôle dans la survie des macrophages en

### Chapitre 3 : Bases moléculaires de l'homéostasie cellulaire

inhibant leur apoptose par la phosphorylation de facteurs régulateurs comme les caspases et en soutenant la survie cellulaire.

En résumé, les protéines kinases, notamment p38 et AKT, régulent diverses facettes de l'athérosclérose, de l'inflammation à la survie cellulaire, et sont des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques (figure 47).



**Fig 47 :** Les protéines kinases ont médiés les voies de signalisation dans la régénération cardiaque et la prolifération de CM. AKT : protéine kinase B; ATG7 : gène 7 lié à l'autophagie; CDK : dépendant de la cycline kinase; CHK1 : Checkpoint kinase 1; CM : cardiomyocyte; ERBB2 : Erb-b2receptor tyrosine kinase 2; ERK : Extracellular signal- regulated kinase; GATA4 : GATA binding protein 4; GSK : Glycogen synthase kinase; MST : Mammalian Ste20-like kinase; P70S6K : Ribosomal protein S6 kinase; TEAD1 : TEA membre de la famille de domaine 1; YAP : Yes-associated protein 1.

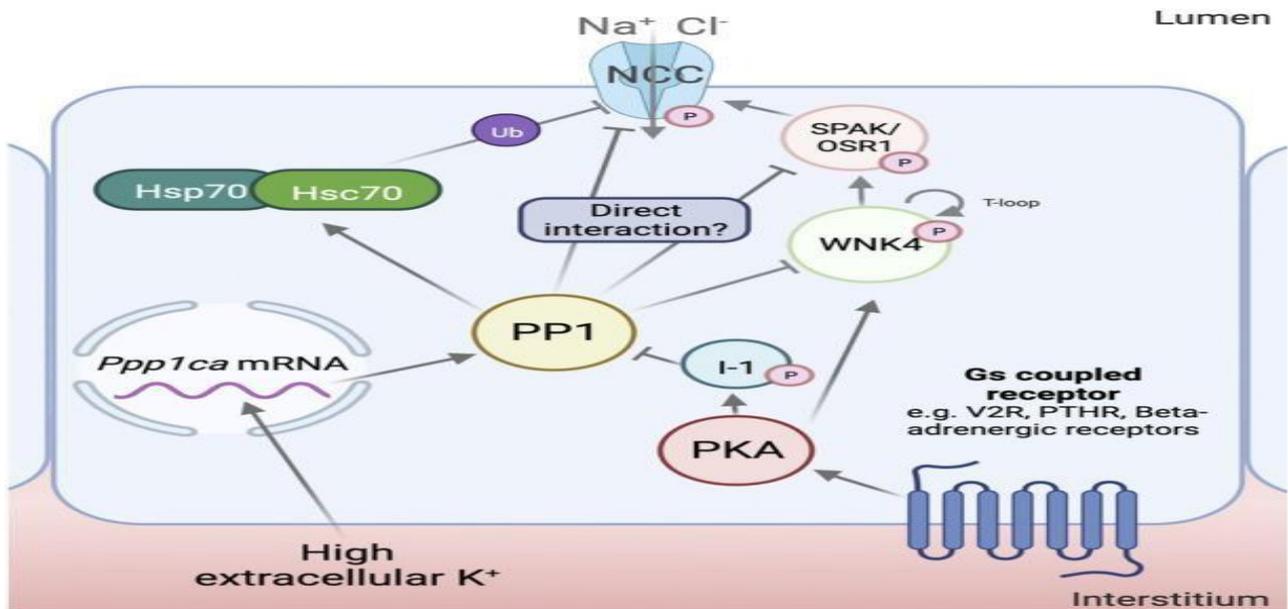
### III.3.4.1.2 Protéines phosphatases (2A, calcineurin), tyrosine phosphatases, PTEN.

L'activité du Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporteur (NCC) dans le tubule contourné distal (DCT) est régulée par un réseau complexe de phosphorylation, impliquant des kinases et des phosphatases. Tandis que la voie de signalisation WNK-SPAK/OSR1 a été largement étudiée, la régulation par les phosphatases reste en grande partie inconnue.

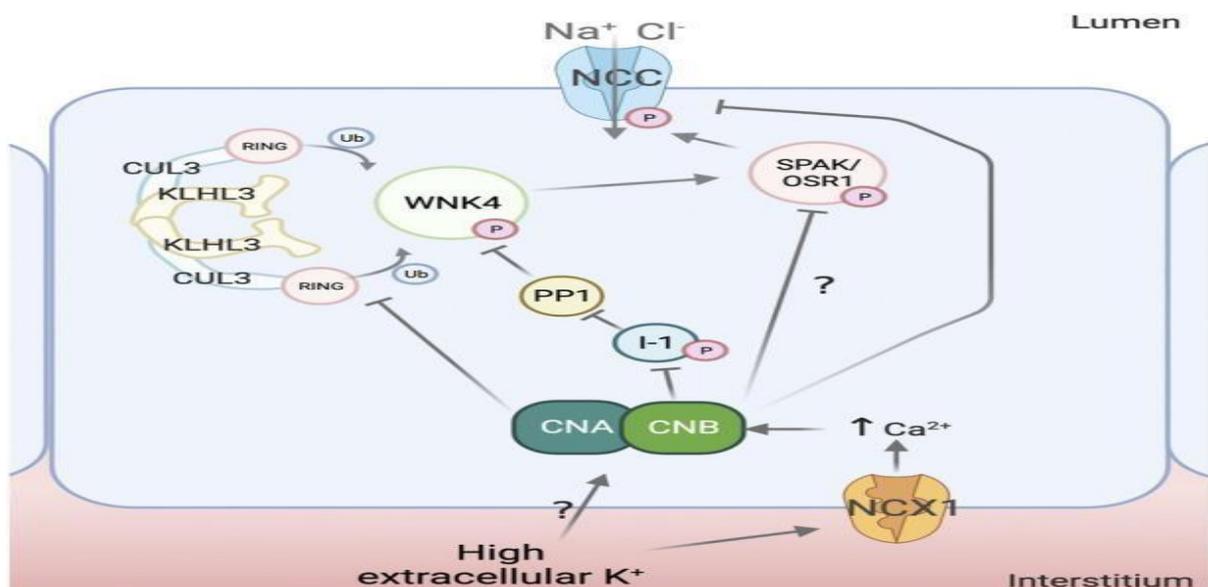
#### Phosphatases et leur rôle :

1. **Protéine phosphatase 1 (PP1) :** Cette phosphatase déphosphoryle directement WNK4, SPAK et NCC. Son activité augmente en réponse à des niveaux élevés de K<sup>+</sup> extracellulaire, ce qui conduit à une inhibition de NCC. L'inhibiteur 1 (I1) inhibe PP1 lorsqu'il est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA).
2. **Calcineurine (CN) :** La CN peut déphosphoryler et activer la protéine KLHL3, réduisant ainsi l'abondance de WNK. Les inhibiteurs de CN, comme le tacrolimus et la cyclosporine A, augmentent la phosphorylation de NCC, ce qui peut entraîner un syndrome d'hypertension hyperkaliémique familiale chez certains patients traités avec ces médicaments.
3. **Protéine phosphatase 2A (PP2A) et PP4 :** Bien qu'ils régulent NCC ou ses activateurs en amont dans des modèles in vitro, leur rôle physiologique spécifique dans la régulation de NCC dans les reins n'a pas encore été pleinement exploré.

Cette revue se concentre sur les médiateurs de la déphosphorylation et les mécanismes de transduction potentiellement impliqués dans les états physiologiques nécessitant une modulation du taux de déphosphorylation de NCC (figure 48 et 49).



**Fig 48.** Mécanismes de régulation de la protéine NCC par la protéine phosphatase 1. Il a été démontré que la protéine phosphatase 1 (PP1) augmente son abondance d'ARNm et de protéines en réponse à la forte  $K^+$  extracellulaire. L'inhibiteur 1 (I1), en réponse aux stimuli d'augmentation de l'AMPc, est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA). Ceci, à son tour, entraîne l'inhibition de l'activité de PP1. Il a été démontré que PP1 régule la kinase avec-no-lysine (K) (WNK4), la proline riche en alanine (SPAK) et le  $Na^+$ - $Cl^-$  Cotransporteur (NCC) liés à Ste20 la phosphorylation, bien qu'il soit actuellement incertain si ces interactions sont physiologiques et dans quelle mesure elles contribuent à la régulation des CCN. Il a également été démontré que PP1 déphosphorylate et active la protéine de choc thermique de 70 kDa (Hsp70) et le cognate de choc thermique 70 (Hsc70), qui ont été proposés pour jouer un rôle important dans l'ubiquitylation et la dégradation de NCC.



**Fig 7.** Mécanismes de régulation de la NCC par la calcineurine. L'activité de la calcineurine (CN) a été

impliquée dans la déphosphorylation du Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>Cotransporter (NCC) en réponse à un K<sup>+</sup> extracellulaire élevé. La modulation de l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> (NCX1) par K<sup>+</sup> a été postulée comme un mécanisme pour induire des changements intracellulaires de concentration de Ca<sup>2+</sup> et ainsi favoriser l'activation du CN, bien que ce mécanisme nécessite une confirmation et des mécanismes supplémentaires peuvent également participer. Les preuves suggèrent que le CN peut directement déphosphoryler le NCC et affecter également les éléments en amont de la voie de signalisation. Par exemple, le CN semble déphosphoryler Kelch-Like 3 (KLHL3), ce qui entraîne une augmentation de l'ubiquitylation de la kinase 4 (WNK4) et de la kinase 1 (KS-WNK1) spécifique au rein avec- sans-lysine (K) et, par conséquent, une diminution de l'activation de la proline/kinase riche en alanine (SPAK) et la kinase 1 réactive au stress oxydatif (OSR1). L'inhibiteur 1 (II) s'est également avéré être un substrat de CN et, par conséquent, cette protéine peut fonctionner comme un nœud reliant l'activation de CN à l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1), avec les implications que cela peut avoir dans le DCT

### III.3.4.2 Récepteurs Tyrosine kinase (signalisation de l'insuline) Le récepteur de l'insuline (RI)

Le récepteur de l'insuline (RI) fait partie de la famille des récepteurs de facteurs de croissance avec activité tyrosine kinase dans le domaine intracellulaire. Il est le principal membre d'une famille de récepteurs comprenant également le récepteur de l'IGF1 (facteur de croissance insulin-like 1). Le RI est constitué de deux chaînes  $\alpha$  extracellulaires et de deux chaînes  $\beta$  transmembranaires, formant un hétérodimère préassocié dans la membrane. Les chaînes  $\alpha$  possèdent des domaines de liaison pour l'hormone, structurés par des ponts disulfure.

Lorsqu'une molécule d'insuline se lie avec une haute affinité aux deux sous-unités  $\alpha$ , elle active complètement le récepteur. Les sites vacants restants sont occupés avec une affinité plus faible par d'autres molécules d'insuline, sans participer à l'activation du récepteur.

Le récepteur IGF1 a une structure similaire à celle du récepteur de l'insuline avec environ 50% d'homologie. Cependant, l'affinité de l'IGF1 pour le RI est 100 à 1 000 fois plus faible que celle de l'insuline. Malgré des concentrations circulantes d'IGF1 beaucoup plus élevées que celles de l'insuline (due au stockage de l'IGF1 sur des protéines de liaison dans le sérum), l'IGF1 peut activer le RI, surtout dans des cas d'insulinorésistance extrême où des concentrations élevées d'insuline peuvent aussi activer le récepteur IGF1.

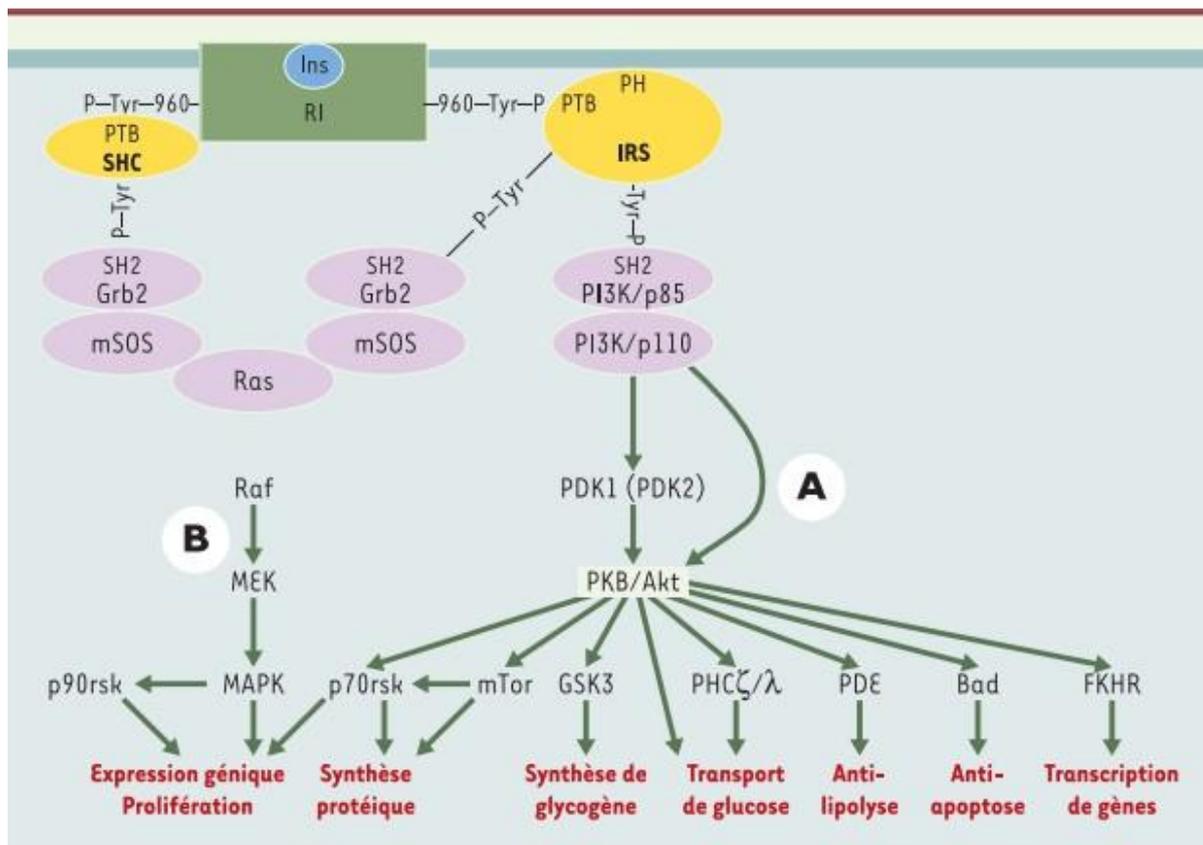
Les hépatocytes et les adipocytes expriment principalement le RI avec peu de récepteurs IGF1, tandis que les myocytes expriment les deux types de récepteurs et montrent une présence significative de récepteurs hybrides, qui ont des caractéristiques de liaison proches de celles des récepteurs IGF1.

### III.3.4.2.1 Transmission du signal insulinique

La transmission du signal insulinique dans la cellule implique des modules protéiques qui reconnaissent et positionnent les protéines substrats près du récepteur activé. Parmi ces substrats, au moins neuf sont communs aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF1. La première famille de ces substrats est celle des IRS (insulin receptor substrates), comprenant quatre membres, dont IRS1 et IRS2, qui jouent des rôles complémentaires dans la signalisation de l'insuline.

L'une des principales voies de signalisation de l'insuline est la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). L'effet le plus étudié de l'insuline est son influence sur le transport du glucose, qui se manifeste par la translocation des vésicules contenant les transporteurs GLUT4 vers la membrane plasmique dans les cellules musculaires et les adipocytes. Ce processus est médié par la voie PI3 kinase ainsi que d'autres voies de signalisation, soulignant la complexité du signal insulinique. Cette spécificité montre comment l'insuline peut réguler le transport du glucose, un effet que d'autres hormones activant la PI3 kinase ne peuvent pas induire sans activer les voies annexes.

En plus de la voie PI3 kinase, l'insuline active également la voie MAP kinase, qui est commune à de nombreux facteurs de croissance et joue un rôle dans l'expression génique et la prolifération cellulaire. Les voies PI3 kinase/PKB et MAP kinase sont interconnectées et contribuent à l'activation réciproque de l'une et de l'autre (figure 50).



**Fig 8.** Principales voies de signalisation par l'insuline : voies PI3 kinase et MAP kinase.

### III.3.4.2.2. Inhibition du signal insuline par phosphorylation sur Ser/Thr des protéines IRS.

Cette phosphorylation peut être induite par un rétrocontrôle du signal insulinique ou par l'action d'autres agents tels que le TNF $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ), les acides gras libres, l'IL-1 $\beta$  (interleukine 1 $\beta$ ), voire par l'insuline elle-même. La kinase IKK $\beta$  (inhibiteur de la kinase nucléaire  $\kappa$ B), la MAP-kinase, et en particulier la Jun kinase (JNK) sont capables de réaliser ces phosphorylations. En phosphorylant la sérine 307 de l'IRS1 murin, la JNK bloque l'interaction entre le domaine PTB de IRS1/2 et la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur de l'insuline, inhibant ainsi la transmission du signal insulinique. La JNK est activée par l'insuline et par le TNF $\alpha$ . De plus, l'augmentation des acides gras libres et l'accumulation de diacylglycérol et d'acyl-CoA peuvent entraîner l'activation de la PKC $\theta$  et la phosphorylation de l'IRS1 sur Ser/Thr (figure 51).

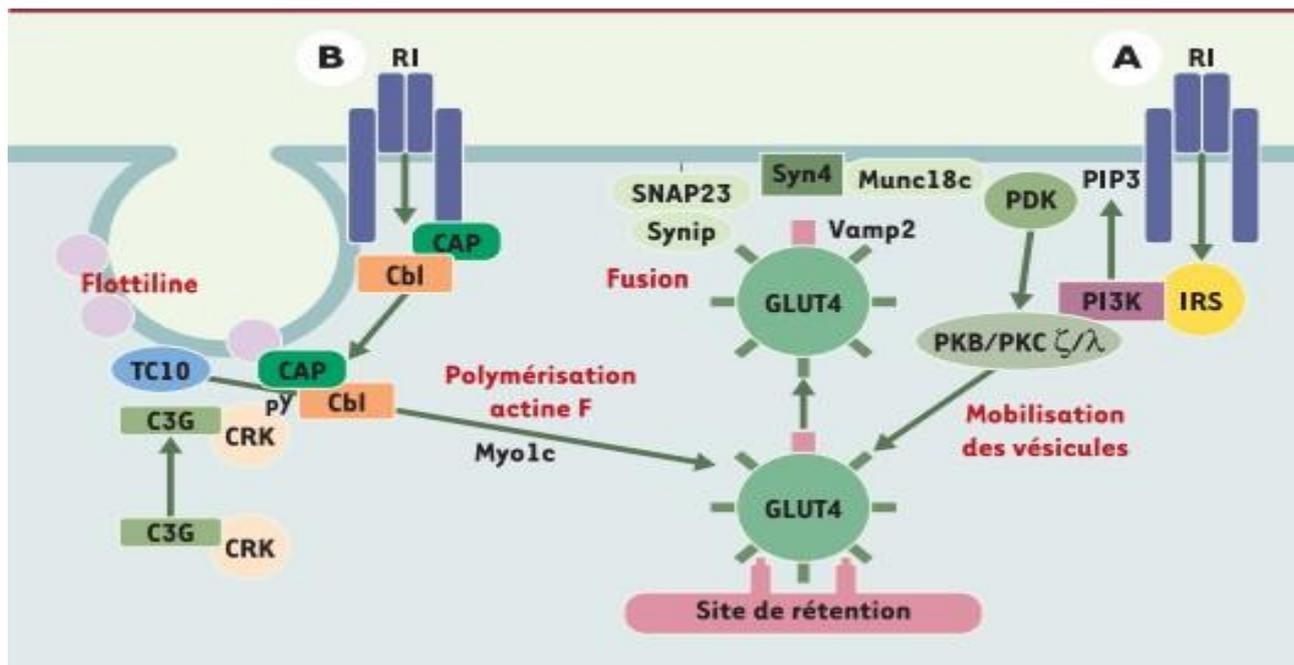


Fig 51. Activation par l'insuline de l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes.

### III.3.4.3 PI3kinase, AKt/PKB (domaines PH, PIP3)

La voie de signalisation PI3K/Akt joue un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire, le développement neurologique, le métabolisme et divers autres processus. Elle régule des aspects essentiels du développement cellulaire tels que l'apoptose, la progression du cycle cellulaire et la différenciation. Le principal régulateur de cette voie est Akt/PKB, une famille de trois kinases sérine/thréonine apparentées :

- **Akt1/PKB alpha** est impliqué dans la prolifération et le métabolisme cellulaires.
- **Akt2/PKB beta** joue un rôle clé dans le métabolisme du glucose.
- **Akt3/PKB gamma**, le membre le moins bien caractérisé, est principalement exprimé dans le cerveau, où il semble réguler la biogenèse mitochondriale.

Les mutations d'Akt sont souvent associées à des dérégulations qui conduisent à diverses formes de cancer. L'hyper-activation d'Akt favorise la glycolyse et la transformation métabolique des cellules cancéreuses, ce qui est exploité dans le développement de la résistance aux médicaments anticancéreux. Néanmoins, l'activation d'Akt seule ne suffit généralement pas à provoquer le cancer ; d'autres mutations sont généralement nécessaires.

Les régulateurs principaux de cette voie incluent :

- **PI3K** : Cette famille d'enzymes phosphoryle le phosphatidylinositol (PtdIns) pour produire le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). Activée par le récepteur à activité tyrosine kinase, PI3K convertit le PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>, ce qui active Akt.
- **PTEN** : Agit comme un régulateur négatif en déphosphorylant le PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub>, inversant ainsi l'activation d'Akt (figure 52).

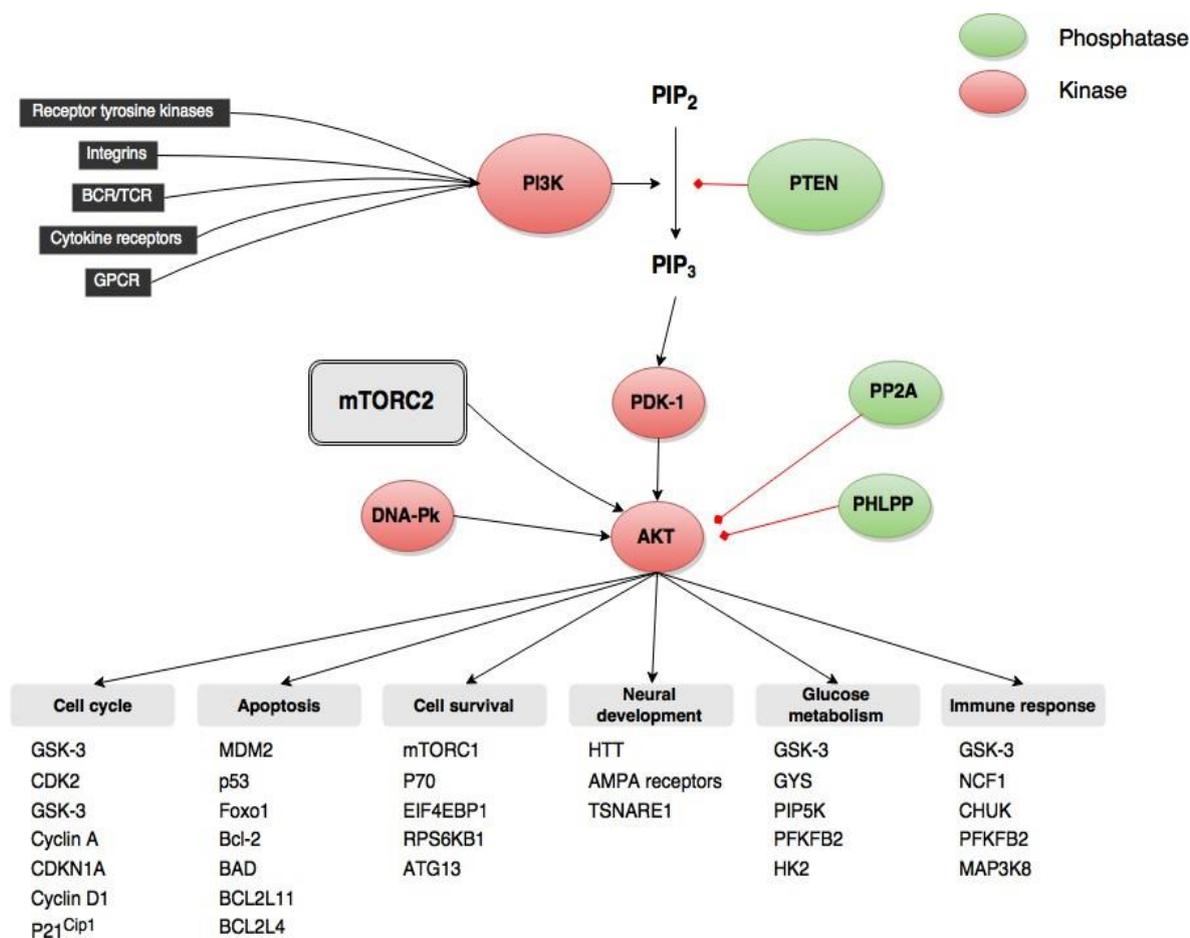


Fig 52. Le régulateur principal du signal PI3K/Akt est Akt/PKB

### III.3.4.4 MAPKinases / Facteurs de transcription

Les plantes détectent les attaques pathogènes en percevant des signaux appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces signaux déclenchent des cascades de signalisation qui activent des facteurs de transcription et régulent la structure de la chromatine, nécessaires à l'expression des mécanismes de défense de la plante. Les voies de signalisation des MAP Kinases sont essentielles dans la transduction de ces signaux. Cependant, le rôle des modifications des histones en lien avec ces voies MAPK dans la réponse aux pathogènes reste encore mal compris (figure 53). Les plantes détectent

les attaques pathogènes en percevant des signaux appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces signaux déclenchent des cascades de signalisation qui activent des facteurs de transcription et régulent la structure de la chromatine, nécessaires à l'expression des mécanismes de défense de la plante. Les voies de signalisation des MAP Kinases sont essentielles dans la transduction de ces signaux. Cependant, le rôle des modifications des histones en lien avec ces voies MAPK dans la réponse aux pathogènes reste encore mal compris.

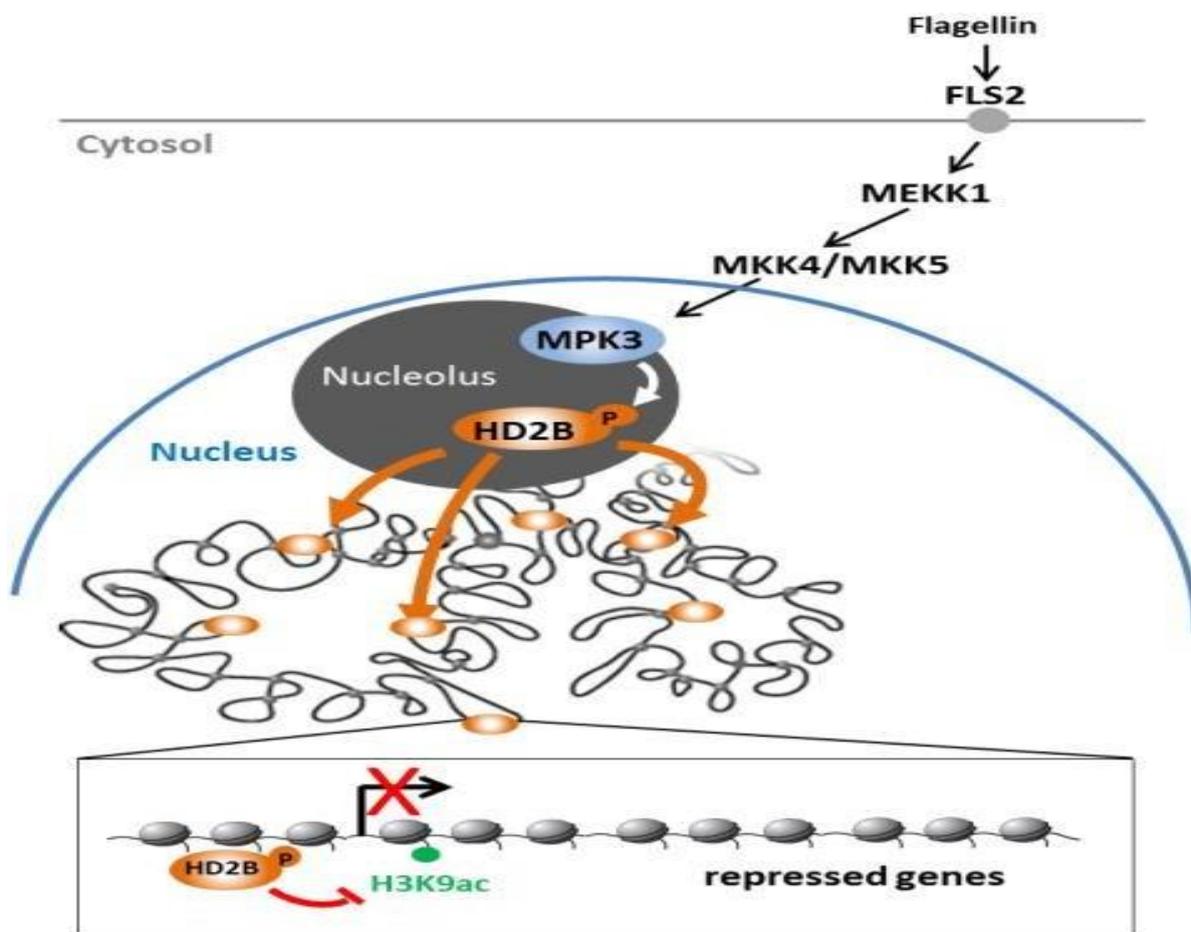


Fig 53 PAMPs.

### III.4 Génomique biochimique : Anomalies de signalisation et pathologies

- **Maladie de Rendu-Osler Dysfonctionnement de la signalisation TGF $\beta$  dans les cellules endothéliales**

La maladie de Rendu-Osler, ou télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), affecte environ 1 personne sur 5 000 à 8 000. Cette maladie est liée à des dysfonctionnements dans la signalisation Smad dépendante de la famille TGF $\beta$ . Les trois gènes impliqués (ENG, ACVRL1, MADH4) codent pour des protéines régulant cette voie de signalisation.

Les facteurs de la famille TGF $\beta$ , comprenant les TGF $\beta$ , les BMP (bone morphogenetic proteins) et les GDF (growth and differentiation factors), agissent via des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Il existe deux types principaux de récepteurs : les récepteurs de type 2 et les récepteurs de type 1 (ou ALK pour activin receptor-like kinase). Ces récepteurs forment un hétérocomplexe, où le récepteur de type 2 phosphoryle le récepteur de type 1, qui à son tour active les protéines de transcription Smad.

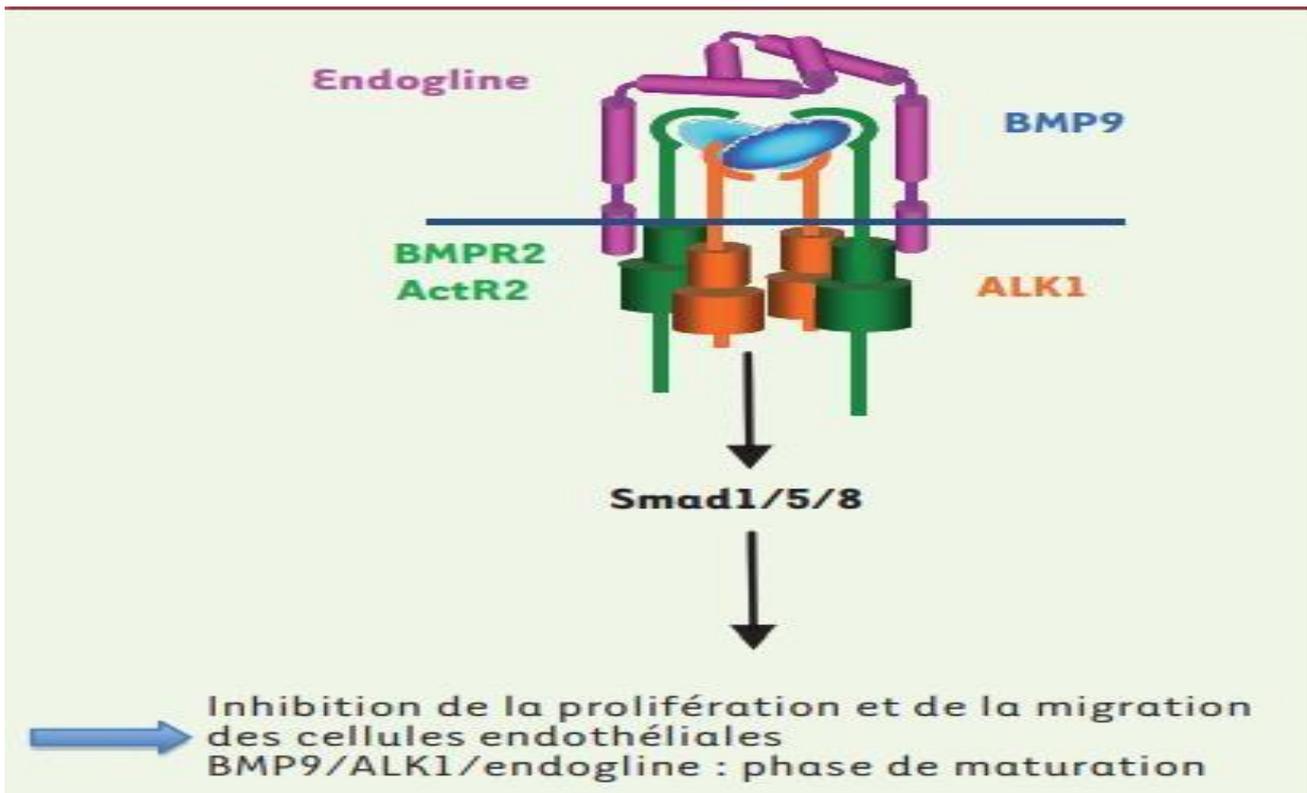
Il existe deux voies de signalisation Smad :

- La voie TGF $\beta$  (récepteurs ALK4, 5, 7) phosphoryle les Smad 2 et 3.
- La voie BMP (récepteurs ALK1, 2, 3, 6) phosphoryle les Smad 1, 5, 8.

Les protéines Smad phosphorylées se lient à Smad4, migrent dans le noyau et régulent l'expression des gènes cibles. Des voies de signalisation indépendantes des Smad existent également.

Les récepteurs de type 3, tels que l'endogline (ENG) et le bêtaglycan, augmentent l'affinité des ligands pour leurs récepteurs mais ne transduisent pas le signal eux-mêmes. L'endogline, codée par le gène ENG, est un corécepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales. Les mutations du gène ENG, souvent des mutations non-sens, entraînent une absence de la protéine fonctionnelle, ce qui provoque une haplo-insuffisance. Le gène ACVRL1 code pour le récepteur ALK1, également exprimé sur les cellules endothéliales. La plupart des mutations dans ce gène sont des mutations faux-sens, conduisant à une protéine non fonctionnelle, ce qui représente une haplo-insuffisance fonctionnelle.

Enfin, le gène MADH4 code pour le facteur de transcription Smad4, qui est commun aux deux voies de signalisation TGF $\beta$ . Les mutations de Smad4, ainsi que les mutations dans les récepteurs TGF $\beta$  spécifiques aux cellules endothéliales, suggèrent que la maladie de Rendu-Osler résulte d'un dysfonctionnement de la signalisation Smad dans ces cellules (figure 54).



**Fig 9.** Implication de la voie BMP9/ALK1/endogline dans la maladie de Rendu-Osler. Le BMP9 se lie sur un hétérocomplexe constitué de deux récepteurs ALK1 et deux récepteurs de type 2 (BMPR2 ou ActR2). Le récepteur de type 2 phosphoryle ALK1 qui à son tour phosphoryle les facteurs de transcription Smad1/5/8. L'addition de BMP9 entraîne l'inhibition de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales, ce qui suggère un rôle pour cette voie de signalisation dans la phase de maturation de l'angiogenèse.

## Référence

### Livres

1. Anselme, B., Cullin, C., Raguénès-Nicol, C., Boujard, D. (2012). *Biologie cellulaire et moléculaire: Tout le cours en fiches*. France: Dunod.
2. Yann Bassaglia. (2021). . *Biologie cellulaire: 4è édition*. (n.p.): MALOINE.
3. Cailliez, J. (2021). *Biologie cellulaire*. Suisse: ELLIPSES.
4. Callen, J. (2003). *Biologie cellulaire: Des molécules aux organismes, Cours et questions de révision*. France: Dunod.
5. Callen, J. (2005). *Biologie cellulaire: Des molécules aux organismes, Cours, questions de révision et QROC*. France: Dunod.
6. Carnoy, J. B. (1884). *La biologie cellulaire: étude comparée de la cellule dans les deux règnes*. Belgique: Van In.
7. Cooper, G. M. (1999). *La cellule: Une approche moléculaire*. Belgique: De Boeck Supérieur.
8. Karp, G., Iwasa, J., Isawa, J., Marshall, W. F. (2018). *Biologie cellulaire et moléculaire de Karp*. Belgique: De Boeck supérieur.
9. Karp, G., Masson, P. L. (2010). *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments*. Belgique: De Boeck Supérieur.
10. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Housset, C. (2004). *Biologie cellulaire*. France: Elsevier.
11. Combarrous, Y. (2013). *Communications et signalisations cellulaires (4e ed)*. France: Lavoisier.
12. Danielian, S., Fagard, R. (1993). *Protéines tyrosine kinases et signalisation cellulaire: le modèle des lymphocytes T*. France: Editions INSERM.
13. Moussard, C., Mougin, C. (2005). *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires*. Belgique: De Boeck Supérieur.
14. Combarrous, Y. (2013). *Communications et signalisations cellulaires*. France: Tec & Doc.
15. Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. Belgique: De Boeck Supérieur.
16. Lancel, S. (2020). *L'essentiel de la biologie cellulaire*. Royaume-Uni: Ellipses.

17. Gilles, R., Anctil, M. (2006). *Physiologie animale*. Belgique: De Boeck Supérieur.

## Articles

1. Proux-Gillardeaux, V., & Galli, T. (2005). Rôle du trafic membranaire dans la migration cellulaire: une nouvelle application pour les neurotoxines clostridiales? [Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion]. *Medecine sciences : M/S*, 21(10), 789–790. <https://doi.org/10.1051/medsci/20052110789>.
2. Cohen, M. M., & Tareste, D. (2018). Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1983. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16629.1>
3. Mayer, J. P., Zhang, F., & DiMarchi, R. D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers*, 88(5), 687–713. <https://doi.org/10.1002/bip.20734>
4. Niswender K. D. (2011). Basal insulin: physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgraduate medicine*, 123(4), 17–26. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.07.2300>
5. Kabra, U. D., & Jastroch, M. (2023). Mitochondrial Dynamics and Insulin Secretion. *International journal of molecular sciences*, 24(18), 13782. <https://doi.org/10.3390/ijms241813782>
6. Picard M. (2023). Membrane proteins. *Biochimie*, 205, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.01.018>
7. Miroux, B., & Pebay-Peyroula, E. (2015). Editorial overview: Membranes. *Current opinion in structural biology*, 33, vii–ix. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.006>
8. Lebon, G., & Tate, C. G. (2012). Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière [G protein-coupled receptors in the spotlight]. *Medecine sciences : M/S*, 28(10), 876–882. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122810017>
9. Lahuna, O., & Jockers, R. (2018). Signalisation mitochondriale des récepteurs couplés aux protéines G [Mitochondrial signaling of G protein-coupled receptors]. *Biologie aujourd'hui*, 212(1-2), 21–26. <https://doi.org/10.1051/jbio/2018024>
10. Lebon, G., & Tate, C. G. (2012). Les récepteurs couplés aux protéines G dans la lumière [G protein-coupled receptors in the spotlight]. *Medecine sciences : M/S*, 28(10), 876–882. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122810017>

11. Lurie, A., Fink, C., Gosselin, G., Dekaban, G. A., & Dikeakos, J. D. (2022). Inhibiteurs de Nef du VIH-1 : applications et développements pour une guérison efficace. *Virologie (Montrouge, France)*, 26(1), 55–71. <https://doi.org/10.1684/vir.2022.0939>
12. Bechet, E., Guiral, S., Torres, S., Mijakovic, I., Cozzone, A. J., & Grangeasse, C. (2009). Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino acids*, 37(3), 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0237-8>
13. Bellot F. (1994). Une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase pour les facteurs de croissance des fibroblastes [A family of receptors with tyrosine kinase activity for growth factors of fibroblasts]. *Pathologie-biologie*, 42(6), 561–565.
14. Holzenberger M. (2009). Les récepteurs centraux de l'IGF-1 contrôlent la longévité chez la souris [IGF-1 receptors in the brain control longevity in mice]. *Medecine sciences : M/S*, 25(4), 371–376. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009254371>
15. Drui, D., Illouz, F., Do Cao, C., & Caron, P. (2018). Expert opinion on thyroid complications of new anti-cancer therapies: Tyrosine kinase inhibitors. *Annales d'endocrinologie*, 79(5), 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.07.003>
16. Castro, L., Yapo, C., & Vincent, P. (2016). Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones [Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons]. *Biologie aujourd'hui*, 210(4), 191–203. <https://doi.org/10.1051/jbio/2017005>
17. Toranzo, G. S., Zelarayán, L., Bonilla, F., Oterino, J., & Bühler, M. I. (2008). Involvement of GABAA receptor in Bufo arenarum oocyte maturation. *Zygote (Cambridge, England)*, 16(2), 135–144. <https://doi.org/10.1017/S0967199408004656>
18. Dam J. (2018). Trafic et signalisation du récepteur de la leptine [Traffic and signalisation of the leptin receptor]. *Biologie aujourd'hui*, 212(1-2), 35–43. <https://doi.org/10.1051/jbio/2018020>