

PAES

Date : Jeudi 06 Décembre

Professeur : Eric Gilson

Nombre de pages : 20

2012-2013

Biologie Cellulaire

Intitulé du cours : Fin de la mort cellulaire - Signalisation

Rédacteur : Clémentine Fresnel

Ronéo n° : 13



**Corporation des Carabins
Niçois**

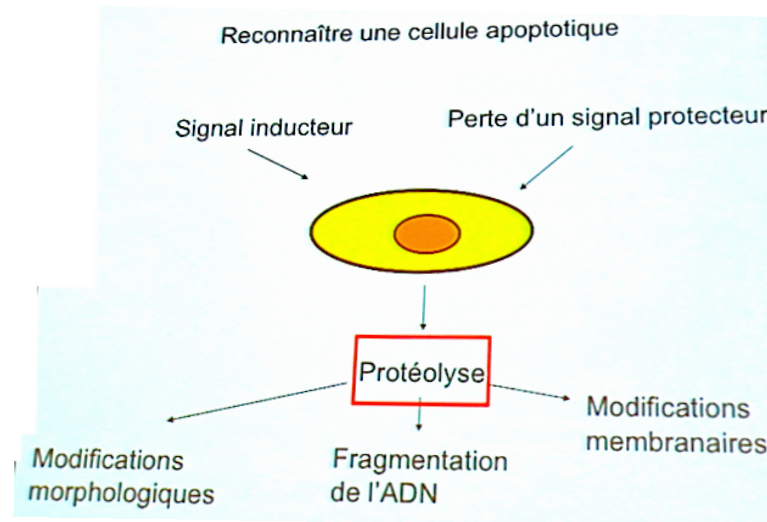
UFR Médecine
28, av. de Valombrese
06107 Nice Cedex 2
www.carabinsnicois.com
vproneo.karpediem@gmail.com

Partenaires



La mort cellulaire

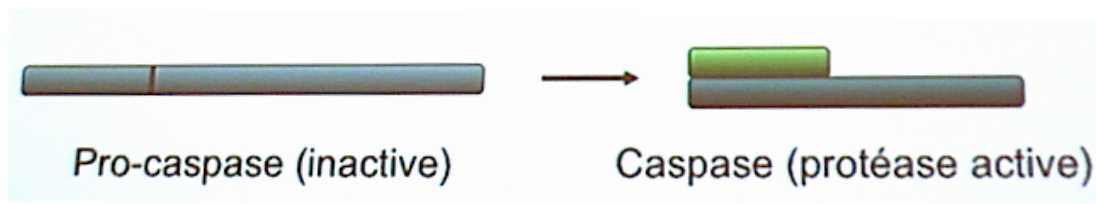
3. Distinction apoptose/nécrose



Les marqueurs de l'apoptose sont liés aux mécanismes propres de l'apoptose, les modifications morphologiques, la fragmentation de l'ADN, les modifications membranaires...

♦ La protéolyse, marqueur de l'apoptose :

C'est la cause des événements cellulaires qui conduisent à l'apoptose.



C'est une protéolyse qui dépend d'une famille de protéases spécifiques, les **caspases** :

Les caspases sont une famille de protéines qui constituent une cascade protéolytique impliquée dans l'apoptose.

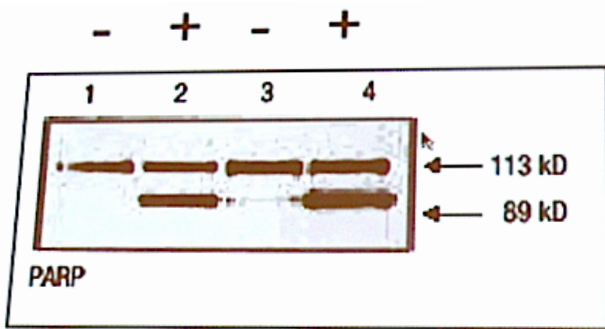
On distingue les caspases initiatrices (caspases 8 et 10) qui sont responsables de l'activation des caspases effectrices. (caspases 3, 6 et 7) Cette activation se fait grâce à une protéolyse activatrice. On passe ainsi d'une pro-caspase à une caspase active.

Les caspases initiatrices sont elles-mêmes activées par les récepteurs de mort et par auto-activation.

Les caspases effectrices, une fois activées, vont protéolyser un grand nombre de protéines spécifiques, appelées substrat de mort, ce qui va déstructurer la cellule. (Leur spécificité est déterminée par leur séquence)
Parmi ces substrats de morts on peut citer les protéines PARP, I-CAD, les lamines ou l'actine.

On peut utiliser des fragments protéolytiques comme marqueur de l'apoptose.

On utilise ici la protéine PARP : technique d'immunoblotting



Dans une cellule normale, la PARP a une taille de 113 kDa.

Or dans la cellule apoptotique on voit apparaître un nouveau fragment de 89kDa et qui possède une forme différente reconnue par un anticorps spécifique.

L'apparition de la bande à 89kDa est spécifique de l'apoptose.

♦ Le rôle de la mitochondrie :

La mitochondrie n'est pas seulement la centrale énergétique de la cellule.

Elle joue également un rôle dans la mise en place du processus de l'apoptose en réponse à un signal.

Pour cela elle utilise un des intervenants de la chaîne respiratoire qui permet donc la production d'ATP mais également l'apoptose : le cytochrome C.

Il est responsable de l'une des voies d'activation des caspases.

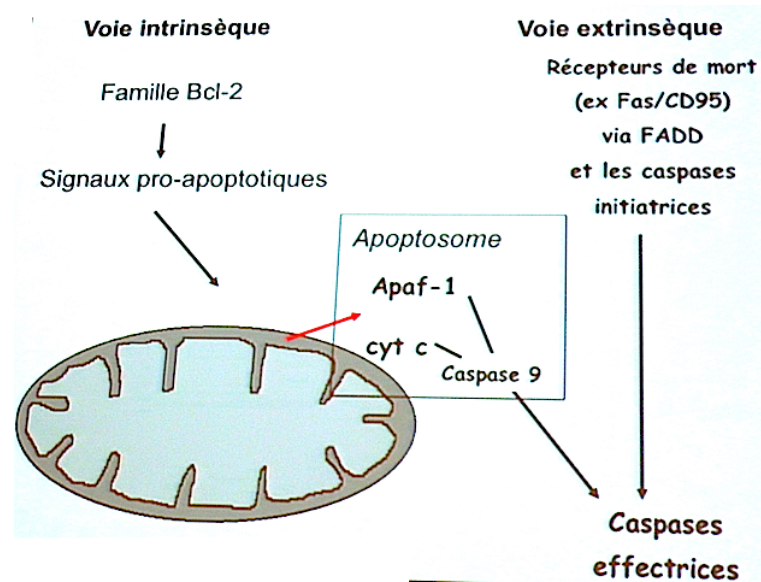
En effet on distingue deux voies qui induisent l'apoptose via l'activation des caspases :

- **Voie intrinsèque** : elle passe par la mitochondrie qui répond à des signaux pro-apoptotiques. Elle fait intervenir le cytochrome C.

La régulation de l'apoptose se fait par la régulation de l'expression des gènes Bcl-2.

- **Voie extrinsèque** : elle est induite cette fois par des signaux extérieurs à la cellule et se fait via les **récepteurs de mort (FAS, CD95)**.

Suite à l'interaction entre la protéine FADD et son ligand FAS on a activation des caspases initiateuses qui vont à leur tour activer les caspases effectrices.



♦ Régulation de la voie intrinsèque : les protéines de la famille Bcl2

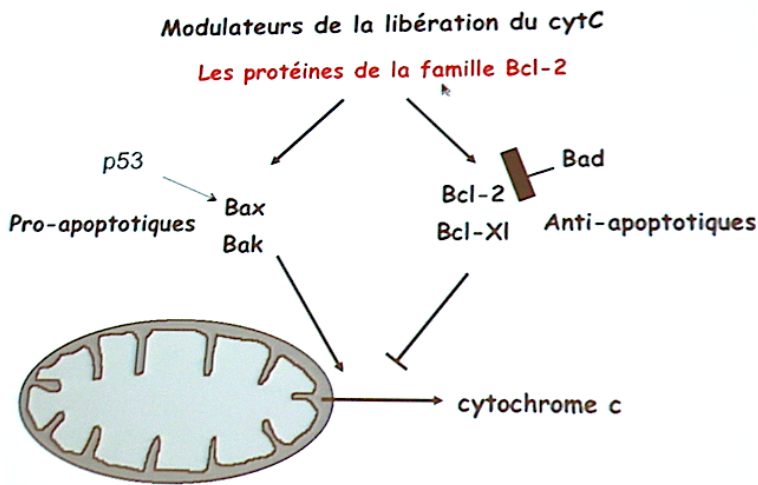
Ces protéines vont répondre à toutes une série de sollicitations cellulaires qui vont décider de la mort de la cellule. Les signaux pro-apoptotiques engendrés par Bcl2 vont se traduire au niveau de la mitochondrie par le relarguage du cytochrome C dans la membrane interne.

Dans la membrane interne, il interagit avec la protéine Apaf-1 qui va former dans le cytosol, avec la pro-caspase 9, une structure cellulaire appelée apoptosome.

L'apoptosome va aller activer les caspases effectrices.

L'étape clé de cette voie est le relargage du cytochrome C dans la membrane interne et c'est donc une étape fortement régulée.

C'est le rôle des protéines **Bcl2** :



On a des protéines qui favorisent ce relargage, ce sont donc des **protéines pro-apoptotiques**. Parmi elles, on retrouve notamment Bax ou Bak (eux mêmes sous contrôle de p53).

On a également des protéines **anti apoptotiques** (dont Bcl2 est le chef de file) elles mêmes sous le contrôle de protéines Bad. Ces dernières inhibent donc le relargage.

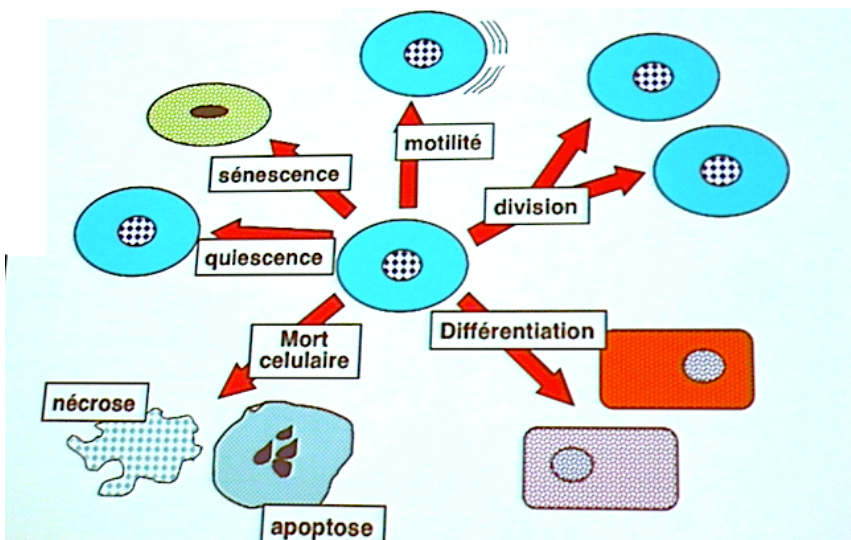
Il ne vous demande pas de connaître le nom de toutes les protéines qu'il cite.

Dans le cas d'un cancer, les signaux normaux de régulation sont complètement déréglés.

La signalisation cellulaire

I. Généralités

1. Programme des cellules



Le programme des cellules est déterminé par une combinaison complexe de signaux.

Il existe plusieurs centaines de types cellulaires spécialisés dans un organisme. Cette spécialisation ne les rend pas indépendantes les uns des autres.

Les cellules s'envoient des signaux et elles en reçoivent.

La destinée d'une cellule dépend des différents types de signaux qu'elle reçoit.

Ainsi la cellule peut :

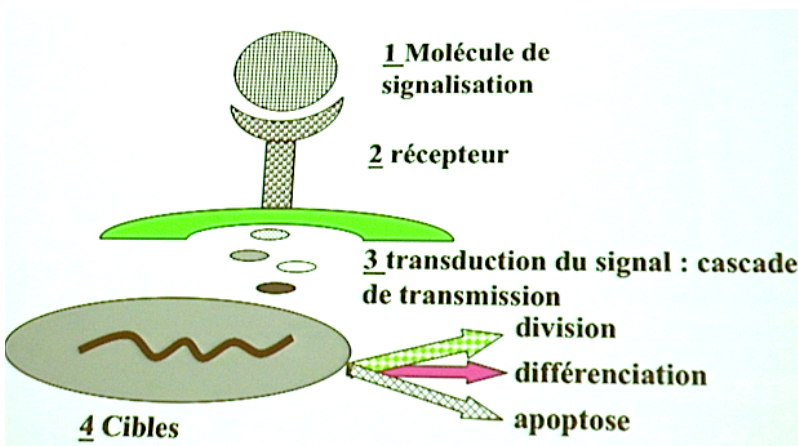
- **mourir** par **nécrose** ou **apoptose**
- se **diviser**
- se **différencier**
- se **déplacer**
- arrêter de se diviser par **sénescence** = définitive ou **quiescence** = transitoire

Il n'y a pas un signal qui va déterminer une direction mais un ensemble de signaux parfois antagonistes les uns par rapports aux autres. On vient de voir le double rôle des protéines Bcl2 pro ou anti apoptotiques.

C'est donc la balance entre la quantité de protéines pro et anti apoptotiques qui détermine l'entrée dans une voie.

On va étudier la signalisation extrinsèque (et très rapidement la signalisation intrinsèque).

2. Transduction du signal



On aura toujours une molécule qui va signaler (une hormone par exemple) et une molécule qui va recevoir ce signal : c'est le récepteur (de membrane ou intracellulaire).

Cette interaction va déclencher une **cascade** qui fait souvent intervenir des **modifications post traductionnelles** des protéines (comme une cascade de phosphorylation).

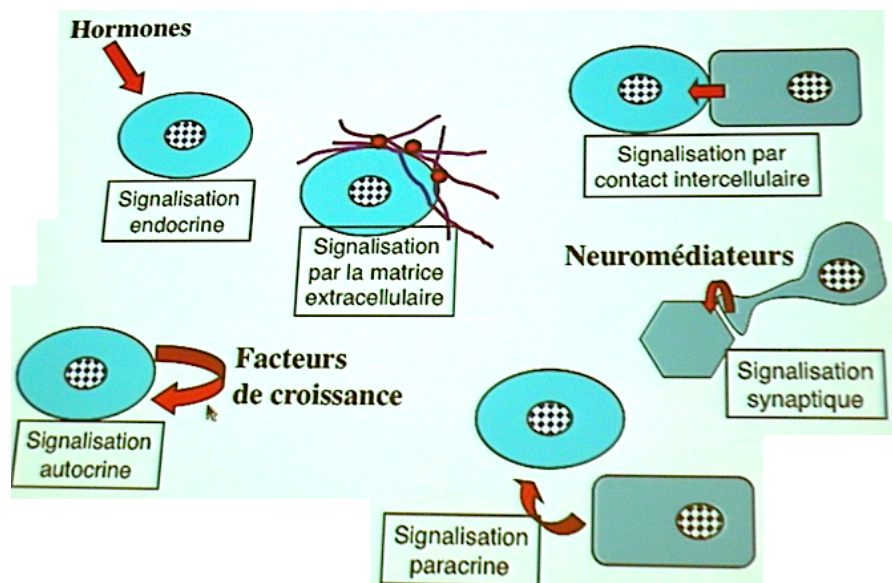
Ces modifications aboutissent à des cibles par exemple des protéines qui vont subir ces modifications.

Les cibles sont souvent des **gènes**.

En effet le but final de la cascade est souvent **d'activer un programme transcriptionnel** qui aboutit à un programme de division, de différenciation etc...

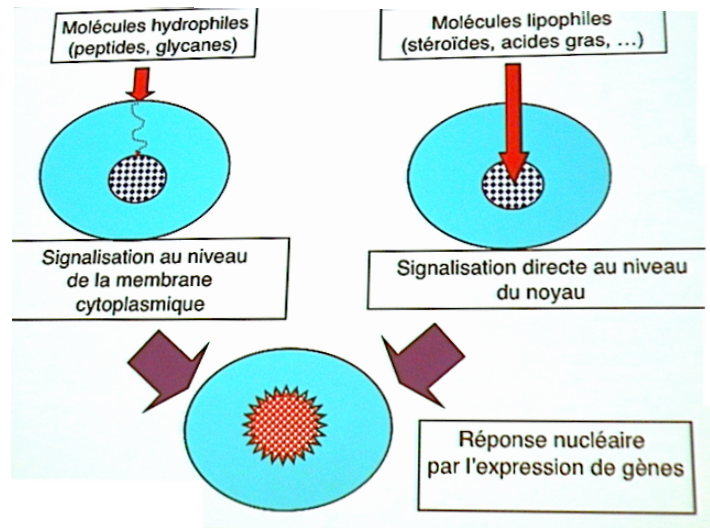
On distingue différents type de communication :

- Contact **intercellulaire**
- Contact avec la **MEC**
- **Endocrine** via les hormones véhiculées par le sang
- **paracrine** : intra tissulaire. La cellule envoie un signal capté par une cellule au sein du tissu.
- la transmission **neuronale** avec la **synapse**. (entre deux neurones ou entre un neurone et une cellule musculaire)
- **autocrine** : production par la cellule de son propre facteur de croissance



3. Deux grands types de signalisation

Ces deux types de signalisation dépendent de la nature de la molécule de signalisation :



- **les médiateurs hydrophiles** (peptidiques comme l'insuline et glucagon, des facteurs de croissance). Ils entraînent des réponses rapides par interaction avec un récepteur dans la membrane qui va reconnaître la molécule qui vient de l'extérieur. En effet, les molécules hydrophiles ne peuvent pas traverser seules la membrane.
- **les médiateurs lipophiles** (*que l'on étudiera pas dans ce cours*) qui peuvent traverser la membrane. Ce sont par exemple les hormones stéroïdes (cortisone, oestradiol...), les hormones thyroïdiennes, les acides gras. Ces molécules se lient à un récepteur intra cellulaire qu'on appelle **récepteur nucléaire d'hormones**. L'interaction des hormones avec leurs récepteurs vont également conduire à l'activation de gènes cibles. Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui sont activés lorsqu'ils interagissent avec leur ligands.

Dans les deux types de signalisation, le résultat sera souvent l'activation d'un programme transcriptionnel par **modification de l'expression des gènes**.

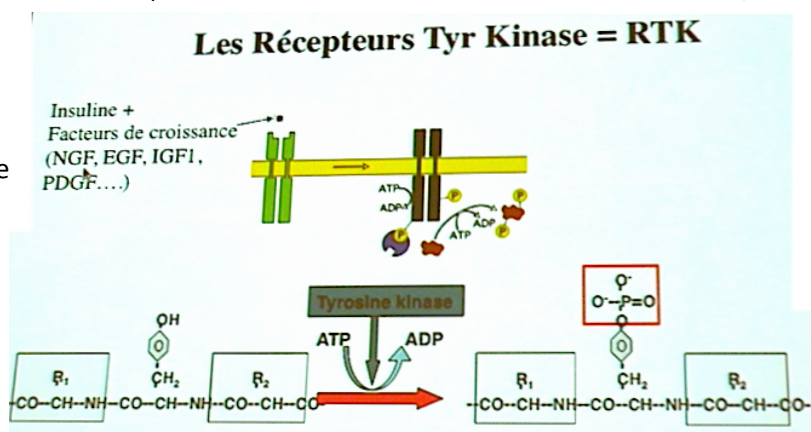
II. Exemple des récepteurs membranaires de type tyrosine kinase

C'est une grande classe de récepteurs membranaires, ce sont des kinases qui vont donc phosphoryler des résidus tyrosine.

Ces récepteurs vont reconnaître l'**insuline**, les **facteurs de croissance** (comme NGF : facteur de croissance des neurones, EGF pour l'épiderme, ou IGF pour insuline growth factor, PDGF...)

Les Récepteurs Tyr Kinase = RTK

- La partie **enzymatique** de ces récepteurs est **intracellulaire**. (L'architecture des récepteurs conditionne les mécanismes)
- La partie **extracellulaire** reconnaît le domaine d'interaction avec le ligand.
- La partie **transmembranaire** qui va former le dimère



1. L'échafaudage signalétique

On a la partie N-term du côté extracellulaire et de l'autre coté (en C-term) on a le domaine kinase qui est inactif en l'absence de ligand.

- ▶ Lorsque le ligand arrive, il va reconnaître spécifiquement le récepteur et s'y fixer.
- ▶ A ce moment là, on a une étape fondamentale dans la transmission du signal : **la dimérisation du récepteur**. En effet, le récepteur est monomérique et ne devient dimérique que lorsque le ligand est fixé.
- ▶ La dimérisation va permettre le rapprochement des 2 segments du récepteur (intra et extra cellulaire).
- ▶ **Cette interaction homodimérique entre les 2 récepteurs reconstitue l'activité kinase.**
- ▶ Il va y avoir une première phosphorylation, une **transphosphorylation** : un des domaines va phosphoryler l'autre et vice versa. On a donc une première série de tyrosine qui vont être phosphorylées.
- ▶ Cette première phosphorylation entraîne **l'ouverture d'une "poche ATP"** qui va permettre d'autres phosphorylations. C'est donc un **phénomène en cascade**. On va avoir phosphorylation de toutes les tyrosines du domaine intracellulaire.
- ▶ Ces tyrosines phosphorylées vont ensuite servir de site d'ancrage pour toute une **grande famille de protéines** qui vont contribuer à la transmission du signal.

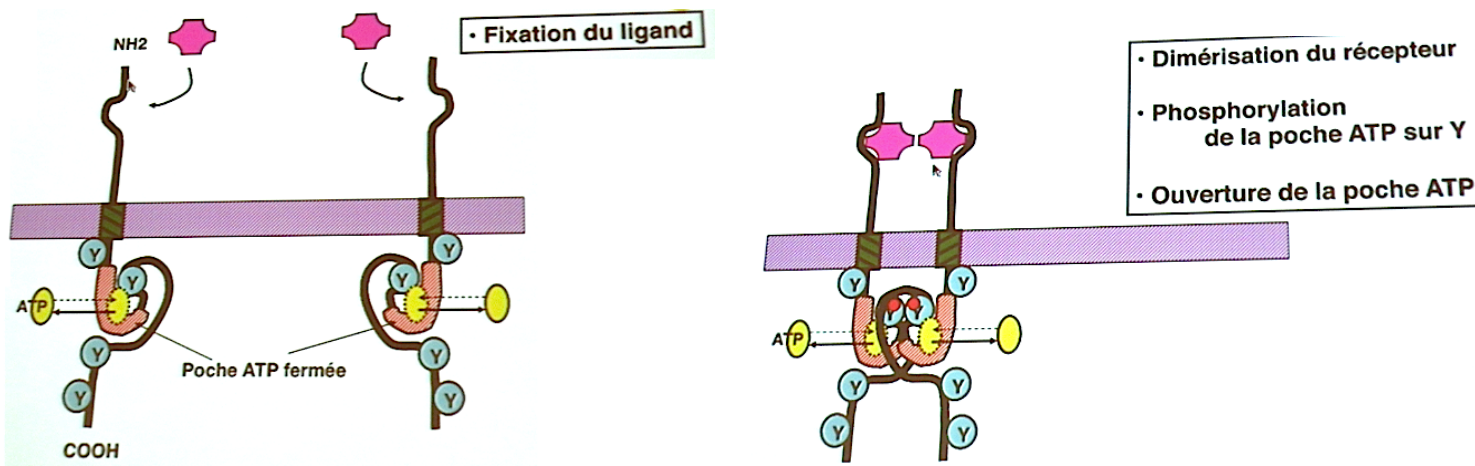
Ces protéines ont la propriété de reconnaître les tyrosines phosphorylées.

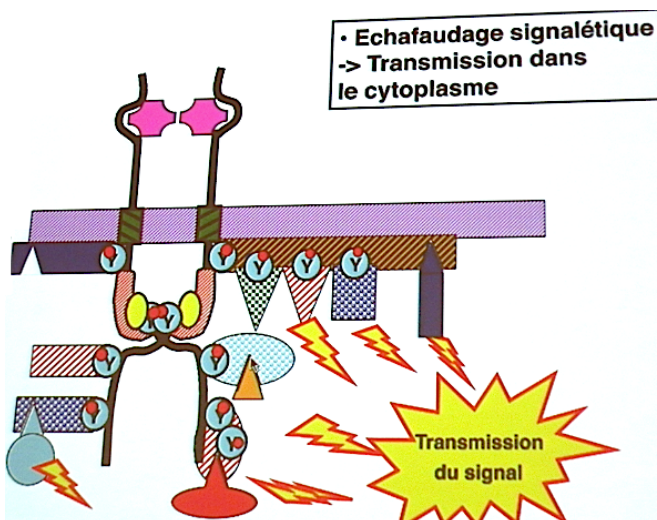
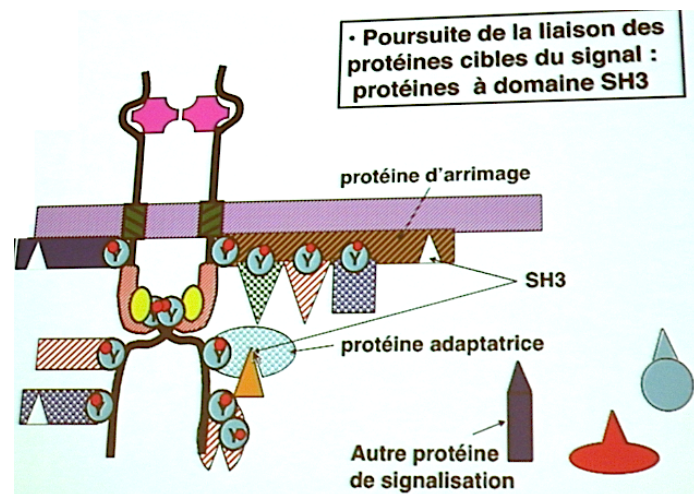
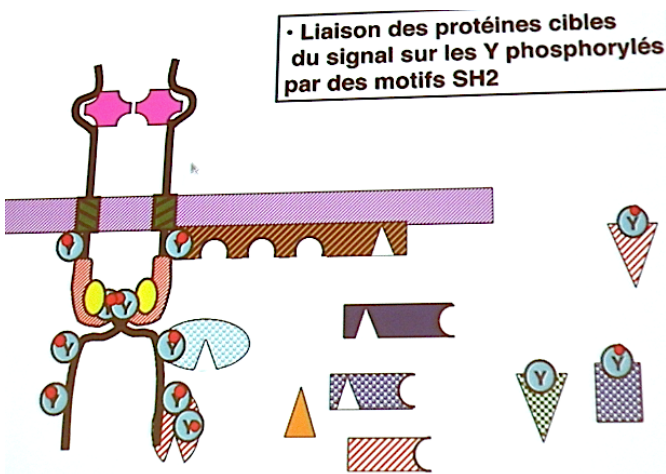
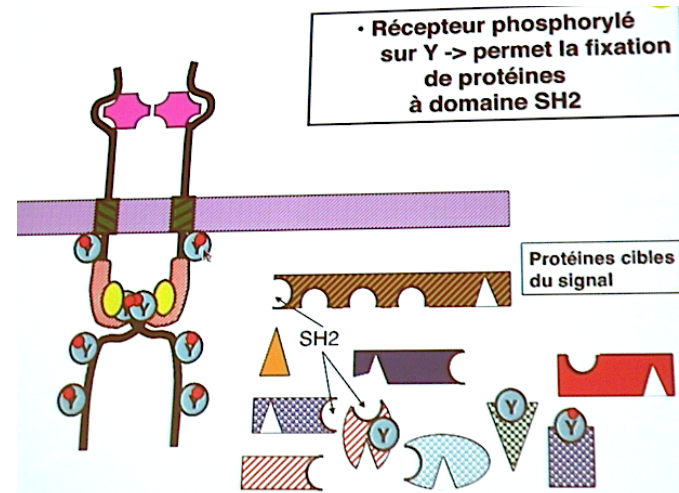
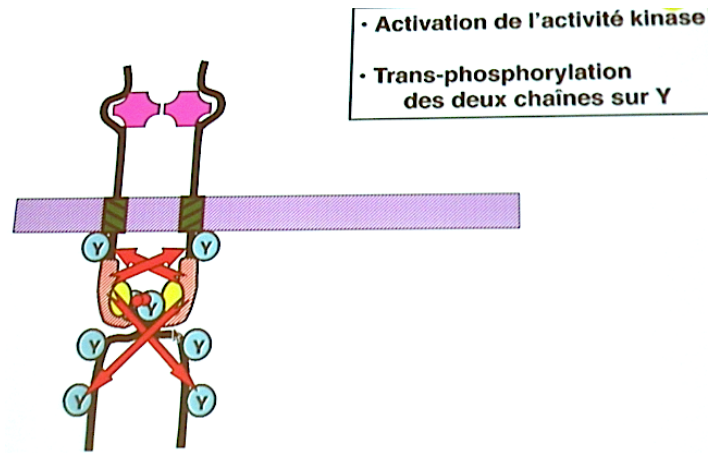
Il existe un domaine particulier (une structure tridimensionnelle particulière) : **le domaine SH2**.

Toutes les protéines ne le possèdent pas et celles qui le possèdent sont donc ces protéines qui interagissent avec les tyrosines phosphorylées dans le cadre de la transmission du signal.

A partir d'un signal extracellulaire, on commence donc à construire une structure qui s'étend à travers l'interaction avec ces protéines à domaine SH2.

- ▶ Cette construction va s'étendre encore plus grâce à un autre type d'interaction, avec des **protéines à domaines SH3**. Les protéines SH2 ont également un **domaine d'interaction avec les domaines SH3**.
- ▶ Ces protéines à domaine **SH3** vont elles mêmes interagir avec d'autres protéines qui se fixent dans le cytosol ou sur la face interne de la membrane plasmique.
- ▶ **On forme donc un véritable échafaudage.**
Lorsque celui ci est assez important, le signal se transmet.





Les schémas reprennent la chronologie que j'ai retranscrite plus haut. Je trouvais ça plus clair que de mélanger texte et schéma.

La décision de transmettre un signal n'est pas prise à la légère par la cellule.

On voit que la réalisation de cet échafaudage requiert de nombreuses étapes.

Il faut bien comprendre que toutes ces protéines à domaines SH2, SH3 ne s'expriment pas n'importe quand... tout ce processus est très régulé.

2. Les grandes voies de signalisation dans le cytoplasme

♦ La voie des MAP-kinases :

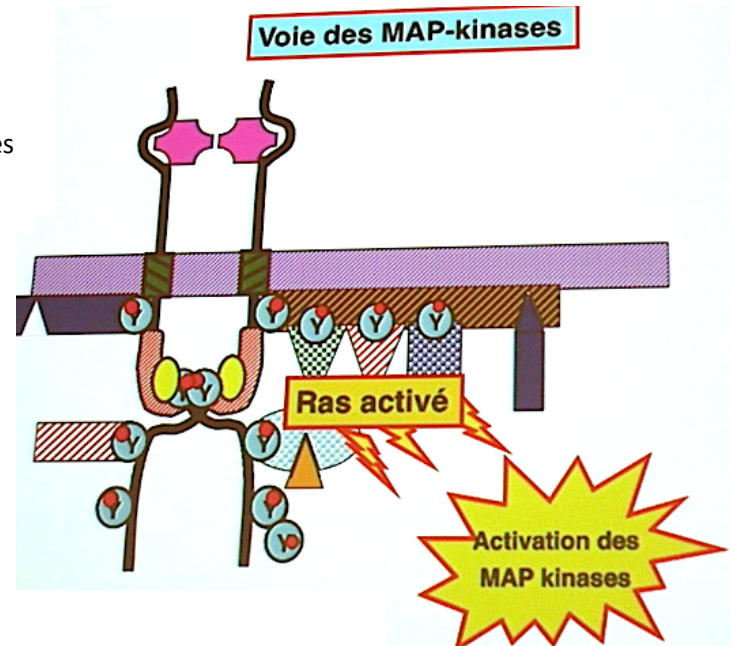
C'est une voie **très conservée**, on la retrouve chez les levures, les invertébrés, les vertébrés.

Elle contrôle de nombreux programmes cellulaires :
métabolisme, division, différenciation, migration etc...

Ici l'échafaudage signalétique va servir à activer une protéine de la famille **des protéines Ras**, appartenant elle-même à la famille des petites protéines G.

Pour revenir aux schémas ci-dessus, dans le cas de la voie des MAP kinases, tout cet échafaudage a donc pour objectif **d'activer Ras**.

C'est Ras qui va activer toute la cascade de phosphorylation.
Ras est localisé sur la face interne de la membrane plasmique.



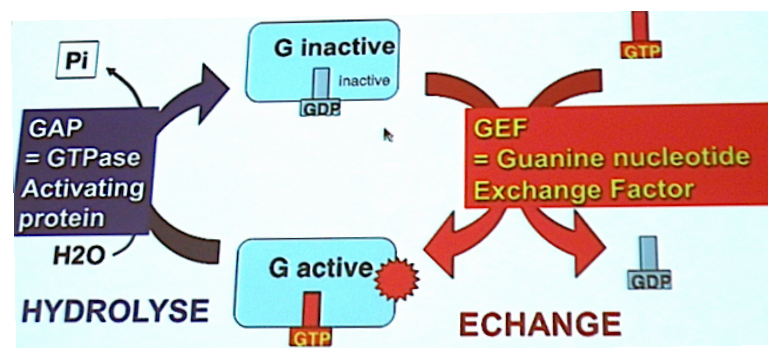
Ras fait partie de la super famille des **petites GTPases**.

On en distingue 4 grandes branches dans l'arbre phylogénétique de l'évolution de ces protéines :

- **RAS** impliquées dans la **prolifération** et la **différenciation**
- **Rho** impliquées dans le cytosquelette, dans la réponse au stress
- **Rab** impliquées dans le trafic vésiculaire
- **Ran** permettant le trafic nucléo-cytoplasmique

Toutes ces protéines G-monomériques fonctionnent de la même façon, elles sont activées par cet échafaudage. Et pour être activées il faut qu'elles soient associées à une molécule de **GTP**.

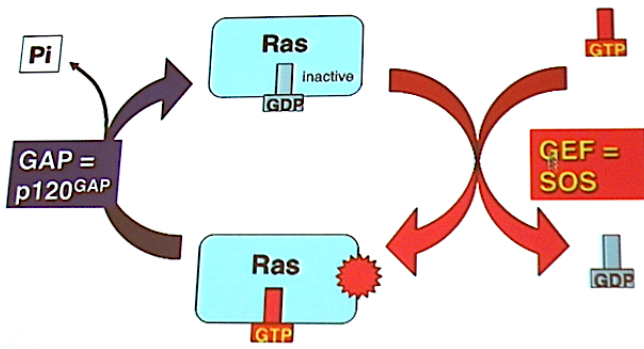
Cette activation est contrôlée par d'autres protéines qui vont soit favoriser l'activation soit la désactivation.



Les protéines qui vont **activer** ces protéines G sont des protéines qui vont effectuer **l'échange du GDP en GTP**. C'est bien un échange et non une phosphorylation, on échange une molécule de GDP contre une de GTP.

Toutes les protéines G sont associées à un facteur d'échange qui leur est spécifique, on donne à ces facteurs le nom générique de **GEF**.

Il suffirait d'hydrolyser le GTP pour rendre la protéine G inactive, ce que la protéine G est d'ailleurs capable de faire, mais pour réaliser cette hydrolyse elle a besoin d'une protéine qui **active son activité GTPase**. C'est le rôle des **protéines GAP** associées à chacune des protéines G.



Dans le cas de la protéine RAS, le GEF associé s'appelle SOS et le GAP est p124.

➔ Fonctionnement du facteur d'échange SOS :

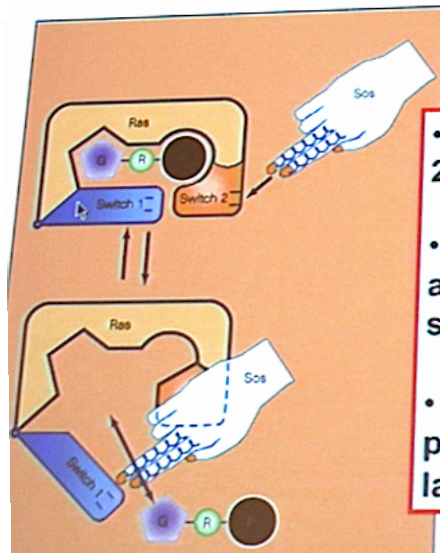
On peut voir représentée schématiquement une coupe transversale de la protéine RAS avec une poche qui accueille le GDP et deux parties de la protéine : **Switch 1 et 2**.

Switch 1 et 2 bloquent la sortie du GDP.

SOS que l'on représente ici comme une main avec 2 doigts qui vont pousser Switch 1 grâce à une hélice alpha.

Donc en présence de SOS on a ouverture de la poche, **le GTP va pouvoir prendre la place du GDP**.

Activation de Ras par SOS



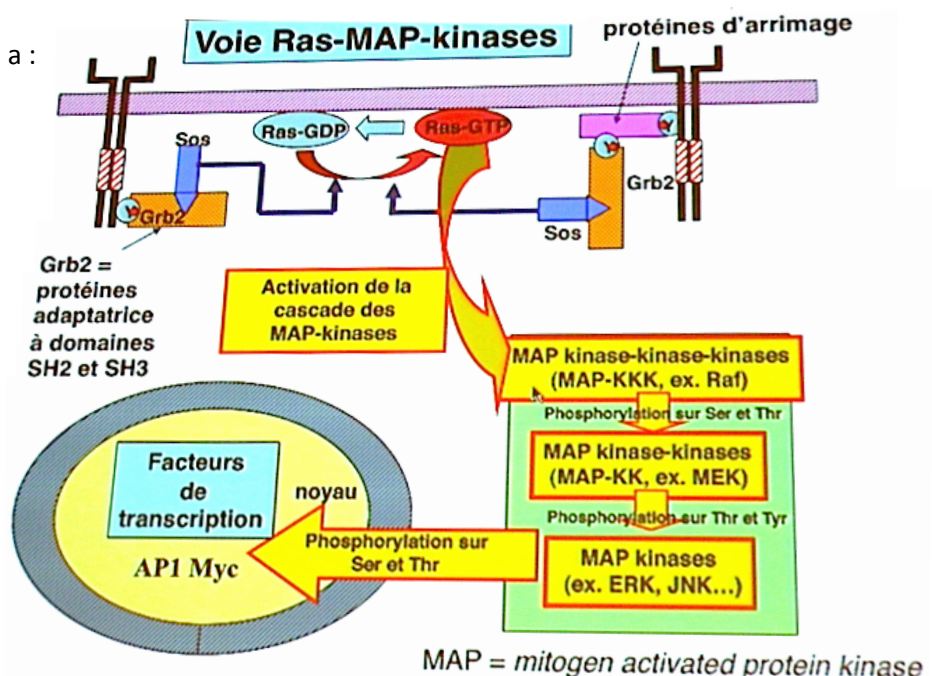
•SOS se fixe sur Switch 1 et 2 (S1 et S2) de Ras-GDP

•L'insertion d'une hélice alpha de Sos déplace S1 du site de fixation du GDP

• Le GDP diffuse, laissant la place pour le GTP qui prend la place

Donc pour résumer la voie des MAP-kinases on a :

- **homodimérisation** du récepteur
- **transphosphorylation**
- formation de tyrosines phosphorylées
- **Activation de RAS** par l'échafaudage : par exemple une protéine à domaine SH2 (Grb2) interagit avec une tyrosine phosphorylée. Par son domaine SH3 Grb2 interagit également avec **SOS** ce qui aboutit à l'activation de RAS.
- Une fois RAS activée, elle va elle-même activer une **cascade de MAP kinases** qui va être en grande partie localisée dans le cytoplasme.



Cette cascade comporte **3 étages** :

- premier étage : la voie des **MAP kinase-kinase-kinases** (MAP-KKK) avec par exemple la protéine **Raf** qui va phosphoryler sur les sérines et thréonine les kinases du 2ème étage. (les MAP kinase-kinase)
- deuxième étage : les MAP KK, une fois activées vont phosphoryler sur **sérine** et **thréonine** des MAP kinases
- Ces MAP kinases vont être ensuite **transloquées dans le noyau** et elles vont elles même **phosphoryler des facteurs de transcription qui vont être responsables de l'effet**.

Ces facteurs de transcription peuvent contrôler la **prolifération** comme le facteur Myc ou AP1.

♦ Voie des phosphoinositides :

Elle est impliquée dans de nombreuses réponses même si elle semble être moins utilisée que la voie des MAP-K. Bien qu'elle parte des mêmes récepteurs, la voie est assez différente.

Le résultat de cet échafaudage qui est créé par la phosphorylation des tyrosines suite à la dimérisation peut être :

- soit l'activation de la **phospholipase C**
- soit l'activation de la **PI3 kinase**

Dans la voie de la **phospholipase C** :

➔ on a PIP2 qui est associé au DAG sur la membrane plasmique et la phospholipase C va activer cette structure en DAG et IP3 qui va être libéré dans le cytosol.

Dans le cas de la **PI3 kinase** :

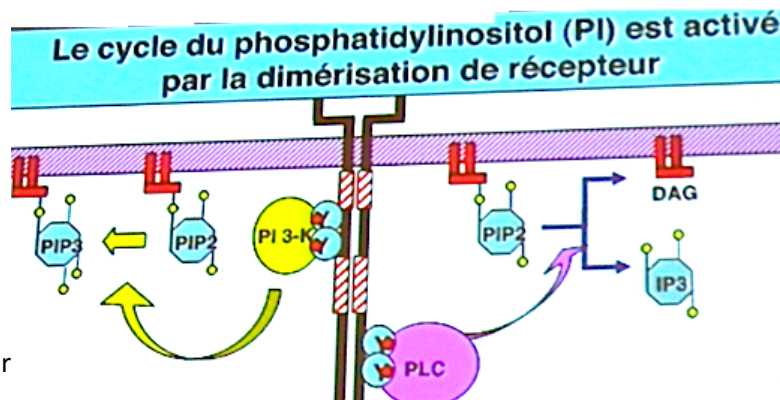
➔ PI3 Kinase qui est une kinase pour lipide va phosphoryler PIP2 qui devient ainsi PIP3.

Tout cela commence bien sûr par une dimérisation du récepteur.

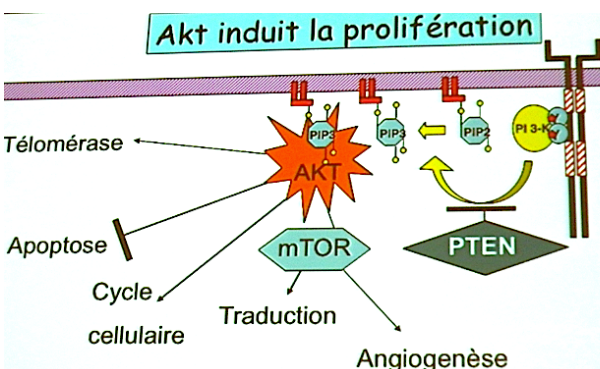
Dans le cas de PI3K, on a phosphorylation de PIP2 en PIP3 et c'est PIP3 (lipide membranaire phosphorylé) qui va servir de **second messenger** pour la transmission signal.

► Ce lipide phosphorylé PIP3 va servir de **site d'interaction avec la protéine AKT** via un domaine PH (pleckstrin homologie)

Cette interaction avec PIP3 va induire un changement de conformation de AKT qui va être phosphorylé et activée.



DAG = Diacylglycérol
IP3 = Inositol triphosphate
PIP2 = Phosphatidylinositol diphosphate
PIP3 = Phosphatidylinositol triphosphate
PLC = Phospholipase C
PI 3-K = Phosphatidylinositol 3'-kinase



Cela a des conséquences multiples qui vont toutes **contribuer à la prolifération de la cellule**.

AKT phosphorylée va **activer le cycle cellulaire, bloquer l'apoptose**.

Elle va activer une enzyme utile pour la réplication de la partie terminale des chromosomes : **la télomérase** (cela va augmenter la possibilité de se diviser pour les chromosomes).

A travers **mTOR** (qui est une sérine/thréonine kinase) elle va favoriser la **traduction** et l'**angiogenèse (pour l'apport d'oxygène)**.

AKT favorise la prolifération en réponse à des signaux (c'est une "pédale d'accélérateur") mais il existe aussi une "pédale de frein".

➡ La pédale de frein c'est une **phosphatase** qui s'appelle **PKS** et qui va déphosphoryler PIP3, empêcher PI3 kinase de phosphoryler PIP2 en PIP3.

Toutes ces voies sont centrales dans de nombreux phénomènes biologiques (activation des lymphocytes, prolifération cellulaire...).

Par exemple, un médicament immunosuppresseur, la rapamicyne, inhibe mTOR et ainsi la voie d'activation des lymphocytes mais est aujourd'hui utilisée contre le cancer puisqu'elle inhibe la prolifération.

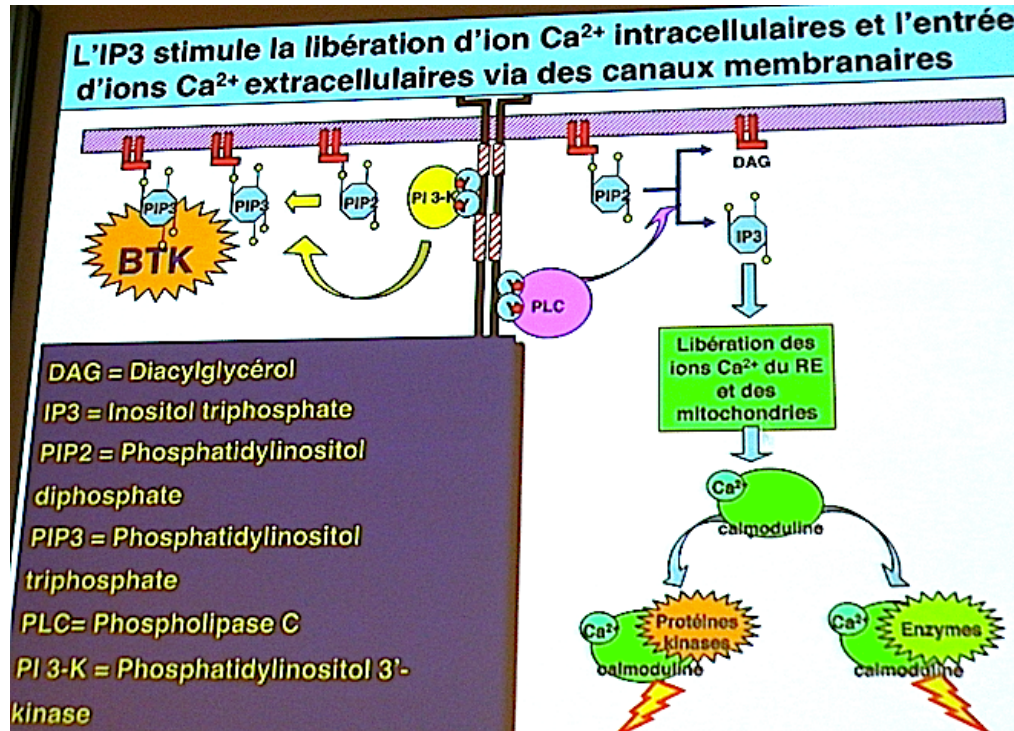
PKS est un frein de la prolifération, un **gène suppresseur de tumeurs**, qui est retrouvé **muté** dans un certains nombres de cancers.

On a donc vu l'activation de la PI3 kinase.

La deuxième branche de cette voie va être **l'activation de la phospholipase C**.

Son activation va donner naissance à deux messagers intracellulaire :

- le **diacylglycérol (DAG)** qui reste à l'intérieur de la bicouche
- l'**inositol triphosphate (IP3)** qui va gagner le cytosol et va ainsi permettre l'interaction avec des protéines, ce qui va aboutir à une mobilisation du calcium. L'IP3 est donc le second messenger qui va induire la **libération de calcium** à partir des compartiments membranaires ou le calcium est stocké.



Le calcium est initialement stocké dans le réticulum endoplasmique et dans la mitochondrie. Une fois libéré, il se fixe à la calmoduline qui elle-même va activer un certain nombre d'enzymes qui vont favoriser la prolifération des cellules.

Le **DAG** libéré, de son côté, va activer la **protéine kinase C**. Cette protéine kinase C, s'aidant du calcium libéré va initier une série de phosphorylation de protéines cytoplasmiques.

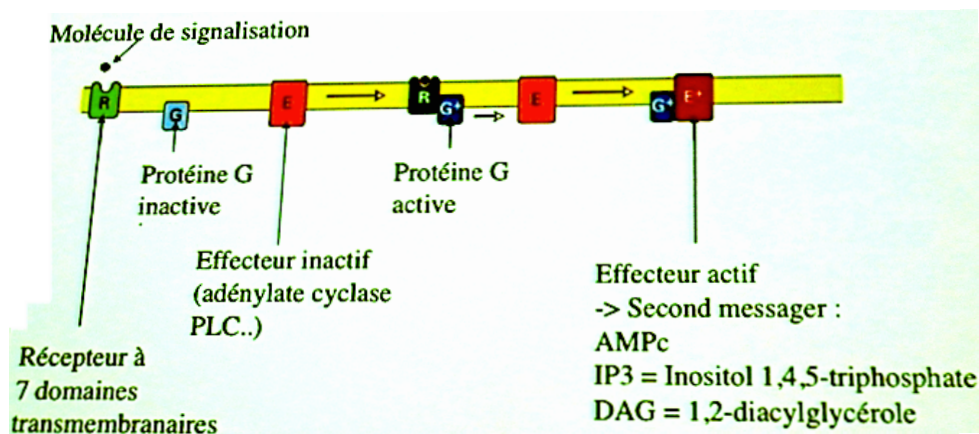
Cela va également entraîner une **boucle de rétro-régulation** qui va inhiber cette voie de la protéine kinase C.

On voit donc que lorsqu'on active une voie, on ne la laisse jamais activée trop longtemps.

III. Exemple des récepteurs couplés aux protéines G

Ce ne sont pas des protéines G de type RAS mais des protéines G spécifiques.

Ces récepteurs couplés aux protéines G sont des récepteurs à **7 domaines transmembranaires**. Leur ligand peuvent être l'**adrénaline**, l'**acétylcholine**, des acides aminés...



► Une fois le ligand fixé, on a activation de ces protéines G ce qui va entraîner l'activation d'une enzyme qui est localisée dans la membrane plasmique : l'**adénylate cyclase** ou la **phospholipase C**. (C'est le plus souvent l'adénylate cyclase)

► L'adénylate cyclase synthétise ensuite un **second messager** : l'**AMP cyclique** (dans le cas de l'adénylate cyclase)

Dans le cas de la **phospholipase C**, le second messager sera toujours l'**IP3**.

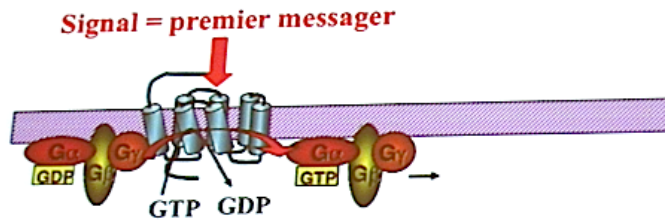
On voit donc que ces voies "se parlent les unes aux autres". Par des portes d'entrée différentes, on peut parfois activer la même voie comme ici avec la phospholipase C qui peut être activée par des récepteurs tyrosine kinase ou par des récepteurs couplés aux protéines G.

Beaucoup de signaux sont médiés par ces récepteurs. En effet, on a environ 1000 récepteurs couplés aux protéines G différents.

Un même ligand peut activer plusieurs membres de la famille des récepteurs ce qui confère les **spécificités de réponses**. On a par exemple 9 récepteurs pour l'adrénaline, plus de 5 pour l'acétyl choline.

Les premiers messagers sont les ligands extra cellulaires qui peuvent être : des ions, des photons, des acides aminés aminés ou leurs dérivés (dopamine, histamine, noradrénaline), des glycoprotéines, des peptides (FSH, LH...), des lipides hydrosolubles (prostaglandines...)

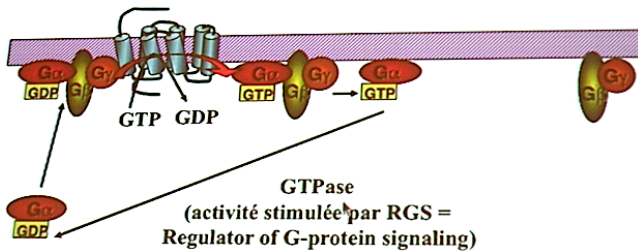
Ces récepteurs sont la cible de plus de 50% des agents thérapeutiques pharmaceutiques sur le marché.

Echange GDP <-> GTP

On a donc les 7 domaines transmembranaires et les 3 sous unités (α , β , γ) des protéines G (hétérotrimériques).

Le récepteur en interaction avec le premier messenger (le signal) va **activer la sous unité α** et permet l'échange du GDP avec le GTP.

Cela a entraîné le clivage de cet hétérotrimère en 2 composants : un monomérique, le $G\text{-}\alpha\text{GTP}$ et un hétérodimère $G\text{-}\beta\text{-}\gamma$.

Désactivation

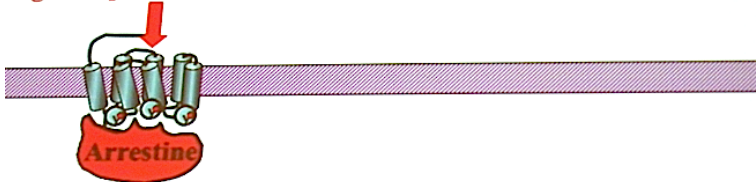
$G\text{-}\alpha$ va être **recyclé par une GTPase**. Cette activité GTPase doit être activée par une **protéine RGS**.

On va revenir à une forme GDP.

Ce recyclage est induit par une rétro régulation négative de cette voie lors d'une **stimulation trop longue**.

stimulation prolongée : désensibilisation du récepteur

Signal = premier messenger



C'est la **désensibilisation** du récepteur.

La phosphorylation des tyrosines induite par cette voie (via une kinase cytosolique) va entraîner la fixation de l'**arrestine** qui va reconnaître les tyrosines phosphorylées et va **bloquer les récepteurs**.

Encore une fois, on ne veut pas que la voie soit activée trop longtemps.

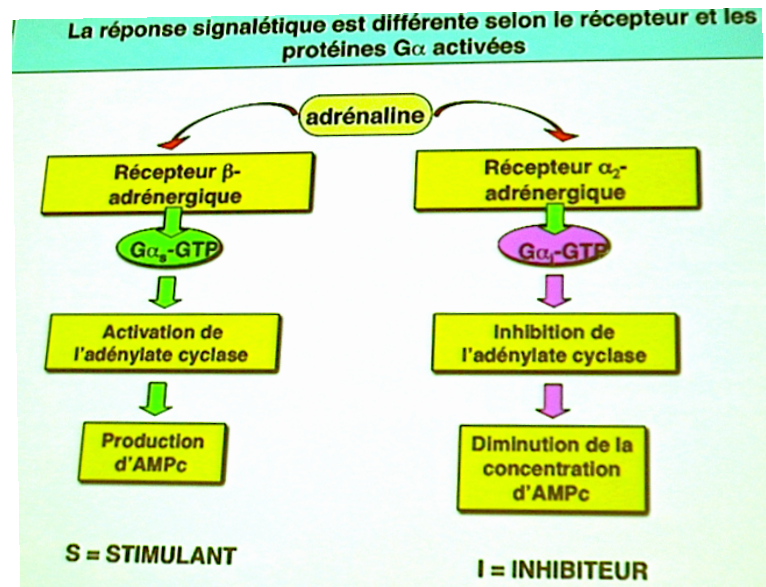
Les réponses signalétiques vont être différentes en fonction des protéines G activées, on pourra ainsi obtenir des signaux inhibiteurs ou activateurs.

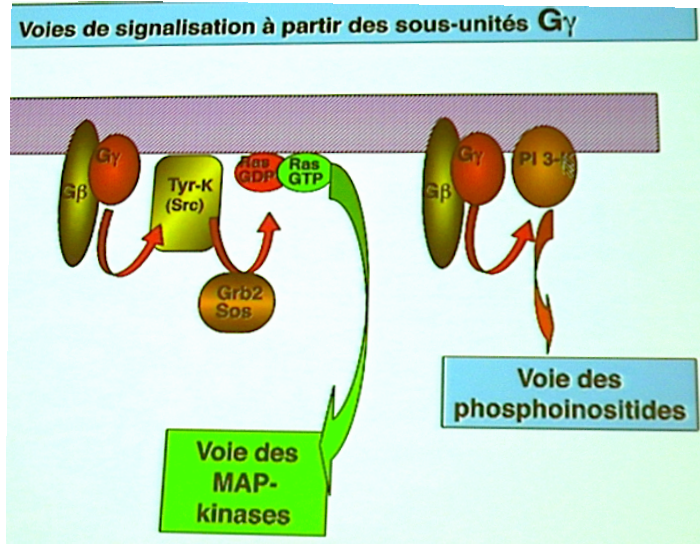
Un même récepteur peut interagir avec plusieurs protéines G.

Dans le cas de l'**adrénaline** :

- Avec les récepteurs **β -adrénergiques** : on aura une interaction avec un $G\alpha_s\text{-GTP}$ qui va **activer l'adénylate cyclase**. On aura donc production d'**AMPc** qui va être stimulant pour la contraction des fibres musculaires.
- Mais avec le même ligand, si la cellule possède cette fois des **récepteurs α_2 adrénergique**, on aura interaction avec un $G\alpha_i\text{-GTP}$ qui va **inhiber l'adénylate cyclase** et donc une diminution de la concentration d'AMPc.

A partir du même signal, en fonction du type de récepteur et de la protéine G-alpha associé, on aura des réponses opposées.





Les sous unités **beta et gamma** jouent aussi un rôle dans ces voies de signalisation.

Elles vont notamment activer la **tyrosine kinase K**, localisée sur la face cytosolique de la membrane plasmique (elle n'a rien à voir avec les récepteurs tyrosine kinase).

Cette protéine kinase K va également créer un échafaudage avec SOS qui va activer Ras qui va activer la voie des Map-kinases.

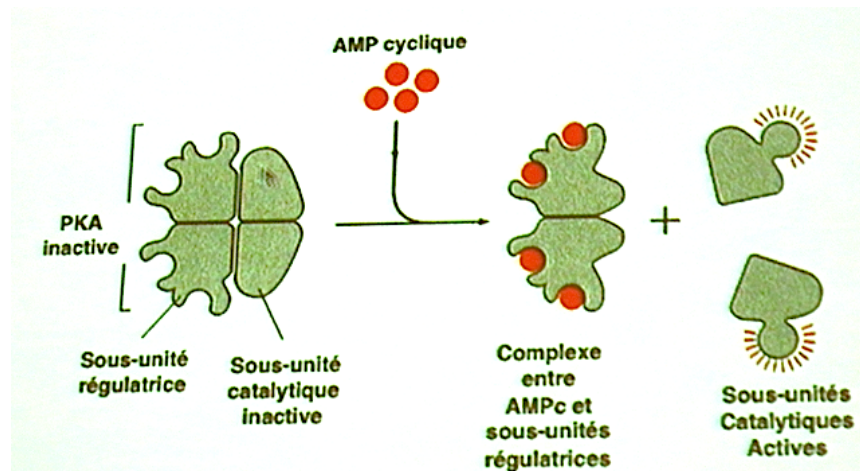
Cet hétérodimère $\beta\text{--}\gamma$ peut aussi activer la voie des **phosphoinositides** via PI3 kinase.

Un des rôles de cette voie de signalisation est de réguler la concentration d'AMPc dans la cellule en activant ou inhibant l'adénylate cyclase.

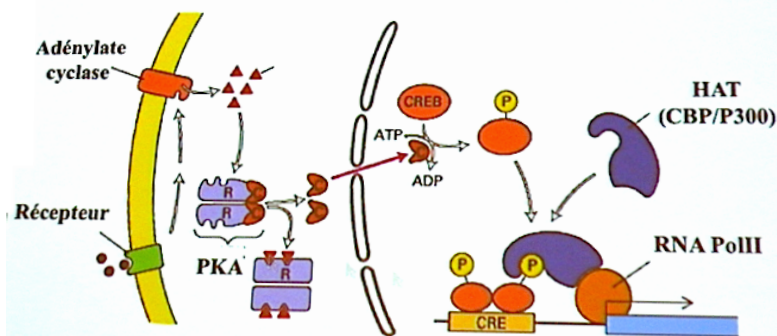
L'AMPc va réguler une autre kinase : la **protéine kinase A**.

Cette **PKA** est formée de **4 sous unités, 2 régulatrices et 2 catalytiques** qui peuvent être activées par la concentration en AMPc. Les sous unités catalytiques sont **inactives** tant qu'elles sont associées aux régulatrices.

Cette activation se fait par la fixation de l'AMPc sur les sous unités **régulatrices**. Cela va **dissocier ces dernières des catalytiques** qui vont ainsi pouvoir agir en tant que **kinases**.



La phosphorylation de CREB par PKA fait le lien entre l'AMPc et la transcription



Les sous unités catalytiques vont être **transloquées à l'intérieur du noyau** ou elles vont pouvoir phosphoryler certains facteurs de transcription, notamment les facteurs **CREB**.

CREB phosphorylé va déclencher une réponse en activant la **transcription** des gènes par le recrutement de la polymérase II et en modifiant la structure de la chromatine.

Il va y avoir recrutement **d'histones acétyl transférase**s pour modifier la structure de la chromatine et activer la transcription.

IV. Transduction du signal d'un dommage à l'ADN

Une des circonstances où les voies de transmission du signal entrent en action c'est lors d'un **dommage à l'ADN**.

Lors de l'étude du cycle cellulaire nous avons vu qu'il existe des points de contrôle du cycle, des **check points** qui s'assurent que toutes les étapes se passent normalement.

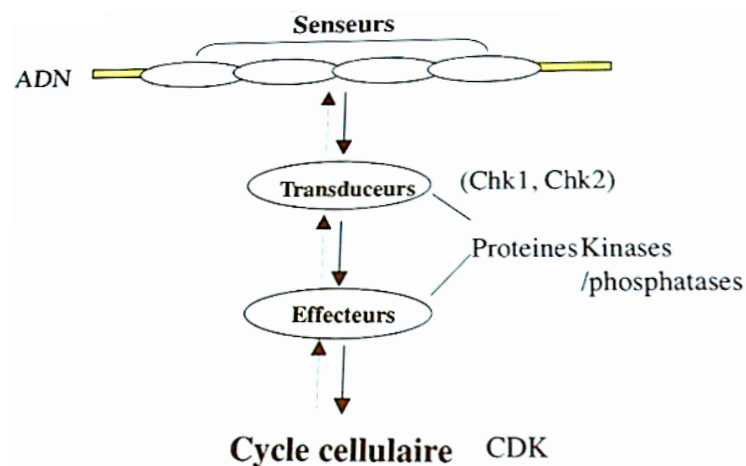
En cas de dommage l'ADN, quelque soit le moment du cycle (G1, S, G2) il y a **arrêt de la prolifération** puis éventuellement **réparation** et reprise du cycle.

C'est un processus central qui se produit tous les jours ; quand nous sommes exposés au soleil, nous sommes exposés aux rayons UV.

Ces voies de reconnaissance et de transmission du signal d'un ADN endommagé ressemblent étonnamment aux voies de transduction du signal venant de l'extérieur de la cellule.

Il existe des protéines qui vont reconnaître que l'ADN a été endommagé, ce sont les protéines **senseurs**. Ce sont ces protéines qui jouent un peu le rôle de récepteurs, ce sont elles qui reconnaissent le dommage.

Au niveau de ces senseurs on va avoir formation d'un **échafaudage** moléculaire. Il n'a pas lieu au niveau de la membrane plasmique (puisque l'on est dans le noyau), mais au niveau de la **chromatine** qui joue un rôle essentiel dans la mise en place de cet échafaudage.



C'est seulement une fois que cet échafaudage est construit que l'on a activation des kinases transductrices du signal. Les différents dommages de l'ADN vont **converger** vers l'activation de 2 kinases qui jouent un rôle très important : **Chk1 et Chk2**.

Ces protéines transductrices du signal vont agir sur des cibles, des **effecteurs**, qui peuvent être des **protéines kinases**, des **phosphatases** ou encore des **facteurs de transcription**.

Un exemple célèbre que vous connaissez déjà est la protéine **p53** qui est une protéine effectrice de cette voie.

Cela va agir sur le cycle cellulaire et notamment sur les **CDK** qui jouent un rôle important dans l'avancée du cycle.

Une des kinases de reconnaissance et d'activation du système est une kinase qui appartient à la même famille que les kinases dont on a parlé lorsque l'on a évoqué les récepteurs tyrosine kinases et les protéines G.

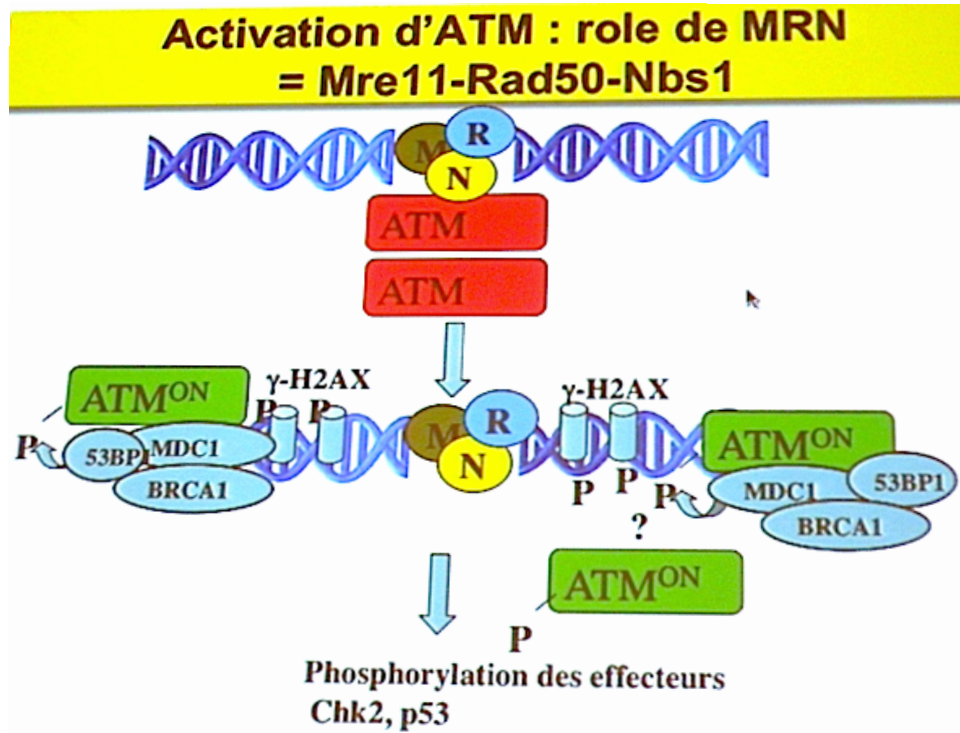
Ce sont les **kinases ATM et ATR** qui jouent un rôle essentiel au début de ce processus de **reconnaissance des dommages**.

Elles ressemblent à des lipides kinases mais sont bien des protéines kinases.

En cas de cassure de la double hélice (qui est parmi des lésions les plus problématiques pour la cellule ; la plus difficile étant le pont inter brin), il faut **reconnaître** la lésion et la **réparer**.

La cellule sait le faire mais ce n'est pas simple, c'est donc dangereux comme dans les irradiations ionisantes, le système peut être débordé.

Lorsque l'on a une cassure double brin, **dès la première seconde**, il va y avoir intervention d'un complexe de **3 protéines** qui jouent un rôle essentiel. C'est le complexe **MRN** pour Mre11-Rad50-Nbs1.



Ce complexe joue un **double rôle** : dans la **reconnaissance** immédiate du dommage, dans la **transduction** du signal et également dans la **réparation**.

Ce complexe MRN intervient dans la principale voie de réparation des cassures de brins : la **recombinaison homologue**.

- ▶ Ce que fait MRN quand il est associé à la cassure c'est activer **ATM**.
- ▶ ATM va **s'auto phosphoryler** et va ensuite pouvoir phosphoryler d'autres protéines.
- ▶ Une des premières protéines qu'il va phosphoryler c'est un **variant de l'histone H2A** : H2AX.

La diversité des histones est due aux modifications post traductionnelles mais aussi à l'existence de variant d'histones.

Parmi ces variants, on a donc **H2AX** qui est spécifiquement phosphorylé par ATM en cas de cassure. (Il devient alors γ -H2AX) Donc à l'état **normal**, sans cassure, H2AX n'est **pas phosphorylé**.

Si on casse notre ADN, lors d'une irradiation par exemple, on aura **fixation de MRN**, **activation de ATM** et **phosphorylation des H2AX** autour de la cassure.

- ▶ H2AX phosphorylé va servir à fixer d'autres molécules ATM. On a un processus itératif qui permet d'**amplifier le signal**.
- ▶ Cet ATM phosphorylé va pouvoir phosphoryler d'autres protéines qui vont être **associées à la chromatine** dont les protéines 53BP1, MDC1 et BRCA1.

- Ce processus va se propager dans la chromatine sur plusieurs milliers de paires de base, plusieurs centaines de nucléosomes.
- Quand la plateforme d'activation va être suffisamment importante autour de la cassure, on va pouvoir activer des kinases de transduction Chk1 et Chk2.

Dans le cas spécifique de l'activation d'ATM par les cassures doubles brins, la kinase principale qui est activée c'est **Chk2**.

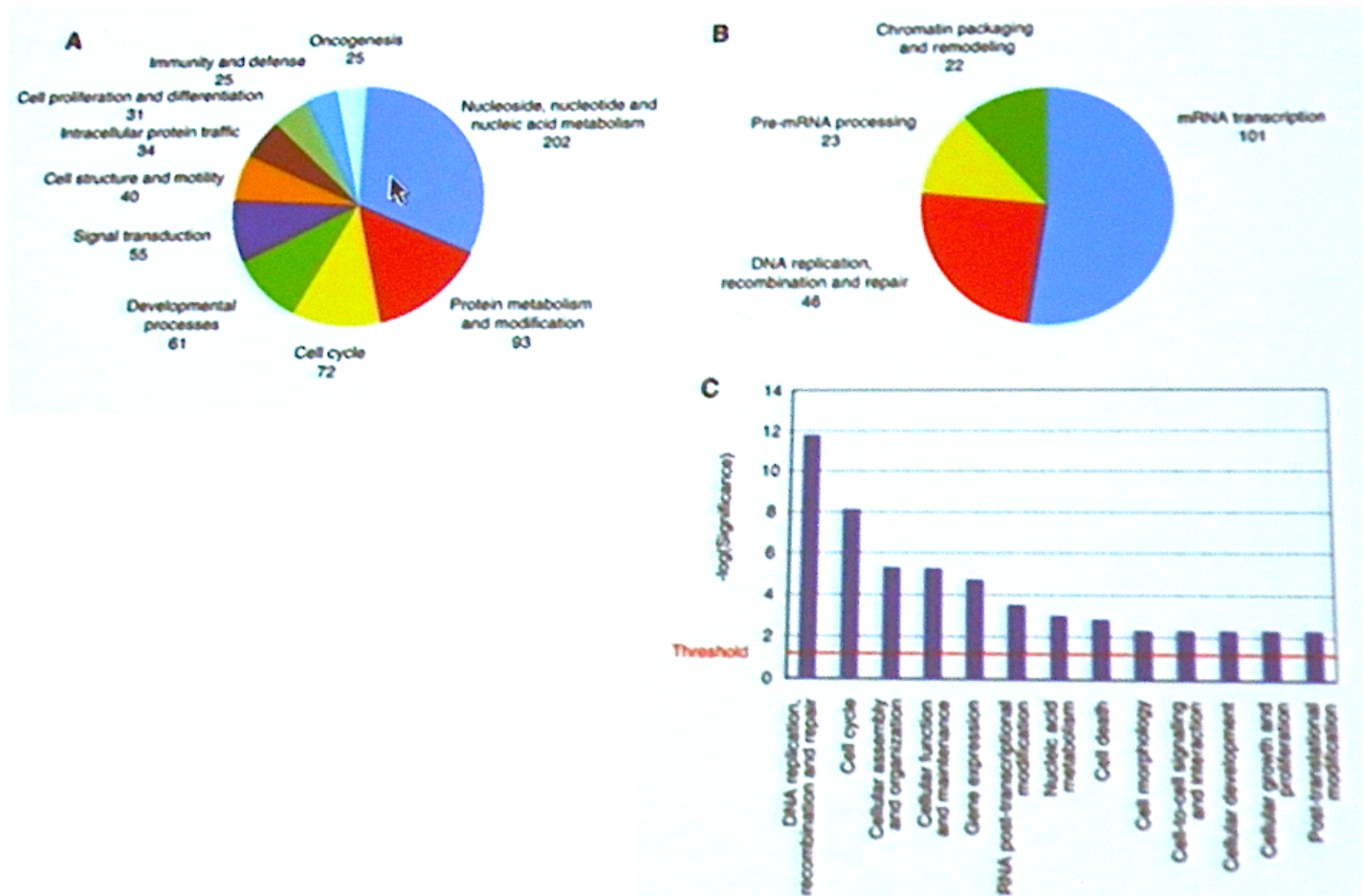
- Chk2 va activer p53 en la phosphorylant et donc va entraîner **l'activation des gènes cibles**.

ATM et ATR sont impliqués dans 2 types différents de reconnaissance.

ATM reconnaît principalement les **cassures** doubles brin (et active Chk2) et **ATR** s'occupe des problèmes de **blocage** de la **fourche de réplication** (et active Chk1).

Des études de **protéomique** ont permis d'identifier toutes les protéines qui sont phosphorylées par ATM et ATR lors d'un dommage de l'ADN.

On en recense plus de 700.



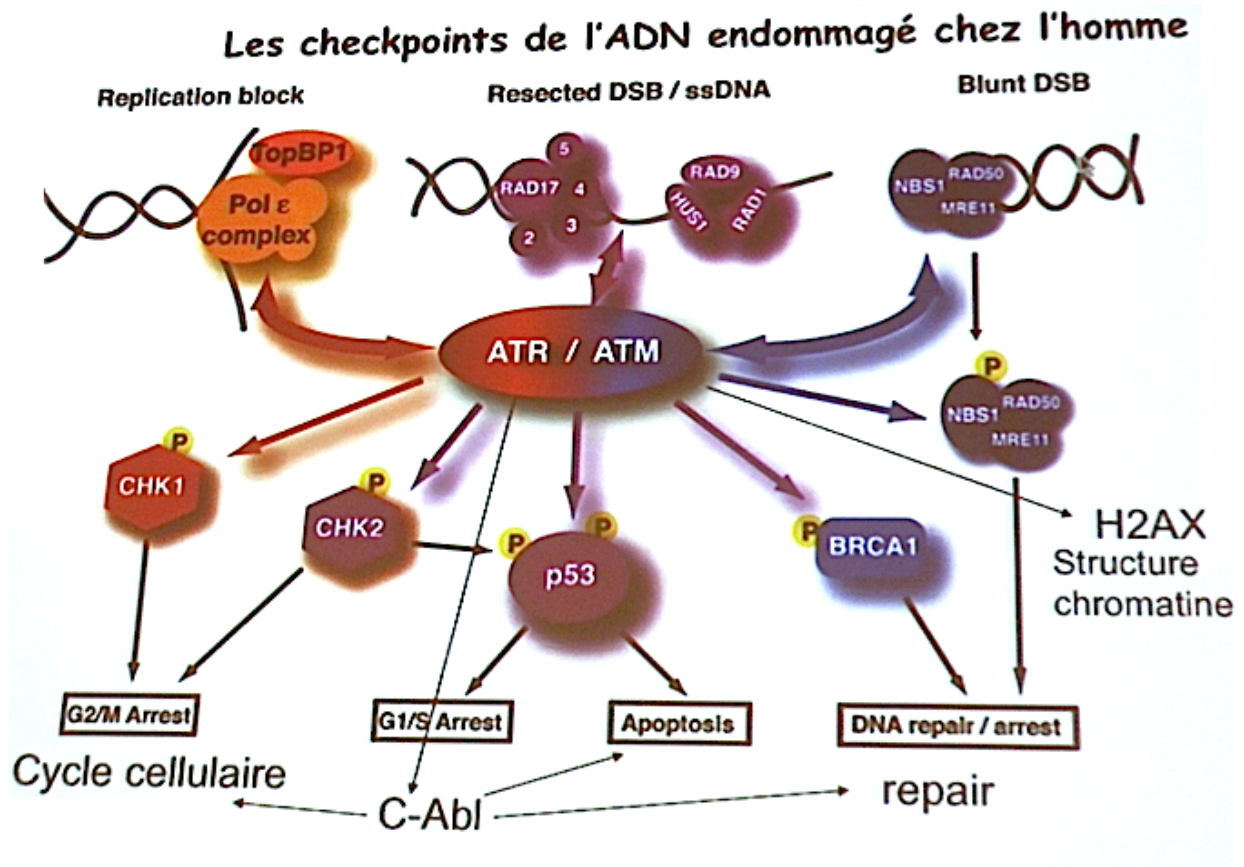
Je vous mets cette diapo même si je sais qu'on voit très mal, malgré un bon appareil photo... mais bon si certains veulent essayer de déchiffrer... De toute façon n'essayez pas d'apprendre ça par coeur^^

- Beaucoup sont impliquées dans la synthèse et la réparation du métabolisme des acides nucléiques.
- Une grande portion est également impliquée dans la régulation du cycle.
- D'une manière plus étonnante, certaines sont impliquées dans le métabolisme, le développement, la transduction des signaux en général

En effet, lorsque l'on a un dommage à l'ADN, toute la cellule est concernée et à travers l'action de ses kinases le contexte cellulaire va être modifié jusque dans ses logiques métaboliques voir du cytosquelette.

On a différents dommages qui peuvent être dûs à :

- une **cassure de la double hélice**
- une **cassure avec une portion d'ADN simple brin**
- un **blocage** au niveau de la **réplication**



La reconnaissance de ces dommages est faite par différentes protéines senseurs mais **converge** vers l'**activation** d'**ATM** et d'**ATR**.

Chacune de ces kinases est plutôt spécialisée dans la reconnaissance d'un type particulier de dommage mais elle sont un peu échangeables. En l'absence d'ATM, ATR peut prendre le relais.

C'est pour cela qu'il y a un dégradé de couleur sur la diapo, elles ont leur spécialité mais elle peuvent éventuellement "faire le travail de l'autre".

Ces kinases vont donc phosphoryler plus de 700 protéines parmi lesquelles on retrouve les kinases de **transduction du signal** **Chk1** et **Chk2** qui elle même va activer **p53**.

On voit donc qu'une même cible très importante comme p53 peut être régulée par plusieurs kinases (comme ici par Chk2 ou ATM).

ATM et ATR agissent aussi sur des protéines de **réparation** comme **BRCA1**.

On retrouve également de double rôle de MRN : à la fois dans la reconnaissance du signal et dans la réparation.

- ▶ Dans le cas de la **cassure double brin**, on aura une reconnaissance très rapide par MRN puis activation d'ATM.
- ▶ Dans le cas d'une cassure avec formation d'une grande zone de **simple brin**, on a l'intervention d'autres complexes qui vont reconnaître le dommage. Cela va activer plutôt **ATR**. (*je crois... j'ai bcp de mal à différencier ATM et ATR quand Gilson marmonne, mais j'ai trouvé ATR sur internet*)
- ▶ La fourche de réplication bloquée va être reconnue par l'association d'une protéine **TopBP1** et d'un complexe **polymérase ϵ** qui va plutôt activer **ATR** qui elle-même active plutôt **Chk1**.
Chk1 va bloquer les cellules à la transition G2/M dans le cycle cellulaire.

Chk2 (plutôt activé par ATM) peut activer p53 qui entraîne la **sénescence** de la cellule voire l'**apoptose**, cette fois par l'activation de **Ras**.

Toutes ces voies sont bien sûr en interaction les unes avec les autres et peuvent se renforcer mutuellement.

♦ Conséquence d'une mauvaise réponse au dommage de l'ADN :

- Il y a augmentation de l'instabilité chromosomique
- Si ce mauvais fonctionnement est dû à un **défaut génétique** on aura des syndromes assez complexes associant des problèmes de développement et une très grande **sensibilité** aux agents **génétoxiques**. Cela provoque une très grande **augmentation** de la **susceptibilité au cancer**.

Par exemple, Ataxia téléangiectasia est une maladie génétique due à une mutation de l'ADN et qui associe des problèmes de développement du système nerveux et une plus grande susceptibilité au cancer.

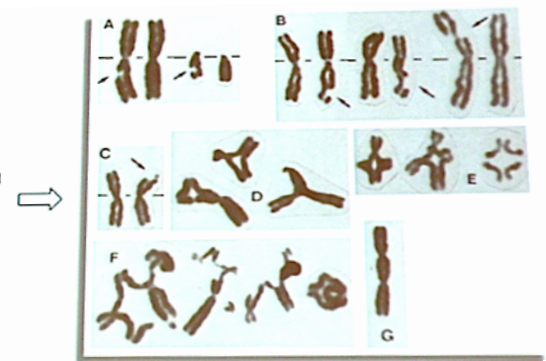
Li-fraumeni est un syndrome qui provient simplement d'une hétérozygotie de p53. Si on a un allèle p53 déjà muté on aura une très grande augmentation de la susceptibilité au cancer.

Instabilité chromosomique

Maladies

- Ataxia téléangiectasia
- Li-fraumeni ...

Senescence



Voilà c'était ma dernière ronéo de biocell... J'espère qu'elles vous ont plu, en tout cas je me suis vraiment donné du mal pour rendre ces cours aussi agréables à lire que possible.

Vous pouvez remercier mon co-ronéoiste Laurent qui a gentiment accepté (devant mon désespoir le plus total) de prendre une partie des 2 premières heures de cours, sinon je n'aurais jamais pu la rendre rapidement...

Je vous souhaite à tous Bon courage pour la dernière ligne droite !!! :)

Vive la Biocell ! (Mais la biostat c'est bien quand même...!^^ si si !)

Je souhaite Bonne chance à Elise, Thomas et Alicia !! :) Et bien sûr à tout mon petit groupe qui se reconnaitra!