

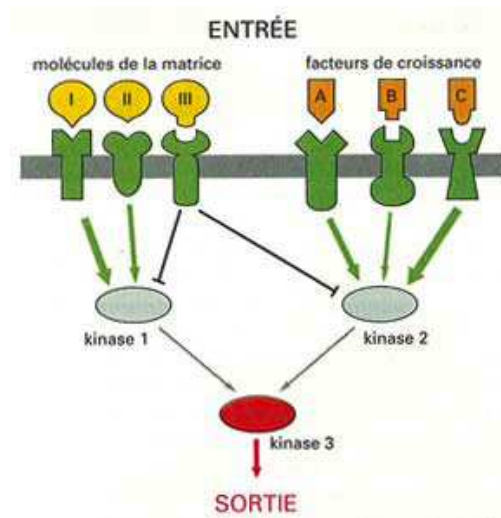
# Signalisation cellulaire dans les cellules lymphoïdes

## 1) Généralités sur les principaux mécanismes moléculaires de la signalisation

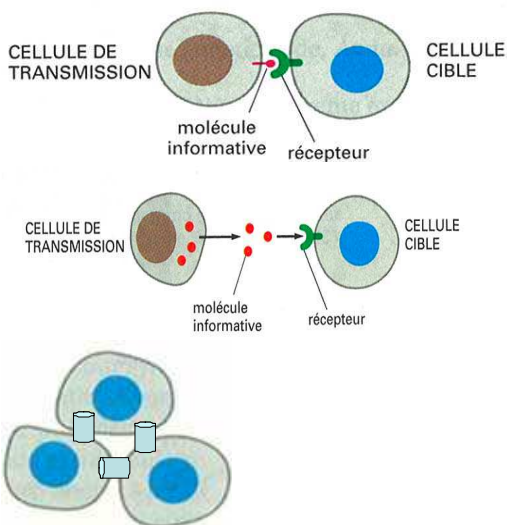
### A/ Le réseau de transduction des cellules

*Comment transmettre des infos à l'int d'une cellule ?*

- Les molécules informatives agissent en combinaison = Nb limité de molécules
- Réponse à des séries complexes de stimuli = Reconnaissance d'un profil /Intégration
- Peu de voies sont linéaires = contrôle simultané de nombreux systèmes effecteurs
- Architecture hautement connectée = Fiabilité du système



*Comment les cellules communiquent-elles ?*



Par l'intermédiaire de molécules liées à la mb plasmique (molécules d'adhérence)

Par l'intermédiaire de molécules sécrétées :

- radicaux libres gazeux (NO)
- molécules hydrophobes (stéroïdes...)
- molécules hydro-solubles (peptides, protéines...)

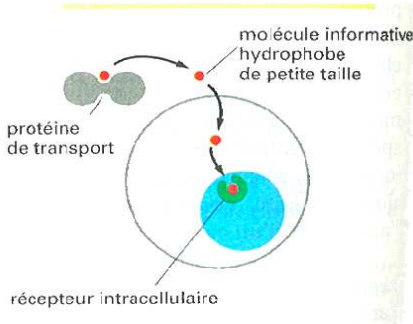
Directement de cytoplasme à cytoplasme (jonctions communicantes type GAP)

### Les différentes formes de communication via les molécules sécrétées :

- paracrine (la cellule sécrète des médiateurs locaux qui agissent sur les cellules adjacentes)
- autocrine (la cellule agit sur elle-même en sécrétant ses propres médiateurs)
- endocrine (la cellule sécrète des hormones qui agissent à distance en passant par le sang)
- synaptique (un neurotransmetteur passe du neurone à la cellule cible par une synapse chimique)

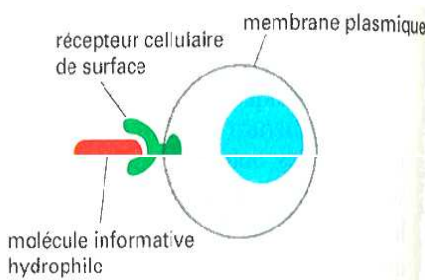
### Les différents types de récepteurs :

#### Récepteurs intracellulaires



Molécules hydrophobes : hormones stéroïdes, thyroïdiennes, les rétinoïdes, Vit D

#### Récepteurs de surface



Molécules hydrophiles : AA et dérivés (GABA, glutamate...), NA, neuromédiateurs, protéines, autres (lumière, odeurs...)

### Les 3 grandes classes de récepteurs protéiques de surface :

- récepteurs canaux ioniques ligand-dépendant
- récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (ex : Rc à 7 segments transmembranaires)
- récepteurs « enzymes » (ex : Rc à l'insuline, EGF, PDGF)

Le devenir d'une cellule (survie, apoptose, division, différenciation) dépend de l'intégration de différents signaux. Le type cellulaire cible et son état de différenciation sont importants pour la spécificité de la réponse.

### B/ Etape clé de la signalisation : la phosphorylation des protéines

Il y a deux grands types d'interrupteurs moléculaires :

- les protéines kinases/phosphatases qui ajoutent/enlèvent un  $P_i$  sur des protéines cibles spécifiques
- les GTPases = protéines G qui se lient au GTP (forme active) et l'hydrolyse en GDP (forme inactive)

La plupart des voies de signalisation font intervenir à la fois des GTPases et des kinases.

La phosphorylation des protéines est la modification post-traductionnelle la plus courante.

La phosphorylation sur sérine et thréonine est la plus courante, mais elle peut aussi se faire sur tyrosine.

Effets de la phosphorylation : - interférence stérique avec le substrat  
- changement de conformation  
- création de sites de liaison pour des protéines partenaires (domaine SH2, PTB)

#### La régulation des protéines kinases :

- ➔ Phosphorylation de la boucle d'activation = accès au substrat et formation du site actif
- ➔ Régulation de la liaison au substrat :
  - auto-inhibition (présence d'un peptide inhibiteur intrinsèque qui bloque les sites de liaison)
  - régulation extrinsèque par des ss/u inhibitrices
  - régulation extrinsèque par des ss/u activatrices
- ➔ Ciblage : bicouches lipidiques, localisation intracellulaire
- ➔ Phosphatases membranaires (CD45) et cytoplasmiques (CDC25A)

Les domaines protéiques d'interaction assurent la spécificité et l'amplification de la réponse.

### C/ Les protéines G et les seconds messagers

Grande diversité des protéines G.

Les protéines G monomériques sont impliquées dans l'expression des gènes, le cytosquelette (Rac/cdc42), le trafic des vésicules (Rab/Ran/arf), l'organisation des microtubules et le transport nucléo-cytoplasmique...

Ce sont des « commutateurs biologiques » avec une régulation fine :

- switch nucléotide
- modification lipidique et localisation
- expression génique (ARNm instable, tissu restreint, régulation transcriptionnelle)

Les seconds messagers sont des petites molécules qui transportent les signaux à l'intérieur de la cellule. Ils sont d'une grande diversité chimique : lipides hydrophobes, ions inorganiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ), nucléotides (AMPc), gaz (NO). Leurs effets sont modulés par la concentration, et la vitesse ou la fréquence de fluctuation.

Leur concentration dépend de la balance entre synthèse et dégradation par des enzymes spécifiques, et de l'ouverture/fermeture des canaux/pompes.

- Les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc)

**Mode d'action :** Se lie de façon réversible à des protéines cibles spécifiques

**Régulation :** Synthèse / dégradation par des enzymes spécifiques

**Propriétés :** Diffusent librement dans tout le cytoplasme

**Cibles :** Protéines kinases, Canaux ioniques, certains GEF

- IP3, DAG, et  $\text{Ca}^{2+}$

La phospholipase C (PLC) clive le PiP2 en IP3 et DAG qui vont respectivement libérer le  $\text{Ca}^{2+}$  du RE et activer la PKC.

Il existe deux PCL :  $\beta$  (régulée par des protéines G) et  $\gamma$  (régulée par des protéines Tyrosine Kinase)

**Transduction d'un signal extracellulaire :** compartimentalisation membranaire et cytoplasmique

➔ amplification ➔ intégration ➔ rétrocontrôles ➔ réponses cellulaires (cytoplasme : cytosquelette/ organelles, et noyau : transcription/chromatine)

## 2) Signalisation lors de l'activation lymphocytaire T

### A/ La théorie des deux signaux

L'activation de la cellule T nécessite la reconnaissance par le TCR d'un peptide antigénique spécifique mais aussi la présence de signaux additionnels co-stimulateurs provenant de molécules dites accessoires (ex:CD28). En leur absence les cellules T deviennent anergiques ou déclenchent un processus apoptotique. Des récepteurs de surface inhibant l'activation de la cellule T sont également présents. La balance entre ces signaux activateurs et inhibiteurs détermine le devenir de la réponse immune.

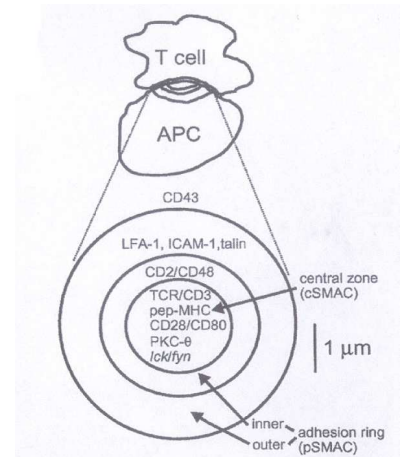
Entre le CPA et la cellule T, il y a une reconnaissance antigénique (CMH/TCR) et une costimulation (B7/cd28)

### B/ La synapse immunologique

La synapse immunologique est composée de 3 zones concentriques :

- Zone centrale (cSMAC)
- Zone inner adhesion ring (pSMAC)
- Zone outer adhesion ring (pSMAC)

Le TCR est dépourvu d'activité enzymatique et ne sert qu'à reconnaître l'Ag. Il est associé aux chaînes du CD3 qui présentent des motifs ITAM. Les tyrosines des motifs ITAM sont phosphorylées permettant la fixation de protéines adaptatrices. Chaque motif ITAM est phosphorylé deux fois par des protéines kinases de la famille des Src : Lck et Fyn.

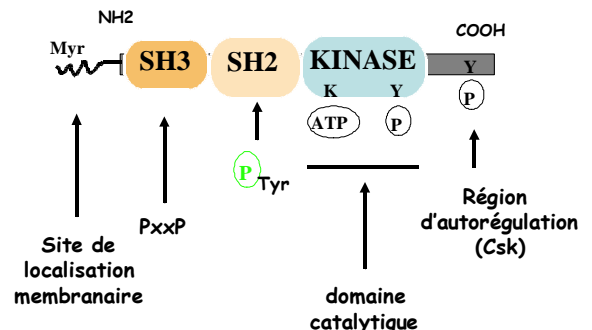


Elles possèdent différents domaines :

- SH1 : domaine catalytique
- SH2 : lie les tyrosines phosphorylées.
- SH3 : lie les séquences riches en prolines
- Une tyrosine ayant un site régulateur négatif

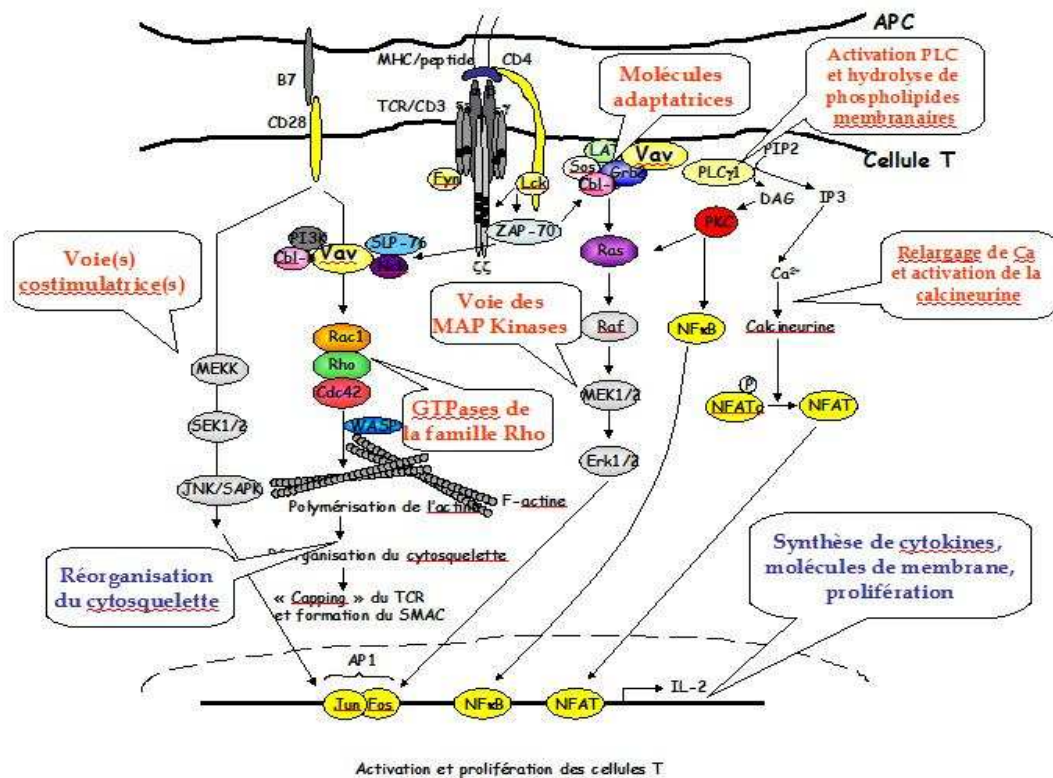
Ces kinases sont reliées à la membrane par une petite ancre lipidique et deviennent actives suite à leur rapprochement vers le TCR après qu'il y ait eu interaction TCR-Ag.

La phosphorylation des motifs ITAM permet l'activation de ZAP-70, qui induit alors une cascade de signalisation.



### Schéma :

- Voie PLC : la PLC hydrolyse PIP2, induisant DAG et IP3 :
  - DAG activera PKC elle-même activant NFκB (facteur de transcription de la survie des L).
  - IP3 entraînera le relargage de Ca. La calcineurine est une phosphatase activée par le Ca : elle déphosphoryle NFAT, le rendant ainsi actif. NFAT entraîne la production d'IL-2.
- Voie des Map kinases : il y a la cascade Ras, Raf, Mek, Erk, AP-1.
- Voie des GTPases de la famille Rho : cette voie permet la réorganisation du cytosquelette comme la polymérisation de l'actine (important pour la mobilité).
- Voies costimulatrices : ces voies activent Jnk et Sapkinase, permettant l'activation de molécules de surface et la production d'IL-2.



### 3) La signalisation en immunopathologie

→ La calcineurine est une sérine thréonine phosphatase qui peut être inhibée par des composés immunosuppresseurs (cyclosporine A/cyclophiline et FK506/FKBP). Elles empêchent donc la déphosphorylation de NFAT, ce qui bloque l'activation des LT.

→ SCID = severe combined immunodeficiencies

Il y a une lymphopénie et les réponses immunitaires sont affectées (cellule T et B).

40% des cas sont liés à une mutation héréditaire sur le chromosome X, et 60% des cas sont liés à des mutations sporadiques ou héréditaires sur les autosomes.

Des défauts d'expression des chaînes CD3 (transfert du signal) ou IL-2 (prolifération) conduisent à une immunodéficiência.

→ Sur ZAP-70, il peut se produire des mutations dans le domaine kinase (SH1) :

- protéine plus courte due à une délétion
- substitution de Ser en Arg due à une mutation ponctuelle
- insertion d'un tripeptide Leu/Glu/Lys due à la création d'un nouveau site de splicing

Ces mutations empêchent l'activation du LT.

*Expérience :* Lorsque les deux allèles du gène de ZAP-70 sont mutés chez la souris, on ne retrouve pas de lymphocytes dans le sang périphérique, il y a un blocage des lymphocytes sous forme immature dans le thymus (double positif CD4/CD8). Ils sont absents de la rate.

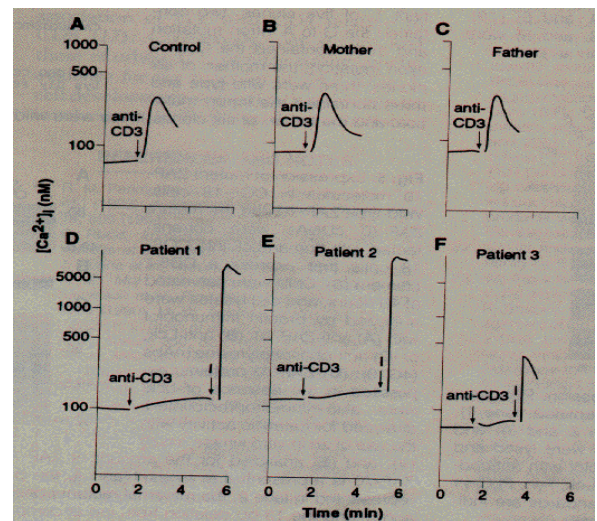


→ *Cellules T issues des patients SCID : dosage du  $Ca^{2+}$  intracellulaire libéré lors d'une stimulation du Rc T*

Les lymphocytes sont marqués avec une sonde fluorescente (Indo-1) qui émet à des longueurs d'onde différentes suivant si elle est sous forme libre ou liée aux ions  $Ca^{2+}$ . Les cellules sont stimulées par des anticorps anti-CD3 ou par un ionophore calcique. Analyse en cytométrie de flux.

Les Ac-anti CD3 entraînent une stimulation du TCR. Normalement cela entraîne une augmentation de la concentration de  $Ca$  cytosolique et donc une augmentation de la fluorescence.

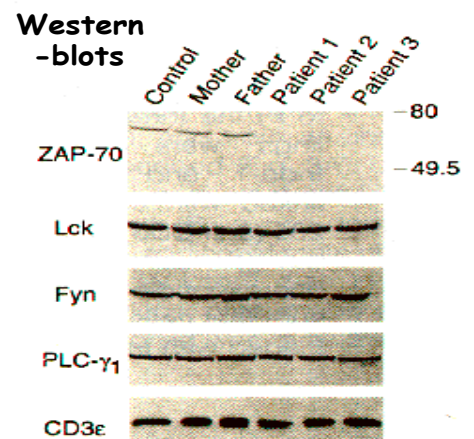
Une personne atteinte d'un SCID ne va pas répondre à la stimulation par les Ac-anti CD3 (sur le schéma, il y a absence d'augmentation de  $Ca$ ).



Cependant, on pourrait penser que cette absence de réponse est due à une anomalie de l'homéostasie calcique. Or, lorsqu'on ajoute un composé qui perfore le RE et libère du  $Ca$  dans le cytosol, on voit une augmentation de la  $[Ca]$ . L'homéostasie calcique est donc normale et c'est bien la stimulation du TCR qui n'est pas fonctionnelle.

Les patients 1,2 et 3 ont une absence de la ZAP 70 visible au Western Blot (WB).

Le WB permet de savoir quelle est la molécule en cause (Lck, Fyn, ZAP 70...) du SCID.



→ Dans l'asthme, il existe de nombreuses voies de signalisation entraînant une infiltration par les PNEo, LB, LT... à l'origine de la symptomatologie clinique. Les inhibiteurs de la Protéine Tyrosine Kinases permettent de lutter contre cette pathologie.

## Intérêt de l'étude de la signalisation en physiopathologie

Un nombre grandissant de pathologies humaines implique des mutations, surexpression ou dysfonctionnements de kinases, de phosphatases, de leurs substrats ou d'autres molécules de signalisation.

Ex: 18 gènes codant pour des Protéines Tyrosine Kinases ont été identifiés comme oncogènes dans des tumeurs humaines ou des rétrovirus transformants

A l'inverse les Phosphatases apparaissent comme des suppresseurs de tumeurs (Ex: PTEN mutée dans des cancers sporadiques et le syndrome de Cowden)