

# SIGNALISATION CELLULAIRE :

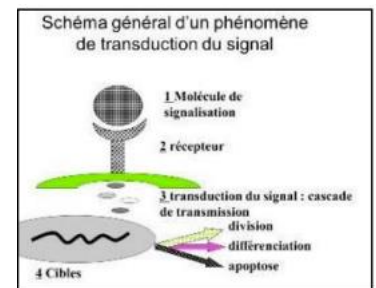
## I. Généralités :

La cellule dispose de différents états et **programmes** : elle décide de se diviser, mourir, se différencier, de se déplacer, d'entrer en sénescence ou en quiescence, en fonction des signaux endogènes et exogènes qu'elle reçoit. L'objectif de ce chapitre est de comprendre les grands principes des mécanismes qui sont à la base de cette importante signalisation.

L'organisme humain contient plus de 200 types cellules, et n'étant pas indépendants les uns des autres, ils ont besoin d'une communication intercellulaire.

Pour signaler, il faut une **molécule de signalisation** (hormone, facteur de croissance, petite molécule etc.) et qu'elle soit reconnue par un **récepteur** qui lui est spécifique à différents niveaux de l'organisation cellulaire.

L'interaction entre le ligand et son récepteur doit déclencher une réaction qui va transférer le signal de la molécule de signalisation vers d'autres processus effecteurs de la cellule : c'est la **transduction du signal**. Elle va avoir pour conséquence ultime de changer le programme de la cellule via la modification de l'expression des gènes, mais pas seulement.

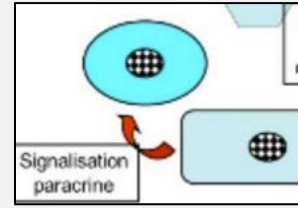


Il existe différents modes d'action des molécules de signalisation :

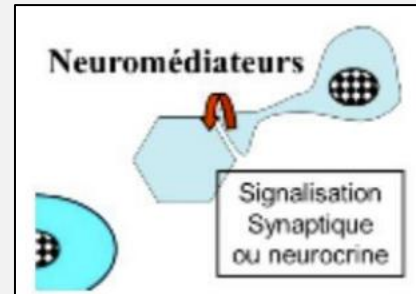
<p><b><u>Par des contacts cellulaires</u></b> : jonctions gap ou communicantes sur la face latérale des cellules. Elles sont formées de canaux et permettent le passage de petites molécules hydrophiles qui vont entraîner un signal dans la cellule.</p>	<p>Signalisation par contact intercellulaire</p>
<p><b><u>Par contact avec la MEC</u></b> : molécules d'adhérence (CAM ou SAM) à la surface des cellules.</p>	<p>Signalisation par la matrice extracellulaire</p>
<p><b><u>La signalisation endocrine</u></b> : grâce à l'action d'hormones via la circulation sanguine générale. Dans ce cas-là, l'hormone est appelée « premier messager » de la signalisation</p>	<p>Hormones</p> <p>Signalisation endocrine</p>

## SIGNALISATION CELLULAIRE

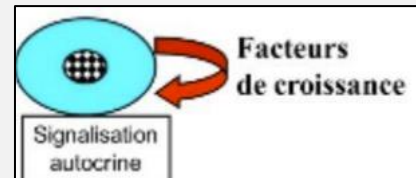
**La signalisation paracrine** : le signal est libéré dans le milieu extracellulaire et agit uniquement sur le tissu concerné : c'est un médiateur local.



**La signalisation synaptique (ou neurocrine)** : cas particulier des cellules neuronales. Un médiateur est libéré par l'élément présynaptique et agit sur l'élément post-synaptique (synapses interneurales ou neuromusculaires). Le médiateur agit localement, il n'y a pas de dispersion du signal, ce qui le distingue de la signalisation paracrine.



**La signalisation autocrine** : La cellule répond à un signal qu'elle a elle-même sécrété. Cette signalisation joue un rôle important dans les processus d'oncogenèse.



*Remarque : Certains médiateurs peuvent agir de manière endocrine et paracrine.*

### **Schéma général d'un phénomène de transduction du signal :**

1. Le signal est souvent une molécule, mais peut éventuellement être une modification physique ou chimique.
2. Il faut un élément pouvant reconnaître ce signal : le récepteur.
3. Ce récepteur doit transduire le signal vers les cibles effectrices et l'amplifier pour qu'il soit détectable par la cellule.
4. Et modifier un programme qui souvent correspond à une modification du programme transcriptionnel.

### **En fonction de la molécule de signalisation, on distingue deux médiations du signal :**

- **Le cas des molécules hydrophiles** : Ces molécules sont incapables de traverser la membrane plasmique. Dans ce cas-là, la molécule de signalisation s'arrête au niveau de la membrane, c'est-à-dire que le récepteur à ces signaux hydrophiles est présent sur la membrane plasmique, qu'il reconnaît la molécule et va transférer le signal à l'intérieur de la cellule. *Exemple : peptides, glycanes.*
- **Le cas des molécules lipophiles** : Ces molécules vont traverser la membrane, le récepteur à ces signaux lipophiles sera donc intracellulaire. *Exemple : stéroïdes, acides gras.*

## SIGNALISATION CELLULAIRE

Dans les deux cas, il y a une convergence des signaux vers le noyau qui entraîne une **modification du programme transcriptionnel et donc de l'expression des gènes.**

*Il existe une grande variété de mécanismes avec différentes voies de signalisation que l'on va étudier. Ces voies dépendent de récepteurs de surface ou bien de récepteurs nucléaires qui répondent aux ligands lipophiles.*

### Les différents types de voies de signalisation :

<u>Molécules hydrophiles (récepteurs membranaires) :</u>	<u>Molécules lipophiles (récepteurs nucléaires) :</u>
Voie des MAP-kinase Ras Voie des PI-3-kinase Voie des récepteurs couplés aux protéines G Voie JAK/STAT	Ces molécules hydrophobes agissent comme des facteurs de transcription et modifient directement l'expression des gènes

## II. Exemple des Récepteurs de type Tyrosine kinase :

Il existe une multitude de récepteurs Tyrosine kinase codée par le génome. On distingue donc :

- Les récepteurs enzymes, c'est-à-dire qu'ils possèdent eux-mêmes une activité enzymatique, comme les récepteurs tyrosine kinase (RTK).
- Les récepteurs couplés aux tyrosines kinase, c'est-à-dire que le récepteur s'associe à une enzyme (en l'occurrence une kinase).
- Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) *(que l'on verra plus tard.)*
- Les récepteurs canaux *(que l'on ne verra pas dans ce cours)*

Chaque facteur de croissance est dirigé vers des cibles cellulaires spécifiques et même si les mécanismes sont semblables, les récepteurs, molécules et ligands sont différents.

Le terme Tyrosine kinase indique que ce sont des **kinases à tyrosine (oui)** dont la partie intracellulaire de ces récepteurs est **enzymatique**. Ce sont des récepteurs qui traversent la membrane plasmique avec la partie kinase enzymatique du **côté cytosolique**.

## SIGNALISATION CELLULAIRE

Les récepteurs les plus répandus sont les RTK. Il existe une cinquantaine de gènes dans le génome humain qui déterminent la synthèse de ces récepteurs. Ils ont tous en commun le fait de posséder :

- Un domaine transmembranaire.
- Un domaine extracellulaire glycosylé qui va reconnaître la molécule signalétique (ligand).
- Un domaine cytoplasmique qui porte l'activité tyrosine kinase.

Pour phosphoryler les tyrosines des protéines substrats, il faut de l'énergie : il y a donc une activité d'hydrolyse de l'**ATP**.

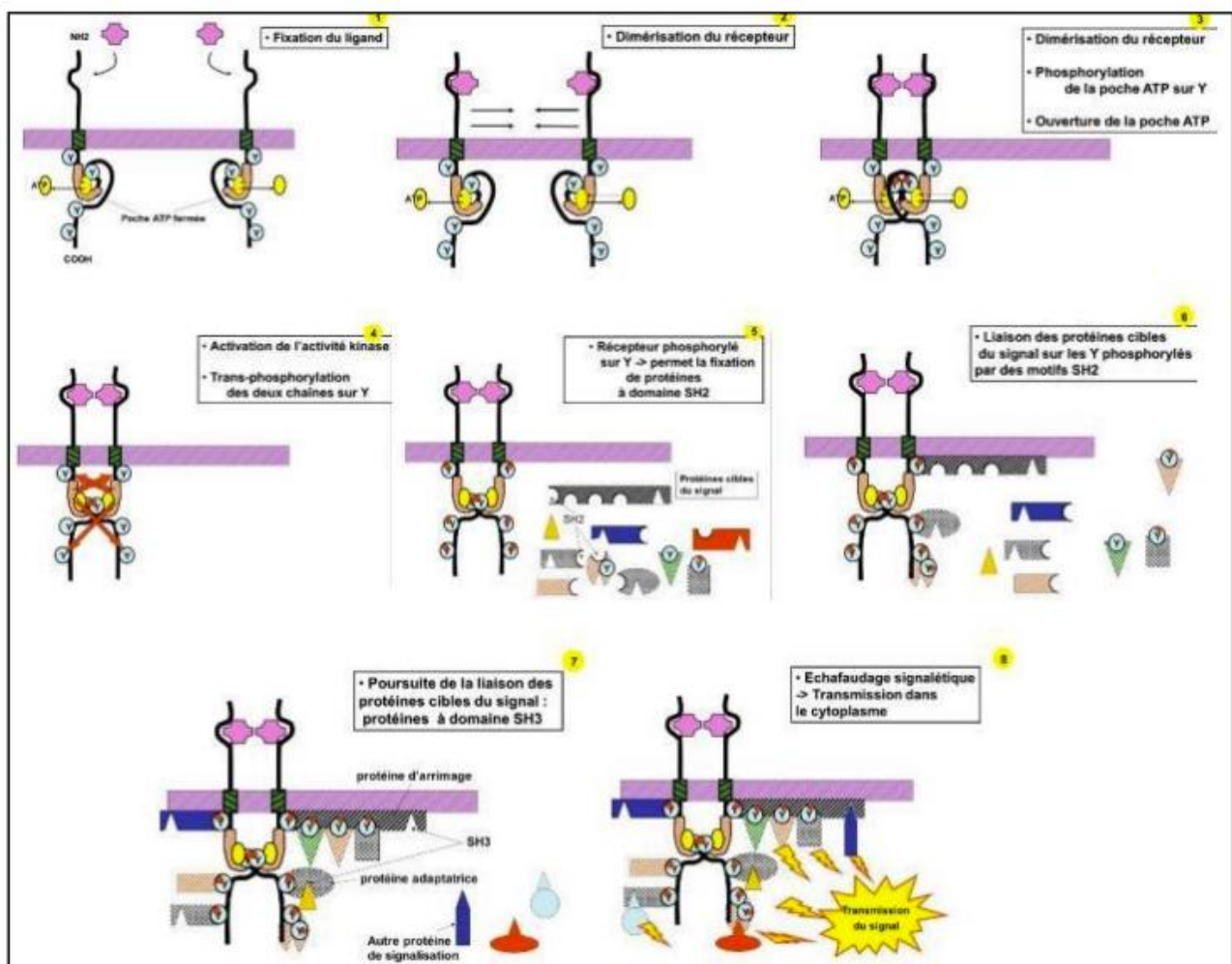
Nous allons étudier la façon dont le signal se transmet entre le récepteur extracellulaire et la partie enzymatique intracellulaire. Le signal revient à activer ce domaine Tyrosine kinase de ces récepteurs.

(Les étapes correspondent aux schémas de la page suivante) :

- 1) Sur le premier schéma, on voit la partie N-term du côté extracellulaire, la partie qui traverse la membrane plasmique et la partie enzymatique intracellulaire du côté C-term. Quand le récepteur est présent à la surface des cellules en absence de ligand, l'activité kinase est inactive et la poche qui permet l'hydrolyse de l'ATP est fermée.
- 2) Quand le ligand se fixe, il va avoir pour effet de favoriser la dimérisation du récepteur, car le ligand est incapable de rentrer dans la cellule. Il transfère l'information dans la cellule en entraînant la dimérisation du récepteur qui devient un homodimère.
- 3) Les domaines catalytiques intracellulaires se retrouvent à proximité, ce qui provoque l'autophosphorylation du récepteur et de la poche ATP. La poche d'ATP remplie s'ouvre ainsi. Une information de l'extérieur a donc été transmise à l'intérieur de la cellule en activant par dimérisation le domaine kinase du récepteur.
- 4) Ensuite, il va y avoir toute une cascade d'événements. Pour l'instant le signal a juste été transmis, on veut maintenant qu'il soit amplifié afin d'atteindre la cible de ce signal spécifique à l'intérieur de la cellule. Pour cela, il va y avoir toute une série de phosphorylation suite à l'ouverture de la poche d'ATP.

## SIGNALISATION CELLULAIRE

- 5) Les tyrosines phosphorylées vont être reconnues par de nombreuses protéines à l'intérieur de la cellule que l'on appelle les protéines à domaine SH2.
- 6) Les tyrosines reconnaissent le domaine SH2 et s'assemblent au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique. Cela forme le premier niveau d'échafaudage moléculaire qui va ensuite se complexifier.
- 7) Les tyrosines phosphorylées sont ensuite reconnues par des protéines à domaine SH3. Par un jeu d'interaction protéine-protéine, un échafaudage signalétique va être formé. Pour l'instant le signal est encore très localisé. Il est juste sous la membrane plasmique au niveau des récepteurs homodimérisés. Le reste de la cellule n'est pas encore informés.
- 8) Pour que toute la cellule soit au courant, il faut passer un certain seuil suffisant de cet échafaudage signalétique pour déclencher un signal à distance. C'est ce qu'on appelle la transmission du signal vers le reste de la cellule. Cette transmission diffère selon le type de signal, des protéines impliquées ou encore de la nature de l'échafaudage.



En réponse aux récepteurs tyrosine kinase, deux principaux types de transmission du signal existent dans les cellules. La cellule a le choix entre deux voies, selon le contexte, le type de cellule ou le type de signalisation :

- La voie des MAP kinases.
- La voie des phosphoinositides.

### A) La voie des MAP kinases :

C'est une voie **très conservée et universelle** : elle est présente chez les levures, les eucaryotes, les invertébrés et les vertébrés (dans toutes les cellules eucaryotes). Elle intervient avec des variantes dans les différents programmes cellulaires (métabolisme, division, différenciation, migration). C'est une voie extrêmement importante. En revanche elle ne contrôle pas tout de manière indifférenciée.

Une protéine centrale à cette voie est la protéine **Ras**. Cette protéine est activée par l'échafaudage signalétique qui va transmettre l'information par des cascades de phosphorylations via des kinases qui vont-elles-mêmes s'activer : les **MAP kinases** (présentes au niveau du cytosol).

#### 1. La superfamille des petites protéines GTPase Ras (Protéines G) :

Cette famille, dont Ras fait partie, est composée de protéines monomériques de masse moléculaire comprise entre **20 et 30 kDa**. Elles ont été découvertes sur la base de leur homologie aux oncogènes portés par les virus de sarcome de Harvey (H-Ras) et de Kirstein (K-Ras). Le terme Ras vient de *Rat sarcoma*.

Ils sont connus lorsqu'ils sont mutés pour être des **oncogènes** cellulaires dans les cancers humains (carcinomes et lignée hématopoïétique).

Comme toute **superfamille** de protéines, des liens de parentés peuvent être déduits par comparaison moléculaire des séquences. On peut déterminer ainsi ce que l'on appelle un **arbre phylogénétique** donnant une idée de leur lien de parenté structurale, mais aussi de leur origine évolutive. On retrouve quatre grandes familles (dont le nom a été donné à partir de la protéine la plus importante) :

- La famille des Ras : impliquée dans les phénomènes de prolifération et différenciation
- La famille des Rho : impliquée dans le remodelage du cytosquelette, la migration et la réponse au stress
- La famille des Rab : contrôle le trafic vésiculaire
- La famille des Ran : permet de contrôler le transport nucléo-cytoplasmique (entre le noyau et le cytoplasme).

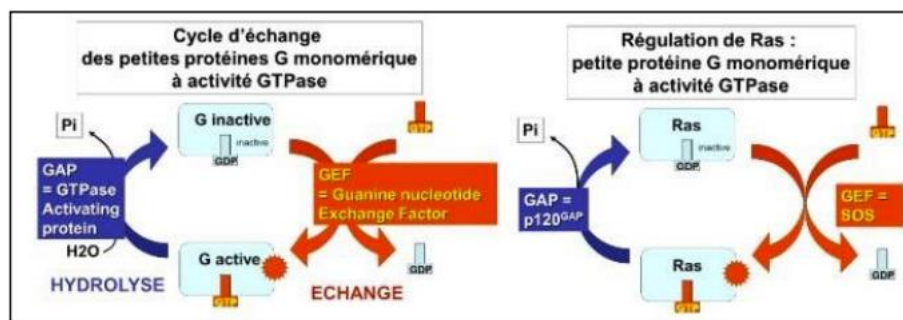


## SIGNALISATION CELLULAIRE

C'est une grande famille de protéines qui ont toutes en commun d'être activées de la même façon : leur activation dépend de la fixation du **GTP** (*c'est pour cela qu'on dit qu'elles sont « G monomériques »*).

Cela signifie qu'il existe d'autres protéines qui vont réguler l'activation de ces protéines G en échangeant le GDP avec le GTP. Un premier facteur d'activation est le **facteur GEF** qui va échanger le GDP vers le GTP qui va activer la protéine G. De même, la réaction inverse se fait par l'hydrolyse du GTP par une GTPase spécifique : la **protéine GAP**. Il y a donc un équilibre entre **GAP et GEF** pour activer ces protéines de signalisation.

Dans le cas de Ras, il y a donc un facteur GEF spécifique qui s'appelle **SOS** et le facteur GAP de Ras s'appelle **p120<sup>GAP</sup>**. (*Les noms importent peu, il faut juste comprendre que chacun des membres de la super famille des protéines G possède des facteurs GEF et GAP associés.*)



### L'activation de Ras par SOS se fait de la manière suivante :

On va imaginer que SOS représente les deux doigts d'une main. En haut à gauche se trouve la poche de GDP de Ras. Il y a deux domaines de la protéine Ras, qui s'appellent Switch 1 et Switch 2, et qui bloquent la sortie de GDP de sa poche de fixation. SOS va donc se fixer sur les domaines Switch 1 et 2 et va les pousser comme les doigts d'une main ce qui libère le GDP. Le GDP va ainsi être capable de diffuser en dehors de la protéine laissant alors la place pour une nouvelle molécule de GTP et activant Ras.



**Ras** est une protéine qui interagit physiologiquement et pathologiquement à de nombreux niveaux. Elle est très souvent mutée dans les **cancers** et dispose de fonctions multiples puisqu'elle **active** une voie centrale de la signalisation : la voie des **MAP kinases**. Elle est capable de :

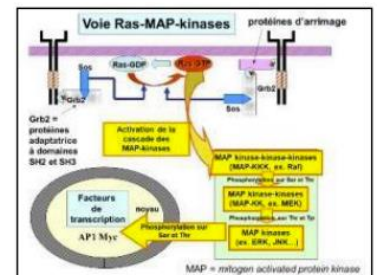
- Contrôler le cytosquelette.
- Contrôler la prolifération.
- Contrôler la mort cellulaire.
- Déclencher la sénescence.
- Modifier les interactions de la cellule avec la MEC.

Après le transfert du signal du ligand par le récepteur, on retrouve une première protéine SH2 qui est composée d'un **domaine SH2 et SH3**. Le domaine SH2 se fixe sur la tyrosine phosphorylée et le domaine SH3 va attirer l'autre protéine SOS, qui va donc être la protéine d'activation de Ras.

Il va y avoir un échange de GTP vers le GDP de Ras, et une fois que Ras dispose du GTP :

- 1) Il y a une activation du premier étage de kinases : étage des MAP kinase/kinase-kinase (**MAP-KKK**, *exemple : Raf*).
- 2) Cette kinase va phosphoryler les Sérines et Thréonines ce qui va activer l'étage des MAP kinase-kinase (**MAP-KK**, *exemple : MEK*).
- 3) L'étage des MAP-KK va ensuite activer les **MAP-kinases** (*exemple : ERK, JNK*).
- 4) Ces MAP kinases phosphorylées sur les Tyrosines et Thréonines vont transloquer dans le noyau par les pores nucléaires et vont activer des **facteurs de transcription** à l'intérieur du noyau. Parmi ces facteurs de transcription activés, il y a les protéines de la **famille AP1** et la **protéine Myc**.

En haut à droite du schéma se trouve un autre exemple d'échafaudage signalétique. Le résultat est le même : on retrouve la présence de SOS et l'activation de Ras, mais les protéines d'arrimage sont dans un **ordre différent** afin de montrer la diversité de ces formations d'échafaudages signalétiques.

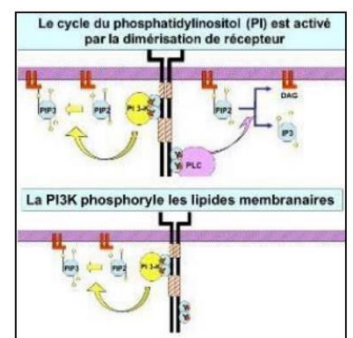


## B) La voie des phosphoinositides :

C'est une grande voie impliquée dans de nombreuses réponses cellulaires, mais qui semble **moins utilisée** que la voie des MAP kinase / Ras.

Le récepteur tyrosine kinase est activé, mais la conséquence de cette activation est différente. Sur la partie cytosolique du récepteur, deux types de protéines peuvent être associées :

- Une protéine PI3-K (Phosphoinositide 3- Kinase) : il s'agit d'une kinase à lipides. Sur la face cytosolique, il y a deux lipides particuliers : PIP2 et PIP3 (Phosphatidylinositol di- et triphosphate). On va donc passer d'une molécule à deux phosphates à deux molécules à trois phosphates.
- La phospholipase C (PLC) : qui va cliver PIP2 en IP3 (inositol triphosphate) libre dans le cytosol puis en DAG (diacylglycérol) qui sera ancré dans la membrane.





### Après, on retrouve le même processus :

- 1) Dimérisation du récepteur.
- 2) Phosphorylation des Tyrosines.
- 3) Recrutement de PI3-K.
- 4) Phosphorylation de PIP2 en PIP3 au niveau de la membrane.

Pour transmettre le signal, **PIP3** va être capable de reconnaître une autre kinase : **AKT**. Le point d'ancrage avec AKT se fait par un domaine particulier qui s'appelle **PH** (Pleckstrin homologie) et qui permet à AKT de reconnaître PIP3.

AKT va donc être activé, et comme c'est une kinase qui dispose de plein de substrats dans la cellule, elle va être capable d'activer toute une série de voies impliquées dans la prolifération des cellules :

- L'activation du cycle cellulaire.
- L'activation de la traduction à travers une autre kinase majeure dans la croissance des cellules : la kinase **mTOR**.
- La favorisation de l'oxygénation en favorisant l'angiogenèse.
- L'activation de l'enzyme télomérase.

Il existe une pédale de frein au système : **PTEN**. C'est une phosphatase qui va déphosphoryler PIP3. PTEN est un **gène suppresseur de tumeur** dans de nombreux cancers.

Du côté de la **phospholipase C**, il y a formation de **DAG et d'IP3**. IP3 est libéré dans le cytosol, ce qui va entraîner une libération des ions **Ca<sup>2+</sup>** qui sont concentrés dans le RE et les mitochondries. Ce flux de calcium dans le cytosol va reconnaître la protéine fixatrice de calcium : la **calmoduline**.

La calmoduline va alors être capable d'activer de nombreuses enzymes comme la **NO synthase** constitutive qui va synthétiser le monoxyde d'azote. Le monoxyde d'azote est un radical libre gazeux qui constitue un **signal chimique local** notamment impliqué dans le **tonus vasculaire**.

DAG joue également un rôle dans ces signalisations en s'associant à une autre kinase : la **protéine kinase C (PKC)**. Cette kinase, via le calcium, va phosphoryler des protéines cytoplasmiques qui vont entraîner **l'inhibition de RTK**. Une des caractéristiques de ce système est de pouvoir arrêter le signal qui n'est pas forcément permanent.

Ce système va donc permettre d'arrêter cette voie de signalisation lorsqu'on n'en a plus besoin.

### III. Exemple des récepteurs couplés aux protéines G :

C'est le deuxième grand groupe de récepteurs de la membrane plasmique impliqués dans la signalisation de molécules hydrophiles : ce sont les récepteurs couplés aux protéines G (**RCPG**).

Ils fonctionnent très différemment des récepteurs à protéines kinases. Le récepteur possède une structure particulière : c'est un **récepteur à 7 domaines transmembranaires** qui va reconnaître des molécules différentes et activer d'autres familles de protéines G qui sont hétérotrimériques.

Ces récepteurs n'ont pas pour objectif d'activer directement Ras, mais **l'adénylate cyclase** qui est une autre enzyme présente sur la membrane plasmique. Cette adénylate cyclase va former de **l'AMP cyclique** qui va servir de deuxième messenger. Il y a donc un dialogue entre cette voie de signalisation et celle des tyrosines kinases.

Les acteurs de cette voie de signalisation sont :

- Le récepteur de nature totalement différente, c'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires.
- Une protéine G (attention pas une petite protéine G, le prof fait le lapsus) associée à la membrane.
- Un effecteur inactif membranaire qui est une enzyme (adénylate cyclase ou la PLC que l'on a vue dans la voie des MAP-K, il y a donc des dialogues entre les voies de signalisation

Ces récepteurs couplés aux protéines G représentent un grand nombre de récepteurs différents : chez l'Homme, il existe plus de **1000 récepteurs**.

Un même ligand peut activer plusieurs membres de la famille des RCPG, ce qui entraîne une complexité dans cette signalisation.

Remarque : il existe 9 récepteurs pour l'adrénaline et 5 récepteurs pour l'acétylcholine.

Le premier messenger est un ligand extracellulaire qui peut être sous différentes formes :

- Des ions, des photons.
- Des AA et leurs dérivés comme la noradrénaline, la dopamine ou l'histamine.
- Des glycoprotéines ou des peptides (FSH, TSH, LH).
- Des lipides hydrosolubles (prostaglandines, cannabinoïdes).

De nombreuses molécules, qui représentent plus de **50%** des agents thérapeutiques utilisés en pharmacie, ciblent directement ou indirectement ces RCPG.

Il y a toujours un échange GDP/GTP, mais ce sont des protéines G différentes des petites molécules G comme Ras. Ce sont des hétérotrimères constituées de **3 sous-unités** : alpha, bêta et gamma.

## SIGNALISATION CELLULAIRE

Une fois que le récepteur avec ses 7 domaines transmembranaires a fixé le signal extracellulaire, il va échanger le GDP de la sous-unité alpha inactive par du GTP. Ceci va activer l'hétérotimère ce qui aura pour conséquence de libérer d'un côté la protéine **G- $\alpha$**  associée au GTP et de libérer de l'autre côté, sur la face cytosolique de la membrane plasmique, l'hétérodimère **G- $\beta$  et G- $\gamma$** .

La conséquence c'est d'activer G- $\alpha$  qui peut revenir sous forme inactive, ce qui va permettre d'éteindre le signal par un échange GDP/GTP qui induit l'association de G- $\alpha$ , une fois que le GTP va être hydrolysé, avec G- $\beta$  et G- $\gamma$  pour un retour à l'état initial.

<u>Activation :</u>	<u>Inhibition :</u>
<p>L'interaction entre le premier messenger et le récepteur à 7 domaines transmembranaires va induire l'activation de la sous-unité <math>\alpha</math> qui va, avec une réaction d'échange, être échangé avec GTP.</p> <p>La conséquence de cette activation va être de dissocier cet hétérotrimère en une sous unité G<math>\alpha</math>-GTP et un hétérodimère <math>\beta\gamma</math>.</p>	<p>G<math>\alpha</math>-GTP peut être associé à des signaux de régulation (Regulator of G-protein signaling RGS) ayant une activité GTPase et ainsi retourner à une forme inactive liée à la GDP.</p> <p>On peut aussi inhiber le premier messenger par une protéine (l'arrestine ici) qui va bloquer l'accès cytosolique du récepteur aux protéines G et donc l'activation. Une stimulation prolongée va désensibiliser le récepteur.</p>

En cas de **stimulation prolongée**, il y a une **désensibilisation du récepteur** pour empêcher d'avoir des signaux trop forts grâce à la **protéine arrestine** qui va bloquer le récepteur sur sa face cytosolique.

Ces protéines G $\alpha$ -GTP vont avoir deux grands types de fonctions. En effet, le même récepteur protéine G peut interagir avec plusieurs protéines G différentes. C'est la sous-unité alpha qui donne son identité à la protéine G.

### Les récepteurs adrénergiques sont de 2 types : alpha et bêta-adrénergiques qui sont très importants en physiologie et en médecine. :

- Les récepteurs bêta-adrénergiques du tissu nodal du cœur sont des stimulants cardiaques. Il y a un effet suite à la stimulation des récepteurs alpha-2 périphériques qui entraînent la contraction de certaines fibres vasculaires lisses non innervées et une relaxation du muscle lisse interstitiel. Ce sont des activateurs de l'adénylate cyclase.
- Les récepteurs alpha-2-adrénergiques vont être des inhibiteurs de l'adénylate cyclase et avoir un effet sur la diminution de l'AMP cyclique.

## SIGNALISATION CELLULAIRE

Les sous-unités bêta et gamma vont contribuer à cette signalisation en effectuant le dialogue activant Ras par un échafaudage un peu différent. Cela passe par l'activation d'une kinase qui s'appelle **Src** qui est une tyrosine kinase qui va, via **GRB2** et **SOS**, activer **Ras** qui mène à la voie des **MAP kinases**.

La signalisation peut être extrêmement complexe dans une cellule avec plusieurs voies d'entrée.

Les sous-unités bêta/gamma peuvent aussi activer PI-3K et la voie des phosphoinositides.

*C'est bien beau de faire de l'AMP cyclique, mais à quoi ça sert ?*

L'AMP cyclique va servir de **deuxième messager** afin d'activer une autre kinase du cytosol qui est la protéine kinase A (**PKA**). L'AMP cyclique se présente sous sa forme inactive tétramérique avec **2 sous-unités régulatrices** et **2 sous-unités catalytiques**.

En présence d'une augmentation d'AMP cyclique, celle-ci va se fixer sur les sous-unités régulatrices et libérer les sous-unités catalytiques qui vont devenir actives.

Ces sous-unités PKA actives vont être transloquées dans le noyau où elles vont **phosphoryler** un certain nombre de facteurs de transcription et contribuer à **l'expression de gènes cibles**, notamment les facteurs de transcription de la **famille CREB** qui vont reconnaître des sites de fixation qui s'appellent **CRE** sur des gènes cibles et ainsi contribuer à l'expression de la signalisation pour la cellule donnée.

On a aussi une modification locale de la chromatine puisque CREB phosphorylé va permettre la fixation de protéines de type HAT (Histone Acétyl Transférase) permettant l'action et la stabilité de l'ARN polymérase et donc la transcription des gènes cibles.

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

Dans cette situation, ce n'est pas un signal qui vient de l'extérieur de la cellule, mais de **l'intérieur** : il s'agit d'un dommage à l'ADN.

On va avoir avec des principes relativement similaires avec la transduction qui vient de l'extérieur. La signalisation d'un dommage à l'ADN peut être due à une cassure simple brin, double brin, une modification de la structure des nucléotides qui empêchent le bon fonctionnement de l'ADN au cours de la réplication et de la transcription.

S'il y a un dommage à l'ADN, il faut que la cellule le reconnaisse et pour cela il y a des **senseurs**, similaires à des récepteurs. Ils vont reconnaître un dommage et il va s'en suivre une **cascade de phosphorylations**.

*Remarque : Ce ne sont pas les mêmes kinases impliquées dans les dommages de l'ADN et dans les voies vues précédemment.*

### *Pourquoi a-t-on des kinases dans la transduction du signal ?*

Phosphoryler et déphosphoryler une protéine est très rapide, ces communications nécessitent des réactions rapides de la cellule, on n'a pas le temps d'attendre la transcription de gènes. C'est pour cela qu'il y a beaucoup de ces kinases.

Quand cet échafaudage sera suffisamment important, c'est-à-dire que le **seuil** sera dépassé, il va y avoir une transduction du signal vers le reste de la cellule via des **kinases effectrices** qui vont donc modifier le cycle cellulaire, voire le programme transcriptionnel.

Le déroulement est très proche, mais avec des acteurs différents. Les premières kinases à arriver sur le site du dommage à l'ADN sont **ATM** et **ATR**. Ce sont des kinases dont la structure est très proche de celle de la famille des PI3-K qui sont des kinases à lipides, mais il s'agit ici de **kinases à protéines**.

Si une cassure apparaît sur la double hélice d'ADN, elle va d'abord être reconnue par un hétérotrimère qui s'appelle le **complexe MRN** (Mre11- Rad50- Nbs1). C'est un complexe multifonctionnel qui va avoir pour fonction de reconnaître la cassure et ensuite recruter puis activer ATM.

Une fois qu'**ATM** est activée à l'endroit de la cassure, il va **phosphoryler** ce qu'il y a autour de lui. C'est notamment un variant d'histones **H2AX** qui va être phosphorylé et qui va devenir **γ-H2AX**. Ce qui est important à comprendre c'est que cette réaction est d'abord très locale, mais elle va partir de la cassure et se propager le long de l'ADN et de la chromatine sur plusieurs milliers de paires de bases : c'est une idée d'échafaudage, d'effet de seuil pour que le signal se déclenche.

C'est pour cela que ce γ-H2AX est beaucoup utilisé dans les anticorps pour marquer ce type de réactions car il est permanent dans les cellules sénescences.

γ-H2AX est un marqueur de la réponse aux dommages à l'ADN.

Mais ce n'est pas suffisant, il va y avoir d'autres conséquences, notamment le recrutement d'encore plus d'ATM qui va se propager et qui va phosphoryler encore plus d'H2AX. Cette plateforme signalétique va recruter d'autres protéines qui sont des **protéines de transduction du signal et de réparation** (53BP1, MDC1, BRCA1).

L'ensemble de cette plateforme va activer les kinases effectrices, et notamment les protéines **Chk2**. En effet, c'est une des kinases qui va phosphoryler **p53**. S'il y a trop de dommages, p53 va mener la cellule à la mort. S'il n'y en a pas trop, ça va juste être un arrêt transitoire du cycle le temps de réparer le dommage et dans certains cas, la cellule va choisir d'entrer en sénescence.

C'est un schéma extrêmement simplifié. En effet, il y a plus de **700 protéines** phosphorylées par ATM et ATR. Il y a énormément de substrats qui vont modifier le programme transcriptionnel mais aussi le programme post-traductionnel (*puisque la phosphorylation est un événement post-traductionnel de la cellule*).

Si on résume la voie, c'est ce que l'on appelle les voies de contrôle de l'ADN endommagé. Nous avons évoqué l'exemple de la cassure double brin avec le complexe MRN et l'activation d'ATM.

Chacune de ces kinases a des cibles particulières. ATM va activer Chk2 qui peut phosphoryler p53. Mais ATM peut aussi phosphoryler directement p53. ATR va plutôt activer Chk1 qui va aussi phosphoryler p53 et ATR peut aussi directement phosphoryler p53. ATM peut aussi réguler la phosphorylation de BRCA1 qui est une protéine impliquée dans la réparation des cassures.

### Les checkpoints de l'ADN endommagé chez l'Homme :

On peut avoir différents types de dommage à l'ADN. On peut décrire :

- Une réplication défectueuse par blocage de la fourche → ATR
- Un excès de simple brin quand la réplication est défectueuse → ATR ou ATM
- Une cassure double brin que l'on vient de décrire → ATM

### Donc ce sont des voies extrêmement complexes et quand ces voies de l'ADN endommagé sont dysfonctionnelles ça peut entraîner :

- Une instabilité du génome.
- Des maladies génétiques qui peuvent entraîner des désordres développementaux et des maladies très graves comme l'Ataxia-telangiectasia qui résulte d'une mutation de la protéine ATM ou des syndromes de prédisposition au cancer comme Li-fraumeni.
- Une induction de la senescence.

## V. Transduction du signal et Cancer :

Nous allons aborder les relations qui existent entre ces voies normales de transduction du signal et le cancer. Pour avoir une vision globale de la formation d'un cancer il faut avoir à l'esprit qu'il y a différentes façons pour une cellule normale de se transformer en **cellule cancéreuse**.

Il est indispensable que la cellule normale acquière un certain nombre de **propriétés pathologiques** pour qu'elle devienne cancéreuse, quel que soit le type de cancer. Les différentes façons pour la cellule d'acquérir ces propriétés vont dépendre de la cellule d'origine, de l'évènement qui va déclencher le cancer et aussi de facteurs que l'on ne comprend pas encore.

Pour qu'une cellule devienne un cancer responsable d'une maladie clinique qui met en danger la vie des individus, **toutes ces propriétés doivent être remplies**. Quand on regarde l'ensemble de ces propriétés résumées ici, on retrouve toutes celles évoquées dans le cours sur la senescence.

Elles peuvent les acquérir dans un **ordre différent**, par mutation et une même mutation peut lui permettre d'acquérir plusieurs propriétés en même temps. C'est pour cela que cette instabilité génétique, le problème des mutations dans les protéines du checkpoint du contrôle qualité de l'ADN qui va favoriser l'apparition de ces mutations oncogéniques.



**La cellule normale, pour devenir cancéreuse, doit acquérir une autonomie de croissance, il faut qu'elles échappent :**

- Aux suppresseurs de croissance qui sont les "pédales de frein" p16 et p21.
- Au système immunitaire qui est capable d'éliminer et de reconnaître des cellules qui deviennent cancéreuses, c'est l'immuno1surveillance. La cellule cancéreuse peut alors développer des "stratégies" en modifiant son programme pour échapper à cette destruction immunologique.

**La cellule cancéreuse peut :**

- Acquérir l'immortalité répllicative, en réactivant la télomérase.
- Créer une inflammation chronique qui va favoriser son invasion locale et donc promouvoir la prolifération et la dissémination de la tumeur.
- Se disséminer dans le corps : c'est l'activation des processus d'invasions métastatiques, elle peut envoyer des cellules cancéreuses dans la circulation générale : ce sont les cellules cancéreuses circulantes qui peuvent entraîner des métastases à distance de la tumeur primaire dans d'autres organes.
- Favoriser la formation de vaisseaux car comme elles vont croître de manière anarchique elles auront besoin d'oxygène. Souvent ce sont des vaisseaux de mauvaise qualité ce qui explique que tumeurs soient très hémorragiques.
- Échapper à l'apoptose grâce aux mécanismes d'instabilité qui vont contribuer à des mutations oncogéniques et à certaines stratégies cancéreuses comme la surexpression de Bcl2.
- Modifier le métabolisme pour l'adapter à une croissance prolongée.

**Les 6 caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses sont +++ :**

- Perte de senescence.
- Autonomie de croissance.
- Contrôle anormal du cycle.
- Résistance à l'apoptose.
- Néo-angiogenèse.
- Invasion et métastase.

### Il existe 3 types d'altérations qui contribuent à l'autonomie de croissance des cellules cancéreuses :

- La sécrétion anormale de facteurs de croissance : c'est la stimulation autocrine.
- Le transfert du signal de l'extérieur vers l'intérieur qui peut devenir constitutif, c'est-à-dire, indépendamment des facteurs de croissance.
- La transduction intracellulaire qui peut y avoir une action sur les cibles extracellulaires en favorisant ces processus.

Il peut y avoir une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance responsables des stimulations autocrines pathologiques. Par exemple, c'est le cas du **PDGF** qui a été montré expérimentalement comme pouvant contribuer à la formation de glioblastomes (tumeurs cérébrales).

#### L'expérience se déroule ainsi :

Si on prend une cellule humaine normale et qu'on essaye de reproduire en laboratoire toutes les étapes qui vont transformer cette cellule normale en une cellule cancéreuse, il nous sera plus facile par la suite de contrecarrer ces mécanismes oncogéniques.

Il a été démontré que pour qu'une cellule humaine devienne cancéreuse, la mutation d'un gène ne suffit pas, il faut modifier plusieurs gènes. La cellule doit acquérir l'immortalité répliquative en surexprimant la **téломérase** (via le **gène hTERT** qui détermine la synthèse de la téломérase).

Il faut bloquer les checkpoints des voies de contrôle de l'ADN endommagé : c'est le rôle de l'**antigène T** d'un virus oncogénique qui s'appelle **SV40**. Si on exprime **SV40** et **hTERT** on aura donc une **cellule immortelle** mais qui ne sera **pas capable de former des cancers**.

Ce qui manque ce sont les **facteurs de croissance** qui vont contribuer à la tumorigénèse qui vont transformer ces cellules immortelles mais non tumorigènes en cellules tumorigènes c'est-à-dire capables de former des tumeurs chez la souris. C'est une expérience très importante qui démontre que **PDGF** est un des facteurs de transformation des cellules humaines normales en cellules cancéreuses.

Il peut donc y avoir des modifications du transfert du signal de l'extérieur vers l'intérieur par **supra-activation** des récepteurs des facteurs de croissance qui va augmenter la sensibilisation des cellules à des doses faibles de ligands. Pour rappel : chacun de ses processus à un seuil physiologique.

Si on la sensibilise plus, la cellule va être plus réactive et favoriser sa croissance et voire même activer des récepteurs indépendamment de la fixation du ligand. Donc le récepteur agit pour son propre compte, la cellule se divise sans recevoir de signal, ce qui est une aberration physiologique qui peut être à la base de cancers.

Il peut y avoir une expression de formes constitutives du récepteur qui ne reconnaît plus le ligand et qui va être constamment actif ou la surexpression des formes normales, le récepteur est normal mais il y en aura plus ce qui induit une plus grande sensibilité. Par exemple, pour surexprimer des formes normales on peut avoir une amplification du gène, plus il y a de copies du gène plus le récepteur est exprimé et cette amplification peut être le résultat d'une altération des mécanismes de contrôle de la stabilité du génome.

Un exemple avec les effets d'un récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) dans la transformation cancéreuse, avec activation de la voie Ras/Raf/MAP-K qui va en cas de surexpression de cette voie de signalisation :

- Augmenter la prolifération.
- Favoriser les métastases.
- Favoriser l'angiogenèse.
- Inhiber l'apoptose.

Dans le cas de cancers qu'on sait identifier comme étant suractivant le récepteur à l'EGF (EGFR) il y a toute une panoplie de stratégies pharmacologiques pour aller inhiber ce récepteur.

Il est possible d'inhiber à tous les niveaux et chaque niveau peut correspondre à des médicaments anticancéreux que l'on appelle « **cytostatiques** » car ils vont empêcher les cellules de proliférer.

Le récepteur peut être inactivé au niveau de sa fixation au ligand, il peut être inhibé au niveau de son activité kinase et il est possible d'inhiber toutes les voies effectrices dépendantes de la signalisation de ce récepteur au niveau de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de l'angiogenèse et des métastases.

La connaissance détaillée d'une voie de signalisation permet d'imaginer des **thérapies ciblées** sur cette voie pour empêcher ces cellules de fonctionner. Cela ne fonctionne pas toujours très bien car il y a d'autres problèmes mais c'est une stratégie qui est largement employée en **pharmacologie anticancéreuse** mais qui s'applique à la médecine de manière générale. L'idée étant que la connaissance des mécanismes moléculaires permet d'identifier, pour un patient donné, les meilleures stratégies thérapeutiques.

On peut agir en inhibant la fixation du ligand et ça peut être d'autres types de médicaments anticancéreux et notamment des médicaments qui sont utilisés : ce sont des **anticorps monoclonaux humanisés**. Ce sont des « anticorps » ça veut dire qu'ils vont reconnaître le ligand par exemple EGF et « humanisés » ça veut dire qu'ils sont tolérés par les cellules humaines.

On prend le cas du récepteur à l'EGF (EGFR), surexprimé dans un grand nombre de tumeurs, on voit qu'il va reconnaître plusieurs molécules signalétiques comme EGF ou TGF $\alpha$ . On a phosphorylation des tyrosines donc activation de la voie Ras/MAPK induisant prolifération, métastase, angiogenèse et inhibant l'apoptose, tout ce que la cellule cancéreuse aime.

Il faut donc bloquer EGFR pour soigner les cancers. C'est une voie pharmacologique largement utilisée de longue date : les inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase (cytostatiques). On peut agir au niveau de l'interaction entre EGF et la partie extracellulaire des récepteurs, au niveau des kinases ou au niveau des signaux effecteurs.

### L'avenir (mais déjà le présent aussi) : le ciblage thérapeutique.

On effectue des prélèvements sur un patient que l'on analyse via **des techniques –omiques** afin de découvrir les voies qui sont altérées chez CE patient. Il sera ainsi possible de le traiter de manière ciblée en fonction des désordres spécifiques qu'il a et de prendre une décision thérapeutique en fonction de ses caractéristiques moléculaires.