

... SUITE ET FIN DES RCPG

I- Rappels

1. Les RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G ou RCPG traversent *7 fois la membrane*. Ils possèdent un maximum de ligands et sont *associés à des effecteurs* tels que l'adénylate cyclase et la phospholipase C.

2. Les protéines G

Les protéines G sont des petites protéines membranaires constituées de *3 sous unités : α , β et γ* . Seule α est impliquée dans la transduction du signal.

Il existe des isoformes de sous-unités α :

- ❖ Les sous-unités αs et i : toutes deux sont en interaction directe avec *l'adényl cyclase*.
- ❖ La sous-unité $\alpha-q$: active la *phospholipase C*.

II- Les sous-unités αs et i

1. Rappel sur la cascade des protéines G avec la sous-unité αs :

- *Fixation du ligand* dans un domaine spécifique du récepteur et *modification la partie cytosolique* du récepteur permettant l'association des protéines G.
- *Association* au récepteur et *modification de la conformation de sous unité α* :
 - ✓ *le GDP* présent sur la sous-unité *se dissocie* due à une *modification de son affinité*.
 - ✓ *le GTP* a une *forte affinité pour la sous-unité α associée* au récepteur et *s'y fixe*.
- L'échange GDP/GTP entraîne une *dissociation de cette sous-unité des deux autres sous-unités β et γ* .
- La *sous-unité α va se fixer sur l'adényl cyclase* et l'active.
- *Tant que α -GTP est associée* à cette enzyme, cette dernière sera active et *génèrera de l'AMPc* : augmentation $[AMPc]_c$.
- Un *effet antagoniste* réprime la phosphodiesterase.

2. L'AMPc

L'AMPc est un des deux *messagers secondaires importants* de la cellule : AMPc et Ca. Comme tout messager secondaire, ils *portent l'information initiale* de l'effecteur primaire.

Au niveau de la cellule, le niveau basal de la $[AMPc]_c$ (=cellulaire) doit être maintenu toujours *le plus bas possible en absence de stimulation*.

La $[AMPc]$ est le résultat de deux enzymes antagonistes qui catalysent des *réactions irréversibles* :

- ✓ Il est généré *à partir de l'ATP* par *l'adénylate cyclase*.
- ✓ Il est dégradé par *une phosphodiesterase* pour *redonner de l'AMP*

Le taux d'AMPc est déterminant pour la transduction du signal donc *indirectement* la voie de signalisation *dépend de la force de l'adényl cyclase (=adénylate cyclase) contre celle de la phosphodiesterase*.

➔ Quand l'adényl cyclase est activée, *une voie complémentaire de signalisation inhibe de la phosphodiesterase* de façon à minimiser cet effet de compétition et maintenir une $[AMPc]$ haute le temps nécessaire à la mise en place de l'effet biologique.

3. La PKA

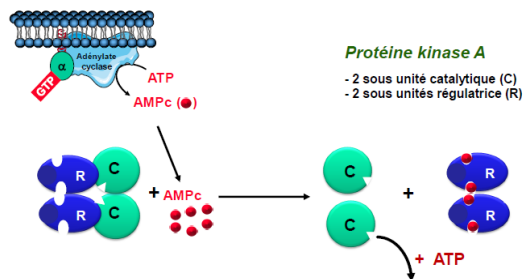
a. Son activation

L'AMPc a comme cible principale les *protéines kinases A* (= PKA : *protéines kinase AMPc-dépendantes*) dont il régule l'activité. Les protéines kinases sont le *support de la réponse biologique* (activation/répression via régulation d'enzyme – induction via facteur e transcription).

La régulation de PKA n'est pas une régulation par phosphorylation ni une régulation allostérique. C'est la fixation de l'AMPc qui permet le *démasquage des sites actifs* des PKA masqués en absence d'AMPc par les sous-unités de régulation.

✓ En absence d'AMPc, la PKA est une *enzyme hétéro-dimérique* inactive constituée de *deux sous-unités de régulation* et de *deux sous-unités catalytiques*. Cette association rend le *site actif inaccessible* au substrat.

✓ La fixation d'AMPc produit par l'adényl cyclase sur les sous-unités régulatrices entraîne la *dissociation* d'avec les sous unités catalytiques. Le *site actif* est alors *démasqué* et l'enzyme peut agir.



b. Ses œuvres

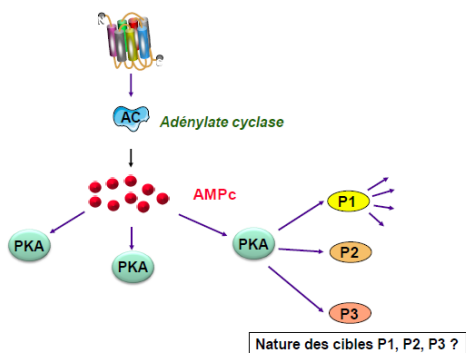
→ ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'enzyme phosphoryle des *résidus Sérines (Ser) ou Thréonine (Thr)* placés dans la *séquence consensus* suivante (= spécificité) :
Arg – Arg/Lys – X – Ser/Thr

Les PKA sont des *sérines/thréonine kinases* qui agissent sur des protéines substrats telles que des *enzymes* (activation), des *protéines de cytosquelette* (mouvement de la cellule) et des *facteurs de transcription* (induction)

Les modifications induites par les PKA sont à la base des modifications des propriétés de ces protéines et donc de la réponse biologique attendue.

→ ACTIVITE AMPLIFICATRICE



- La fixation de l'AMPc active une PKA.
- Une PKA va activer différentes protéines P1, P2, P3 (généralement des kinases)
- P1 active à son tour d'autres protéines.
- P2 et P3 peuvent être des cibles qui ne génèrent pas d'amplification.

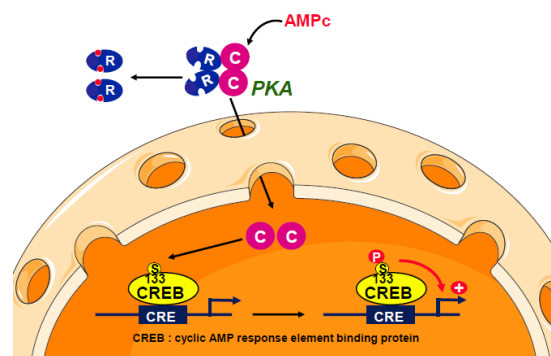
⚠ Un effet d'amplification se met en place principalement dans les voie d'activation (peu de sens dans une voie d'induction).

→ ACTIVATION DE L'EXPRESSION DU GENE CODANT POUR LA PEPCK

La voie d'induction de la PKA permet *l'activation du facteur de transcription CREB*.

- ✓ A l'état basal, il est *inactif* et ne permet *pas la production* de PEPCK
- ✓ Après *phosphorylation sur la Ser 133* par la PKA, CREB est un facteur de transcription *actif*.
 - Fixation de CREB phosphorylé sur une *séquence consensus de l'ADN* : la *séquence CRE*
 - *Activation du gène codant pour la PEPCK* et augmentation de la [PEPCK].

La PKA permet également l'activation de la glycogène-synthase.



⚠ A partir d'un même signal on peut avoir un signal d'induction et/ou un signal d'activation.

Nota Bene (... qui tombe comme un cheveux sur la soupe. Oui, parfaitement « cheveux » avec un « x ».) :

Pour avoir un signal fort, la cellule n'induit la réponse biologique que lorsque deux stimuli viennent se fixer sur le récepteur spécifique.

Exemple de la lipolyse au niveau du tissu adipeux :

Le glucagon a effet relativement faible. Il ne peut exercer son effet que si, en même temps, d'autres signaux comme l'hormone thyroïdienne ou le cortisol viennent synergiser l'effet du glucagon.

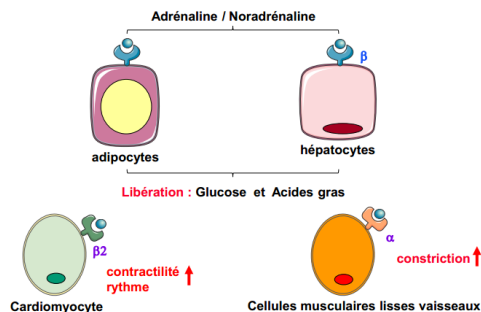
4. Récepteur de l'adrénaline (ADR) :

Le **récepteur de l'adrénaline** est un **RCPG** qui va passer par l'activation de **l'adényl cyclase**.

a. Les isoformes

Il existe des **isoformes de récepteurs** comme pour les enzymes. Le récepteur de l'ADR présente des **récepteurs β** et les **récepteurs α**. La localisation de ces isoformes est **tissu-dépendante**. On différencie ces isoformes **en fonction de la réponse aux stimuli primaires**.

- ❖ La fixation de l'ADR sur le **récepteur β adrénergique (?)** de l'**adipocyte** et de l'**hépatocyte** induit la libération de glucose et d'acide gras (**hyperlipémiant et hyperglycémiant**).
- ❖ La fixation de l'ADR sur le **récepteur β1** (erreur sur la diapo) des **cardiomyocytes** modifie leur **contractilité** et augmente le **rythme cardiaque**.
- ❖ La fixation de l'ADR sur les **récepteurs α** des **cellules musculaires lisses des vaisseaux** augmente la constriction de ces cellules pour la **circulation sanguine**.



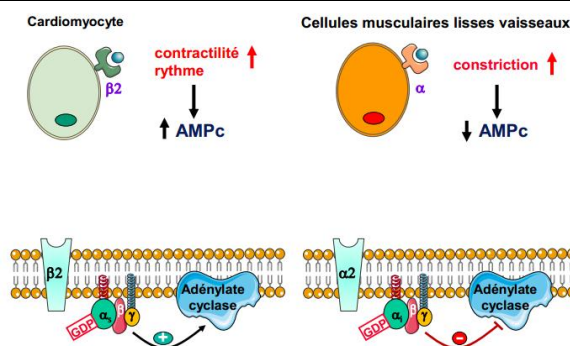
Le même effecteur, en fonction de l'isoforme de récepteur sur lequel il se fixe, génère une réponse biologique différente parfaitement adaptée à la cellule considérée.

Ex : une cellule musculaire n'a pas pour rôle la régulation du métabolisme cellulaire mais le bon déroulement de la circulation sanguine.

b. Les voies de signalisation

➔ Les voies de signalisation en aval de cette différence d'isoforme sont différentes.

Exemple du cardiomyocyte (β 1) et de la cellule musculaire lisse du vaisseau (récepteur α) :



Récepteur β2 :

- RCPG associé à une protéine G avec la **sous-unité αS**.
 - **Activation de l'adényl cyclase et augmentation de l'AMPc** à l'initiation de la réponse biologique.
- Les récepteurs du cardiomyocyte et de l'hépatocyte fonctionnent tous deux avec l'adényl cyclase mais les enzymes activées par la PKA sont totalement différentes.

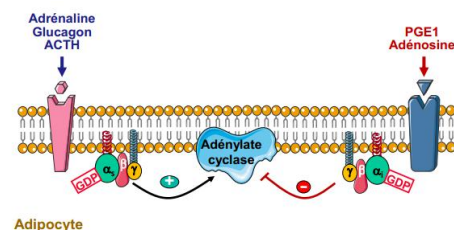
Récepteur α2 :

- RCPG associé à une protéine G avec la **sous-unité αi**.
 - **Association** de la sous unité αi au **récepteur** et **échange du GDP en GTP**.
 - Dissociation du récepteur et **fixation sur l'adényl cyclase en l'inhibant**.
 - La réponse biologique de ces cellules est induite par une **diminution de la concentration d'AMPc**.

Le même ligand primaire en fonction de l'isoforme et des voies de signalisation qui seront sélectionnées va générer une réponse biologique qui sera parfaitement adaptée à la cellule considérée.

➔ Néanmoins, des effets antagonistes peuvent s'exercer à l'échelle d'une même cellule. Ex du récepteur du glucagon au niveau de l'adipocyte :

- ✓ Le RCPG du glucagon (sous-unité αS) aboutit à l'activation de l'adényl cyclase.
- ✓ En présence de phosphatidyl ou d'adénosine à taux anormalement élevé, activation possible d'une voie antagoniste et altération la réponse attendue.

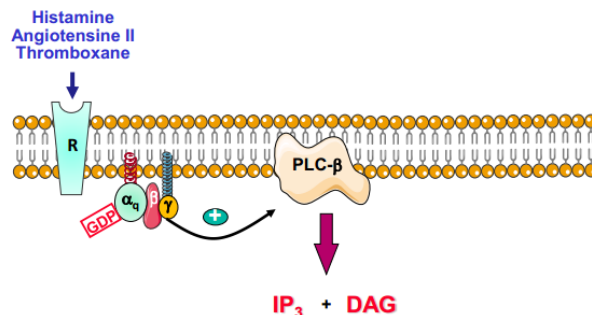


I- La sous-unité αq

1. Généralité

L'isoforme de la protéine G avec la sous-unité αq active la phospholipase C lorsqu'elle est réquisitionnée par le RCPG.

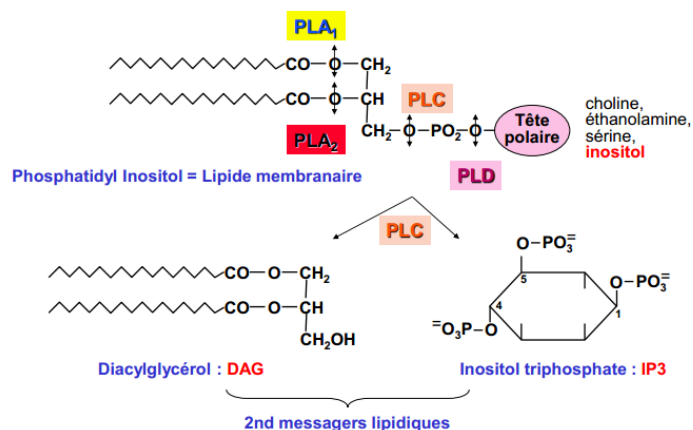
La phospholipase C ou PLC- β est une enzyme membranaire côté cytoplasmique. Son substrat un lipide de la membrane : le phosphatidyl inositol. Son rôle est la libération à partir du phosphatidyl inositol d'un inositol-3-phosphate (=IP3) et un diacylglycérol (=DAG). Ce sont deux messagers secondaires équivalant à l'AMPC.



2. Voie de signalisation dépendante de la PLC-béta

Le phosphatidyl inositol est une des classes de phospholipides très fortement représentée sur la bicouche de la membrane plasmique. Il est composé de :

- deux résidus acyl servant d'ancrage à la membrane. Ce sont deux acides gras saturés ou insaturés s'associant à...
- une molécule de glycérol pour donner le diacylglycérol
- Puis association avec un phosphate pour donner l'acide phosphatidyl
- Sur ce phosphate, fixation d'un résidu polaire baignant dans le cytosol (une choline, une éthanolamine, une sérine ou un inositol : constituent les quatre classes des phospholipides)



Ce phosphatidyl inositol est clivé par la phospholipase C : coupure de la liaison associant le glycérol au groupement phosphate et libérant du DAG et de l'IP3.

Il existe d'autres phospholipases de clivage spécifique mais non impliquées dans la transduction du signal.

IP3 :

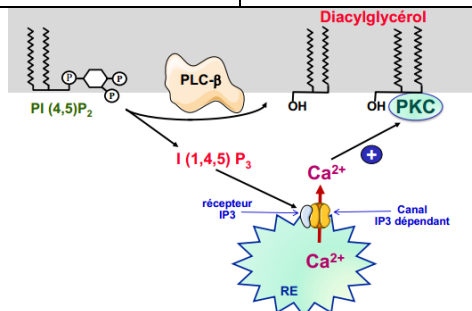
- Deux phosphates en positions classiques 1 et 5 et un dernier au niveau de la coupure avec le glycérol.
- Produit d'action de la PLC-béta totalement hydrophile.
- Pouvoir de se déplacer librement au sein du cytosol.
- Sécrétion de Ca par activation d'un canal ionotropique du réticulum endoplasmique par IP3 (canal actif/ouvert lors de la fixation du ligand sur son récepteur)
- Libération et augmentation du [Ca] : Ca devient messager secondaire. Homéostasie du Ca.

DAG :

- deuxième produit d'action totalement hydrophobe à l'exception d ce groupement OH.
- Ancré à la bicouche lipidique.
- Rôle de messager secondaire pour l'ancrage de certaines protéines inactives sous forme soluble dans le cytosol et actives une fois ancrées au DAG.

DAG & IP3 :

- Complémentaires : pas des effets spécifiques/indépendants mais des effets synergiques convergents.
- Fréquemment la fixation d'IP3 sur des protéines solubles inactives constitue le signal de migration de ces protéines à la membrane où elles vont s'ancrer au DAG.
- Associée à ces deux messagers secondaires, une famille de protéines kinase réquisitionnée très souvent : les PKC (« calcium dépendant »).



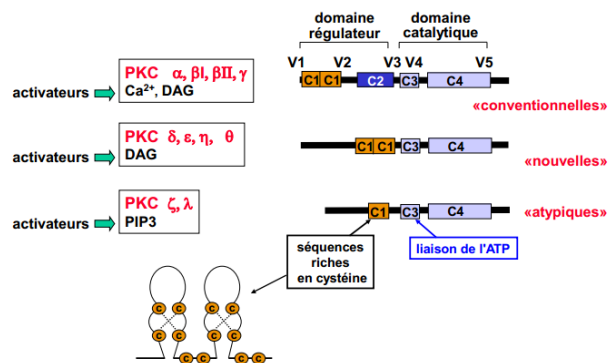
3. Les PKC

a. Définition et caractéristiques :

Famille de protéines représentées par *treize isoformes* impliquées dans *la transduction du signal* comme les PKA. Ce sont des *enzymes sérine/thréonine kinases* monocaténares de 600 à 740 acides aminés de poids moléculaire 60 à 75kDa nécessitant pour l'essentiel *la fixation au DAG pour être actives*. Elles phosphorylent soit des enzymes, des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des récepteurs etc... *comme la PKA*.

b. 3 familles de PKC :

- *PKC conventionnelles* où on a les isoformes α , $\beta 1$, $\beta 2$ et γ .
- *PKC nouvelles* : c'est la famille la plus représentée.
- *PKC atypiques* : deux identifiés pour l'instant. N'utilisent ni le calcium ni le DAG, ni l'IP3 pour être activée. Vont certainement être sorties de cette classification



c. Les différents domaines des PKC :

- ❖ La *partie N-term* : domaine régulateur
- ❖ Le *domaine C1* : participe à la régulation avec une *structure en doigt de Zinc* et *site de fixation du DAG*.
- ❖ Le *domaine C2* : spécifiques aux PKC conventionnelles : *site d'action du Ca*.
- ❖ Le *domaine C3* : permet *la liaison de l'ATP* nécessaire aux phosphorylations.
- ❖ La *partie C-term* : partie très conservée portant le domaine catalytique.

d. La séquence consensus :

La séquence consensus nécessaires aux PKC pour agir est la suivante :

X – Arg – X – X – Ser/Ter (sur lequel agira la PCK) – X – Arg – X.

En dehors de cette séquence les PKC n'ont pas la potentialité de phosphoryler. Cette séquence n'a aucune analogie avec celle des PKA.

e. Œuvres :

- Activation de la *voie des kinases de stress*, en particulier les MAPkinase,
- Modification de la structure de *protéines de cytosquelette*,
- Activation des *facteurs de transcription* (ex : *NF- κ B*, impliqué dans l'inflammation et *C/EBP*, impliqué dans la différenciation)

II- Mécanisme de la phosphorylase kinase et de la calmoduline :

La phosphorylase kinase a besoin de la calmoduline pour agir. Cependant la calmoduline n'est pas une sous unité de la phosphorylase kinase.

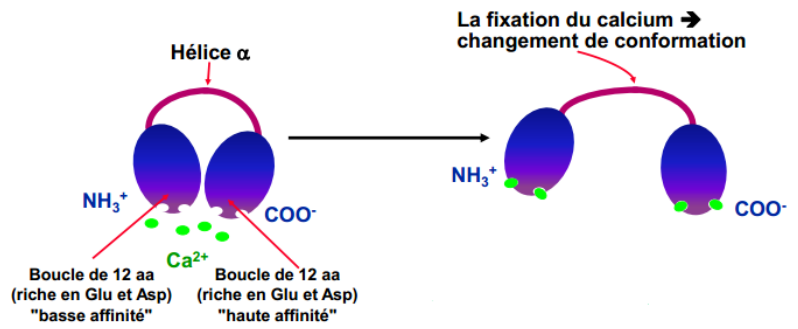
a. Définition de la calmoduline :

Une des *protéines les plus représentées* dans les cellules : *1% des protéines de la cellule*. Beaucoup d'effets lui sont associés.

Son action est la *régulation de différentes protéines kinases* et en particulier la phosphorylase kinase et l'AMPC phosphodiesterase.

✓ Forme inactive : repliée sur elle-même. Les domaines *N-term* et *C-term* sont en interaction. Ainsi présentée, la calmoduline ne peut pas s'associer avec une protéine kinase pour l'activer.

✓ Quand la $[Ca]$ augmente dans la cellule, 2 molécules de Ca se fixe sur le *N-term* et le *C-term* la calmoduline (une calmoduline = 4 atomes calcium). La calmoduline active s'ouvre et se fixe sur la protéine à activer.



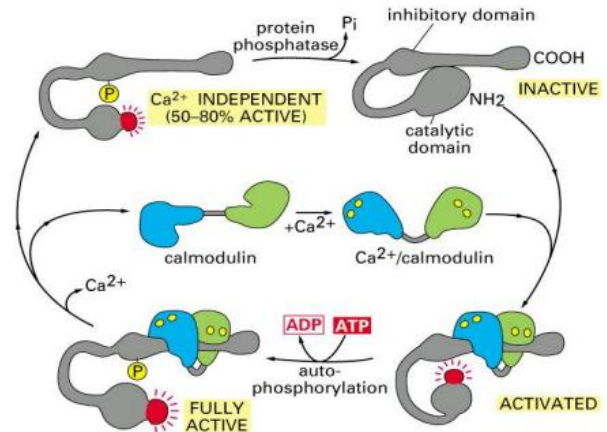
b. Mécanisme de la phosphatase

✓ Sous forme inactive, le domaine *N-term* de la phosphorylase kinase portant l'activité catalytique s'associe au domaine *C-term* qui est un domaine inhibiteur.

✓ En présence de calmoduline activée (ouverte par le calcium), cette dernière et la phosphorylase interagissent et la protéine kinase est activée : la calmoduline dépasse partiellement sur le site actif représenté en rouge : partiellement active.

✓ Puis phosphorylation de l'enzyme : en fonction de sa nature de la protéine kinase, la phosphorylation est automatique ou nécessite l'action conjointe d'une hormone (Ex : phosphorylase kinase). Phosphorylation + fixation de la calmoduline = totale active.

✓ Puis détachement de la calmoduline : la phosphorylation dans un des domaines α β joue en quelques sortes le rôle de la calmoduline et impose la dissociation du domaine catalytique et du domaine inhibiteur = partiellement active.

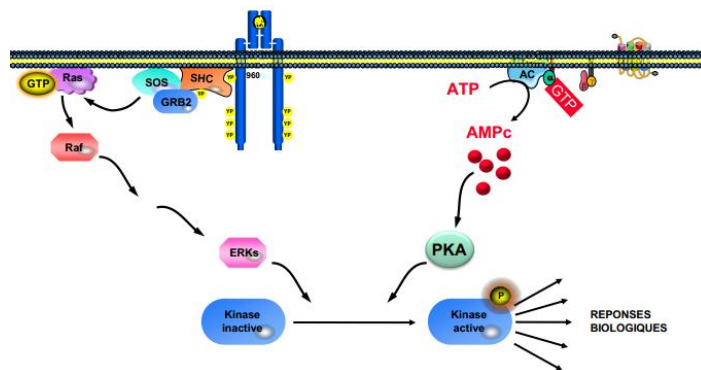


ASSOCIATION DE VOIES

Souvent *une voie de signalisation n'est pas unique ni suffisante* pour induire un effet et on peut également rencontrer un *effet synergisant complémentaire* de deux voies de signalisation.

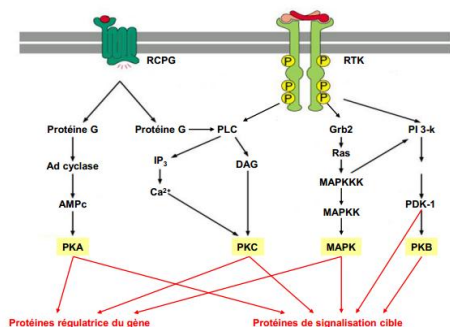
Par exemple, synergie entre le récepteur à tyrosine kinase de l'insuline et la fixation d'un ligand pour activer une PKA :

- Action conjointe de la *voie MAPKinase* et de *la voie de la PKA* sur une kinase permettant son activation et son amplification.
- Jamais/très rarement une voie unique dépendante d'un seul ligand. Très souvent, une réponse biologique répond à deux ligands (cf. cours n°2 sur les différents signaux intégrés par la cellule)



L'expression conjointe d'un récepteur à tyrosine kinase et d'un RCPG peut activer *la voie des PKA, des PKC, des PKB et des MAPkinase*.

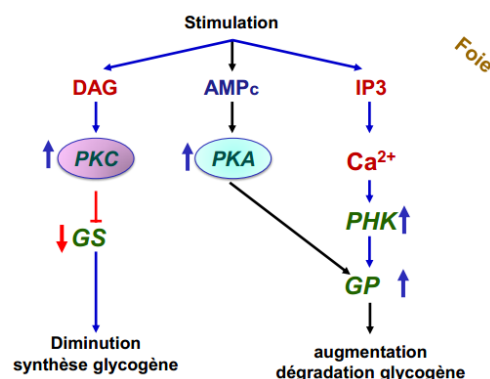
- Pour l'induction d'une réponse biologique adaptée, il faudra peut-être 2, 3 ou 4 de ces voies activées pour avoir la réponse.
- *Spécificité de la réponse* : si 3 signaux sont nécessaires à l'induction de la voie, peu de risque que la cellule se trompe.



La régulation de l'expression génique comme celle de la PEPCK peut également soumise à une ou plusieurs voies.

Stimulation de la glycolyse :

- *Activation de la voie classique de PKA* conjointement à *l'activation de la voie de la phospholipase C dépendante*.
 - *Augmentation d'une PKC* inhibant de la glycogène synthase → *diminution de la synthèse de glycogène*.
 - De plus *IP3 augmente le calcium* qui se fixe sur la calmoduline. La calmoduline active la phosphorylase kinase qui *active la glycogène phosphorylase*.



ARRÊT DU SIGNAL

On prend l'exemple d'un récepteur RCPG (récepteur à l'insuline vu dans le cours suivant).

I- Voie de désensibilisation

Il s'agit de l'arrêt de la transduction du signal et de la dégradation du ligand.

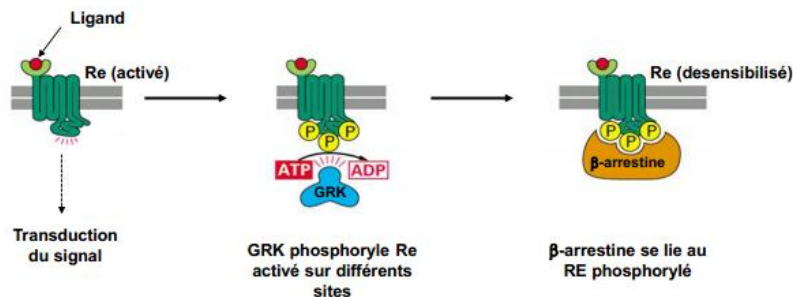
1. Arrêt de la transduction du signal

Le RCPG possèdent des sites de phosphorylation qui servent à arrêter le signal porté par le ligand.

Une fois la réponse biologique effectuée, le signal doit être arrêté.

- *Activation d'une kinase* : la protéine G récepteur kinase dite « **GRK** ».

- *Phosphorylation* du récepteur RCPG portant le ligand au niveau de la boucle 4 de ces sites phosphorylants par la GRK → Le ligand n'a plus d'effet.



2. Fixation de la β-arrestine

Le ligand ne peut pas être libéré dans le milieu extracellulaire (Eviter un autre effet non programmé sur d'autres cellules). Il ne doit servir qu'une seule fois et donc être dégradé.

En revanche le récepteur doit se retrouver à la membrane par *recyclage tel qu'il était à l'origine*.

- Quand ces sites du RCPG sont *phosphorylés*, ils constituent des *points d'ancrage* pour une protéine qu'on appelle la **β-arrestine**

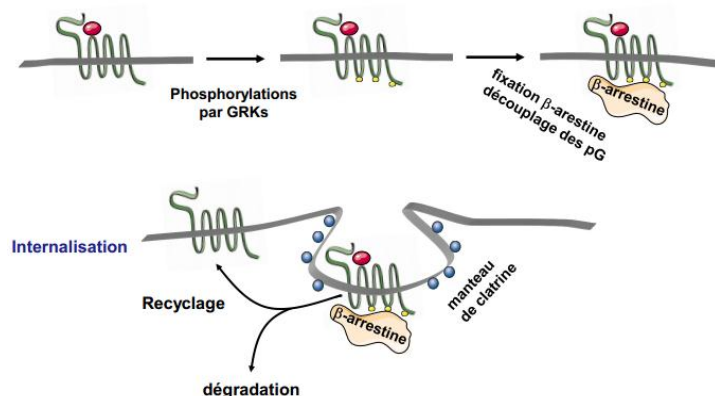
- *Fixation* de la β-arrestine en regroupant les différentes molécules phosphorylées
- *Induction le signal* du recyclage du récepteur par *endocytose*.

3. Endocytose et dégradation

- Mise en place de *vésicules d'endocytose entourées d'un manteau de clatrine* autour du complexe RCPG/β-arrestine induite par cette dernière et *endocytose*.

- Orientation et passage par tous les systèmes de l'endosome : *dégradation du ligand* dissocié du récepteur

- *Recyclage du récepteur libéré* de son ligand et *nettoyage par des phosphatases* qui déphosphorylent ces sites.



II- Pathologie

Résistance à l'insuline chez les diabétiques de types 2.

- Il faut *plus d'insuline pour avoir la même réponse biologique* donc les récepteurs vont être *réquisitionnés plus souvent*

- Le *recyclage* va se faire *plus rapidement*. Il est sans fin *pour s'adapter* à l'augmentation de la [insuline]

- Le ligand *manque de temps pour se dissocier* du récepteur et l'ensemble des deux est orienté vers la *dégradation*.

- Diminution progressive du nombre de récepteur à l'insuline à la membrane → Augmentation **la résistance à l'insuline**.

C'est un des éléments initiaux de la mise en place de la résistance à l'insuline.

