

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique*



*Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique*

Trafic intracellulaire des macromolécules, communication et signalisation cellulaire

**Document destiné aux étudiants de Master 1 Biochimie
fondamentale**

**Dr. METROUH-AMIR Hassiba
(Maître de conférences classe B)**

Liste des figures

figure	Titre	page
1	Représentation schématique d'une cellule eucaryote	03
2	Compartiments du système endomembranaire et transport vésiculaire	06
3	Compartiments cellulaires impliqués dans les voies de biosynthèse-exocytose et d'endocytose	07
4	Les deux voies majeures du transport intracellulaire	09
5	Trafic des protéines dans la cellule	10
6	Voie sécrétoire et voie lysosomale	12
7	Transport antérograde et rétrograde des protéines	12
8	Principales modifications biochimiques des protéines au cours de leur transport antérograde dans les compartiments successifs	14
9	Adressage des protéines sécrétées au réticulum endoplasmique rugueux	16
	Classes topologiques des protéines membranaires	17
11	Adressage et insertion d'une protéine transmembranaire de type I (protéine transmembranaire pourvue d'une séquence signal clivable et d'une séquence d'arrêt de transfert)	18
12	Insertion des protéines transmembranaires de type II et de type III	19
13	Adressage et insertion d'une protéine de type IV (protéine avec plusieurs passages transmembranaires (x séquences signal internes et d'arrêt de transfert, ou $x \geq 2$))	20
14	Rôle de la protéine chaperon BIP soluble pour l'acquisition de la configuration tridimensionnelle normale	22
15	Adressage et insertion d'une protéine transmembranaire du RE pourvue d'une séquence signal clivable et d'une séquence d'arrêt de transfert	24
16	Adressage et insertion d'une protéine transmembranaire du RE pourvue d'une séquence signal permanente (non clivable) et d'une séquence d'arrêt de transfert	24
17	Orientation des protéines mitochondriales matricielles	27
18	Intervention des protéines chaperonnes (hsp 70) dans le mécanisme d'orientation des protéines mitochondriales matricielles	27
19	Importation de protéines depuis le cytosol vers l'espace inter-membranaire ou la membrane interne des mitochondries	29
20	Les différentes modalités d'endocytose	30
21	Diverses formes d'endocytose toutes au stade de séparation avec le plasmalemme	31
22	Différentes étapes de la phagocytose	33
23	Différentes étapes de la pinocytose	33
24	Différentes étapes de l'endocytose dépendante de récepteurs	34

25	Endocytose dépendante de clathrine	37
26	Clathrine et adaptine	38
27	Endocytose dépendante de cavéoline	40
28	Maturation endosomique	42
29	Transport vésiculaire impliquant les vésicules enveloppées de clathrine et de COP (Coatomères Proteins).	44
30	Recrutement et assemblage de protéines manteaux, puis bourgeonnement et scission de la vésicule	45
31	Le rôle du SNARE dans le processus de reconnaissance des membranes cibles des vésicules de transport	46
32	Le processus de reconnaissance des membranes cibles des vésicules de transport qui fait intervenir les deux classes de protéine, les SNARE et les protéines rab	47
33	Rôle des Rab, SNAP et NSF dans la fusion d'une vésicule de transport avec une membrane cible	48
34	Transport vésiculaire impliquant les vésicules enveloppées de COP (Coatomères Proteins)	48
35	Formation des vésicules COPII	50
36	Formation des vésicules COPI	51
37	Mécanisme moléculaire à l'origine du mucus épais et visqueux	55
38	Stratégies mises en place par le VIH pour réduire l'expression de CD4 à la surface des cellules	56
39	Implication de processus d'autophagie au cours des pathologies humaines	58
40	Types d'autophagie dans la cellule	59
41	Les différentes étapes de la macroautophagie	61
42	Initiation de l'autophagie	63
43	Le complexe ULK1	63
44	Formation de l'omégasome et de l'autophagosome	64
45	Elongation	65
46	Le système de conjugaison ATG12-ATG5	66
47	Le système de conjugaison LC3-PE	67
48	Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie	69
49	Communication cellulaire	70
50	Communication cellulaire par l'intermédiaire des molécules de signalisation	71
51	Communication autocrine et communication paracrine	73
52	Effets d'un signal dans une cellule cible en se liant à un type de récepteur protéique	74
53	Effet de l'acétylcholine sur différentes cellules	74
54	Récepteur extracellulaire	76
55	Récepteur intracellulaire	76

56	Les différentes classes de récepteur protéique de surface	79
57	Activation et inactivation des récepteurs membranaires	80
58	Stimulation des récepteurs couplés à une protéine G	82
59	Contrôle de canaux ioniques membranaire par une protéine G	84
60	Voie de l'adénylate cyclase	86
61	Voie de la phospholipase C	87
62	Régulation de l'activité de la tyrosine kinase	88
63	Activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par autophosphorylation croisée	89
64	Activation des voies des MAP-kinases et de PI3 kinase	90
65	Voie des MAP kinases	91
66	Quelques voies de signalisations activées par les récepteurs couplés aux protéines G	93
67(a)	Récepteur associé à une tyrosine kinase (JAK)	94
67(b)	Voie d'activation de JAK/STAT	95
68	Voie d'activation du TGF- β	96

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction.....1

Chapitre I : Modes de transports des protéines: translocation, diffusion, transport vésiculo-tubulaire

I. Compartiments des cellules eucaryotes	3
I.1. Membranes biologiques	4
I.2. Noyau	5
I.3. Réticulum endoplasmique	5
I.4. Appareil de Golgi.....	6
I.5. Lysosomes	8
I.6. Mitochondries.....	8
II. Trafic intracellulaires des protéines	8
II.1. Voies de biosynthèse et/ou de sécrétion	9
II.1.1. Adressage et triage intracellulaires.....	11
II.1.1.1. Protéines de la voie de sécrétion	11
II.1.1.2. Protéines membranaires.....	16
II.1.1.3. Protéines du réticulum endoplasmique.....	20
II.1.1.4. Protéines de l'appareil de Golgi	24
II.1.1.5. Protéines lysosomales	25
II.1.1.6. Protéines mitochondriales.....	25
II.2. Voie d'endocytose.....	29
II.2.1. Introduction	29
II.2.2. Différentes formes d'endocytoses	30
II.2.2.1. Phagocytose.....	31
II.2.2.2. Pinocytose	33
II.2.2.3. Endocytose dépendante de récepteurs.....	34
II.2.3. Endosomes et voie d'endocytose	40

Chapitre II : Mécanisme moléculaire du trafic vésiculaire dans les voies de biosynthèse/sécrétion

I. Transport des protéines	43
II. Evènements de transport vésiculaire.....	44
II.1. Assemblage des protéines de revêtement.	44
II.2. Sélectivité du transport vésiculaire.	45

II.2.1. Protéines SNARE.....	45
II.2.2. Protéines rab.....	46
II.3. Fusion entre les deux membranes	47
III. Principales vésicules enveloppées	48
III.1. Vésicules formées par les coatomères COP.....	48
III.1.1. Formation des vésicules COP II.....	48
III.1.2. Formation des vésicules COP I.....	50
III.2. Vésicules à clathrine	51
III.3. Vésicules recouvertes de rétromères.	52
III.4. Autres types de vésicules.....	52
IV. Triage intracellulaire et maladies.....	53
IV.1. Hypercholestérolémie familiale	53
IV.2. Mucoviscidose	54
IV.3. Pathogénicité du VIH	55

Chapitre III : Autophagie

I. Définition.....	58
II. Différentes formes d'autophagie.....	59
II.1. Microautophagie	59
II.2. Autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA).....	59
II.3. Macroautophagie	60
III. Etapes de l'autophagie.....	60
III.1. Initiation.....	61
III.2. Elongation.....	64
III.2.1. Système de conjugaison Atg12-Atg5.....	66
III.2.2. Système de conjugaison LC3-PE.....	66
III.3. Fusion de l'autophagosome avec le lysosome et dégradation de son contenu.....	67
IV. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie.	68

Chapitre IV : Communication et signalisation cellulaire

I. Communication cellulaire.....	70
I.1. Communication cellulaire par contact direct (juxtacrine).....	70
I.1.1 Jonctions communicantes.....	70
I.1.2. Molécules d'adhérences	70

I.2. Communication cellulaire par l'intermédiaire des molécules de signalisation.....	71
I.2.1. Communication endocrine	71
I.2.2. Communication paracrine	72
I.2.3. Communication neurocrine	72
I.2.4. Communication autocrine	72
I.2.5. Communication intracrine.....	73
II. Signalisation inter- et intracellulaire	73
II.1. Molécules signal	73
II.2. Récepteurs membranaires.....	74
II.3. Nature des molécules signal	75
III. Transduction du signal à partir des récepteurs membranaires.....	78
III.1. Introduction	78
III.2. Différentes classes de récepteurs protéiques de surface	78
III.2.1. Récepteurs couplés aux canaux ioniques : Egalement appelés canaux.....	78
III.2.2. Récepteurs couplés aux protéines G.....	78
III.2.3. Récepteurs couplés à des enzymes.....	79
III.3. Activation des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et aux enzymes	80
III.4. Récepteurs couplés à une protéine G	81
III.4.1. Stimulation des récepteurs couplés à une protéine G.....	81
III.4.2. Protéines cibles des protéines G.....	83
III.4.3. Contrôle des canaux ioniques membranaires par une protéine G.....	83
III.4.4. Activation des enzymes membranaires par les protéines G.....	84
III.4.4.1. Voie de l'AMPc.....	84
III.4.4.2. Voie de la phospholipase C	86
IV. Récepteurs couplés aux enzymes.....	88
IV.1. Récepteurs-enzymes	88
IV.2. Structure et activité enzymatique des récepteurs catalytiques.....	88
IV.2.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase (ou TKR).....	89
IV.2.2. Récepteurs à activité serine/thréonine kinase.....	95
Références bibliographiques.....	97

INTRODUCTION

Introduction

Ce document est consacré à développer le mécanisme de transport des macromolécules dans les voies de biosynthèse/sécrétion et d'endocytose de la cellule eucaryote, aux différents modes de transport utilisés entre les différentes organelles cellulaires ainsi qu'aux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation et la spécification de l'adressage des protéines qui transitent ou résident dans ces régions.

Le transfert des protéines à partir du réticulum endoplasmique vers les autres organites et la membrane plasmique (exocytose) se fait par l'intermédiaire de vésicules de transport. Toujours grâce à des vésicules, les cellules eucaryotes captent des macromolécules du milieu extracellulaire pour les diriger vers les lysosomes (endocytose).

La vie de tout organisme pluricellulaire repose sur la communication et les interactions entre les cellules qui le composent. Cette communication est assurée par le biais de molécules informatives hydrophiles, y compris les neurotransmetteurs, les hormones protéiques, ainsi que quelques protéines liposolubles. Ces molécules se fixent sur un récepteur spécifique situé à la surface des cellules cibles qu'elles influencent, afin d'assurer la transduction du signal ainsi que la communication cellulaire.

Objectifs

Le présent polycopié constitue un support pédagogique d'une grande importance, destiné aux étudiants ayant dans leur cursus le module de trafic intracellulaire des macromolécules, communication et signalisation cellulaire

Ce support permettra aux étudiants d'assimiler, d'une part, le mécanisme de transport des macromolécules, entre les différents compartiments des cellules eucaryotes, et d'autre part de développer le mode de communication et de signalisation entre les cellules.

Dans un souci pédagogique, les cours sont simplifiés et structurés en quatre chapitres :

- ✓ Le premier concerne les modes de transports des protéines: translocation, diffusion, transport vésiculo-tubulaire.
- ✓ Le second est consacré au mécanisme moléculaire du trafic vésiculaire dans les voies de biosynthèse/sécrétion.
- ✓ Le troisième chapitre résume l'autophagie.
- ✓ Alors que le dernier chapitre est consacré à la communication et la signalisation cellulaire.

Chapitre I

*Modes de transports des protéines:
translocation, diffusion, transport
vésiculo-tubulaire*

I. Compartiments des cellules eucaryotes

Les cellules eucaryotes sont compartimentées et entourées d'une membrane plasmique. D'autres membranes intracellulaires délimitent des compartiments au sein de la cellule, chaque compartiment étant caractérisé par une structure, composition biochimique et des fonctions bien précises (Figure 1).

Les différents compartiments (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes, lysosomes, membrane plasmique) communiquent entre eux grâce à des vésicules qui bourgeonnent d'un compartiment donneur et fusionnent avec un compartiment accepteur.

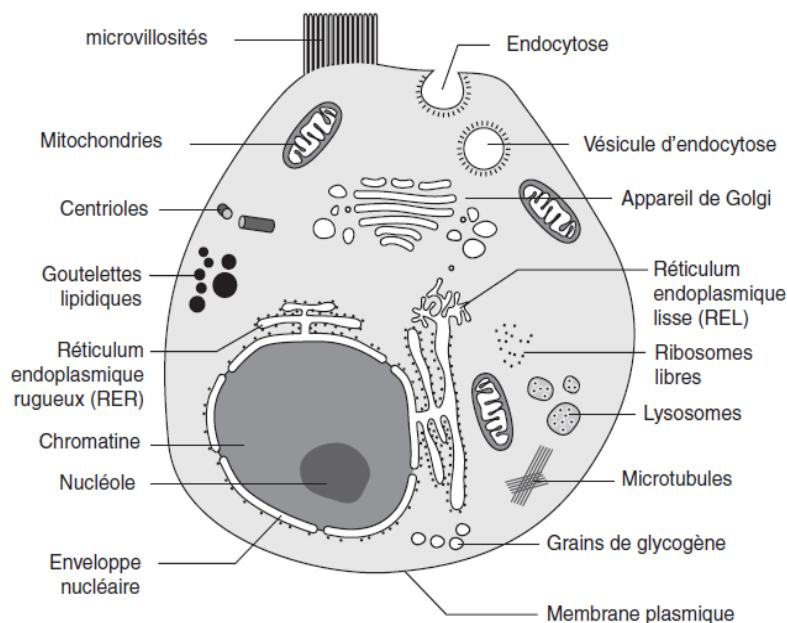


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule eucaryote.

Le trafic membranaire dépend de trois mécanismes clés: le bourgeonnement de vésicules à partir d'un compartiment donneur, le déplacement de ces vésicules vers un compartiment accepteur, et leur fusion avec ce dernier. La fusion membranaire entraîne la réunion de deux structures membranaires en une seule et le mélange du contenu des compartiments que délimitaient les deux structures membranaires. Il en est ainsi au cours de l'exocytose lorsque la membrane de la vésicule de sécrétion fusionne avec la membrane plasmique et libère son contenu dans le milieu extracellulaire.

I.1. Membranes biologiques

Les membranes biologiques sont composées de lipides (30-50 % en moyenne) et de protéines (70-50 %).

Les lipides membranaires constituent la structure de base des membranes. Du fait de leur nature amphiphile, ils s'organisent spontanément en une double couche : les têtes polaires sont en contact avec le milieu aqueux (extracellulaire ou intracellulaire) et les chaînes hydrophobes s'associent face à face. Les lipides membranaires comprennent en majorité des phospholipides, le plus abondant étant la phosphatidylcholine ; il s'y ajoute du cholestérol et des glycosphingolipides. Leur nature et leurs proportions respectives varient à la fois le long des compartiments membranaires et en fonction de la différenciation cellulaire. Le rôle des lipides membranaires dans le fonctionnement cellulaire est double. Outre leur participation dans le transport membranaire et le tri des protéines, ils sont impliqués dans la transduction des signaux extracellulaires activant des récepteurs spécifiques de la membrane plasmique.

Les protéines membranaires sont soit intégrées dans la bicouche lipidique (protéines membranaires intégrales ou transmembranaires), soit associées à l'une des faces de la bicouche lipidique (protéines périphériques). Cette distinction repose sur des mécanismes de biosynthèse et d'insertion différents. Les protéines périphériques sont associées à l'une des faces de la bicouche lipidique par des mécanismes enzymatiques assurant l'addition covalente de chaînes lipidiques. Les protéines associées à la face cytoplasmique du réticulum sont synthétisées dans le cytosol et peuvent subir différentes modifications selon la nature des chaînes lipidiques ajoutées (myristoylation, palmitoylation, isoprénylation). D'autres protéines sont associées dans la face luminale du réticulum et, après insertion dans la membrane plasmique, elles sont exposées à la surface cellulaire. Parmi celles-ci on citera les protéines ancrées par un groupement glycosyl- phosphatidyl-inositol (GPI). De même que les lipides, les protéines membranaires sont mobiles latéralement. Cependant, ces mouvements ne se font pas au hasard. Par exemple, les protéines périphériques pourvues d'un groupement GPI ont une affinité pour les

radeaux lipidiques. Des mécanismes contrôlent ces mouvements latéraux qui jouent un rôle déterminant dans le trafic membranaire, le transport et l'adressage des protéines de même que dans le couplage des mouvements membranaires avec le cytosquelette et la signalisation intracellulaire.

I.2. Noyau

Le noyau est l'organite le plus remarquable de la cellule eucaryote, est le lieu de stockage de son information génétique. Cette information est codée dans la séquence des bases des molécules d'ADN qui constituent les chromosomes. Ces derniers sont constitués de chromatine et de protéines. L'information génétique codée par l'ADN est transcrite en molécules d'ARN qui, après de profondes modifications, seront transportées dans le cytoplasme où vont diriger la synthèse protéique au niveau des ribosomes. L'enveloppe nucléaire est constituée de deux membranes (interne et externe). Ces deux membranes fusionnent ensemble au niveau des pores nucléaires à travers lesquels des molécules (ex : ARNm, protéines, ribosomes...) peuvent migrer du noyau vers le cytosol. D'autres protéines, comme celles impliquées dans la régulation de l'expression des gènes peuvent traverser les pores du cytosol vers le noyau.

Le noyau contient au moins un nucléole, site de la synthèse de l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr). La membrane nucléaire externe est souvent continue avec le réticulum endoplasmique rugueux (RER).

I.3. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est la structure membranaire la plus importante de la cellule. Le réticulum endoplasmique est un réseau d'interconnexion de vésicules entourées de membrane. Une grande partie de cet organite, appelé réticulum endoplasmique rugueux est recouvert de ribosomes qui sont impliqués dans la synthèse des protéines (protéines sécrétrices, membranaires, du RE, du Golgi, des endosomes et des lysosomes (transmembranaires ou non)). A l'intérieure de la lumière du réticulum endoplasmique rugueux, sont localisés les enzymes impliqués dans les modifications post-traductionnelles (N-glycosylation, protéolyse...) des protéines sécrétrices et membranaires.

Le réticulum endoplasmique lisse, qui ne porte pas de ribosomes, est le site de la biosynthèse des phospholipides ainsi que celui d'un certain nombre de détoxification.

I.4. Appareil de Golgi

Un autre organeite pourvu de membrane, l'appareil de Golgi, dirige des protéines et des lipides libérés par le réticulum endoplasmique vers leurs destinations finales à l'intérieur de la cellule ou dans le milieu extracellulaire. Le Golgi est le centre de tri et de ciblage de la cellule. Sous le microscope électronique, le Golgi ressemble à une série de sacs membranaires aplatis, reliés entre eux et entourés d'un grand nombre de petites vésicules. Ces vésicules transportent des protéines du RE au Golgi et entre les divers sacs du Golgi. En transit à travers l'appareil de Golgi, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles supplémentaires. Ces vésicules bourgeonnent à partir du Golgi, sont transportées à travers le cytosol, et fusionnent finalement soit avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans l'espace extracellulaire (exocytose), soit avec d'autres organeites internes (ex : lysosomes) (Figure 2).

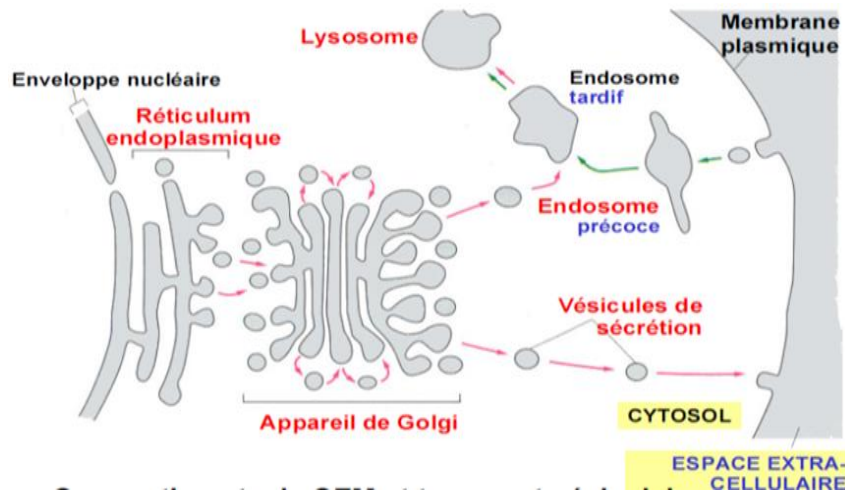


Figure 2 : Compartiments du système endomembranaire et transport vésiculaire.

Dans le compartiment Golgien, les protéines sont modifiées par l'addition covalente aux chaînes polypeptidiques de différents groupements tels que des chaînes glycosylées, des acides gras ou des groupements sulfates, et par des coupures protéolytiques. Ces modifications se produisent séquentiellement, au fur et à mesure de la progression des protéines. De même, les lipides membranaires

peuvent être glycosylés, donnant naissance aux sphingolipides qui participent à la composition de la membrane plasmique. Les enzymes responsables de ces modifications sont membranaires ou luminales.

Classiquement, trois compartiments Golgiens, *cis*, médian et *trans* sont identifiés (Figure 3), chacun correspondant à une étape de progression antérograde des protéines issues du réticulum endoplasmique. Schématiquement, ces compartiments sont représentés par trois citernes aplaties et parallèles entourées de vésicules. À ces trois compartiments classiques s'ajoutent des régions frontières assurant respectivement la communication avec le compartiment précédent, le réticulum endoplasmique, et avec le compartiment suivant, le compartiment post-Golgien. Il s'agit, d'une part, du compartiment intermédiaire (*cis-Golgi network* (CGN)) et, d'autre part, du compartiment *trans* du Golgi (*trans-Golgi network* (TGN)) (Figure 3).

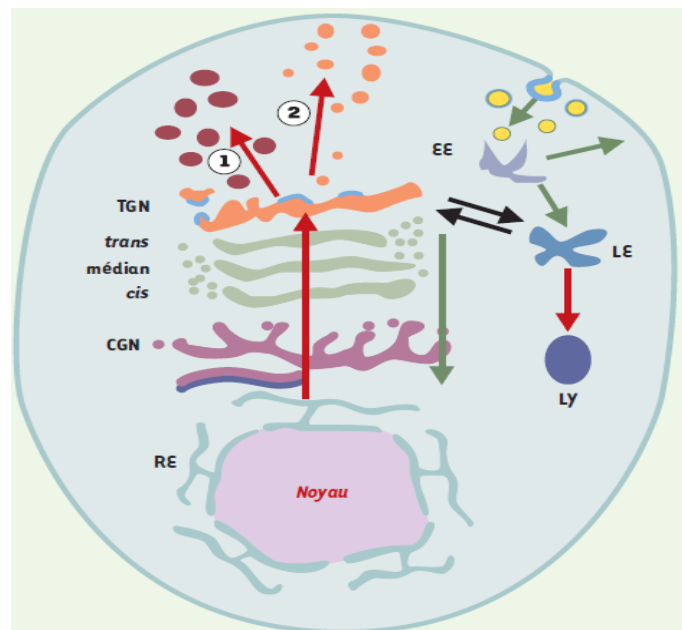


Figure 3 : Compartiments cellulaires impliqués dans les voies de biosynthèse-exocytose et d'endocytose. La voie de biosynthèse est en rouge, celles d'endocytose est en vert. RE : réticulum endoplasmique ; CGN : *cis-Golgi network* ou compartiment intermédiaire ; TGN : *trans-Golgi network*. Les voies 1 et 2 sont respectivement les voies soumises à régulation et constitutive. La voie d'endocytose est en noir. EE : *early endosome*; LE : *late endosome* ; LY : *lysosome*. Le revêtement de clathrine est représenté en bleu clair sur la TGN et quelques vésicules d'endocytose.

I.5. Lysosomes

Les lysosomes sont des sacs membraneux remplis de nombreux enzymes d'hydrolyse. Des recherches cytologiques ont montré que les lysosomes se forment par bourgeonnement de l'appareil de Golgi. Les lysosomes assurent la dégradation des organites intracellulaires arrivés au terme de leur vie ainsi que les molécules prélevées dans le milieu extracellulaire par endocytose.

Les protéines produites et assemblées par le RE et l'appareil de Golgi ne sont pas toutes destinées à être transférées à la surface cellulaire. Dans les cellules animales, des sous-ensembles indépendants de protéines sont envoyés vers les lumens d'autres organites, les lysosomes. Les lysosomes sont des vésicules spécialisés contenant des enzymes participant à la décomposition des macromolécules telles que les sucres, les protéines et les graisses. Bien qu'ils puissent adopter une variété de formes irrégulières, ils sont tous caractérisés par un lumen acide d'un pH voisin de 5. Cette acidité du milieu ambiant est une condition préférentielle pour le fonctionnement des enzymes lysosomiales.

Diverses macromolécules, destinées à être décomposées, sont transférées aux lysosomes au moyen des vésicules. Les produits de décomposition, comme les acides aminés et les lipides, sont alors transportés à travers la membrane lysosomiale dans le cytosol pour être mis à la disposition de la cellule.

I.6. Mitochondries

Les mitochondries sont les principaux producteurs d'énergie dans toutes les cellules eucaryotes. Une mitochondrie possède une double membrane, celle de sa face intérieure est fortement pliée. Les plis (crêtes) de la membrane intérieure contiennent des enzymes participant à la production d'énergie. Le lumen interne de la mitochondrie est appelé la matrice. Cette dernière est le site de nombreuses réactions métaboliques dont le cycle de l'acide citrique et de la dégradation des acides gras.

II. Trafic intracellulaires des protéines

Dans cette partie, nous nous intéresserons au transport des protéines dans les voies de biosynthèse/sécrétion et d'endocytose de la cellule eucaryote, aux

différents modes de transport utilisés entre les différentes organelles cellulaires ainsi qu'aux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation et la spécification de l'adressage des protéines qui transitent ou résident dans ces régions.

Le transport intracellulaire des protéines est divisé en deux voies majeures ayant des directions opposées. La voie de l'exocytose est destinée à la sécrétion des composants cellulaires, alors que la voie d'endocytose constitue la voie d'entrée des molécules depuis l'extérieur de la cellule (Figure 4).

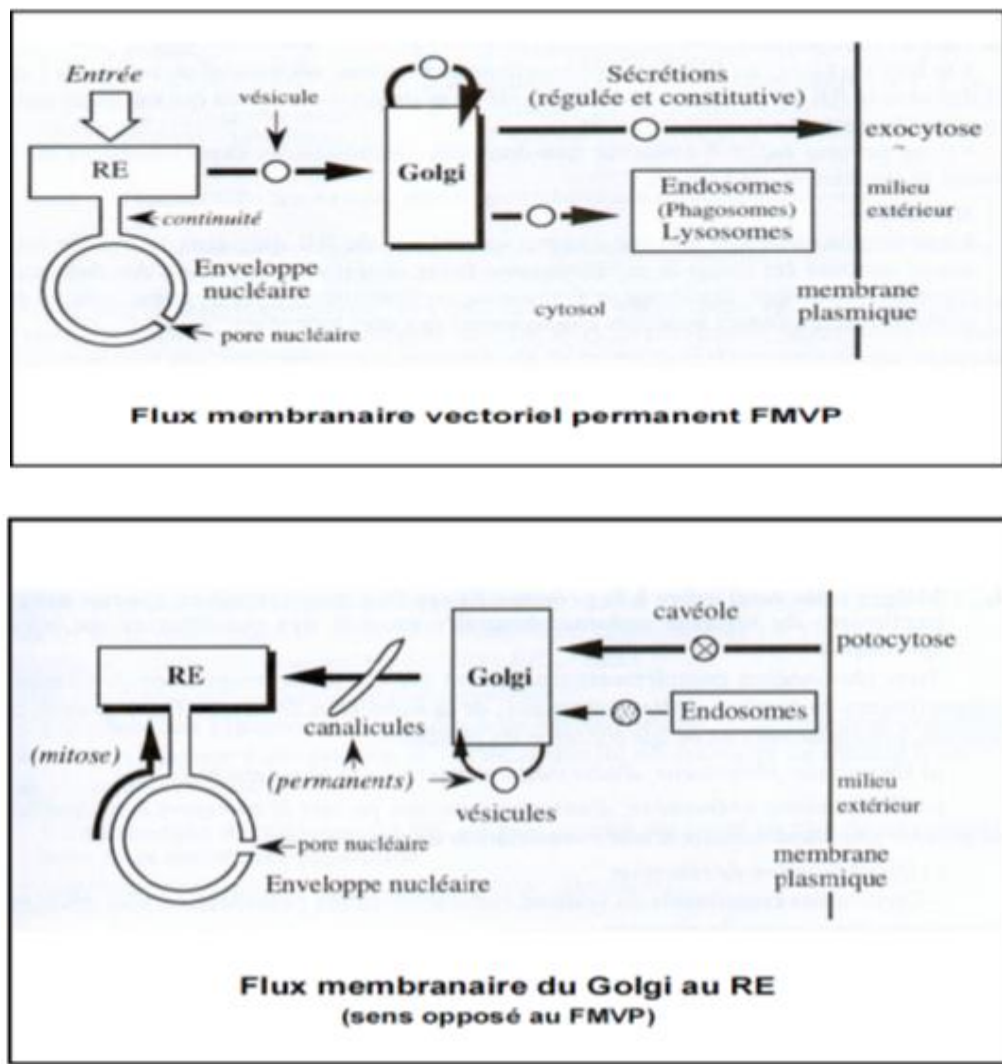


Figure 4 : Les deux voies majeures du transport intracellulaire.

II.1. Voies de biosynthèse et/ou de sécrétion

Toutes les protéines prennent naissance sur les ribosomes du cytosol et, de là, sont dirigées vers 2 embranchements principaux (Figure 5):

- Dans le premier embranchement, les protéines sont initialement libérées dans le cytosol après leur synthèse. La majorité de ces protéines va rester dans le cytosol, tandis que d'autres sont exportées vers les mitochondries, le noyau ou les peroxysomes. Le passage des protéines au travers de la membrane des mitochondries ou des peroxysomes se fait grâce à une protéine membranaire de translocation. Le passage des protéines dans le noyau se fait, quant à lui, au travers de pores nucléaires qui ont une perméabilité sélective.
- Dans le deuxième embranchement, les protéines sont initialement transférées dans le réticulum endoplasmique. Le transfert de ces protéines vers le réticulum endoplasmique se fait après fixation, des ribosomes qui synthétisent ces protéines sur le réticulum endoplasmique. La translocation nécessite une protéine de transport. Les protéines transloquées peuvent rester dans le réticulum endoplasmique, ou bien être dirigées vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, les protéines peuvent là encore rester dans ce compartiment, ou être dirigées soit vers les lysosomes, soit vers la membrane plasmique.

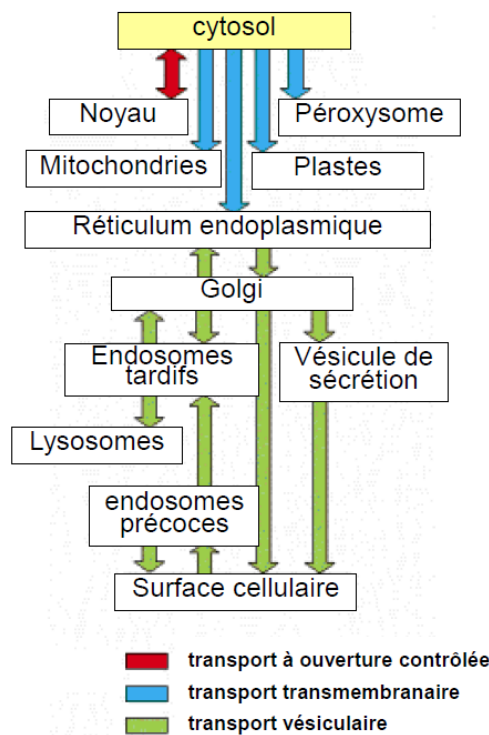


Figure 5 : Trafic des protéines dans la cellule.

II.1.1. Adressage et triage intracellulaires

Les cellules doivent s'assurer que chaque protéine nouvellement synthétisée est dirigée correctement vers sa destination où elle peut accomplir une fonction appropriée. Ce processus est appelé orientation ou adressage d'une protéine; une protéine peut être destinée à rester dans le cytosol (exemple : enzyme de glycolyse), elle peut aussi être orientée vers un organe (ex : mitochondrie, noyau...), être insérée dans la membrane plasmique ou être exportée à l'extérieur de la cellule.

- Si la protéine est destinée à rester dans le cytosol, elle est synthétisée sur des ribosomes libres et libérée directement dans le cytosol.

-Si la protéine est destinée à d'autres localisations, des mécanismes d'orientation sont impliqués. La notion de signaux de triage constitue l'un des concepts fondamentaux relatifs au trafic intracellulaire.

II.1.1.1. Protéines de la voie de sécrétion

Les protéines destinées à une sécrétion sont synthétisées par des ribosomes liés au RER. Dès que la protéine est synthétisée, elle est déplacée ou transloquée à travers la membrane du RER vers la lumière du RER où elle s'enroule dans sa conformation finale. Le RE bourgeonne alors en vésicules qui transportent la protéine vers l'appareil de Golgi. Ainsi les vésicules du RER fusionnent avec le compartiment *cis* du Golgi en libérant la protéine dans l'appareil du Golgi. La protéine se déplace ensuite à travers le complexe du Golgi vers le compartiment *trans* en étant modifiée en cours de route par addition de résidu glucidique (glycosylation). Finalement des vésicules bourgeonnent du compartiment *trans* et transportent les protéines sécrétées glycosylées vers la membrane plasmique où les vésicules fusionnent et libèrent leur contenu à l'extérieur de la cellule (exocytose) (Figure 6).

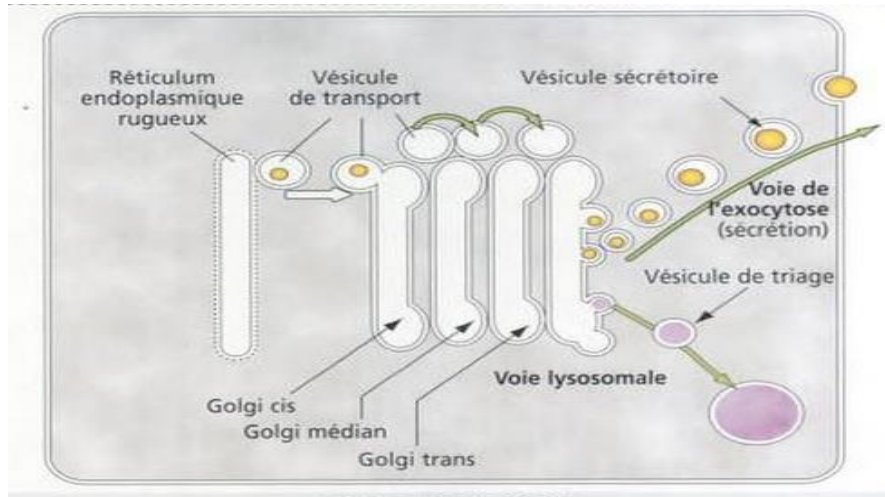


Figure 6: Voie sécrétoire et voie lysosomale.

La compartimentation précise de l'appareil sécrétoire permet une maturation progressive des protéines nouvellement synthétisées au fur et à mesure qu'elles traversent le réticulum endoplasmique, puis les divers compartiments (*cis*, *median* et *trans*) de l'appareil de Golgi. Cette maturation progressive s'accompagne d'un « contrôle de qualité » permanent qui permet la rétention sélective, dans l'appareil de sécrétion, des protéines dont la conformation ou la maturation est incorrecte ou inachevée. L'existence d'une voie de transport à contre-courant, dite voie de transport rétrograde, assurant le transport depuis l'appareil de Golgi jusqu'au RE, a également été mise en évidence (Figure 7).

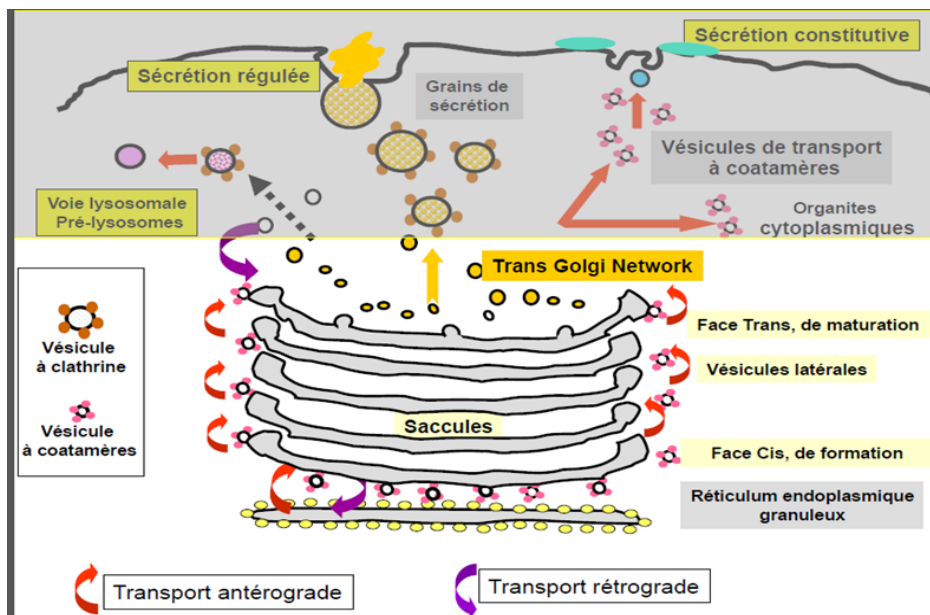


Figure 7: Transport antérograde et rétrograde des protéines.

- **Modifications co- et post-traductionnelles des protéines**

Dans la lumière du réticulum endoplasmique, les protéines des voies de biosynthèse/sécrétion vont subir les premières étapes du repliement et certaines modifications telles que la glycosylation (glycosidases) et la formation de ponts disulfures (protéine disulfide isomérase) (modification co-traductionnelle). Les protéines naissantes seront aidées dans ces différentes étapes de maturation par des protéines résidant dans le RE telles que les protéines chaperonnes qui assurent le bon déroulement du repliement et évitent les interactions intermoléculaires indésirables. Les protéines, qui peuvent s'assembler en oligomères ou rester monomérique, subissent un contrôle qualité avant d'être regroupées dans des régions spécialisées du RE, aussi appelées sites de sortie (ERES pour Endoplasmic Reticulum Exit Sites). En cas de défaut, les protéines sont orientées vers la voie de dégradation cytosolique par le protéasome. Les protéines présentes dans les ERES sont ensuite acheminées vers le compartiment intermédiaire (CGN pour *cis-Golgi network*), compartiment de triage entre les protéines qui retournent vers le RE et celles qui continuent leur route vers le Golgi. Traversant les différentes citernes du Golgi (dans l'ordre du transport antérograde, cis-, médian et trans-Golgi), les ramifications oligosaccharidiques des protéines vont être modifiées de façon séquentielle par les glycosidases ou glycosyl-transférases rencontrées. Certaines protéines retourneront vers le RE par transport rétrograde à partir des saccules du Golgi mais la plupart atteindront à ce stade le réseau trans-Golgien (TGN pour Trans-Golgi Network). De nouvelles modifications post-traductionnelles peuvent encore intervenir, telles que la sialylation ou la sulfatation des sucres ou encore le clivage protéolytique par des protéases comme la furine. Le TGN permet le triage des protéines à un stade tardif du transport et est impliqué dans la spécification de l'adressage des protéines vers la voie lysosomale ou vers des domaines spécialisés de la membrane plasmique. En fonction des voies empruntées à partir du TGN, les protéines seront sécrétées de façon constitutive ou régulée, et pourront être envoyées vers les régions apicales ou basales distinctement dans le cas des cellules polarisées. Ce compartiment est aussi particulièrement important car il fait le lien entre les voies d'exocytose et d'endocytose (Figure 8).

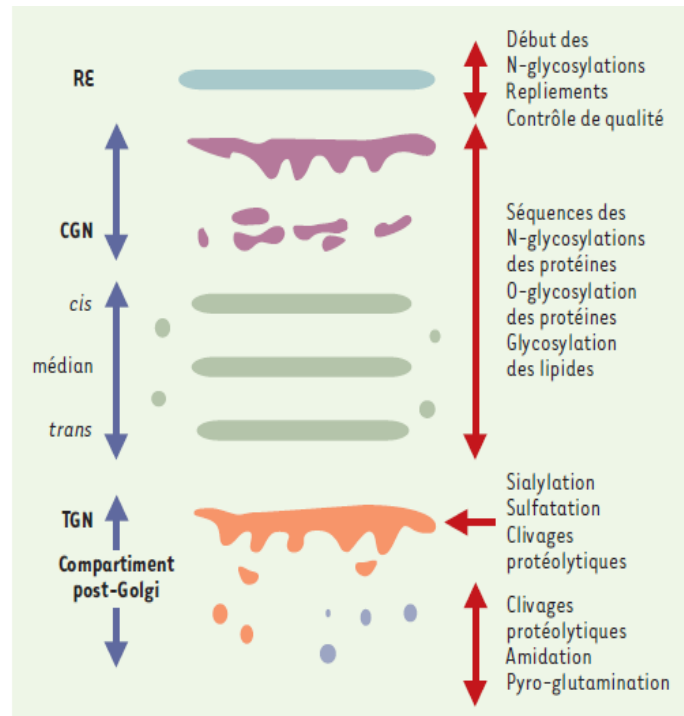


Figure 8: Principales modifications biochimiques des protéines au cours de leur transport antérograde dans les compartiments successifs. *RE* : *réticulum endoplasmique* ; *CGN* : *cis-Golgi network* ou *compartiment intermédiaire* ; *TGN* : *trans-Golgi network*.

- **Importation co-translationnelle dans le RE (Hypothèse du signal)**

Une protéine sécrétrice caractéristique diffère d'une protéine cytosolique par une séquence de 13 à 35 acides aminés à son extrémité N-terminale appelée séquence signale ou peptide signal. Les peptides signaux de différentes protéines sécrétrices diffèrent par leurs séquences d'acide amine mais ils ont quelques aspects communs comme par exemple, le centre de la séquence qui comprend 10 à 15 acides aminés hydrophiles. Le peptide signal dirige la protéine sécrétrice vers la membrane du RE et oriente ainsi la protéine pour traverser la lumière du RE et être exportée.

- **Mécanisme de la translocation co-translationnelle**

Les protéines sécrétrices sont transloquées dans le RER selon les étapes suivantes (Figure 9) :

- ✓ Dans le cytoplasme, l'ARNm destiné à la protéine sécrétrice se lie à un ribosome cytoplasmique libre et une synthèse protéique démarre.

La première partie de la protéine fabriquée est le peptide signal N-terminal.

- ✓ Une particule de reconnaissance du signal (SRP), se lie au peptide signal et arrête une synthèse protéique ultérieure (stoppe une libération prématurée de la protéine dans le cytosol).
- ✓ Le complexe SRP-ARNm-ribosome se lie à un récepteur SRP = SR (une protéine de surface du RE)
- ✓ La membrane du RE contient aussi une protéine récepteur du ribosome associée à un déplaceur de protéine ; le ribosome est fortement maintenu par la protéine récepteur du ribosome. Le SRP lié au SR et se trouve libéré du peptide signal (SS), permettant ensuite la poursuite d'une traduction.
- ✓ Le polypeptide naissant va traverser un pore de la membrane créé par un déplaceur d'une protéine.
- ✓ Dès qu'il traverse le pore le peptide signal est retiré par une peptidase signale située sur la face lumen du RER puis dégradé pour libérer le reste de la protéine dans la lumière.
- ✓ La SRP libérée est recyclée par l'intermédiaire de son récepteur prêt à une liaison à un autre peptide signal.

Les séquences signales sont constituées de 3 domaines :

- a- Domaine N-terminal: Le domaine Nt est très polaire et porte en générale plusieurs charges positives ;
- b- Domaine centrale : Le domaine centrale est constitué d'une succession de résidus hydrophobes ;
- c- Domaine C-terminal : Le domaine Ct est plus polaire que le précédent, et comprend le site de clivage de la séquence signale (SS) par la peptidase signale.

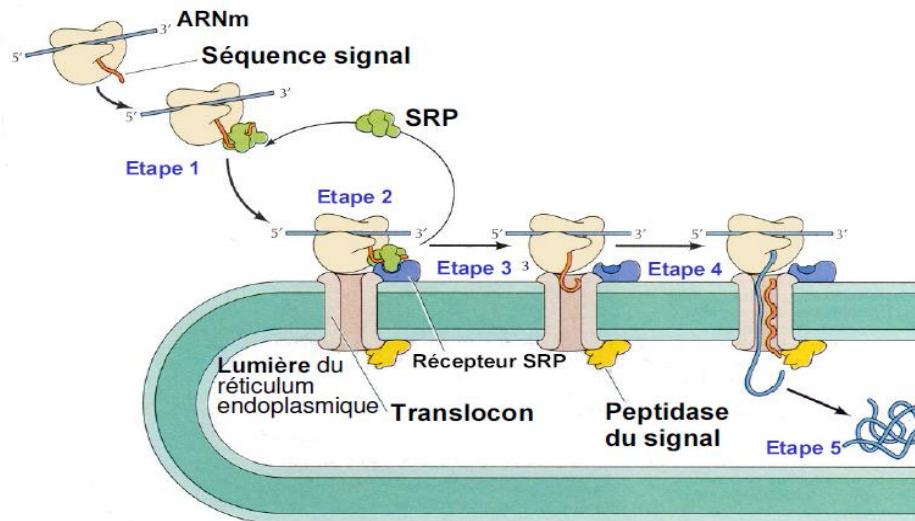


Figure 9: Adressage des protéines sécrétées au réticulum endoplasmique rugueux.

II.1.1.2. Protéines membranaires

Des protéines intégrantes de la membranaire (Mb) plasmique sont aussi synthétisées par des ribosomes du RER mais sont insérées dans la Mb du RER (elles ne sont pas libérées à l'intérieur du RER). Au cours du transport vers le Golgi puis vers la surface cellulaire, ces protéines restent ancrées à la Mb. La partie de la protéine fait face à la lumière du RER, après le transport cette partie fait face à l'extérieur de la cellule. C'est cette partie de la protéine qui reçoit le glucide (glycosylation) dans le RER et le complexe de Golgi, exposant ainsi un glucide sur la surface cellulaire.

Plusieurs classes de protéines intrinsèques des membranes sont synthétisées dans le RE. La topologie d'une protéine membranaire désigne le nombre de fois que celle-ci traverse la membrane ainsi que l'orientation de ses segments transmembranaires définissant ainsi de quel côté se trouve l'extrémité N et C terminale. Le fragment transmembranaire est constitué de 20-25 acides aminés hydrophobes formant une hélice α . On définit quatre classes topologiques (Figure 10). Les classes I-III comprennent qu'un segment transmembranaire et se différencient par la présence ou non d'un peptide signal et l'orientation C et N terminale de part et d'autre de la membrane. La classe IV possède plusieurs segments transmembranaires, c'est le cas de nombreuses protéines de transport.

Enfin il existe des protéines membranaires qui ne possèdent pas de fragment transmembranaire mais qui sont liées à une ancre phospholipidique amphipathique enfouie dans la membrane. Ces différentes topologies des protéines membranaires sont déterminées par des mécanismes d'insertion dans la membrane et par la reconnaissance de séquences particulières qu'on appelle les séquences topogènes.

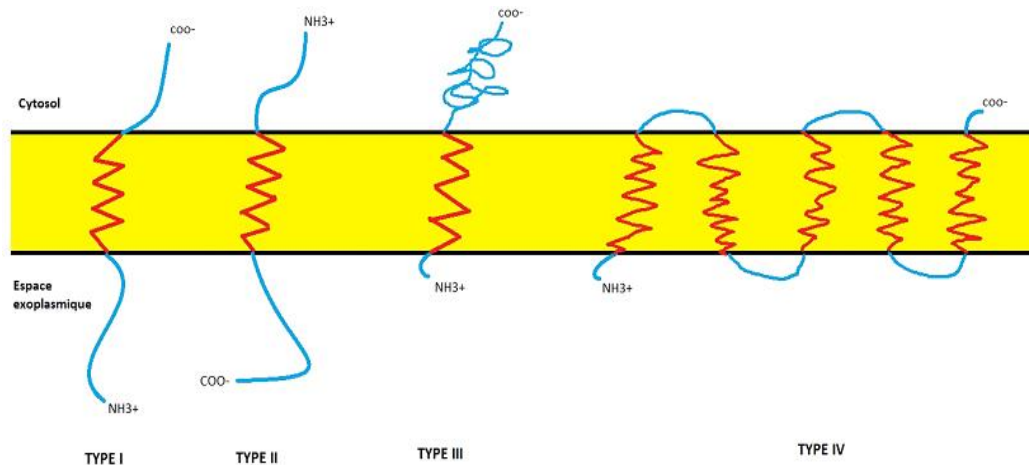


Figure 10: Classes topologiques des protéines membranaires.

a. Protéine transmembranaire de type I

De nombreuses protéines à un segment transmembranaire possédant une séquence signal clivable à l'extrémité N-terminale extra-cytoplasmique, sont synthétisées sous forme de précurseur avec une séquence signal classique clivée en cours d'insertion dans la membrane. Elles ont toutes la même orientation ; extrémité N-terminal extracellulaire, extrémité C-terminal cytoplasmique.

Les étapes de l'insertion sont les suivants (Figure 11):

- ✓ L'insertion et le début de la translocation s'effectuent de manière identique à ceux des protéines entièrement transloquées : reconnaissance par la SRP du la SS dès que celle-ci apparaît hors du ribosome, insertion de la chaîne polypeptidique dans le translocateur (déplaceur) sous forme de boucle et reprise de la synthèse et de la translocation co-translationnelle, le ribosome étant attaché au translocateur.
- ✓ La SS est clivée et la synthèse se poursuit jusqu'au moment où la séquence hydrophobe constituant le segment transmembranaire apparaît dans le

translocateur. A ce stade, l'affinité du segment hydrophobe pour le milieu lipidique lui fait quitter le translocateur. Le contact entre ribosome et translocateur est perdu. La translocation n'a plus lieu et la synthèse se poursuit normalement jusqu'à son terme dans le cytosol. Toute la partie de protéine localisée entre le segment hydrophobe et la partie C-terminal est restée dans le cytoplasme. Le segment transmembranaire est dénommé « séquence stop-transfert ». dans ce mécanisme d'insertion, la chaîne polypeptidique quitte latéralement le translocateur, par diffusion, lorsque la séquence stop-transfert hydrophobe s'y trouve.

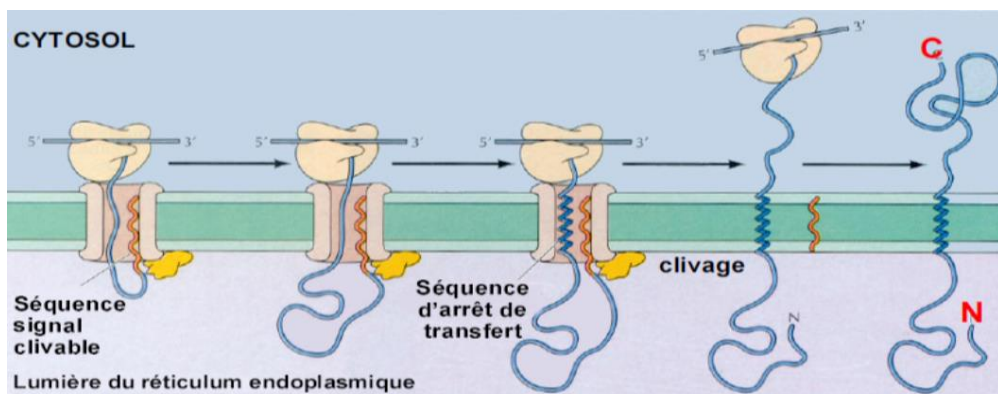


Figure 11 : Adressage et insertion d'une protéine transmembranaire de type I (protéine transmembranaire pourvue d'une séquence signal clivable et d'une séquence d'arrêt de transfert).

b. Protéines transmembranaires de type II et III

Commençons par les protéines de type III. Le mécanisme d'insertion est identique à celui de type I, la seule différence est qu'il n'y a pas de signal d'adressage. Un peptide signal n'est pas obligatoire pour adresser une protéine au RE. Les protéines de type II possèdent comme celle de type III une séquence ancrage mais qui ne stoppe pas le transfert. Dans les protéines de type II cette séquence se replie, faisant ressortir la partie N-terminale côté cytosol alors que le transfert de la partie C-terminale se poursuit. L'orientation de la séquence topogène intramembranaire semble dépendre d'acides aminés chargés positivement qui permettent son repliement dans le translocon, ces acides aminés chargés restant toujours du côté cytosolique. Les protéines de type II ont donc cette séquence

chargée positivement du côté N-terminal alors que celle de type III l'ont du côté C-terminal (Figure 12).

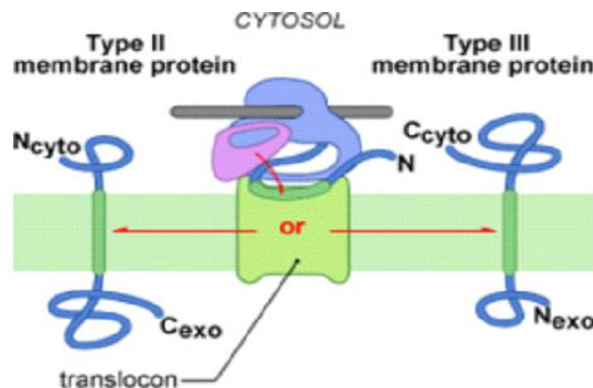


Figure 12 : Insertion des protéines transmembranaires de type II et de type III.

c. Protéines membranaires de type IV

Le fonctionnement de l'insertion d'une protéine de type IV (protéine avec plusieurs passages transmembranaires) correspond à une combinaison du mécanisme décrit dans le type II et III. Il existe plusieurs séquences topogènes alternées (séquence ancrage / stop-transfert ancrage). L'extrémité N-terminale peut être cytosolique ou lumenale cela dépend de la séquence topogène la plus proche de l'extrémité N-terminale et de la charge des séquences voisines. Si une protéine type IV a un nombre pair d'hélices α transmembranaires les deux extrémités sont orientées du même côté, si nombre impair extrémités de part et d'autre de la membrane.

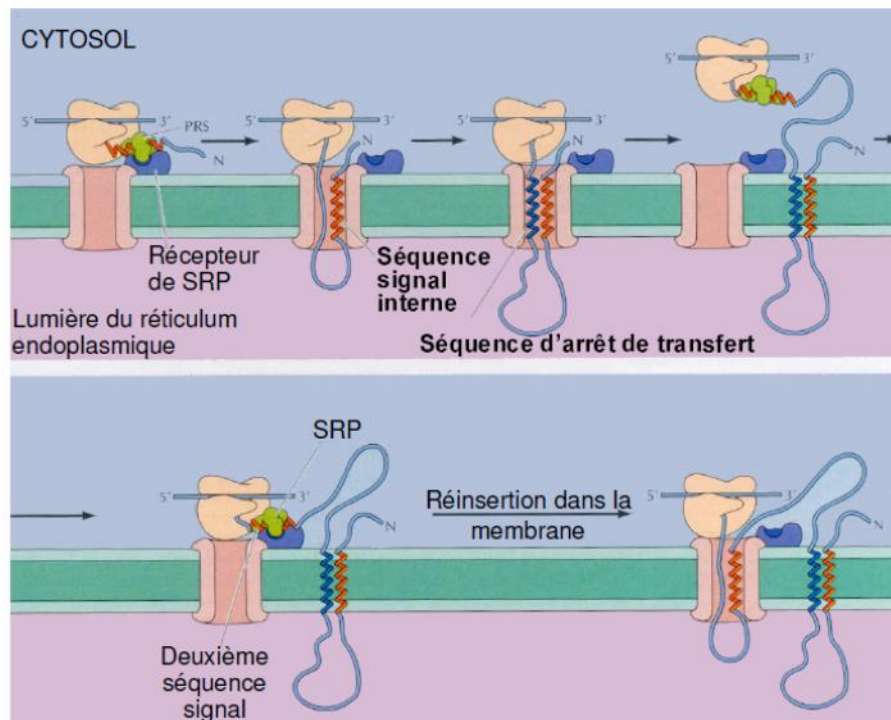


Figure 13 : Adressage et insertion d'une protéine de type IV (protéine avec plusieurs passages transmembranaires (x séquences signal internes et d'arrêt de transfert, ou $x \geq 2$)).

d. Protéines ancrées par une molécule amphipathique

Une molécule amphipathique possède à la fois une partie lipophile (apolaire) et une autre hydrophile (polaire). Ces protéines sont ancrées à la membrane par une séquence topogène terminale. Une transamidase coupe une partie de la protéine et la transfère sur l'ancre membranaire ; Cette ancre peut être coté lumenale ou cytosolique. Dans ce cas la séquence topogène se trouvera du côté N-terminal. Cet attachement des protéines sur un autre site d'ancrage est justifié par une plus grande mobilité de ces ancres dans la membrane plasmique.

II.1.1.3. Protéines du réticulum endoplasmique

Ces protéines sont synthétisées dans le RER passant dans la lumière du RER, et sont alors transportées vers le Golgi dans des vésicules. Ces protéines contiennent un signal de rétention sur C-Terminal. En atteignant le Golgi, des récepteurs se lient à cette séquence et la protéine retourne au RE par des vésicules.

a. **Protéines solubles** : Ce sont les protéines résidentes dans le RE, elles participent à la maturation des protéines qui ne font qu'y passer ; formation des ponts disulfures, premières étapes de la glycosylation, clivage protéolytique spécifique, repliement correct, oligomération. Certaines d'elles appelées chaperonnes.

Ces protéines résidentes RE sont synthétisées dans le RER, passant dans la lumière comme le font les protéines sécrétrices et sont alors transportées vers le Golgi dans des vésicules. Toutefois, ces protéines contiennent un segment de rétention KDEL (Lys, Asp, Glu, Leu) sur les C-terminaux. En atteignant le Golgi, des récepteurs se lient à la séquence KDEL et la protéine retourne au RE par l'intermédiaire de vésicules. Des récepteurs membranaires qui font la navette entre le Golgi et le RE reconnaissent le térapeptide KDEL et empêchent les protéines possédant cette séquence de rétention d'aller plus loin dans la voie de sécrétion.

b. **Protéines incorrectement repliées** : Il existe un contrôle qualité au sein du RE. Les protéines normalement sécrétées et les protéines membranaires, n'atteignant leur destination finale que si leurs structures tertiaire et quaternaire sont correctes. Des mutations qui affectent le repliement de protéines affectent également leur trafic intracellulaire. La protéine mal structurée reste associée à des protéines chaperonnes (exemple BIP). Elle est dégradée par la suite par des protéases du RE (Figure 14).

Grâce aux molécules chaperonnes le RE reconnaît les protéines mal pliées et leur permet de se replier correctement. Les chaperonnes moléculaires se lient aux protéines natives et les protègent d'un mauvais pliage ou bien d'agrégation et réarrangent des ponts disulfure des protéines natives. De plus, les chaperonnes aident à l'assemblage de protéines multimériques nouvellement transférées. Ensemble, toutes ces protéines forment un système de contrôle de qualité qui assure le pliage approprié et l'assemblage de protéines dans le RE. Tant qu'une protéine est associée aux chaperonnes, elle ne peut pas sortir du RE et se déplacer vers le Golgi. Des interactions hydrophobes contrôlent le pliage des protéines. Les domaines hydrophobes d'une protéine ont tendance à s'associer entre eux plutôt qu'être exposés à leur environnement aqueux. BiP est le chaperon le mieux caractérisé (membre de famille des HSP70 (Heat Shock Protein)) et la protéine la plus

abondante du RE. La présence d'un domaine d'hydrophobe exposé sur une protéine est le témoin que la protéine n'a pas encore fini de se plier. BiP se lie aux protéines natives grâce à ces domaines. Par cycles successifs de liaison et de détachement, BiP protège la protéine native de l'agrégation et lui donne des occasions multiples de réaliser sa conformation appropriée. Lorsque la protéine s'est pliée dans une structure compacte avec ses domaines hydrophobes enterrés, BiP se dissocie de la protéine.

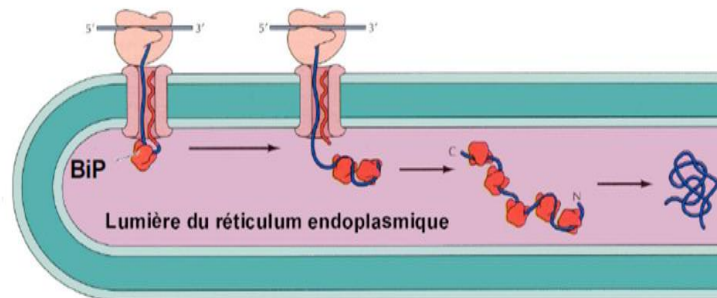


Figure 14 : Rôle de la protéine chaperon BiP soluble pour l'acquisition de la configuration tridimensionnelle normale.

c. Protéines membranaires : De nombreuses protéines membranaires qui résident dans le RE sont de type I, un segment transmembranaire, une extrémité N-terminal catalytique dans le lumen, une C-terminal dans le cytosol.

L'élément responsable de la rétention de ces protéines dans le RE est localisé dans l'extrémité C-terminal. L'étude comparative de ces séquences C-terminal des protéines membranaires du RE montre la présence d'une lysine en position 3, est un point commun à toutes les séquences C-terminal de ces protéines. Sa modification en tout autre acide amine par mutagenèse dirigée conduit à une protéine qui se trouve localisée dans la membrane plasmique.

La présence d'une seconde lysine en position : soit -2, soit -4, soit -5 est nécessaire pour maintenir la protéine associée à la membrane du RE. Ces deux lysines constituent donc de motif de rétention dans la membrane du RE. Le mécanisme pourrait être semblable à celui qui a été décrit par les protéines solubles ; présence

d'un récepteur reconnaissant le motif de lysine, faisant la navette entre le RE et le Golgi, ramenant dans le RE les protéines qui s'en seraient échappées.

Remarque : dans le cas des protéines du RE du type II (N-terminal cytoplasmique, C-terminal luminal) le motif de rétention semble être une diargénine localisée à l'extrémité N-terminal, en position 2/3 ou 2/4 ou 3/5.

c.1. Mécanismes d'insertion des protéines dans la membrane du RE

Le processus de translocation des protéines membranaires intrinsèques est plus complexe que celui des protéines solubles car :

- certaines parties de la protéine ne sont pas transloquées ;
- certaines protéines transmembranaires traversent plusieurs fois la double couche lipidique ;
- l'extrémité N-terminal de la protéine peut être située du côté cytosolique ou dans la lumière du RE.

Nous décrivons 3 mécanismes d'insertion de protéines à traversée unique dans la membrane du RE.

- Dans le premier mécanisme, la translocation est initiée par un peptide signal N-terminal qui s'ancre dans le translocon. Un second peptide hydrophobe, appelé peptide de terminaison de transfert, situé dans la protéine, interrompt la translocation avant qu'elle ne soit terminée. Après clivage du peptide signal N-terminal, ce peptide de terminaison de transfert sert de point d'ancrage de la protéine dans le translocon puis dans la membrane du RE. La protéine transmembranaire est à traversée unique et son extrémité N-terminale est située du côté luminal du RE (Figure 15).

- Dans les deux autres mécanismes, le peptide signal est plus interne dans la protéine. Ce signal est également reconnu par la SRP et s'insère dans le translocon. Il n'est pas clivé et sert donc d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE. Selon l'orientation du peptide signal dans le translocon, la protéine aura son extrémité N-terminale dans la lumière du RE ou dans le cytosol (Figure 16).

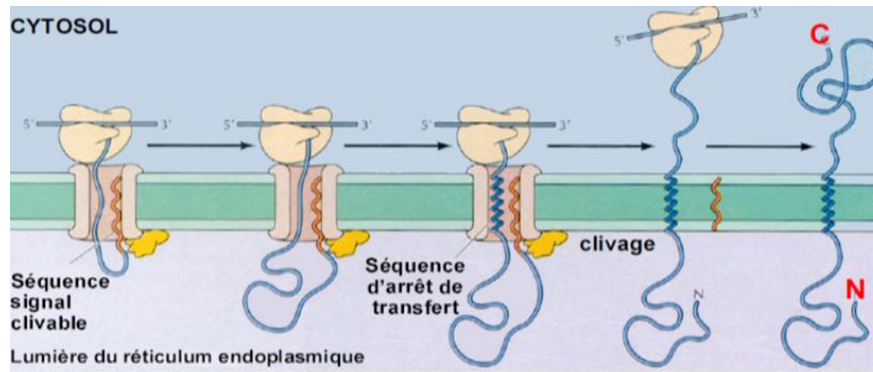


Figure 15: Adressage et insertion d'une protéine, transmembranaire du RE, pourvue d'une séquence signal clivable et d'une séquence d'arrêt de transfert.

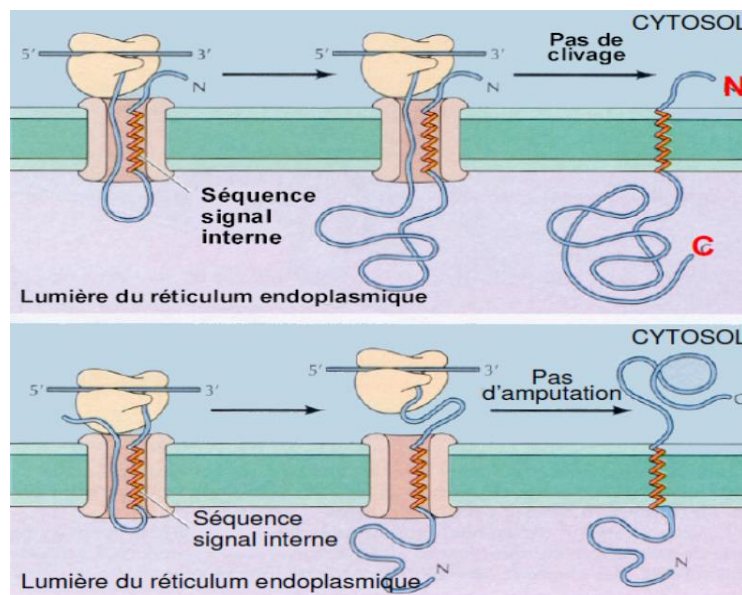


Figure 16 : Adressage et insertion d'une protéine transmembranaire du RE pourvue d'une séquence signal permanente (non clivable) et d'une séquence d'arrêt de transfert.

II.1.1.4. Protéines de l'appareil de Golgi

La totalité des protéines résidantes dans le Golgi sont des protéines membranaires. La plupart du type II possédant un segment transmembranaire (séquence signal) non clivable, un domaine C-terminal catalytique luminal, et N-terminal cytoplasmique.

Les caractéristiques du segment transmembranaire confèrent la rétention dans le Golgi. La longueur de ce segment est facteur important dans la rétention.

Celui-ci est plus court qu'un segment transmembranaire classique (17 résidu au lieu de 23 en moyenne). Un allongement artificiel du segment conduit à une protéine qui apparaît dans la membrane plasmique.

II.1.1.5. Protéines lysosomales

Le lysosome est un sac membranaire contenant une collection d'hydrolases. Les lysosomes récupèrent leurs protéines spécifiques à la sortie des compartiments *Trans* Golgiens. Les protéines du lysosome sont synthétisées dans le RER et transportées au compartiment *cis* du complexe de Golgi où elles sont glycosylatées avec un groupement mannose 6-phosphate, qui le signal d'orientation de la protéine lysosomale. Il est reconnu par un récepteur du mannose 6-phosphate localisé dans la membrane du *Trans* Golgi. Après la fixation du mannose 6-phosphate au récepteur, la protéine lysosomale emballée dans des vésicules de transport bourgeonnent de l'appareil de Golgi. Ces vésicules fusionnent avec des vésicules de sécrétion dont les contenus sont acides. Le faible pH provoque une dissociation de la protéine lysosomale de son récepteur et une phosphatase déplace le phosphate du mannose pour l'empêcher de se lier à nouveau au récepteur.

Des vésicules bourgeonnent de la vésicule de sécrétion pour retourner le récepteur au Golgi (recyclage du récepteur) et la protéine lysosomale est ensuite libérée par une fusion avec le lysosome.

Certaines protéines lysosomales achèvent ce processus en étant exportées par la cellule et doivent être récupérées. Cette voie fonctionne comme suit : la protéine plus le mannose 6-phosphate se lie au récepteur mannose 6-phosphate dans la membrane plasmique, elle est intériorisée par endocytose. Les vésicules d'endocytose suivent le même chemin.

II.1.1.6. Protéines mitochondriales

Plus de 90% des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme sur des ribosomes libres. Ce n'est qu'une fois entièrement synthétisé dans le cytoplasme qu'elles sont importées dans

la mitochondrie. L'adressage puis l'importation s'effectuent de manière post-traductionnelle.

L'adressage des protéines vers les différents compartiments de la mitochondrie, fait intervenir deux types de séquence signale, la première consiste à acheminer la protéine vers la mitochondrie, alors que la seconde à acheminer la protéine vers son compartiment final, c'est-à-dire soit la membrane externe, la membrane interne, l'espace inter membranaire ou la matrice.

Le premier peptide signal qui assure l'orientation des protéines à la matrice ou de certaines protéines ancrées dans la membrane interne est constitué d'acides aminés chargés positivement (Lys, Arg) alternant avec des acides aminés hydrophobes, et situé à l'extrémité N-terminal.

a. Protéines mitochondriales matricielles : Les protéines sont orientées par une séquence N-terminal de 15 à 35 acides aminés, appelée préséquence. Après la synthèse, la protéine libérée dans le cytosol reste dépliée (linéaire) sous l'action des protéines chaperonnes (hsp 70) qui se lient à la protéine durant sa synthèse. Ce processus est nécessaire puisque des protéines enroulées ne peuvent être importées aux mitochondries. La hsp 70 transfère la protéine déroulée à un récepteur import dans la membrane externe de la mitochondrie, qui se déplace le long de la membrane jusqu'à un site où la membrane externe et la membrane interne viennent en contact.

À ce stade la protéine entre dans la matrice à l'aide d'un déplaceur de protéine, Tom 40 (Tom pour Translocan outer membran), qui existe dans la membrane externe puis traverse la membrane interne via un complexe protéique formé de 3 protéines, la Tim 23, la Tim 17 et la Tim 44 (Tim pour Translocan inner membran). Dès que la protéine est dans la matrice mitochondriale, la hsp 70 est libérée, le peptide signal est retiré par une peptidase signal et la protéine se lie dans la matrice à une hsp 70 mitochondriale adjacente à la Tim44. La hsp 70 mitochondriale est remplacée par une hsp 60, dont le rôle est d'aider la protéine à s'enrouler dans son état final actif (Figures 17 et 18).

Le transfert de la protéine au travers de la membrane mitochondriale (TIM 23) fait intervenir le gradient électrochimique d'ions H^+ et les protéines hsp 70 mitochondriales. Ces protéines chaperonnes sont liées à TIM 23, se fixent sur la protéine dès son apparition dans la matrice grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

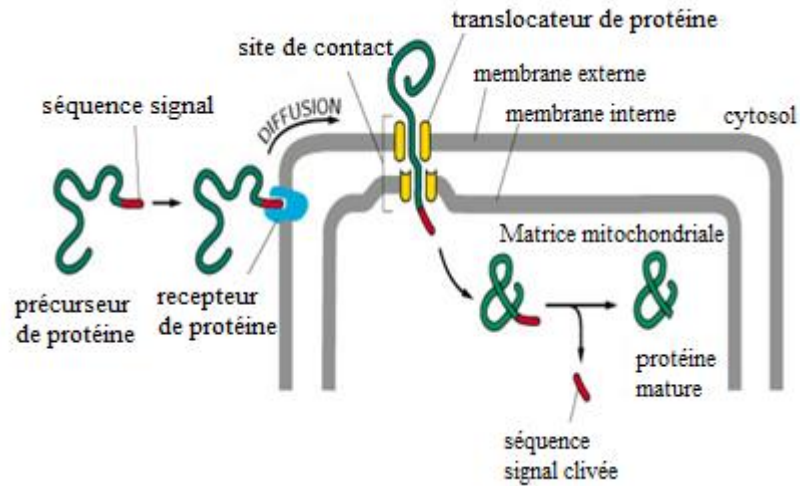


Figure 17: Orientation des protéines mitochondriales matricielles.

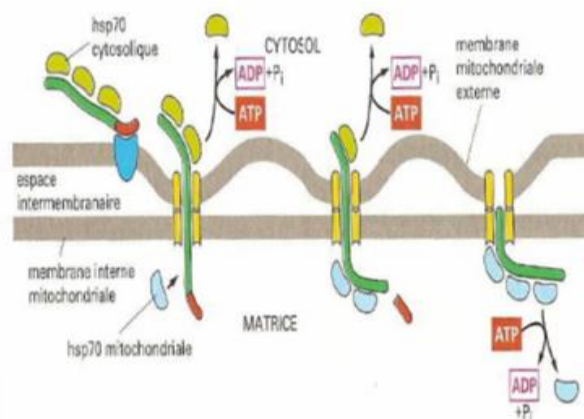


Figure 18: Intervention des protéines chaperonnes (hsp 70) dans le mécanisme d'orientation des protéines mitochondriales matricielles.

b. Protéines de la membrane mitochondriale interne: L'importation d'une protéine dans la membrane mitochondriale interne et dans l'espace intermembranaire nécessite deux signaux ; la protéine est d'abord importée dans la matrice selon le processus décrit au paravent, puis reconnue par une seconde

séquence signal qui renvoie la protéine dans la membrane interne ou la dirige dans l'espace intermembranaire (Figure 19 (A)).

Les protéines mitochondriales se fixent par leur peptide signal intégré à un récepteur spécifique situé sur la membrane externe intégré dans le complexe protéique TOM. L'insertion des protéines dans la membrane interne fait intervenir TIM 22 ou le complexe TIM 23. Les protéines qui utilisent TIM 23 pour leur insertion, ont après le peptide signal N-terminal d'importation vers la matrice, une séquence d'acides aminés hydrophobe qui interrompe leur transfert au travers de TIM 23. Le reste de la molécule passe dans l'espace intermembranaire et le peptide signal est clivé. La séquence hydrophobe sort alors de TIM 23 et ancre la protéine dans la membrane interne (Figure 19 (B)).

La protéine peut suivre une autre voie d'orientation pour être insérer dans la membrane interne ; en effet elle est d'abord importée dans la matrice comme une protéine matricielle (selon le processus décrit au paravent), puis reconnue par une seconde séquence signal secondaire qui renvoie et intègre la protéine dans la membrane interne en utilisant le translocon (Oxa1) (Figure 19(A)).

c. Protéines de l'espace membranaire: Deux voies conduisent les protéines

cytosoliques à l'espace membranaire des mitochondries :

- La première voie ressemble à la première voie d'adressage des protéines à la membrane interne. La différence est la présence d'une protéase qui sépare la partie hydrophobe (second signal) enchâssée dans la membrane de la partie C-terminale, libérant ainsi la protéine dans l'espace intermembranaire (Figure 19(C)).
- La seconde voie est un transfert direct des protéines à l'espace intermembranaire à travers Tom40.

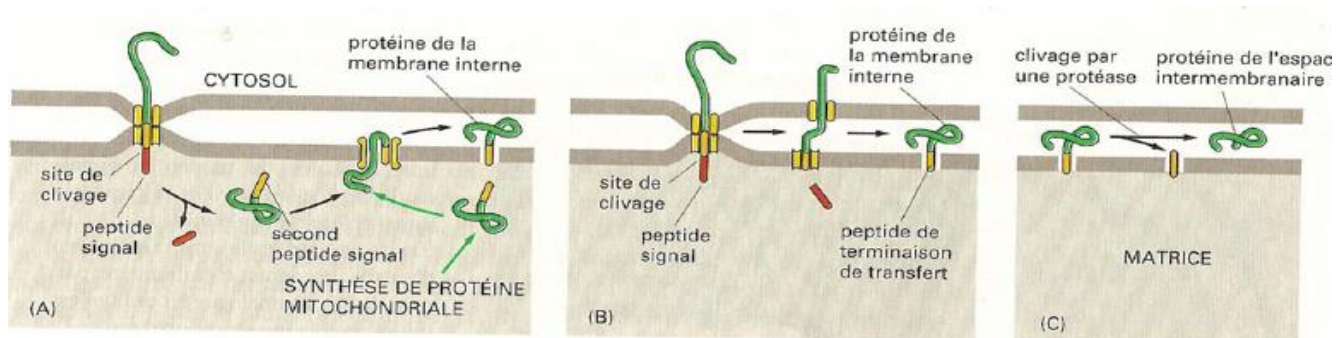


Figure 19: Importation de protéines depuis le cytosol vers l'espace inter-membranaire ou la membrane interne des mitochondries.

d. Protéines de la membrane externe: Les protéines mitochondriales se fixent par leur peptide signal intégré à un récepteur spécifique situé sur la membrane externe intégré dans le complexe protéique TOM. TOM participe à la translocation de toutes les protéines dans la mitochondrie et assure l'insertion de protéine transmembranaire de la membrane externe.

Les protéines de la membrane externe présentent une séquence hydrophobe suit la séquence d'adressage à la matrice. Lorsque la séquence hydrophobe entre dans la membrane externe, les protéines restent coincées dans le translocon puis migrent transversalement dans la membrane externe.

II.2. Voie d'endocytose

II.2.1. Introduction

Le processus inverse de l'exocytose est l'endocytose. Au cours de celui-ci, une région de la membrane s'invagine vers l'intérieure (s'enfonce) pour former une poche au tour du liquide extracellulaire, qui englobe une sélection de molécules ou particules entières. La poche devient de plus en plus profonde jusqu'à ce que la membrane dont elle est constituée se rompe et devienne une vésicule fermée, qui se trouve désormais à l'intérieure du cytoplasme et qui referme des constituants extracellulaires.

Toutes les cellules eucaryotes, sauf les hématies, capturent des molécules extracellulaires en les englobant dans des vacuoles ou des vésicules. Les cellules utilisent l'endocytose pour se nourrir, se défendre et préserver leur homéostasie. Le

foie (endocytose des HDL notamment) et le cerveau (transmission synaptique) sont les 2 organes pratiquant le plus l'endocytose.

On différencie trois modalités d'endocytose où les éléments transportés sont de nature et de taille différentes: pinocytose, endocytose médiée par récepteur et phagocytose (Figure 20).

La pinocytose est une forme non spécifique d'endocytose. Lors de la pinocytose la cellule absorbe du liquide extracellulaire. Le bourgeon formé par la vésicule contient n'importe quel soluté dissous dans le liquide, cependant la cellule n'absorbe pas de particules particulières.

L'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs est un processus spécifique et hautement sélectif. Grace à la présence de récepteurs spécifiques dans la membrane la cellule peut envelopper et importer un seul type de molécule. Cependant la phagocytose est une endocytose à grande échelle.

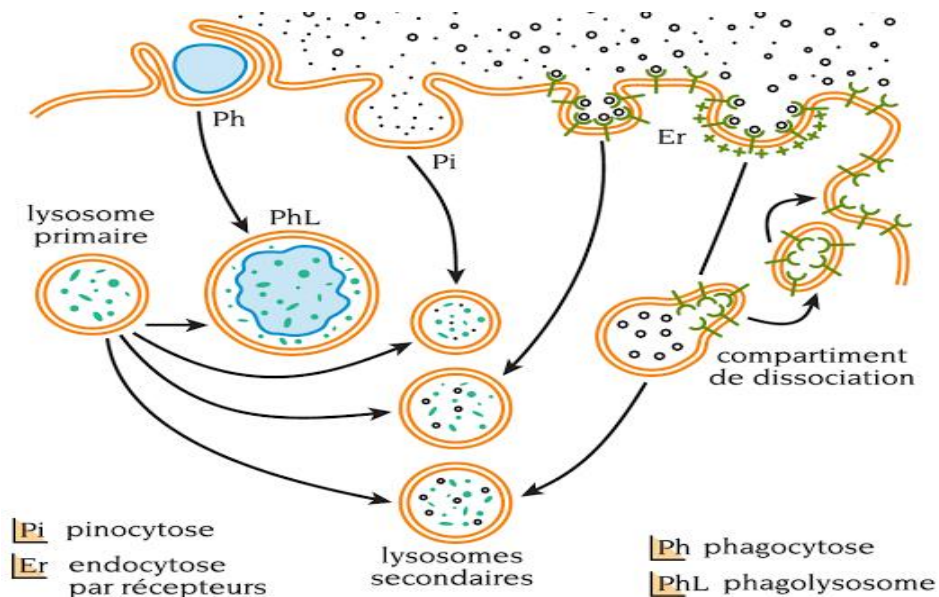


Figure 20: Les différentes modalités d'endocytose.

II.2.2. Différentes formes d'endocytoses

L'endocytose peut être réalisée selon trois voies, pinocytose, endocytose médiée par récepteur et phagocytose, dépendant de la nature du matériel et du type cellulaire.

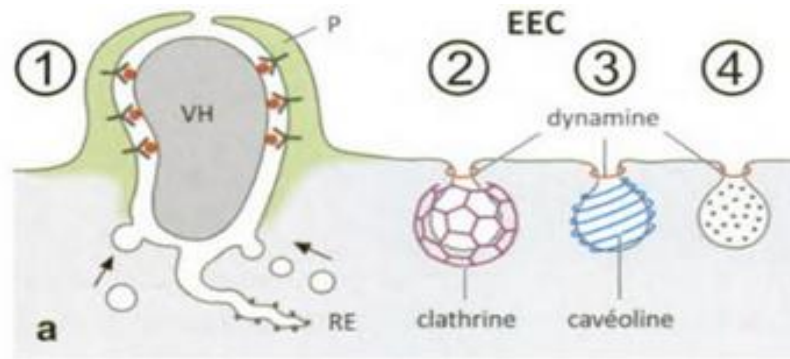


Figure 21: Diverses formes d'endocytose toutes au stade de séparation avec le plasmalemme. (1) phagocytose médiée par récepteur, (2) Endocytose à clathrine, (3) Cavéoline recouverte de cavéoline, (4) endocytose sans clathrine et sans cavéoline. EEC : espace extracellulaire ; fm : fossette mantelée ; P : pseudopodes ; VH : vacuole d'hétérophagie.

II.2.2.1. Phagocytose

La phagocytose est une ingestion par la cellule de particules de grande taille (bactéries ou virus) (diamètre supérieur à $0.5 \mu\text{m}$) par l'intermédiaire de grosses vésicules appelées phagosome (diamètre supérieur à 250nm). La phagocytose est réalisée par des cellules spécialisées (macrophages, polynucléaires) et constitue un système de défense contre les organismes étrangers. Les cellules apoptotiques sont aussi éliminées par phagocytose. La phagocytose des cellules apoptotiques peut être exécutée à la fois par des phagocytes professionnels (tels que les macrophages et cellules dendritiques) et non professionnels présents à proximité (comme les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes).

Le processus de phagocytose est caractérisé par les étapes suivantes (Figure 22) :

- 1) **Fixation de l'élément étranger par reconnaissance de récepteurs membranaires :** Les particules et les micro-organismes adhèrent à la membrane de la cellule, soit par des récepteurs non spécifiques, comme les récepteurs de type lectine qui reconnaissent les polysides bactériens, soit par des récepteurs pour les opsonines spécifiques que sont les IgG ou le C3b.

RMQ : les opsonines sont des molécules qui se lient d'un côté aux particules à phagocyter et de l'autre côté aux récepteurs des cellules phagocytaires, réalisant ainsi un pont entre les deux, et favorisent ainsi leur capture.

- 2) **Englobement de la particule par des prolongements cytoplasmiques :** L'attachement de la particule ingérée à la membrane plasmique entraîne localement des modifications morphologiques de la membrane plasmique aboutissant à la formation de pseudopodes. Ces derniers entourent totalement la particule pour former le phagosome.
- 3) **Formation d'un phagosome :** Cette étape correspond à la phase d'internalisation ou d'ingestion.
- 4) **Fusion avec des lysosomes et formation d'un phagolysosome :** Des lysosomes fusionnent avec le phagosome et libèrent les hydrolases qui digèrent le corps phagocyté. La fusion avec de phagosome avec le lysosome forme le phagolysosome.
- 5) **Recyclage de produits et formation de corps résiduels :** Certains des produits de la digestion, comme des acides aminés, des acides gras, des glucides, peuvent être réutilisés par la cellule. Ces substances traversent la membrane du phagosome et sont solubles dans le cytosol. Les substances non dégradées par les enzymes lysosomiales restent séquestrées dans le lysosome pour former un corps résiduel. Concernant les peptides issus de la digestion de pathogène, ils vont être recyclés pour les présenter comme antigène nécessaire à l'immunité adaptative.

RMQ : les vésicules Golgiennes riches en hydrolases qui fusionnent avec le phagosome sont des lysosomes primaires, cependant le phagosome enrichie en hydrolases avec du matériel en cours de digestion est un lysosome secondaire.

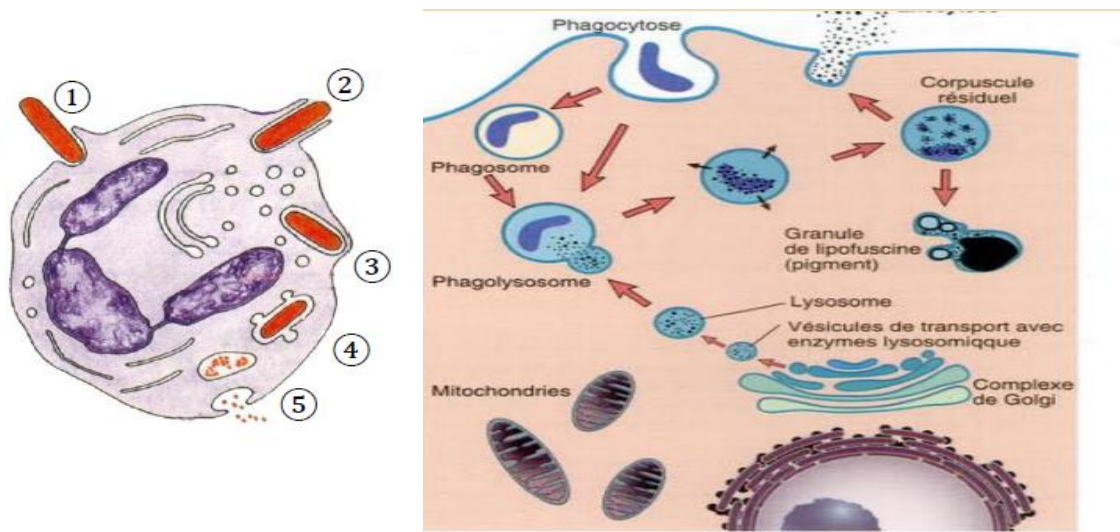


Figure 22: Différentes étapes de la phagocytose.

II.2.2.2. Pinocytose

La pinocytose est l'ingestion des fluides et des solutés à l'aide de vésicules de petite taille (diamètre inférieur à 150 nm). Ces vésicules sont appelées endosomes. C'est un processus non spécifique qui concerne la plupart des types cellulaires.

Lors de la pinocytose, la membrane plasmique s'invagine, formant une poche contenant un faible volume de fluide extra-cellulaire. Elle obture (ferme) ensuite l'ouverture de la poche séquestrant le contenu dans une petite vésicule d'endocytose intracellulaire. La dynamine, protéine responsable du pincement, se dispose en anneaux qui enveloppent et « tordent le cou » de la poche, coupant la vésicule de la membrane de surface (Figure 23).

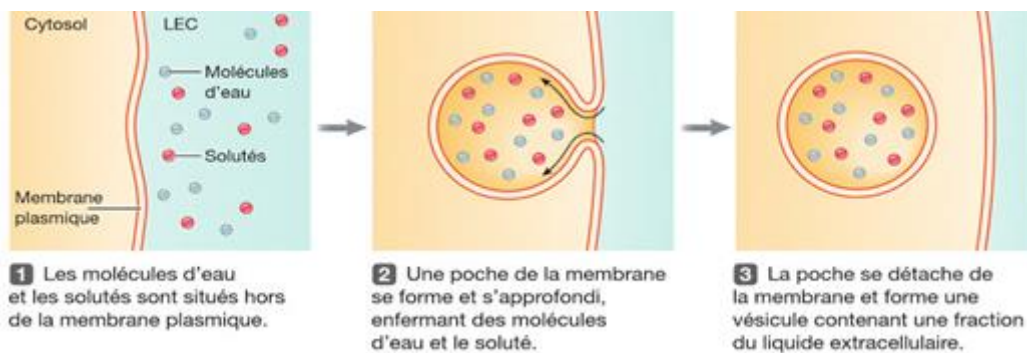


Figure 23: Différentes étapes de la pinocytose.

II.2.2.3. Endocytose dépendante de récepteurs

Contrairement à la pinocytose, qui prélève de façon non spécifique de fluide environnant, l'endocytose médiée par récepteur est un processus hautement sélectif qui permet aux cellules d'importer, à partir du milieu environnant, des molécules spécifiques de grande taille dont la cellule a besoin (Figure 24).

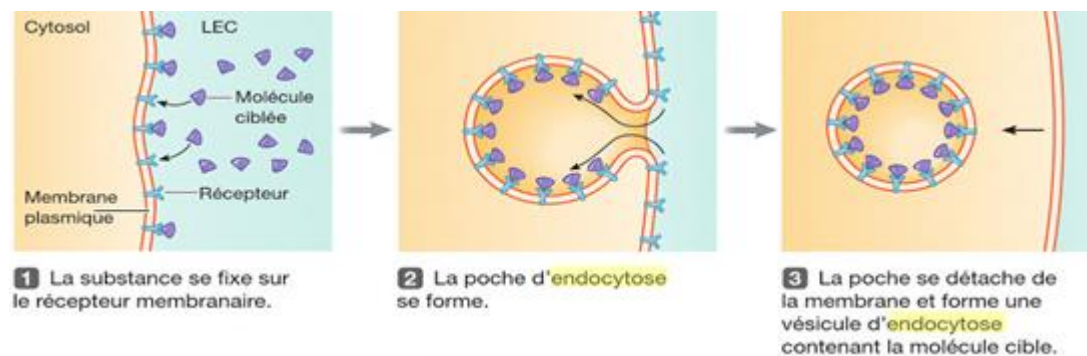


Figure 24: Différentes étapes de l'endocytose dépendante de récepteurs.

Selon le revêtement de la vésicule impliquée dans l'endocytose médiée par récepteur, on distingue deux types d'endocytoses: endocytose dépendante de clathrine et endocytose dépendante de cavéolines (potocytose ou voie indépendante des clathrine).

A. Endocytose dépendante de clathrine

L'endocytose dépendante de clathrine permet la formation de puits de diamètre compris entre 100 et 150nm, qui récupèrent des molécules spécifiques.

L'endocytose par vésicules recouvertes de clathrine est une voie majeure d'internalisation utilisée par toutes les cellules eucaryotes pour assurer l'entrée sélective de nombreux facteurs de croissance (hormones) et nutriments, elle est aussi utilisée pour éliminer du milieu extracellulaire des produits potentiellement toxiques.

Les étapes nécessaires pour l'endocytose dépendante de clathrine sont le tri et la concentration des récepteurs, la déformation de la membrane plasmique et le recrutement du manteau de clathrine pour former un puits recouvert de clathrine, et enfin la scission de la vésicule de la surface cellulaire. Les principales protéines impliquées lors de ces étapes sont l'adaptateur AP2, les triskèles de clathrine, la

mécano-enzyme dynamine et de nombreuses protéines dites accessoires ayant des fonctions diverses, comme l'aide au tri sélectif des récepteurs ou la déformation de la membrane plasmique.

L'endocytose dépendante de la clathrine commence par le recrutement et l'assemblage de complexes protéiques appelés adaptateurs AP2 sur la membrane plasmique. Cette activité dépend de GTPases. Les complexes AP2 recrutés se regroupent et déclenchent l'assemblage de la clathrine.

Les molécules de clathrine s'auto-assemblent pour former les puits recouverts sur la face cytosolique des membranes. Les molécules de clathrine sont liées à la membrane par l'intermédiaire des adaptateurs. Aussi le rôle de ces adaptateurs est de capturer des récepteurs transmembranaires dans les puits recouverts en reconnaissant des peptides signal spécifiques situés dans la partie cytosolique du récepteur. Les récepteurs impliqués dans l'endocytose ont tous au moins **un segment transmembranaire et un motif d'internalisation** situé sur leur domaine intracytoplasmique, contenant une séquence FRXY (phénylalanine, argénine, X quelconque, Y tyrosine), cette séquence forme une partie de signal d'endocytose. Ces récepteurs se concentrent dans les puits recouverts avant ou seulement après avoir fixé leur ligand spécifique. Ce processus permet ainsi de capter et de concentrer dans un petit volume des macromolécules présentes en très faibles concentrations dans la lumière des organites ou le milieu extracellulaire.

Cette endocytose se déroule selon les étapes suivantes (Figure 25);

- 1) Fixation du ligand sur son récepteur :** Des molécules présentes dans le milieu extracellulaire (hormone peptidique, LDL,...) se fixent à la surface de la membrane au niveau des récepteurs spécifiques.
- 2) Déplacement latéral des complexes ligand-récepteur et regroupement de ces complexes :** Les récepteurs occupés migrent alors dans le plan de la membrane jusqu'à des régions couvertes sur la face cytosolique de clathrine et de protéines d'adaptation (adaptines AP2). Le domaine cytosolique des récepteurs interagit avec ces adaptines.

- 3) Formation d'un puit recouvert de clathrine :** La membrane subit une dépression et forme de vésicules revêtues. Le revêtement est constitué de molécules de clathrine et d'adaptines. Ces molécules forment sous la membrane un réseau à maille hexagonale et pentagonale. La formation de l'enveloppe de clathrine provoque l'invagination de la membrane qui se pince pour former une vésicule recouverte de clathrine.
- 4) Détachement des vésicules :** Le détachement de la vésicule de la membrane plasmique nécessite l'intervention d'une protéine à activité GTPasique (G monomérique), la dynamine. Cette dernière forme un anneau hélicoïdal autour du collet du puit. Cet anneau va permettre la constriction du collet du puit et la libération de la vésicule dans le cytoplasme.
- RMQ :** Ces vésicules contiennent en grande concentration les récepteurs membranaires et leurs ligands (environ 1000 récepteurs/ligands par vésicules).
- 5) Désassemblage du manteau de clathrine de la vésicule nouvellement formée :** Au cours de leur transport cytosolique, les vésicules recouvertes de clathrines perdent leur revêtement de clathrine sous l'action de l'ATPase Hsc70, protéine chaperonne, recrutée par la protéine auxilin, Les composants de la machinerie du manteau de clathrine sont de nouveau disponibles pour un nouveau cycle. La nouvelle vésicule lisse formée fusionne avec l'endosome. Le milieu endosomal est acidifié en raison du transport actif des ions H^+ par l'ATPase H^+ , l'acidification provoque la dissociation du ligand de son récepteur.
- 6) Recyclage des récepteurs :** Les récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique à partir des endosomes (ils peuvent assurer plusieurs cycles d'endocytoses).

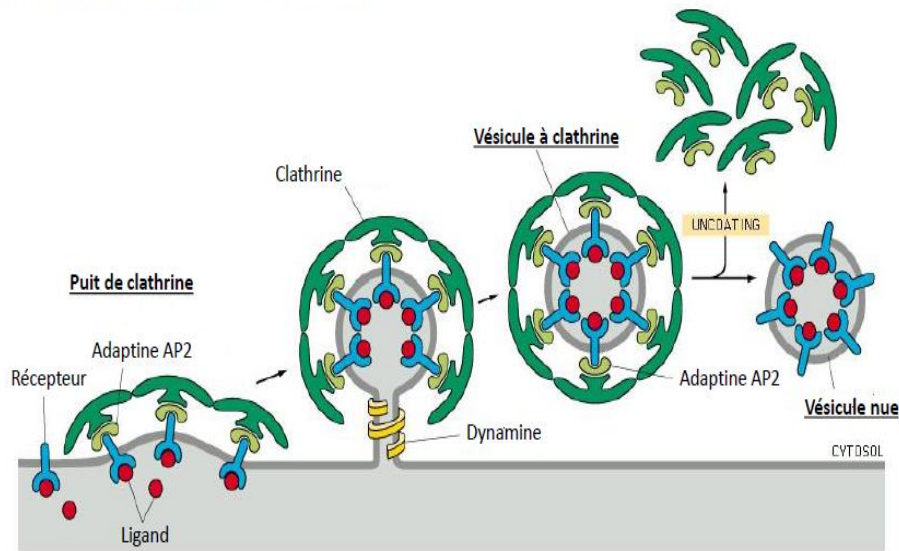


Figure 25: Endocytose dépendante de clathrine.

- **Reseau clathrine/adaptine**

La clathrine est utilisée dans de nombreux sites de formation de vésicule comme le réseau transGolgie et les endosomes. Elle est constituée de trois chaînes lourdes de 190 kD, chacune d'elle étant associée à une chaîne légère de 25 kD. L'hexamère ainsi constitué porte le nom de **triskèle**. Les **triskèles** de la clathrine se polymérisent en cages formées d'hexagones et de pentagones (de forme similaire à un ballon de football). L'assemblage spontané de la clathrine provoquerait l'inflexion de la membrane et la création d'une vésicule.

L'adaptine AP2 est une protéine adaptatrice, elle assure la connexion entre de nombreux récepteurs, les triskèles de clathrine et de nombreuses protéines accessoires.

Les adaptines sont des hétérotétramères, formées de quatre sous-unités :

- Un polypeptide, appelé adaptine α , de 100kD environ.
- Un polypeptide, appelé adaptine β , de 100kD environ.
- Une chaîne moyenne, appelée μ , de 50 kD.
- Une chaîne plus petite, appelée σ , de 20kD.

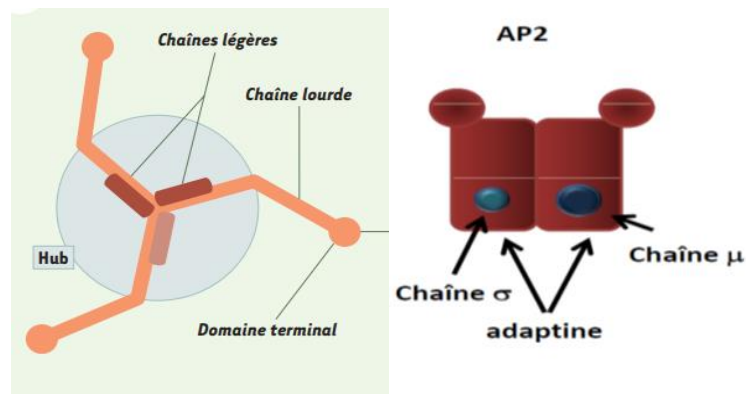


Figure 26: Clathrine et adaptine.

- **Spécificité des vésicules à clathrine**

Quatre complexes AP différents (AP1, AP2, AP3 et AP4) ont été identifiés dans les cellules de mammifères:

- Les complexes AP1 et AP3 assurent le trafic vésiculaire entre le transGolgi et les endosomes.
- Le complexe AP2 participe à la constitution des vésicules de clathrine à partir de la membrane plasmique

- **Ciblage des complexes AP :** Le ciblage des complexes AP est médié par l'une des sous unités d'adaptine.

- L' α -adaptine spécifique de AP2, cible ce complexe sur la membrane plasmique.
- La sous-unité spécifique de AP1, cible le complexe vers le transGolgi.
- Les sous unités des complexes AP interagissent directement avec les motifs de tri et concentrent les récepteurs dans des puits recouverts.

B. Endocytose dépendante de cavéoline (potocytose)

Les premières structures soupçonnées de participer aux phénomènes d'endocytose indépendants de la clathrine furent les cavéoles. Les cavéoles apparaissent en microscopie électronique comme des puits comparables à ceux du système d'endocytose dépendante de clathrine, mais s'en distinguent par une absence de couverture de clathrine et un diamètre plus réduit (60-80 nm). De plus, les cavéoles partagent avec les vésicules recouvertes de clathrine, le recrutement de la

dynamine impliquée dans le mécanisme de fission des vésicules lors de l'endocytose. Le constituant majeur des cavéoles est la protéine cavéoline-1 (CAV1).

Les cavéoles ont été mis en évidence au niveau de différents types cellulaires (cellules endothéliales, cellules des adipocytes ou des muscles). Les cavéoles ont été impliquées dans les fonctions d'endocytose, de transcytose et de transduction des signaux calciques et de nombreux autres événements de signalisation.

Les cavéoles sont constituées par l'auto assemblage d'une petite protéine de poids moléculaire de 22kD appelée **cavéoline**. Cette protéine se caractérise par une grande affinité pour le cholestérol.

Les cavéoles sont classiquement définies comme étant de petites invaginations de la membrane plasmique riches en cholestérol et en glycosphingolipides et constituent un ensemble particulier des **radeaux lipidiques** de la membrane plasmique. Les cavéoles bourgeonnent à partir de la membrane plasmique pour former des vésicules de transport. La vitesse et le pourcentage d'endocytose effectués par les cavéoles sont largement inférieurs à celui des vésicules bordés de clathrine.

L'endocytose dépendante de cavéoline fait intervenir des récepteurs spécifiques dépourvus de microdomaines cytosoliques. Ces récepteurs sont des glycoprotéines ancrées dans les feuilletts extracellulaires de la bicouche lipidique. Le domaine membranaire comporte aussi plusieurs édifices moléculaires impliqués dans la signalisation et la communication intracellulaire.

La potocytose se déroule selon les étapes suivantes (Figure 27):

- 1) la fixation d'un ligand sur son récepteur membranaire entraîne le bourgeonnement incomplet d'une cavéole. La cavéole ne se sépare pas immédiatement de la membrane plasmique, elle se referme ensuite sur elle-même ;

- 2) Une ATPase à H⁺ acidifie le contenu de la cavéole, provoquant la dissociation du complexe ligand/récepteur, une perméase contenue dans la cavéole s'ouvre et facilite le transport du ligand séparé de son récepteur vers le cytosol.
- 3) La cavéole peut avoir deux destinées, elle s'ouvre à nouveau vers l'extérieur en exposant les récepteurs vers l'extérieure en exposant les récepteurs libre. Elle peut aussi s'isoler de la membrane comme une vésicule d'endocytose classique avec l'intervention de la dynamine, elle est alors transportée dans le cytosol vers l'appareil de Golgi.

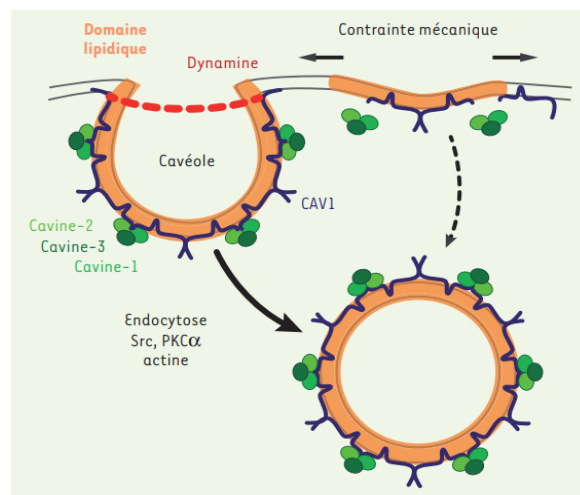


Figure 27: Endocytose dépendante de cavéoline. Les oligomères de cavéoline-1 (CAVI), en association avec des microdomaines lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides, forment les cavéoles, invaginations à la membrane plasmique. Les cavéolines-1, -2 et -3 interagiraient avec CAVI pour donner aux cavéoles leur forme et leur courbure, et permettre leur endocytose. Cette dernière peut être induite par certaines protéines « cargo » comme les particules virales et l'ajout de lipides ; elle dépend de l'action de la dynamine, des kinases Src et PKC α , ainsi que de l'actine.

II.2.3. Endosomes et voie d'endocytose

Les vésicules d'endocytose, issues des voies dépendantes ou indépendantes de la clathrine fusionnent avec les éléments du compartiment endosomal.

a. **Différentes classes d'endosomes :** Les endosomes constituent les principaux compartiments de tri de la voie d'endocytose. Ils se caractérisent par une structure pléiomorphe composée d'un ensemble de vésicules, vacuoles, tubules et corps multivésiculaires. En effet les endosomes sont classés en quatre classes :

- **Les endosomes précoces :** Les protéines nouvellement internalisées sont acheminées vers les endosomes précoces ou de tri, proche de la membrane plasmique et qui se présente comme un réseau de tubules et de vacuoles.
- **Les endosomes de recyclage :** Les récepteurs qui doivent retourner à la surface de la membrane cytoplasmique sont accumulés dans des endosomes de recyclage qui sont des structures tubulaires situées dans le Golgi périnucléaire.
- **Les corps multivésiculaires :** Les vésicules endosomales de transport (les vacuoles) se détachent de l'endosome précoce pour acquérir progressivement des vésicules membranaires internes. Ces éléments sont appelés corps multivésiculaires.
- **Les endosomes tardifs :** Ces corps multivésiculaires évoluent pour donner des endosomes tardifs.

b. Acidification des endosomes et tri des protéines

Une pompe à protons l'ATPase vacuolaire situé dans la membrane de l'endosome, acidifie la lumière de l'endosome. Le pH des endosomes passent progressivement de 6,5 dans les endosomes précoces à 5,0 dans les endosomes tardifs.

Les interactions de nombreux ligands avec leur récepteur sont sensibles au pH. Lorsque les complexes récepteur-ligand atteignent le seuil de pH de leur dissociation, le ligand est libéré dans la lumière de l'endosome alors que le récepteur reste lié à la membrane. Les ligands solubles s'accumulent dans la vacuole endosomale tandis que les récepteurs vont dans les segments tubulaires. Selon la chronologie de la dissociation des récepteurs de leur ligand ceux-ci peuvent être véhiculés jusqu'à la membrane plasmique ou bien vers le transGolgi. Les segments vacuolaires matures, par contre, fusionnent directement avec les lysosomes où leur contenu est dégradé.

c. Recyclage des récepteurs et endosomes

Plus de 90% des protéines ou des lipides de surface sont rapidement recyclés au niveau des endosomes précoces par le biais des tubules ou indirectement par des

endosomes de recyclage. Les récepteurs dirigés vers les lysosomes restent dans les structures vacuolaires.

Le tri des récepteurs à recycler se fait progressivement durant la maturation des endosomes et par la machinerie cytoplasmique qui récupère les récepteurs à recycler.

d. Endosomes tardifs et corps multivésiculaires

Après la dissociation des tubules de recyclage, la partie vacuolaire des endosomes va migrer le long des microtubules vers la région périnucléaire.

Les vacuoles accumulent des petites vésicules et des tubules dans leur lumière par invagination de leur membrane. Ce sont les corps multivésiculaires qui perdent progressivement les marqueurs restants de la membrane plasmique et les récepteurs incorporés par erreur. Ils acquièrent progressivement des hydrolases lysosomales en incorporant les vésicules qui proviennent du transGolgi et deviennent des endosomes tardifs. Les endosomes tardifs ont sur leur membrane interne de nombreux récepteurs du mannose-6-phosphate qui véhiculent les enzymes lysosomales. Puis les endosomes tardifs vont fusionner avec les lysosomes.

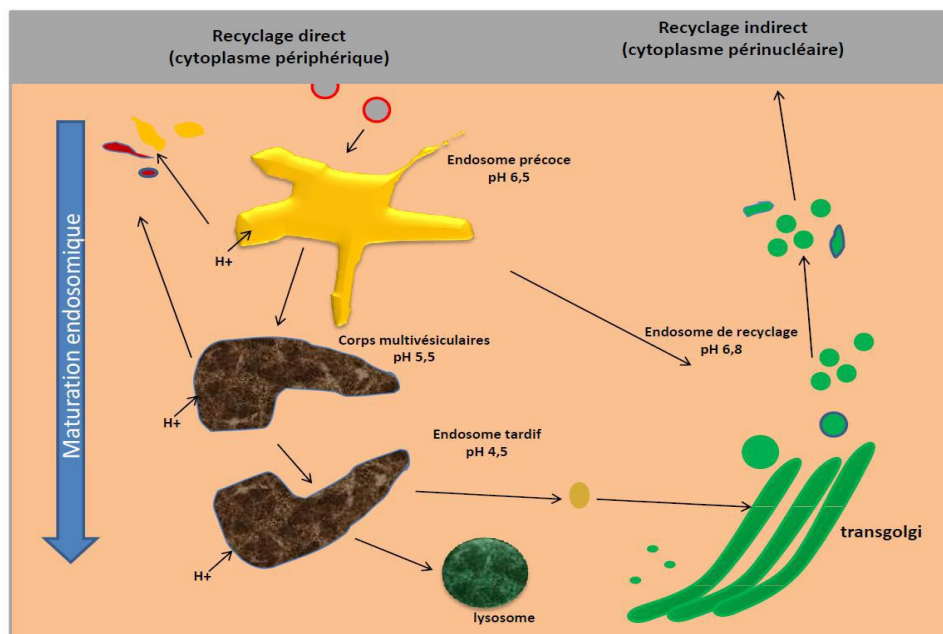


Figure 28 : Maturation endosomique.

Chapitre II

Mécanisme moléculaire du trafic vésiculaire dans les voies de biosynthèse/sécrétion

I. Transport des protéines

Le transfert des protéines à partir du réticulum vers les autres organites et la membrane plasmique (exocytose) se fait par l'intermédiaire de vésicules de transport. Il en est de même pour le transport des protéines d'un saccule golgien à un autre. Dans ce type de transport, les vésicules se forment par bourgeonnement du compartiment donneur. Au cours de ce processus, les vésicules ainsi formées s'emparent du matériel présent dans le compartiment donneur et le libère dans le compartiment cible, après fusion de la membrane vésiculaire avec celle du compartiment cible. Toujours grâce à des vésicules, les cellules eucaryotes captent des macromolécules du milieu extracellulaire pour les diriger vers les lysosomes (endocytose).

Les vésicules transportant les protéines sont recouvertes d'une enveloppe protéique (protéines manteaux). Le revêtement protéique joue un rôle dans le bourgeonnement de la vésicule et dans la sélection des protéines à transporter. Il a été montré qu'il existe principalement 2 types de vésicules enveloppées (Figure 29):

- **Les vésicules enveloppées de clathrine**, qui transportent du matériel destiné à l'exocytose contrôlée ou aux endosomes (de l'appareil de Golgi vers le compartiment endosomal tardif) ou de la membrane plasmique vers le compartiment endosomal précoce (endocytose).
- **Les vésicules enveloppées de COP (Coatomères Proteins)** sont impliquées dans le transport vésiculaire non sélectif du RE au Golgi et dans les transports vésiculaires de l'appareil de Golgi au RE et d'un compartiment du Golgi au suivant.

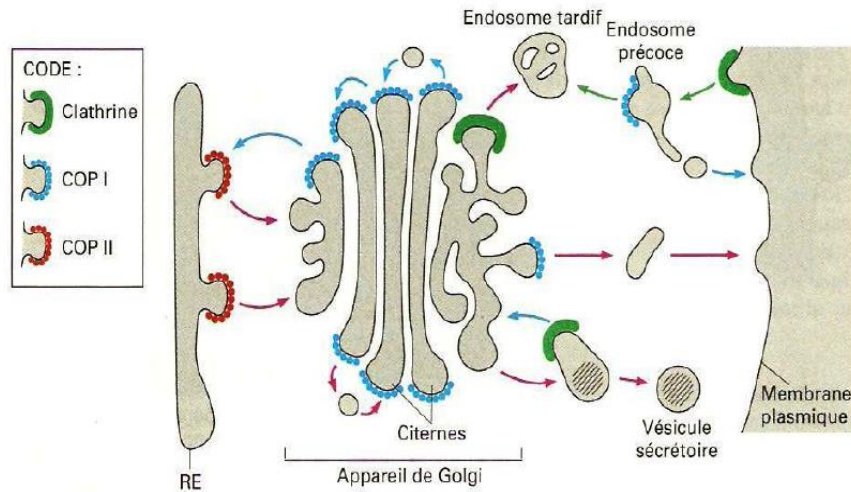


Figure 29: Transport vésiculaire impliquant les vésicules enveloppées de clathrine et de COP (Coatomères Proteins).

II. Evènements de transport vésiculaire

Le transport de molécules entre deux compartiments peut toutefois se décomposer en une succession d'évènements élémentaires :

II.1. Assemblage des protéines de revêtement

Le processus de formation des vésicules nécessite le recrutement de protéines manteaux. L'assemblage de ces protéines dépend d'une famille de GTPases monomériques ; les protéines ARF, responsables de l'assemblage du revêtement de COP-I et de clathrine, et la protéine Sar1 responsable de l'assemblage du revêtement de COP-II. Ces GTPases existent sous deux formes, actives lorsqu'elles sont liées au GTP (guanosine triphosphate), inactives lorsqu'elles sont liées au GDP (guanosine diphosphate). Le passage d'une forme à l'autre est régulé par deux classes de protéine, les GEF (facteurs d'échange des nucléotides guanyliques) qui sont activateurs car ils catalysent le remplacement du GDP par du GTP et les GAP (protéines activatrices de la GTPase) qui sont inactivatrices car elles stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP.

Les protéines ARF et Sar1 sont présentes à de fortes concentrations dans le cytosol sous forme inactive, liées au GDP. Avant le bourgeonnement membranaire, des GEF membranaires activent cette famille de GTPase (remplacement d'un GDP par un GTP). Sous forme active, ces molécules exposent des chaînes hydrophobes

leur permettant de s'insérer dans les membranes et de recruter les protéines de revêtement (Figure 30). Après hydrolyse du GTP en GDP, les protéines ARF et Sar1 inactives se décrochent des membranes provoquant le désassemblage du revêtement vésiculaire.

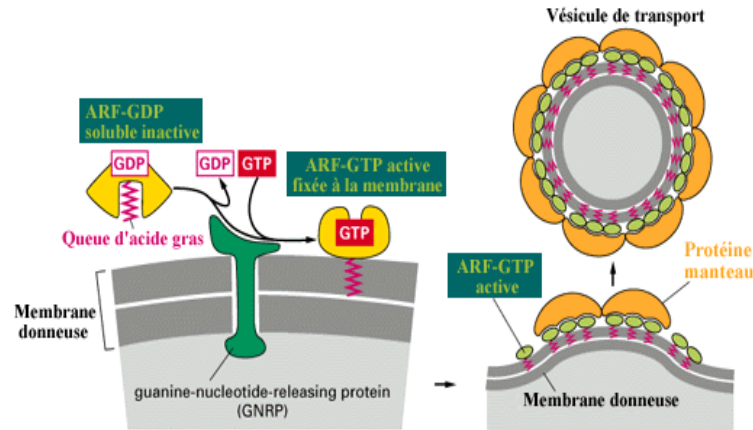


Figure 30: Recrutement et assemblage de protéines manteaux, puis bourgeonnement et scission de la vésicule.

II.2. Sélectivité du transport vésiculaire

Le processus de reconnaissance des membranes cibles des vésicules de transport est hautement spécifique et fait intervenir deux classes de protéine, les SNARE et les protéines rab.

II.2.1. Protéines SNARE

Les protéines SNARE jouent un rôle essentiel dans la spécificité de l'amarrage d'une vésicule à la membrane cible et dans la fusion des deux membranes. Ils se regroupent en paires complémentaires où chaque élément d'une paire s'amarre spécifiquement à l'autre élément ; les v-SNARE (v=vesicule) sont présentes sur la membrane des vésicules qui bourgeonnent et les t-SNARE (t=target) sur la membrane cible et chaque couple identifie une voie bien définie de transport vésiculaire. Les SNARE sont des protéines transmembranaires; le domaine cytosolique d'une v-SNARE s'enroule en hélice avec le domaine cytosolique de son partenaire t-SNARE. Cet enroulement permet le rapprochement des deux membranes puis leur fusion. Après fusion membranaire, chaque couple peut se dissocier pour que les deux éléments qui le constituent soient réutilisés. La

dissociation est catalysée par des protéines accessoires et une ATPase appelée NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor).

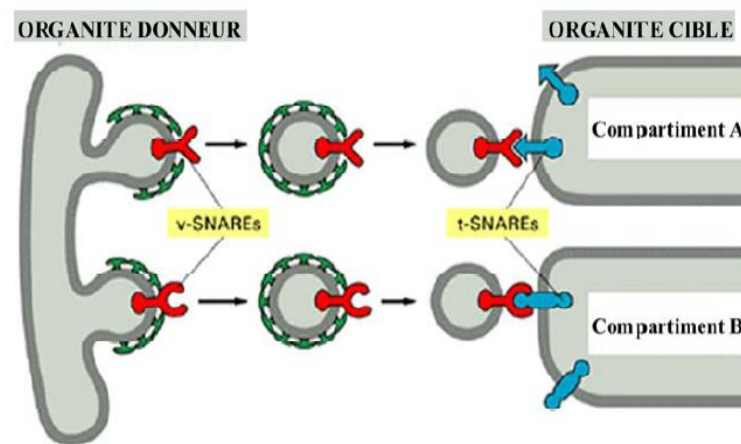


Figure 31: Rôle du SNARE dans le processus de reconnaissance des membranes cibles des vésicules de transport.

II.2.2. Protéines rab

Les protéines rab sont des GTPases monomériques qui contribuent également à la sélectivité du transport vésiculaire. Leur rôle est de faciliter et de réguler l'amarrage d'une vésicule à une membrane et l'appariement d'une v-SNARE avec son partenaire t-SNARE. Comme les protéines ARF et Sar1, les protéines rab existent sous deux formes, inactives dans le cytosol (liées au GDP), actives membranaires (liées à du GTP). Le passage de la forme inactive à la forme active est dû à des facteurs d'échange (GEF) ancrés dans les membranes. L'activation des protéines rab se caractérise par l'exposition d'un ancrage lipidique permettant la liaison de la protéine à une membrane. En se liant à un effecteur de rab présent sur une membrane cible, la protéine rab intégrée dans la membrane d'une vésicule permet l'amarrage de ces deux membranes l'une à l'autre, facilitant ainsi l'appariement des SNARE puis la fusion membranaire (Figure 32).

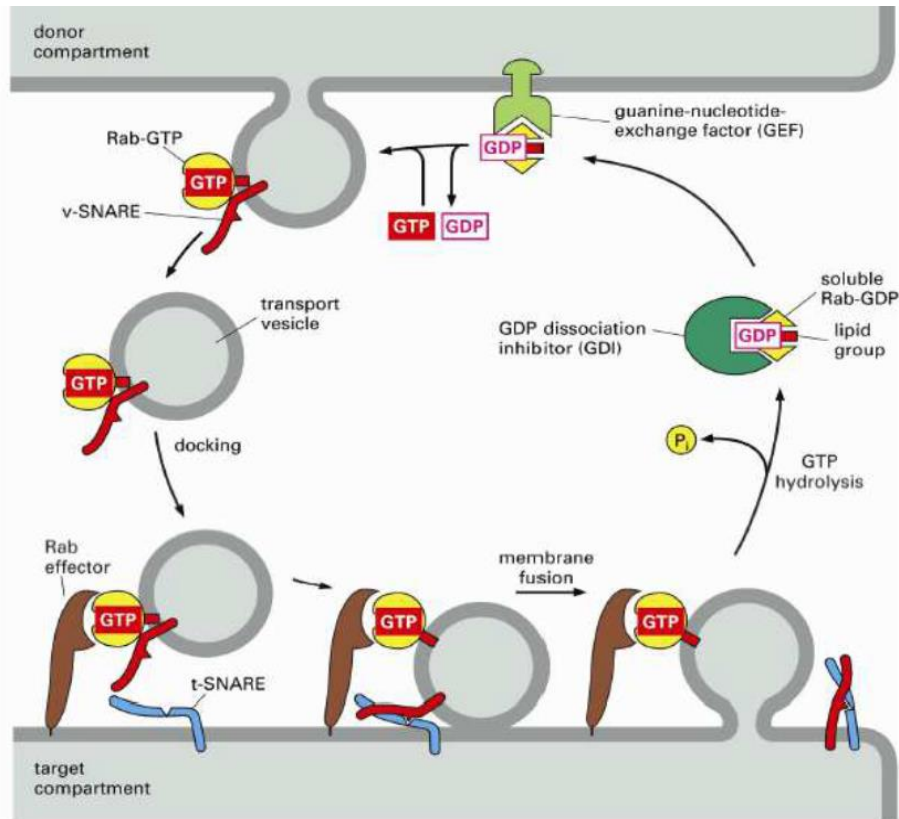


Figure 32: Processus de reconnaissance des membranes cibles des vésicules de transport qui fait intervenir les deux classes de protéine, les SNARE et les protéines rab.

II.3. Fusion entre les deux membranes

L'ATPase NSF et SNAP (soluble NSF attachment protein) pourraient intervenir dans l'étape de fusion entre les deux membranes après l'hydrolyse de l'ATP par NSF.

La fusion d'une vésicule de transport avec une membrane cible est réalisée comme suit : Le NSF et les SNAPs se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques appelés SNARE (pour SNAP receptors). Les SNAREs sont présents au niveau des membranes de la vésicule v-SNARE et de la cible t-SNARE et correspondent à des protéines d'arrimage. Une fois l'arrimage est effectué, le complexe SNARE, recrute le NSF et les SNAPs pour réaliser la fusion des membranes de la vésicule et de la cible.

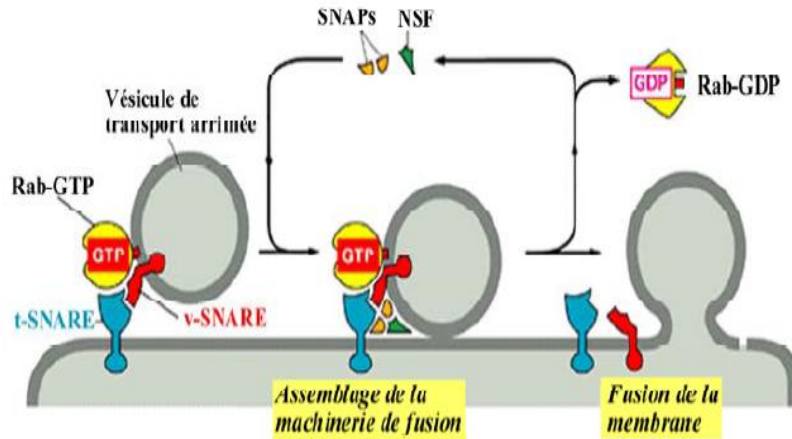


Figure 33: Rôle des Rab, SNAP et NSF dans la fusion d'une vésicule de transport avec une membrane cible

III. Principales vésicules enveloppées

III.1. Vésicules formées par les coatomères COP

Deux types de coatomères ont pu être identifiés, COPI et II. Les coatomères COPII sont impliqués dans le transport antérograde des protéines du RE vers le compartiment cis-golgi (CGN) tandis que les complexes COPI sont associés aux vésicules assurant les échanges intra-golgiens ou le transport rétrograde du Golgi vers le RE.

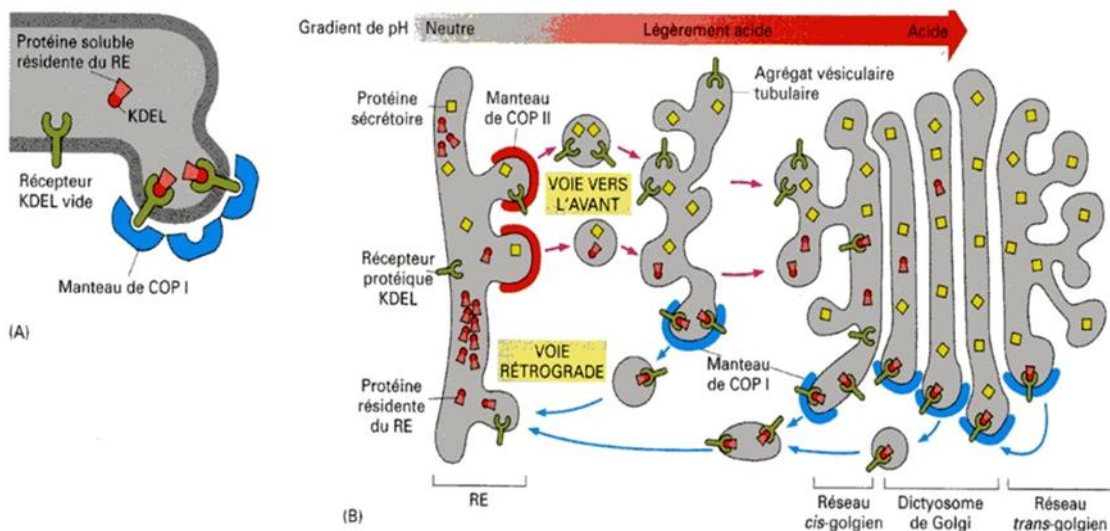


Figure 34: Transport vésiculaire impliquant les vésicules enveloppées de COP (Coatomères Proteins).

Le recrutement des coatomères sur les membranes du compartiment donneur est régulé par la GTPase Sar1 pour COPII et Arf1 pour COPI. Les protéines v-SNAREs peuvent également coopérer avec les GTPases en interagissant directement avec les protéines du manteau. Les coatomères sont initialement présents dans le cytosol sous forme de complexes dont les sous-unités protéiques peuvent varier. L'existence de sous-complexes permet une régulation fine du chargement et de l'adressage final de la vésicule, et en particulier de distinguer les transports antéro- et rétrogrades de COP. Certains signaux de tri impliqués lors du recrutement vésiculaire ont été caractérisés, en particulier ceux portés par les protéines destinées à être recyclées vers le RE.

III.1.1. Formation des vésicules COP II

La genèse des vésicules COPII démarre par l'activation de la petite protéine G Sar1. Elle est soluble et inactive dans le cytoplasme lorsqu'elle est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate). Lorsque le facteur d'échange Sec12 catalyse la substitution du GDP par un GTP (guanosine triphosphate), il provoque le changement de conformation de Sar1, qui ainsi activée s'attache à la membrane du RE et se positionne dans un site d'export *via* son interaction avec la protéine Sec16. Sar1 recrute alors le premier étage du manteau COPII, l'hétérodimère Sec23/Sec24 qui à son tour recrute diverses protéines « passagères » diffusant dans la membrane pour peu qu'elles arborent un motif de reconnaissance spécifique. *Le complexe* Sar1-GTP-cargo-Sec23-Sec24 assure le recrutement du complexe Sec13-Sec31 le second étage du manteau, aboutissant à la déformation des membranes et au bourgeonnement de la vésicule. L'activité de la GTPase de Sar1 est augmentée en présence de Sec23 aboutissant à une inactivation de Sar1 et une dépolymérisation du coatomère (Figure 35).

Les vésicules à coatomères COP-II permettent l'incorporation sélective de protéines "cargo" contenant dans leur domaine cytoplasmique un motif di-acide de type EXD ou EXE (où E est un résidu glutamate et D un résidu aspartate). Ces motifs di-acides interagissent avec Sar1 et Sec23/24. Des paires de résidus

hydrophobes (di-leucine ou di-phenylalanine) sont également importantes pour la liaison aux COP-II.

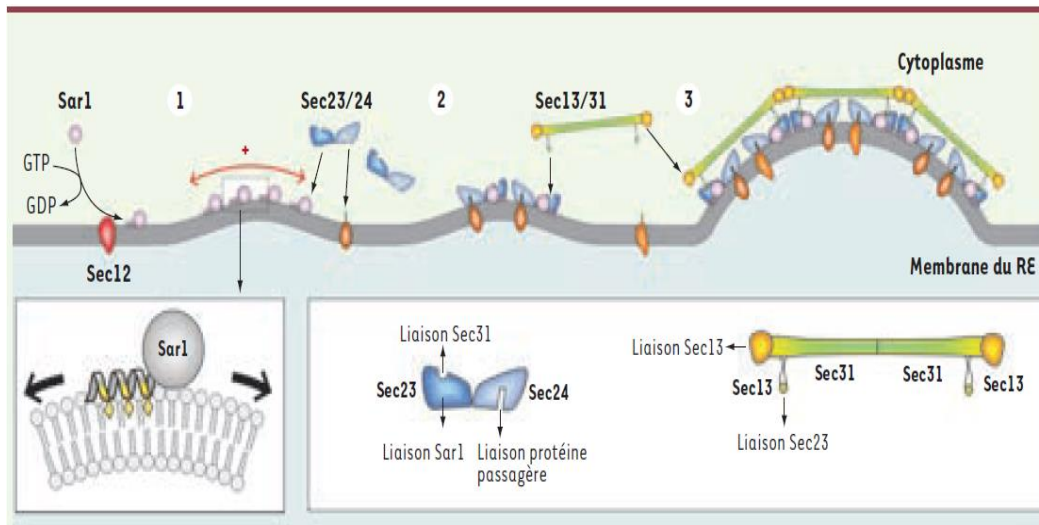


Figure 35: Formation des vésicules COPII. *Sar1* activée induit une courbure positive (1) et recrute le complexe *Sec23/24* qui se lie aux protéines passagères (cargo) (2). Les complexes sont rassemblés par l'assemblage de *Sec13/31* en une cage (3) qui induit le bourgeonnement de la membrane en vésicule.

III.1.2. Formation des vésicules COP I

La formation des vésicules COPI débute aussi par l'activation d'une petite protéine G, cette fois-ci *Arf1* (*ADP ribosylation factor 1*), par son facteur d'échange (*GBF1*) localisé au *cis*-Golgi. *Arf1* recrute sur la membrane un complexe soluble constitué de sept sous-unités, appelé *Coatomer*. Comme le manteau COPII, le *Coatomer* polymérise pour induire le bourgeonnement d'une membrane et interagit spécifiquement avec certaines protéines pour les concentrer dans ce bourgeon (Figure 36).

L'assemblage du manteau COP-I à la surface des membranes permet la séquestration des protéines "cargo" (protéines transporteurs) aux sites de bourgeonnement. Ces protéines portent sur leur domaine cytoplasmique des "signaux de tri". Il en existe deux types : Le motif di-lysine de type *KKXaXa* ou *KXaKXaXa* (où K est un résidu lysine et Xa un résidu acide) reconnu par la sous-unité γ ou par un sous-complexe composé des sous unités α , β' et ε . Le motif delta L reconnu par la sous-unité δ .

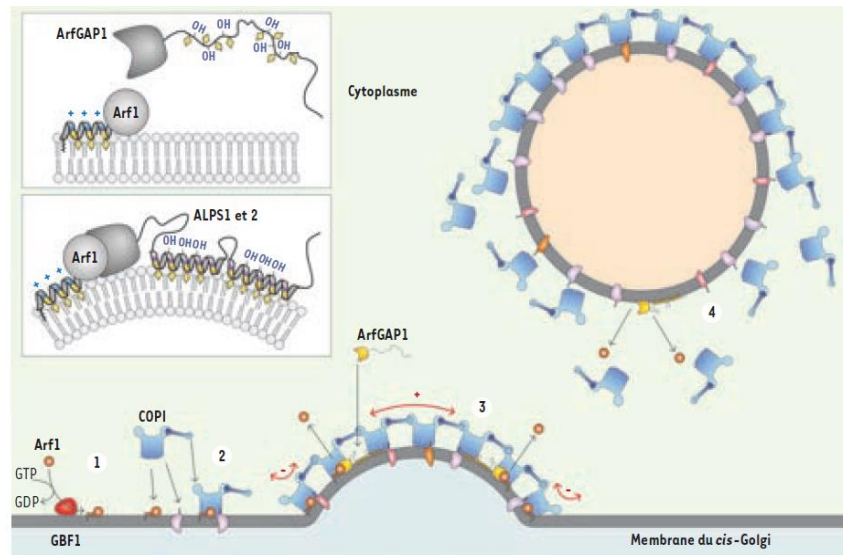


Figure 36 : Formation des vésicules COPI. L'activation d'Arf1 entraîne le recrutement du coatome et des protéines passagères.

Durant la vie d'une vésicule, l'existence d'un manteau doit être transitoire. La vésicule une fois formée doit se débarrasser de son manteau qui représente un obstacle à la fusion de sa membrane avec celle du compartiment cible. En effet, le recrutement des manteaux dépend de l'activation d'Arf1 ou de Sar1 : les désactiver apparaît donc essentiel pour déstabiliser les manteaux, et pour cela des GAP spécifiques (*GTPase activating protein*) vont stimuler l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans les vésicules COPI, la désactivation d'Arf1 fait intervenir ArfGAP1 (*Arf GTPase activating protein*).

III.2. Vésicules à clathrine

Les vésicules à clathrine, participent à l'endocytose de très nombreux ligands après interaction avec leurs récepteurs et au transport de certaines protéines comme les enzymes lysosomales du TGN vers les endosomes. Les oligomères de clathrine n'interagissent pas directement avec la membrane cible mais requiert la fixation préalable de complexes protéiques (Adaptor Protein complex) appelés AP1 pour les vésicules dérivées du TGN et AP2 pour celles formées à partir de la membrane plasmique.

Les complexes adaptateurs de clathrine comportent différentes sous-unités possédant des homologues de séquence avec certaines sous-unités des coatomères

COP. Comme dans le cas des «COP-coated» vésicules, la protéine Arf participe au recrutement des complexes AP1 sur la membrane. Pour AP2, il semble que ce soit une autre GTPase, la dynamine, qui intervienne. La dynamine sert également lors de la scission entre la vésicule et la membrane plasmique par formation d'un collier à la base de la vésicule naissante.

Certaines sous-unités des adaptateurs présentent la propriété de reconnaître des motifs à dileucine ou à tyrosine (de type NPXY ou YXXO, O étant un acide aminé hydrophobe), qui sont des signaux de tri portés par des protéines de la membrane plasmique pour leur internalisation, ou par des protéines du TGN destinées à être envoyées vers les lysosomes.

Certaines protéines cargo solubles disposent aussi d'un signal d'adressage lysosomal, le mannose 6 phosphate, reconnu par le récepteur membranaire MRP (mannose 6P receptor).

III.3. Vésicules recouvertes de rétromères.

Les rétromères s'assemblent sur l'endosome et forment des vésicules qui assurent le retour des récepteurs des hydrolases acides (récepteurs du mannose-6-phosphate) vers l'appareil de Golgi. Un rétromère est constitué de 4 sous-unités protéiques dont l'une se lie au domaine cytosolique des récepteurs au mannose-6-phosphate et dont une autre se lie à un phosphatidylinositol phosphaté en 3' de l'inositol [PI(3)P].

III.4. Autres types de vésicules

Le complexe AP3 est associé à des vésicules qui circuleraient entre le TGN et les lysosomes, ainsi qu'à des vésicules synaptiques. Il n'est cependant pas clair si AP3, comme AP1 ou AP2, interagit avec la clathrine pour former le manteau de ces différents types de vésicules. Les caveolines représentent une famille grandissante de protéines associées à des vésicules. Plusieurs types de caveolines ont été identifiées, associées suivant le cas à la membrane plasmique ou à des compartiments golgiens. Les protéines vésiculaires impliquées dans le recrutement et l'adressage apical ou basolatéral des protéines n'ont pas été caractérisées, de

même que les signaux reconnus pour le ciblage n'ont pas encore été clairement identifiés.

IV. Triage intracellulaire et maladies

L'altération d'un signal de triage dans une protéine peut entraîner son mauvais adressage dans la cellule et conduire éventuellement à diverses maladies graves. Par exemple, certaines formes familiales d'hypercholestérolémie sévère ont pour origine des altérations des signaux d'endocytose. D'autres maladies congénitales, telles que la mucoviscidose, sont liées au fait que certaines protéines n'arrivent pas à bonne destination. Les mécanismes de pathogénicité de certains rétrovirus, comme le VIH, sont également fondés sur une modification du transport intracellulaire de certaines protéines cellulaires au sein des cellules infectées.

IV.1. Hypercholestérolémie familiale

Le taux de cholestérol dans le sang est en grande partie contrôlé par le récepteur pour les lipoprotéines de basse densité (LDL) auxquels le cholestérol plasmatique est complexé. Ce récepteur élimine le cholestérol circulant dans le sang en liant les LDL à la surface cellulaire puis en l'internalisant. Le cholestérol est ensuite dégradé dans les lysosomes et le récepteur est recyclé à la membrane plasmique. Certaines formes d'hypercholestérolémie familiale conduisant à l'athérosclérose et à des attaques cardiaques dès l'âge de 40 ans, ont pour origine la présence de mutations dans le récepteur aux LDL. Les mutations dites de classe 4 empêchent par exemple la concentration du récepteur dans les vésicules d'endocytose en formation. Toutes ces mutations ont été localisées sur le récepteur des LDL et ont permis de définir les domaines fonctionnels du récepteur.

Pour certains de ces mutants de classe 4, le défaut observé a pour origine la substitution de la tyrosine 807 en cystéine dans le domaine cytoplasmique du récepteur. Par la suite, de nombreuses études réalisées sur d'autres récepteurs ont démontré le rôle essentiel joué par un résidu tyrosine dans les signaux d'internalisation.

IV.2. Mucoviscidose

- **Présentation de la maladie**

La mucoviscidose ou fibrose kystique est une maladie caractérisée par une viscosité anormale du mucus que sécrètent les glandes intestinales, pancréatiques et bronchiques. Elle se caractérise par une modification des transports ioniques épithéliaux due à un mauvais adressage ou un dysfonctionnement du canal CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) dont l'activité est régulée par l'AMPc et l'ATP.

- **Le gène de la mucoviscidose**

C'est sur le chromosome 7 que se trouve le gène CFTR. Ce dernier engendre la protéine responsable de la production des canaux qui permettront le passage d'ions chlorures. Il existe beaucoup d'anomalies différentes pour la mucoviscidose (58) mais la plus fréquente (dans environ 70 à 80% des cas) est la délétion de trois bases CTT. Il n'y a plus de phénylalanine et donc la protéine est défectueuse.

	Séquence de base :	Séquence d'acides aminés
Séquence normale de base :	ATC ATC TTT GGT TTG	Isoleucine Isoleucine Phénylalanine Glycine Valine
Séquence d'un mucoviscidosique :	ATC AT. ..T GGT TTG	Isoleucine Isoleucine Glycine Valine

- **Origine du mucus visqueux et épais**

Tous les animaux possèdent une couche de cellules épithéliales qui tapissent notamment l'intérieur de leurs organes. Dans la membrane des cellules muqueuses (comme dans celle de chaque cellule) il y a des protéines (canaux ioniques) qui ont pour rôle de transporter des ions chlorure (Cl⁻) de l'intérieur à l'extérieur de la cellule. L'un de ces types de canaux s'appelle CFTR. Il libère des ions chlorure à l'intérieur de l'organe et l'autre capte des ions sodium. Ces échanges permettent au mucus produit par d'autres cellules de rester fluide (95% d'eau) et de s'éliminer naturellement.

Lors d'une mucoviscidose, le canal chlorure est soit absent, soit anormal, ce qui empêche tout mouvement des ions chlorure vers l'extérieur de la cellule. Il y'a ainsi

une concentration plus élevée dans le milieu intracellulaire et trop faible du côté apicale. Ce manque d'ions chlorure est responsable de viscosité et de la déshydratation du mucus sécrété. En effet, notre organisme cherchant toujours un équilibre parfait, la rétention des ions chlore va entraîner indirectement une absorption en excès de ions sodium. Il y aura donc formation de sel (NaCl).

Le principe d'osmose veut que la concentration en sel soit égale de part et d'autre d'une cellule. L'eau contenue dans le mucus va passer à l'intérieur de la cellule. Le mucus va donc se déshydrater et s'épaissir.

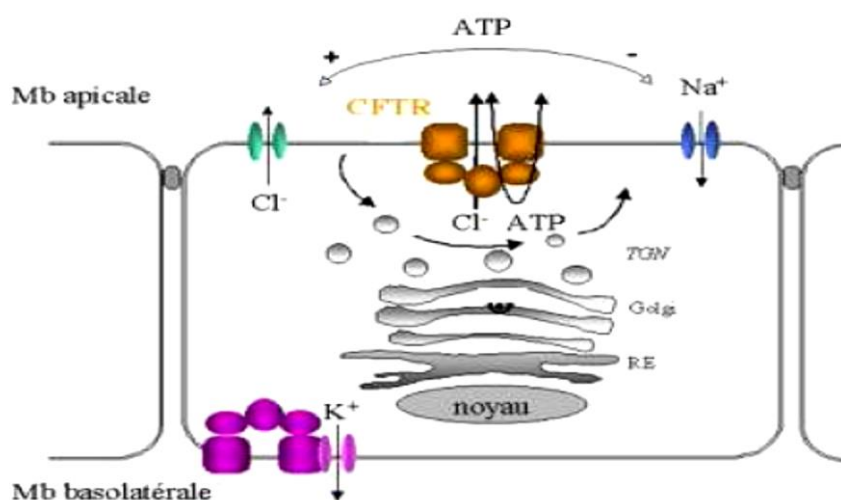


Figure 37: Mécanisme moléculaire à l'origine du mucus épais et visqueux.

IV.3. Pathogénicité du VIH

La molécule CD4 est une glycoprotéine membranaire normalement exprimée à la surface de certaines sous-populations lymphoïdes, et impliquée dans les mécanismes de la réponse immunitaire. Le CD4 sert également un corécepteur pour le virus responsable du SIDA chez l'homme (VIH) lors de l'étape de reconnaissance des cellules cibles. L'étude de la modulation de l'expression de CD4 par le VIH a révélé comment un virus peut détourner la machinerie cellulaire de la cellule hôte en sa faveur. Le VIH est susceptible de mettre en place trois stratégies convergentes afin d'empêcher l'expression de CD4 à la surface des cellules infectées (Figure 38).

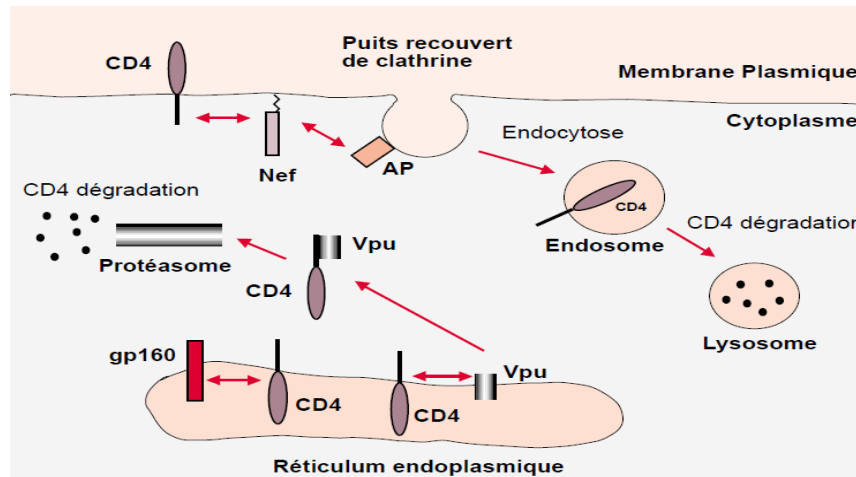


Figure 38: Stratégies mises en place par le VIH pour réduire l'expression de CD4 à la surface des cellules. La protéine virale *Nef* interagit à la fois avec le domaine cytoplasmique de CD4 et les composants des puits recouverts de clathrine. CD4 est donc recruté dans la voie d'endocytose, mais au lieu d'être recyclé à la surface cellulaire, CD4 est transporté vers les lysosomes pour être dégradé. Une autre protéine virale, *Vpu*, recrute CD4 nouvellement synthétisé dans le réticulum endoplasmique. L'association *Vpu*/CD4 induit la translocation de CD4 dans le cytoplasme où il sera dégradé par le protéasome. Enfin, la protéine d'enveloppe *gp160* est également capable de s'associer avec CD4 et d'induire ainsi sa rétention dans le réticulum endoplasmique.

La présence de CD4 à la surface cellulaire perturbe en effet l'assemblage des particules virales et diminue fortement l'infectivité du virus produit. Tout d'abord, les protéines Env et Vpu codées par l'ARN de VIH1 contribuent à la rétention des molécules CD4 nouvellement synthétisées et à leur dégradation. L'interaction de la protéine env avec le domaine luminal de CD4 conduit à la séquestration du complexe CD4/env dans le RE. La protéine membranaire virale Vpu s'associe également à CD4 dans le RE, et facilite la translocation de CD4 dans le cytoplasme, en y induisant ainsi sa dégradation.

Une troisième stratégie dépendante de la protéine virale *Nef* permet d'éliminer les molécules de CD4 déjà présentes à la surface des cellules infectées, et vient compléter les mécanismes viraux empêchant l'arrivée de molécules de CD4 nouvellement synthétisées jusqu'à la surface cellulaire. *Nef* induit effectivement l'augmentation de l'endocytose de CD4 et son adressage vers les lysosomes où il subit sa dégradation. Lors d'une réponse immunitaire normale, l'endocytose de

CD4 a lieu grâce à la présence d'un signal di-leucine présent sur son domaine cytoplasmique. Après son transport dans les endosomes, CD4 est soit recyclé à la surface cellulaire soit dégradé dans les lysosomes. Dans le cas des cellules infectées, Nef interagit directement avec le signal di-leucine de CD4, et recrute efficacement les complexes adaptateurs du manteau clathrine. Le taux d'endocytose de CD4 s'en trouve largement augmenté. Après concentration dans les endosomes, l'association de CD4 avec Nef induit son transport vers les lysosomes, et le voyage de CD4 s'achève alors avec sa dégradation. Sous l'action du VIH, la cellule perd donc en partie le contrôle des mécanismes de compartimentation des protéines.

Chapitre III

Autophagie

I. Définition

L'autophagie est un processus d'auto-digestion qui consiste en une dégradation de composants intracellulaires par le lysosome.

L'autophagie joue un rôle physiologique important dans la croissance cellulaire, la différenciation et surtout dans le maintien de l'homéostasie qui nécessite l'élimination et le remplacement continuels des protéines et des organites non fonctionnels (Figure 39). Ce processus est une voie de catabolisme de protéines à vie longue (demi-vie), complémentaire de celle du protéasome impliquée dans la dégradation de protéines à vie courte.

Par ailleurs, il est important de noter que les produits de cette dégradation lysosomale sont nécessaires à la synthèse de nouvelles macromolécules, utilisées comme source d'énergie pour la cellule.

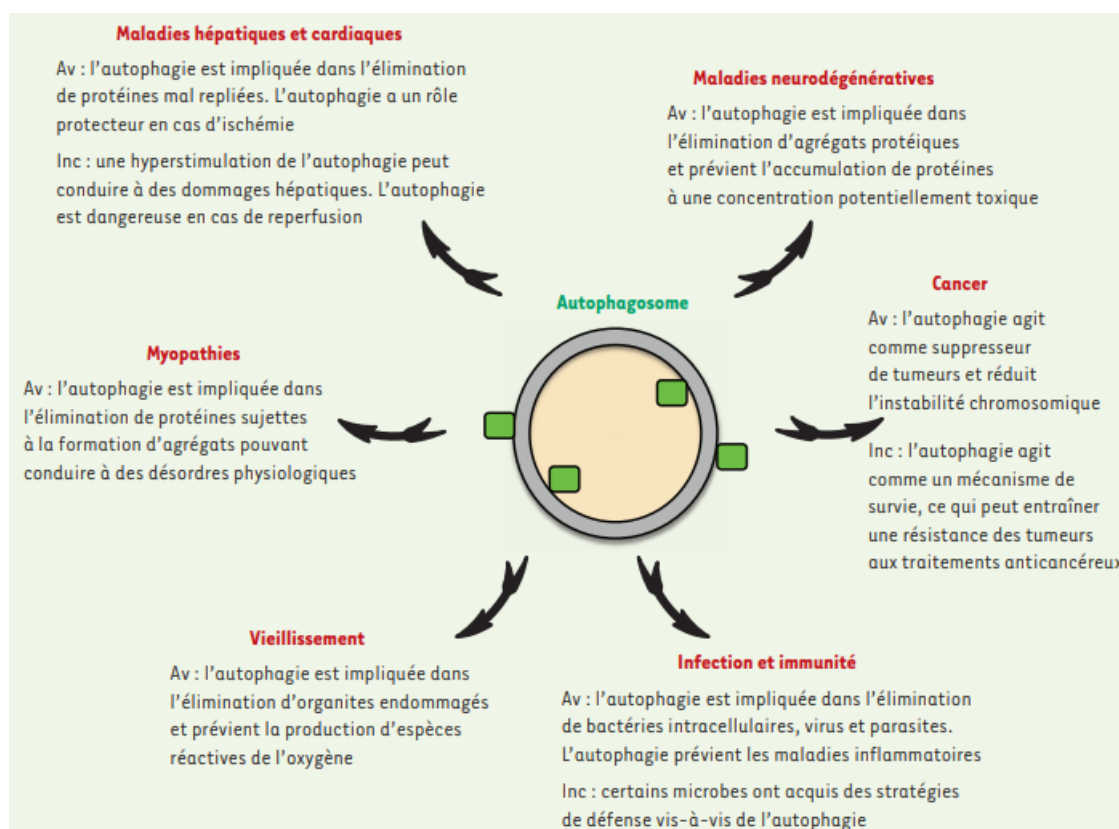


Figure 39: Implication de processus d'autophagie au cours des pathologies humaines. Av : avantages ; Inc : inconvénients.

II. Différentes formes d'autophagie

Il existe trois différents types d'autophagie: la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones et la forme principale, la macroautophagie (Figure 40).

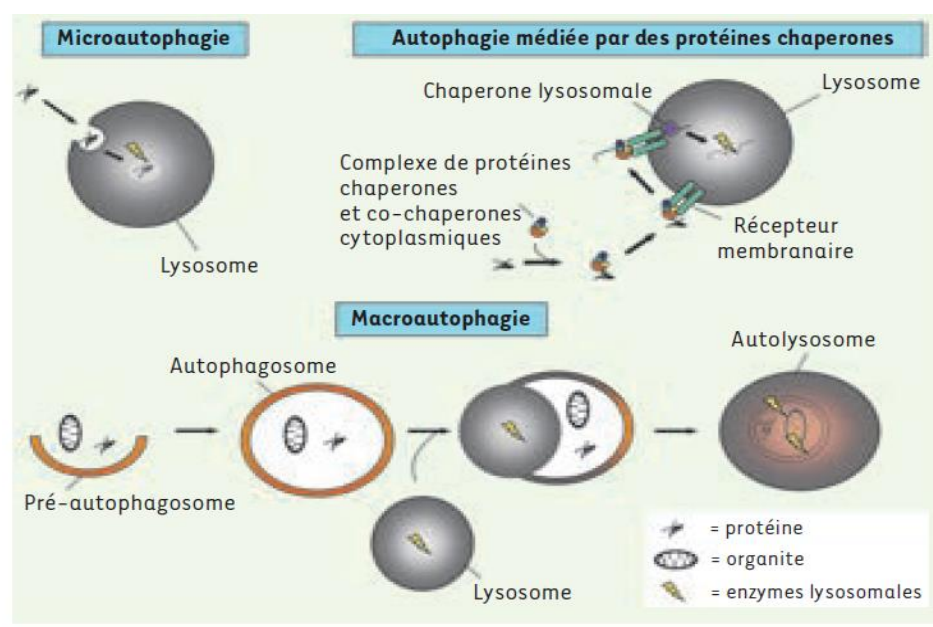


Figure 40: Types d'autophagie dans la cellule.

II.1. Microautophagie

La microautophagie est un processus, majoritairement non sélectif, qui peut être induit en conditions de stress, telles que le jeûne et l'hypoxie. Cette forme d'autophagie se caractérise par une invagination de la membrane lysosomale, permettant ainsi la séquestration du contenu cytoplasmique, qui sera directement dégradé par le lysosome. En effet, la microautophagie conduit à l'internalisation de différents organites tels que les peroxysomes, les mitochondries et le noyau.

II.2. Autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA)

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes, s'agit d'une forme d'autophagie exclusivement sélective. En effet, ce mécanisme protéolytique concerne seulement les macromolécules possédant le motif pentapeptidique **KFERQ** (Lys, Phe, Glu, Arg, Gln), ce qui représente près de 30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires. Cette séquence est spécifiquement reconnue par

la protéine chaperonne **Hsc70**, permettant ainsi la formation d'un complexe, qui sera alors adressé à la membrane du lysosome. L'internalisation de celui-ci dans le lysosome est dépendante de la protéine transmembranaire **LAMP-2A** (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2). Sous sa forme monomérique, LAMP-2A joue le rôle de récepteur des substrats de la CMA. En revanche, leur translocation requière la multimérisation de LAMP-2A. L'existence de ce complexe est transitoire, il se dissocie juste après le passage du substrat à travers la membrane lysosomale.

II.3. Macroautophagie

La macroautophagie, c'est la forme la moins sélective d'autophagie, dans laquelle une portion entière de cytoplasme contenant les organites ou les protéines à dégrader est séquestrée dans une vésicule formée de plusieurs membranes nommée autophagosome.

La macroautophagie, appelée plus communément autophagie, permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant le contenu cytoplasmique. D'autre part, il est intéressant de noter que l'autophagie est stimulée en conditions de stress, telles que la carence en acides aminés ou en facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif et lors d'infections. L'autophagie est un processus dynamique, d'une très grande rapidité. En effet, la durée entre la genèse et la dégradation d'un autophagosome est estimée à 8 minutes. Les étapes de l'autophagie sont régulées par les gènes Atg (autophagy related genes).

III. Etapes de l'autophagie

Le processus d'autophagie (macroautophagie) se déroule en plusieurs étapes (Figure 41). La première étape s'initie par la formation d'une double membrane au point de nucléation appelée phagophore ou pré-autophagosome. Ensuite, cette membrane s'allonge pour séquestrer une partie du contenu cytoplasmique et former une vésicule nommée autophagosome. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome ou un endosome pour former respectivement un autolysosome ou un amphisome. La dernière étape de ce processus consiste en la dégradation du contenu de l'autophagosome par les enzymes lysosomales (hydrolases). Ainsi la macroautophagie génère des nucléotides, des acides aminés et des acides gras libres

qui pourront être réutilisés pour la synthèse de nouvelles macromolécules et d'énergie (ATP).

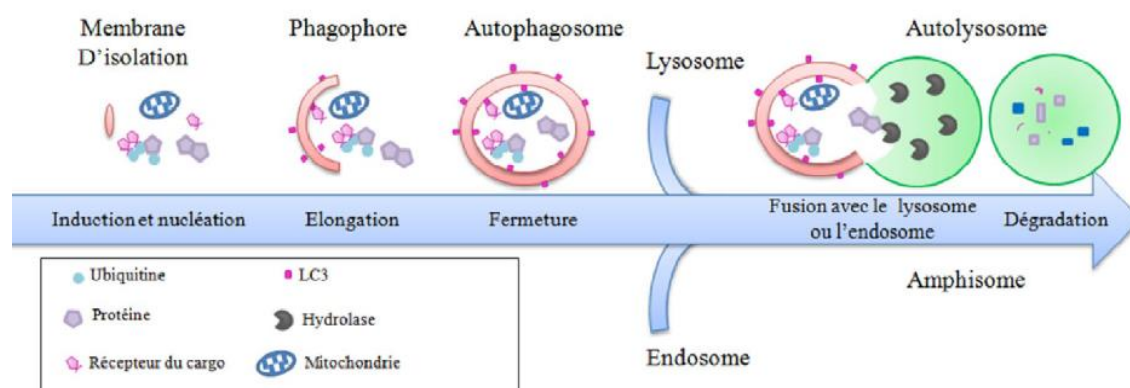


Figure 41: Les différentes étapes de la macroautophagie.

L'autophagie requière un grand nombre d'acteurs regroupés en trois complexes suivant les étapes de l'autophagie :

- le complexe protéique comprenant la serine/thréonine kinase ULK1(UNC-51-Like Kinases) et les protéines Atg13, FIP200 (FAK (Focal Adhesion Kinase) family Interacting Protein of 200 kDa)et Atg101. Ce complexe est impliqué dans l'étape d'initiation du phagophore ;
- Le complexe PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase) de classe III constitué de Vps34 (PI3K de classe III) (Vacuolar Protein Sorting 34), Vps15 (p150), Beclin-1, Atg14 (BARKOR: protéines BECLIN 1-associated Autophagy-Related Key regulatOR) et d'Ambra1 (Activating Molecule in Beclin1 Related Autophagy protein 1), engagé pour la nucléation du photophore ;
- les deux systèmes de conjugaison Atg5-Atg12 et Atg8/ LC3-PE, essentiels à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome,

III.1. Initiation

L'autophagie est initiée par l'isolation de *novo* d'une double membrane intracellulaire, le phagophore, dont les extrémités vont fusionner pour former un autophagosome, délimité par plusieurs feuilletés lipidiques, qui séquestre les constituants du cytoplasme, incluant protéines et organites intracellulaires.

L'origine des membranes du phagophore est aujourd'hui sujette à débat. En

effet, différentes études ont montré que l'émergence de ces dernières a pour origine une région particulière du réticulum endoplasmique enrichie en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) appelée omégasome. Cependant, il a également été démontré que la membrane nucléaire, la mitochondrie, le golgi, la membrane plasmique et les endosomes, participent à l'initiation de la biogenèse de l'autophagosome (Figure 42).

Initialement, des études génétiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'identifier les principaux acteurs moléculaires des différentes étapes de l'autophagie. En particulier, la protéine kinase Atg1 (*autophagy-related genes 1*), identifiée par un criblage génétique chez la levure, est un acteur essentiel dans l'induction de l'autophagie. Atg1 forme un complexe avec les protéines Atg13 et Atg17 en réponse à un signal de carence nutritionnelle. Cette induction de l'autophagie est rendue possible grâce à une inhibition de la voie de signalisation TOR (*target of rapamycin*), la déphosphorylation de Atg13, une interaction accrue entre Atg13 et Atg1 et une augmentation de l'activité kinase de Atg1 et de la phosphorylation de ses cibles. Les cellules de mammifères possèdent deux homologues pour la protéine Atg1, ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*) et ULK2. Alors qu'ULK1 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'autophagie, la fonction d'ULK2 n'a pas été clairement définie. Les homologues chez les mammifères des partenaires d'interaction Atg13 et Atg17 sont les protéines mAtg13 et FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*). Dans ce complexe, mAtg13 permet l'interaction entre ULK1 et FIP200 et est nécessaire à la phosphorylation de FIP200 par ULK1 en condition de carence nutritionnelle.

Les mécanismes moléculaires du contrôle d'ULK1 par les nutriments restent encore largement méconnus. Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la détection des niveaux nutritionnels et la gestion des stocks énergétiques ont récemment été identifiées. Cependant, l'initiation de l'autophagie par phosphorylation d'ULK1 en fonction de la disponibilité en nutriments par la voie de signalisation mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) est la voie la plus importante.

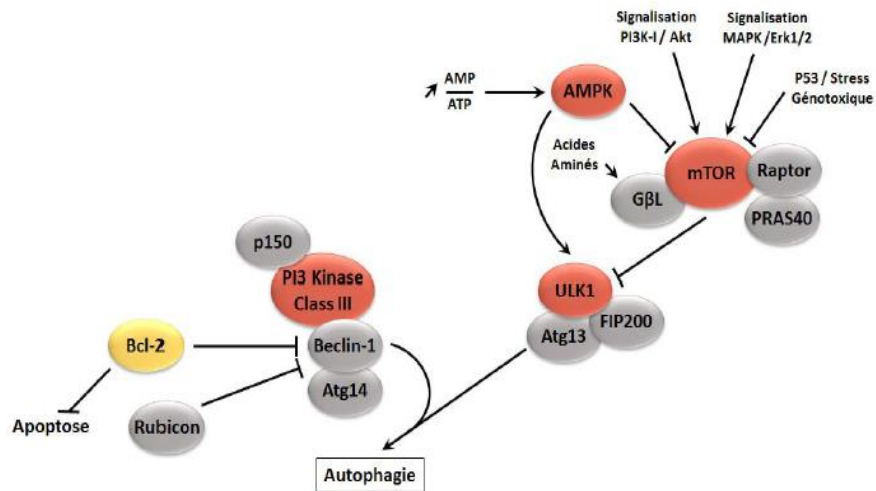


Figure 42: Initiation de l'autophagie.

En conditions normales, la kinase mTORC1 interagit avec ULK *via* RAPTOR. Ceci conduit à la phosphorylation d'ULK1 et d'Atg13 inhibant ainsi l'activité kinase d'ULK et l'autophagie. En condition de carence en nutriments, le complexe mTORC1 se dissocie du complexe ULK1, ce qui entraîne la déphosphorylation d'Atg13 et d'ULK1. Dans cette condition, ULK1 s'autophosphoryle et phosphoryle Atg13 et FIP200, induisant ainsi l'activation de l'autophagie (Figure 43).

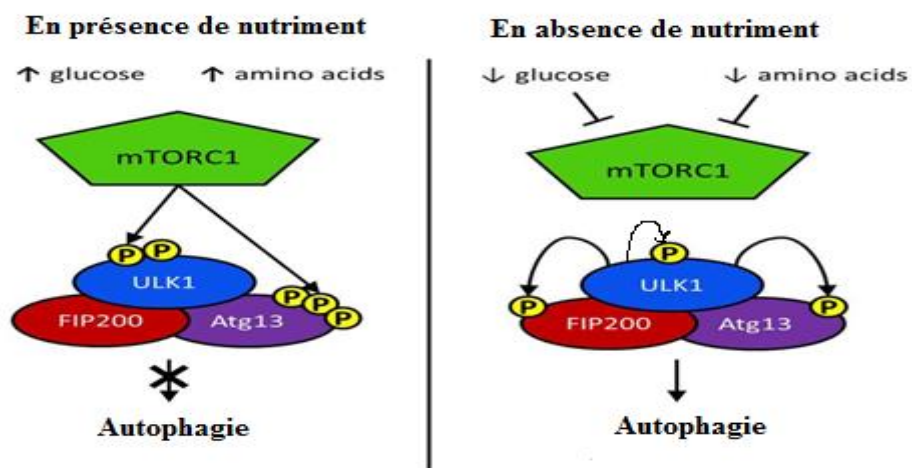


Figure 43: Le complexe ULK1.

La protéine ULK1 devient alors active et entraîne la formation et le recrutement du complexe phosphatidylinositol-3- phosphate (PI3K) de classe III (Ambra1, Beclin-1, Atg14, Vps15 et Vps34). La formation de ce complexe est

indispensable à l'activation de Vps34 (PI3K de classe III) qui permet la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et à l'initiation de l'autophagie. Le complexe PI3K de classe III participe à la fois à l'induction de l'autophagie, à la formation de l'autophagosome (par son rôle dans le recrutement de protéines importantes tels que les complexes Atg12-Atg5 et PE-Atg8/LC3) et à l'incurvation du pré-autophagosome (Figure 44).

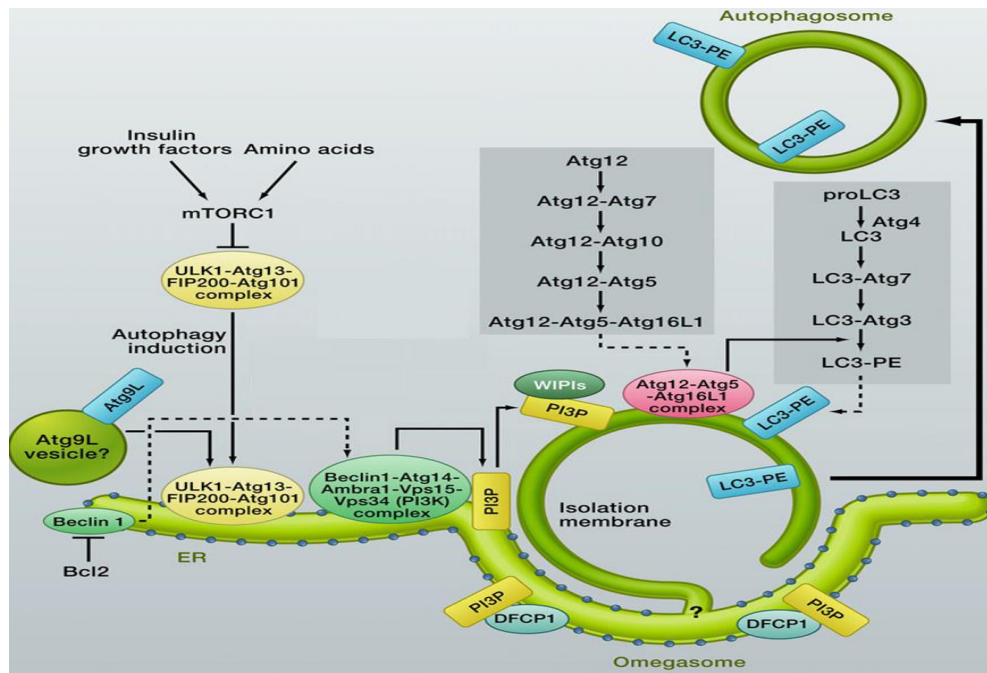


Figure 44: Formation de l'omégasome et de l'autophagosome. Lorsque les cellules disposent de nutriments, le complexe *mTORC1* régule négativement l'autophagie. Lors d'une carence en nutriments, le complexe ULK (composé de ULK1-Atg13-FIP200-Atg101) se relocalise au niveau du réticulum endoplasmique pour activer le complexe PI3K de classe III (composé de BECLIN 1-Atg14 (BARKOR)-AMBRA1-Vps15 (p150)-Vps34 (PI3K de classe III)). Cette étape entraîne la génération de PI(3)P et le recrutement des protéines effectrices de PI(3)P, WIP1 et Atg9 au niveau de l'omégasome. Les complexes Atg12-Atg5-Atg16 et LC3-PE interviennent ensuite dans la formation de l'autophagosome. Atg9L participe également à l'initiation de la formation de l'autophagosome.

III.2. Elongation

Une fois le phagosome généré, la progression du processus autophagique requiert son allongement et son incurvation, autour du contenu cytoplasmique à séquestrer. En effet, ces deux événements sont essentiels à la formation d'une

structure close nommée **autophagosome**. Cette étape d'élongation de la membrane fait intervenir deux systèmes de conjugaison similaires à celui de l'ubiquitinylation. Le premier système aboutit à la conjugaison de l'Atg12 à l'Atg5, puis à leur association à l'Atg16L1 dans un complexe macromoléculaire. Le deuxième système aboutit à la conjugaison de la phosphatidyléthanolamine (PE) à l'Atg8 (LC3-I).

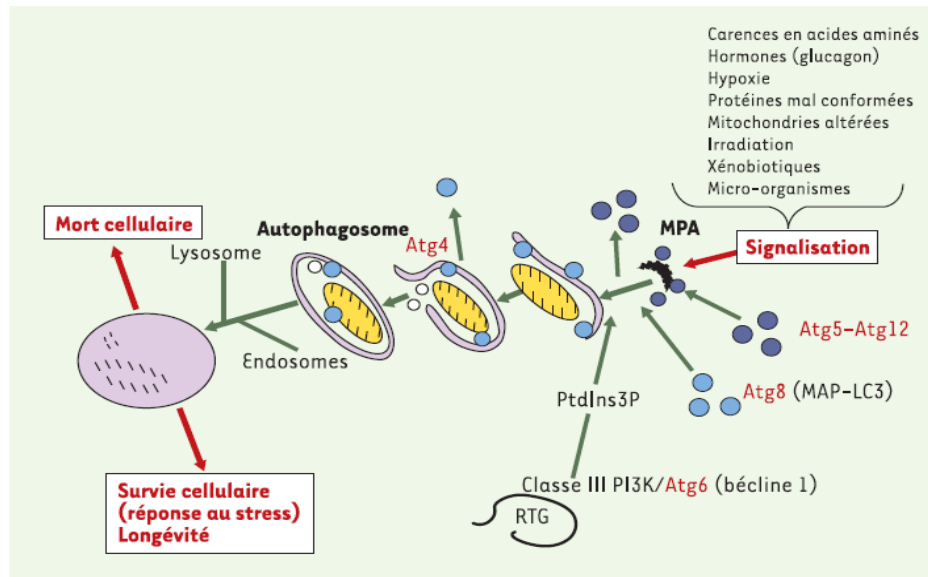


Figure 45 : Elongation. Le conjugué protéique Atg5-Atg12, recruté à partir du cytoplasme, permet la conjugaison d'Atg8 (MAP-LC3) et de la phosphatidyléthanolamine sur la membrane pré-autophagosomale (MPA). La formation de l'autophagosome nécessite aussi la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) par la phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) type III localisée probablement sur la membrane du réseau trans-golgien (RTG) où elle interagit avec la protéine bécline 1 (Atg6). Après formation de l'autophagosome, la plupart des protéines Atg sont recyclées vers le cytosol, à l'exception notable d'une fraction Atg8-phosphatidyléthanolamine, qui est un marqueur de l'autophagosome, insensible à la déconjugaison réalisée par Atg4 du fait de sa topologie membranaire. Après fusion avec des endosomes (précoces et/ou tardifs), le matériel séquestré dans l'autophagosome est digéré dans le lysosome (y compris la copule protéique du complexe Atg8-phosphatidyléthanolamine intravacuolaire). La macroautophagie est stimulée par divers signaux qui sont transduits le long de voies de signalisations dont la voie PI3K de type I/PKB/mTOR pour aboutir à la membrane autophagosomale.

III.2.1. Système de conjugaison Atg12-Atg5

Cette voie entraîne la liaison covalente de Atg12 à Atg5 grâce à la participation de Atg7 et de Atg10. L'enzyme Atg7 et l'enzyme Atg10 catalysent la fixation d'Atg12 sur la protéine Atg5 (la Atg12 est activée par la protéine Atg7, puis transférée sur Atg10 pour finalement se lier de façon covalente à Atg5). Le complexe Atg5–Atg12 s'associe ensuite à Atg16L et forme un complexe tétramérique. Ce complexe sera ensuite recruté à la membrane autophagosomale et se dissociera de celle-ci avant la fermeture de l'autophagosome.

Le complexe Atg12–Atg5-Atg16L est très important dans l'étape d'élongation car il va agir comme une enzyme E3-like dans le deuxième système de conjugaison dépendant de LC3 (Figure 46).

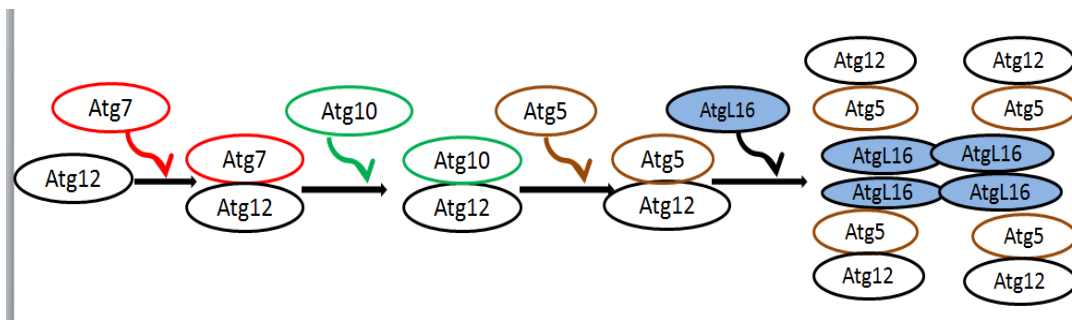


Figure 46: Le système de conjugaison Atg12-Atg5.

III.2.2. Système de conjugaison LC3-PE

La protéine LC3 (Atg8 chez la levure) existe sous deux formes : une forme non lipidée cytosolique appelée LC3-I et une forme lipidée ancrée dans la membrane des autophagosomes appelée LC3-II. Le système de conjugaison dépendant de LC3 aboutit à la lipitation de LC3.

La protéine LC3 est tout d'abord synthétisée sous une forme pro-LC3 qui est immédiatement clivée par la protéase Atg4 pour former la protéine LC3-I. L'enzyme de type E1 (Atg7) et l'enzyme de type E2 (Atg3) catalysent la fixation de la protéine LC3 sur un lipide, la phosphatidyléthanolamine (PE). La protéine ainsi formée est appelée LC3-II. Cette conjugaison et le recrutement de LC3-II à la membrane autophagosomale sont dépendants du complexe Atg5/Atg12/Atg16 (Figure 47).

Grâce au PE, la protéine LC3-II s'ancre à la fois dans la membrane externe et interne des autophagosomes. Après complétion de l'autophagosome, les protéines de LC3-II fixées sur la membrane externe de l'autophagosome sont clivées par la protéine Atg4 et recyclées. Les protéines LC3-II liées à la membrane interne de l'autophagosome restent présentes jusqu'à la fusion avec les lysosomes qui entraînera leur dégradation lors de l'étape de maturation.

Contrairement au complexe Atg12–Atg5–Atg16, LC3-II se distribue de manière équitable entre les membranes externes et internes du phagophore. De plus, ce complexe est primordial dans les dernières étapes de la formation de l'autophagosome. En effet, LC3-II intervient dans la fermeture des membranes. Enfin, LC3 II, située sur la surface interne, sera dégradée lors de la fusion avec le lysosome.

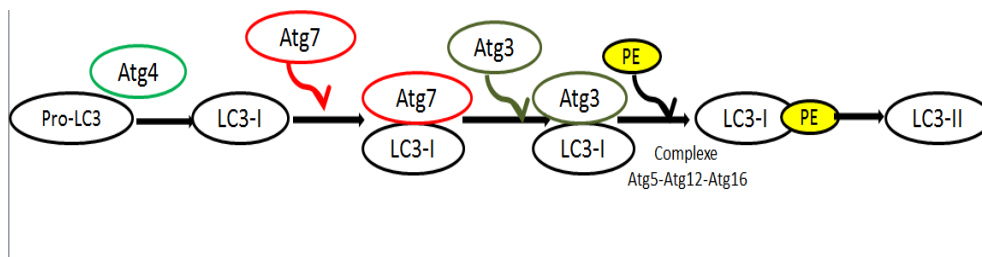


Figure 47: Le système de conjugaison LC3-PE

III.3. Fusion de l'autophagosome avec le lysosome et dégradation de son contenu

La phase d'élongation s'achève par la fusion des deux extrémités du phagophore, structurant un autophagosome. Celui-ci isole ainsi son substrat du reste de la cellule, mais la lumière autophagique n'étant ni acide, ni riche en enzymes actives. Afin d'assurer que l'autophagosome peut dégrader son contenu, le processus autophagique se poursuit (on parle de flux autophagique) par la fusion de l'autophagosome avec une vésicule de la voie endolysosomale. Cette étape de maturation mène à la formation d'un autolysosome (fusion autophagosome lysosome), qui peut être précédée par la formation d'un amphisome (fusion autophagosome-endosome) ; la maturation est indispensable car elle seule permet

de dégrader ce qu'emprisonne la vésicule autophagique. Cette dernière requière la participation des hydrolases acides du lysosome, telles que :

- les **lipases** : elles génèrent des acides gras à partir de lipides ;
- les **protéases** : elles dégradent les protéines en peptides, lysés ensuite par des peptidases en acides aminés ;
- les **nucléases** : elles dégradent les acides nucléiques en nucléosides.

L'ensemble de ces produits de dégradation seront libérés dans le cytosol, grâce à des transporteurs lysosomaux, afin d'être réutilisés par la cellule.

IV. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie.

La protéine kinase mTor, inhibiteur de l'autophagie, est l'acteur central du contrôle de l'induction de l'autophagie. La diminution en nutriments (manque en acides aminés (aa) et en énergie [ATP]) et par conséquent la diminution en facteurs de croissance ou en insuline, sont des inducteurs importants de l'autophagie. En effet, dans de telles conditions, mTor est inhibée suite notamment à l'activité de la phosphatase PTEN qui inhibe la phosphoinositol 3 kinase de classe I. Ainsi Atg13 est partiellement déphosphorylée (mTor contrôlant son état de phosphorylation) ce qui permet sa liaison avec Atg1. Ce complexe se lie ensuite à Atg11 et Atg17 induisant ainsi une augmentation de l'autophagie.

En parallèle, l'inactivation de mTor permet également l'activation de la PP2A (*protein phosphatase 2A*) et la translocation de Gln3 (glutaminase) dans le noyau où il active la transcription de gènes autophagiques tels que *LC3* et *Atg14*. Suite à cette phase d'induction les étapes de nucléation vésiculaire (dans laquelle le complexe Bécline 1/PI3KIII joue un rôle indispensable) et d'élongation (assurée par l'action concomitante des deux systèmes de conjugaisons Atg12-Atg5 et PE-Atg8/LC3) sont activées. Tout au long du processus d'élongation, le complexe Atg9 (Atg9, Atg2 et Atg18) joue un rôle essentiel dans le recrutement de ces différentes protéines. Ainsi le pré-autophagosome (ou phagophore) s'allonge, entoure les constituants à dégrader, puis se referme pour former un autophagosome doté le plus souvent d'une double membrane. LC3-II est la seule protéine Atg

connue à ce jour présente au stade d'autophagosome, toutes les autres étant recyclées (grâce à l'action du complexe Atg9).

La rapamycine est un activateur de l'autophagie (inhibe mTOR) alors que la 3-MA (3-méthyladénine), la wortmannine et le LY294002 sont des inhibiteurs de la voie de la PI3K-III et par conséquent de l'autophagie.

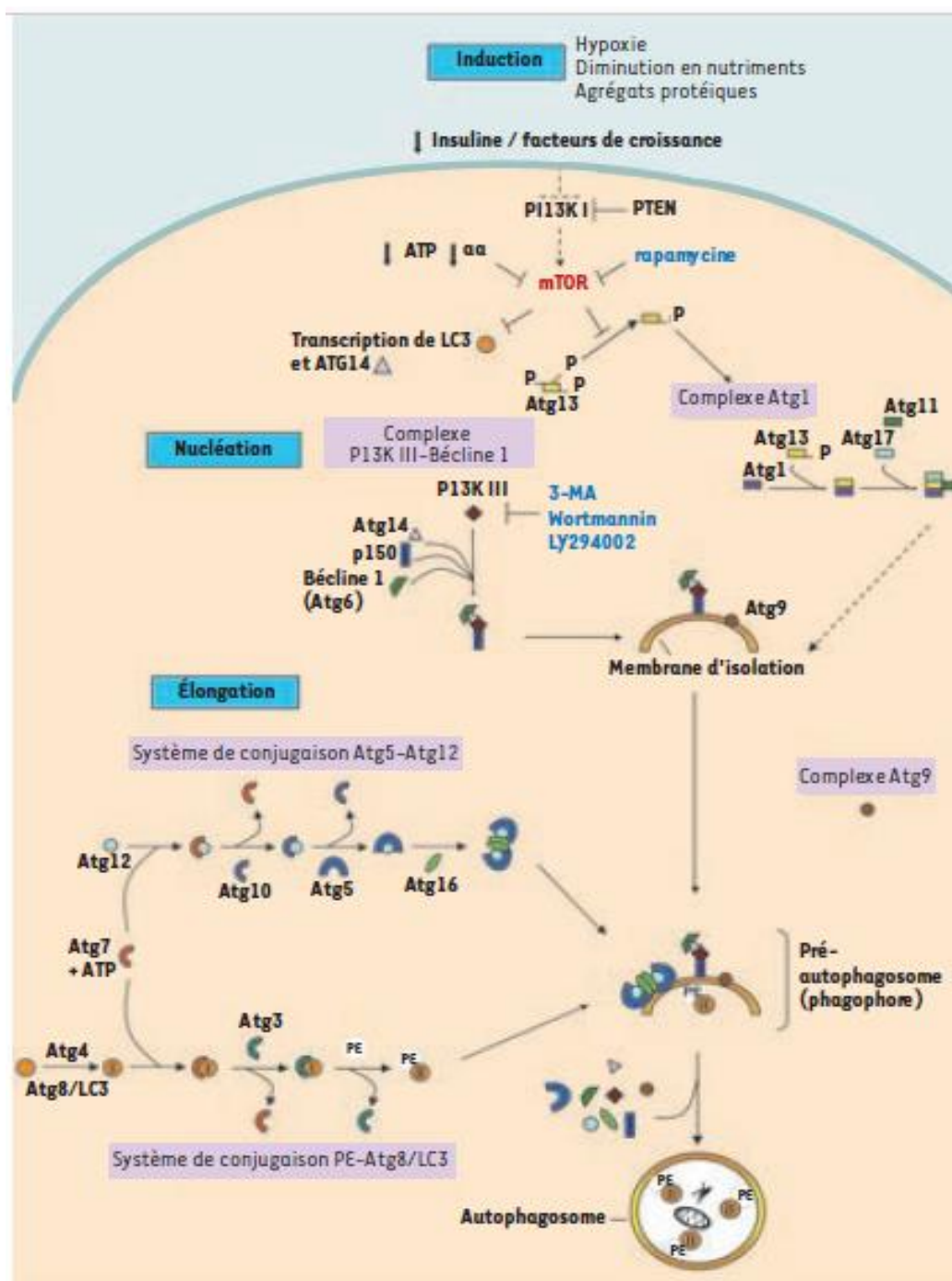


Figure 48: Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'autophagosome et dans la régulation de l'autophagie.

Chapitre IV

Communication et signalisation cellulaire

I. Communication cellulaire

La vie de tout organisme pluricellulaire repose sur la communication et les interactions entre les cellules qui le composent. On distingue deux types d'interactions cellulaires ;

- Communication cellulaire par contact direct.
- Communication cellulaire par l'intermédiaire des molécules de signalisation.

I.1. Communication cellulaire par contact direct (juxtacrine) :

Ce type de communication n'est utilisé que si deux cellules sont suffisamment proches l'une de l'autre. On distingue deux types de communication par contact direct (Figure 49) :

- A travers les jonctions communicantes (Figure 49 (A)).
- Par l'intermédiaire des molécules d'adhérences (Figure 49 (B)).

I.1.1 Jonctions communicantes : Elles permettent le passage direct entre deux cellules voisines de petites molécules (de poids moléculaire inférieur à 1500Da) comme les électrolytes (Ca^{2+}) et les seconds messagers (AMPc).

I.1.2. Molécules d'adhérences : Elles sont des glycoprotéines transmembranaires appartenant à cinq grandes familles : les intégrines, les cadhérines, les sélectines, les immunoglobulines et les molécules riches en leucines.

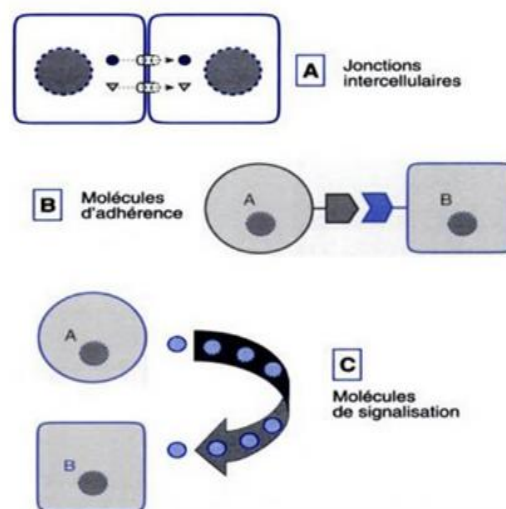


Figure 49 : Communication cellulaire.

I.2. Communication cellulaire par l'intermédiaire des molécules de signalisation

Les molécules de signalisation sont des substances chimiques d'origine cellulaire, capables de jouer le rôle de messagers en mettant en communication deux cellules plus ou moins distantes l'une de l'autre. Les molécules de signalisation peuvent appartenir à diverses familles de substances biochimiques (neurotransmetteurs, hormones et neurohormones, cytokines, immunoglobulines, eicosanoïdes (dérivés de l'acide arachidonique), gaz (NO, CO) (Figure 49 (C)).

On distingue divers types de communication cellulaire selon la nature des cellules qui émettent et/ou qui reçoivent le signal moléculaire, et la disposition de ces cellules les unes par rapport aux autres (Figure 50).

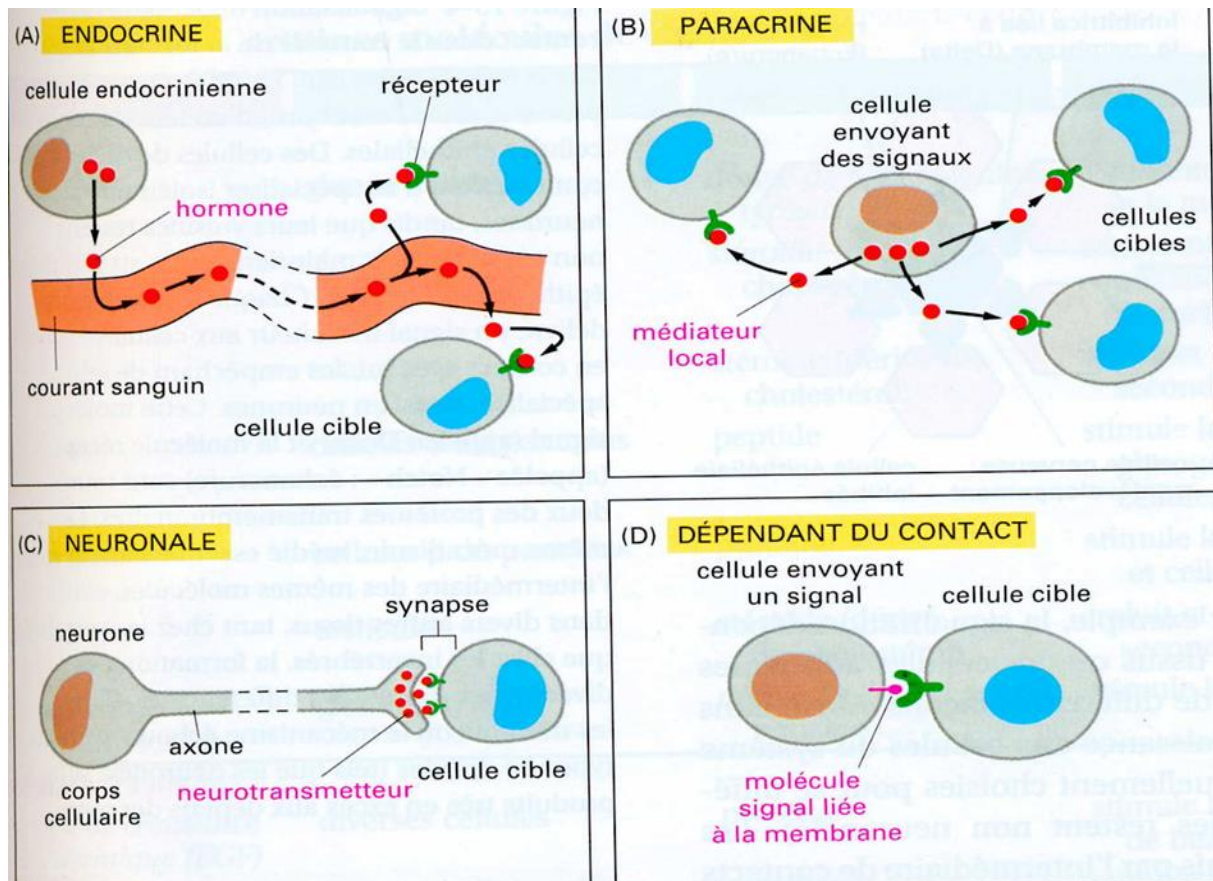


Figure 50 : Communication cellulaire par l'intermédiaire des molécules de signalisation.

I.2.1. Communication endocrine : Elle permet de relier, par des signaux chimiques, des cellules situées à distance les unes des autres. Les molécules de signalisation sont des hormones. Elle utilise la circulation sanguine pour atteindre la

cellule cible à partir de la cellule émettrice. Par définition, les cellules émettrices appartenant aux glandes endocrines. Les cellules cibles peuvent, dans certains cas, se comporter comme de véritables cellules émettrices en synthétisant d'autres hormones. Les nouvelles hormones peuvent agir soit sur la première cellule émettrice (principe de rétroaction), soit sur une autre cellule cible (action en cascade) (Figure 50 (A)).

I.2.2. Communication paracrine : C'est un moyen de communication utilisé par des cellules voisines, dont la proximité rend l'inutilité de l'utilisation de la circulation sanguine. Les molécules signales agissent comme médiateurs locaux (c.-à-d. elles diffusent localement dans le milieu extracellulaire restant au voisinage de la cellule qui les secrètes) (Figure 50 (B)).

Exemple 1 : La communication entre cellules endothéliales et cellules du muscle lisse vasculaire est paracrine en utilisant le mono-oxyde d'azote (NO).

Exemple 2 : Beaucoup de molécules signal qui contrôlent l'inflammation au siège d'une infection ou la prolifération cellulaire lors de la guérison d'une plaie, agissent de cette façon.

I.2.3. Communication neurocrine : Elle est semblable à la communication paracrine, car elle permet également de connecter deux cellules voisines. Les principaux points de différences concernent le lieu où s'effectuent l'émission et la réception du signal, ainsi que les types de cellules impliquées. En effet la communication neurocrine doit survenir à un endroit bien précis qui est la synapse (Figure 50 (C)). De plus, ce type de communication ne s'établit qu'entre deux cellules nerveuses (synapse neuroneuronale) ou entre une cellule nerveuse et une cellule musculaire (synapse neuromusculaire). Cette communication est bien orientée de la cellule présynaptique vers la cellule postsynaptique.

I.2.4. Communication autocrine : Dans ce cas le signal agit sur la cellule qui lui a donné naissance. Ce mécanisme est utilisé parfois dans des processus d'amplification du signal (rétrocontrôle positif). Cependant, la communication autocrine est le plus souvent impliquée dans des boucles de rétroaction négative lorsqu'un signal agit en inhibant sa propre synthèse, ce qui permet de réguler leur propre activité en fonction des besoins et effets physiologiques obtenus. Ce type de

communication n'est possible que si la cellule exprime aussi le récepteur spécifique du signal qu'elle synthétise (Figure 51).

I.2.5. Communication intracrine : Est une forme particulière de la communication autocrine. Dans ce cas, le signal ne sort pas de la cellule qui le synthétise et agit sur elle en se liant à un récepteur intracellulaire (Figure 51).

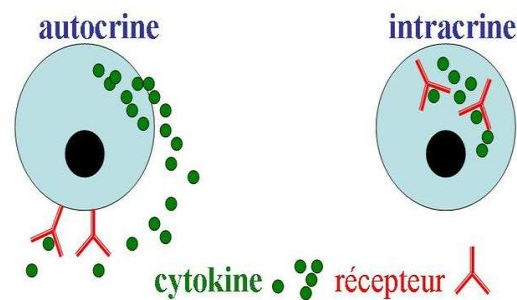


Figure 51: Communication autocrine et communication paracrine.

II. Signalisation inter- et intracellulaire

II.1. Molécules signal

Une cellule typique d'un organisme multicellulaire est exposée à des centaines de molécules signales différentes. Celles-ci peuvent être libres dans le liquide extracellulaire, ou être attachées à la matrice extracellulaire, ou être liées à la surface des cellules voisines. La cellule doit répondre sélectivement à ce mélange de signaux, écartant certains et réagissant à d'autres, selon la fonction spécialisées de la cellule.

Pour qu'une cellule réagisse à une molécule signale, il faut tout d'abord qu'elle possède un récepteur pour cette molécule.

Un signal en se liant à un type de récepteur protéique peut entraîner une multitude d'effets dans la cellule cible ; la forme, le mouvement, le métabolisme, l'expression génique. Le signal provenant d'un récepteur de surface cellulaire est généralement relayé à l'intérieur de la cellule par un ensemble d'autres composants intracellulaire qui produisent des effets étendus (Figure 52). Ce système de relais intracellulaire et les cibles cellulaires sur lesquelles il agit varient d'un type de cellule spécialisée à un autre, si bien que des cellules différentes répondent de façon différente à un même signal. Ainsi quand une cellule du muscle cardiaque est

exposée au neurotransmetteur (Acétylcholine), il diminue la fréquence de ses contractions ; mais quand une glande salivaire est exposée au même signal, elle sécrète des constituants de la salive (Figure 53).

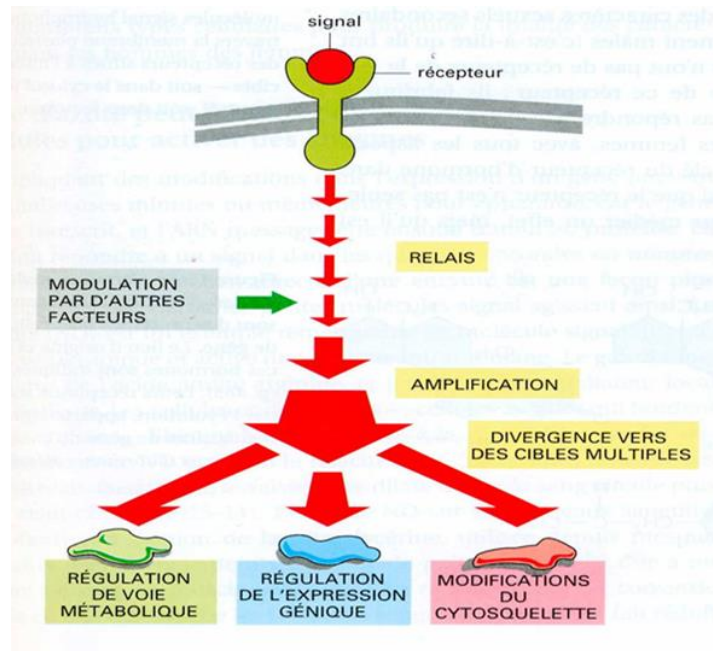


Figure 52 : Effets d'un signal dans une cellule cible en se liant à un type de récepteur protéique.

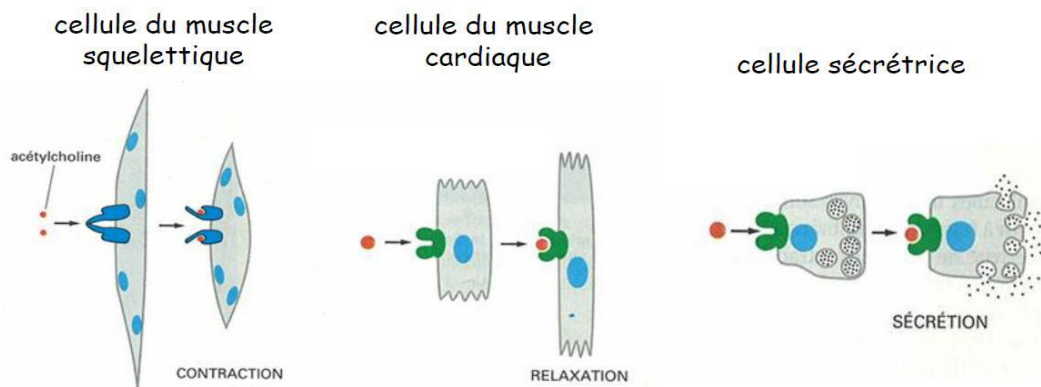


Figure 53 : Effet de l'acétylcholine sur différentes cellules.

II.2. Récepteurs membranaires

La réception du signal débute là où un signal venant de l'extérieur rencontre une molécule cible (récepteur) appartenant à la cellule cible. Le récepteur effectue la première étape de transduction du signal. Il reçoit le signal extérieur et il génère en réponse un nouveau signal intracellulaire. Dans ces processus, le message est transmis d'un jeu de molécule de signalisation intracellulaire à un autre, chacun

provoquant à son tour la production du jeu suivant, jusqu'à ce qu'une enzyme métabolique soit activée, que l'expression d'un gène soit déclenchée, ou que le cytosquelette soit mis en action.

Ces chaînes de relais ou cascades de signalisation ont plusieurs fonctions cruciales :

1. Elles transfèrent physiquement le signal de l'endroit où il est reçu à la machinerie cellulaire qui fabriquera la réponse ;
2. Elles transforment le signal en une forme moléculaire capable de stimuler cette réponse ;
3. Dans la plupart des cas, les cascades de signalisation amplifient aussi le signal reçu, le rendant plus fort si bien que peu de molécules signal intracellulaire suffisent pour évoquer une grande réponse ;
4. Les cascades de signalisation peuvent distribuer le signal de façon à influencer parallèlement plusieurs processus : le signal peut diverger à n'importe quelle étape de la voie, et être relayé jusqu'à un certain nombre du flux d'information et donnant naissance à une réponse complexe ;
5. Enfin chaque étape de la cascade est ouverte à l'action d'autres facteurs, si bien que la transmission du signal peut être modulée en fonction des conditions prévalant dans la cellule, ou hors d'elle.

II.3. Nature des molécules signal

Les molécules signal extracellulaires se répartissent en deux classes qui correspondent à deux sortes de récepteurs fondamentalement différents.

La première classe est la plus importante, elle est constituée de molécules trop volumineux et trop hydrophiles pour pouvoir passer ou traverser la membrane plasmique de la cellule cible. Les récepteurs de ces molécules doivent siéger dans la membrane et relayer le message à travers la membrane (Figure 54).

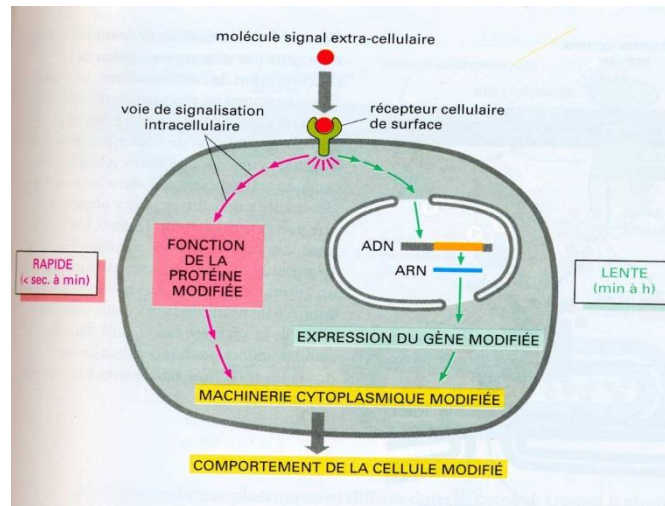


Figure 54: Récepteur extracellulaire.

La seconde classe, est celle des molécules suffisamment petites et hydrophobes pour diffuser à travers la membrane plasmique. Les récepteurs de ces molécules signal siègent à l'intérieur de la cellule cible, et ils sont généralement soit des protéines régulatrices de gène, soit des enzymes (Figure 55).

Les molécules signal hydrophobes les mieux connues sont les hormones stéroïdes (cortisol, estradiol et la testostérone) et les hormones thyroïdiennes telles que la thyroxine. Toutes celles-ci traversent la membrane plasmique de la cellule cible, et se lient à des récepteurs protéiques cytosoliques et nucléaires. Les récepteurs de ces hormones sont des protéines régulatrices de gènes présentes sous forme inactive dans la cellule non stimulée. Quand son hormone se lie à lui, le récepteur protéique subit une profonde modification de conformation qui le rend capable de se lier à sa séquence régulatrice correspondante dans l'ADN ; il peut alors promouvoir ou inhiber la transcription d'un jeu sélectionné de gènes.

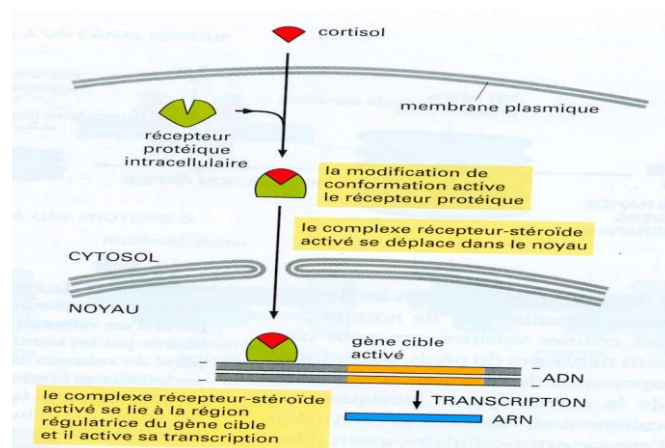


Figure 55: Récepteur intracellulaire.

Exemple : la testostérone agit chez le fœtus et à la puberté comme signal de développement des caractères sexuels males. De très rares individus sont généralement males (XY) mais n'ont pas de récepteur de la testostérone par suite d'une mutation du gène de ce récepteur ; ils fabriquent l'hormone mais leur cellules ne peuvent pas répondre à celle-ci, la séquence est qu'ils se développent comme des femmes, avec tous les aspects de celles-ci.

RQ : Les récepteurs du cortisol et de certains hormones stéroïdes sont localisés dans le cytosol ; ceux d'autres molécules signal appartenant à cette famille sont déjà localisés dans le noyau.

Les récepteurs impliquant des modifications dans l'expression d'un gène, peuvent demander de nombreuses minutes ou même heures pour apparaître. Là où une cellule doit répondre à un signal dans les quelques secondes ou minutes qui suivent sa réception, l'activation directe d'une enzyme est une façon plus rapide de produire un effet. Le NO est un exemple remarquable de molécules signal qui traverse la membrane plasmique et active une enzyme intracellulaire. Le gaz dissous est fabriqué à partir de l'acide aminé arginine, et il agit comme médiateur local dans beaucoup de tissus. Les cellules endothéliales (cellules aplatis qui bordent chaque vaisseau sanguin) libèrent le NO en réponse à la stimulation par les terminaisons nerveuses, et ce NO entraîne le relâchement des cellules musculaires de la paroi du vaisseau, faisant que le vaisseau se dilate et que le sang circule plus librement de celle-ci.

L'effet de NO sur les vaisseaux sanguin fournit une explication à l'action de la nitroglycérine, utilisé depuis presque de 100 ans pour traiter les patients atteints d'angine de poitrine (douleur dû à un apport insuffisant de sang au muscle cardiaque). La nitroglycérine est convertie dans l'organisme en NO, qui relâche les vaisseaux sanguins, et qui de ce fait réduit la charge de travail du cœur et aussi, par voie de conséquence, réduit les besoins en oxygène du muscle cardiaque.

Le NO dissous diffuse rapidement hors de la cellule qui le fabrique pour atteindre les cellules voisines. Il n'agit que localement en raison de sa courte demi-vie (5 à 10S) dans l'espace extracellulaire, avant d'être converti en nitrate et nitrite en réagissant avec l'oxygène et l'eau). Une fois dans la cellule cible, la cible la plus

habituelle de NO est l'enzyme guanylate cyclase, qui catalyse la formation de GMPc à partir de GTP. Le GMPc est une petite molécule de signalisation intracellulaire qui active une courte voie de signalisation intracellulaire pour entraîner la réponse cellulaire. La structure et le mécanisme d'action de GMPc est très semblable à ceux de l'AMPc.

III. Transduction du signal à partir des récepteurs membranaires

III.1.Introduction

Toutes les molécules informatives hydrophiles, y compris les neurotransmetteurs, les hormones protéiques, ainsi que quelques protéines liposolubles, se fixent sur un récepteur spécifique situé à la surface des cellules cibles qu'elles influencent. Ces récepteurs protéiques de surface agissent comme des transducteurs des signaux.

Il existe trois classes de récepteur protéique de surface : les récepteurs couplés aux canaux ioniques, aux protéines G et à une activité enzymatique (Figure 56).

III.2. Différentes classes de récepteurs protéiques de surface

III.2.1. Récepteurs couplés aux canaux ioniques : Egalement appelés canaux ioniques à ouverture contrôlée par un transmetteur, ils sont impliqués dans la transmission rapide des signaux dans la synapse entre des cellules électriquement excitables. Ce type de transmission se fait par l'intermédiaire d'un petit nombre de neurotransmetteurs qui ouvrent ou ferment transitoirement les canaux ioniques sur lesquels ils se fixent, modifiant brièvement la perméabilité de la cellule post-synaptique. Ces récepteurs appartiennent à une famille de protéines homologues, qui possèdent plusieurs segments transmembranaires.

III.2.2. Récepteurs couplés aux protéines G : Contrôlent indirectement l'activité d'une protéine cible spécifique liée à la membrane plasmique, qui peut être une enzyme ou un canal ionique. L'interaction entre les récepteurs et les protéines cibles (enzyme ou canal ionique) est transmise par l'intermédiaire d'une 3eme protéine, appelée protéine de régulation trimérique liant le GTP (protéine G).

L'activité de la protéine cible modifie soit la concentration d'un ou de plusieurs médiateurs intracellulaire (si la protéine cible est une enzyme), soit la perméabilité ionique de la membrane plasmique (si la protéine cible est un canal ionique). Les médiateurs intracellulaires agissent à leurs tours, pour modifier le comportement d'autres protéines cibles dans la cellule. Tous les récepteurs couplés aux protéines G appartiennent à une grande famille de protéines homologues, qui possèdent 7 segments transmembranaires.

III.2.3. Récepteurs couplés à des enzymes : Agissent soit directement comme des enzymes, soit sont associés à des enzymes. La plupart d'entre eux possèdent un seul segment transmembranaire. Les sites de fixation au ligand sont situés à l'extérieur de la cellule et les sites catalytiques à l'intérieur de la cellule. Cette classe de récepteur est hétérogène, bien que la grande majorité soit des protéines kinases qui phosphorylent des protéines spécifiques dans la cellule.

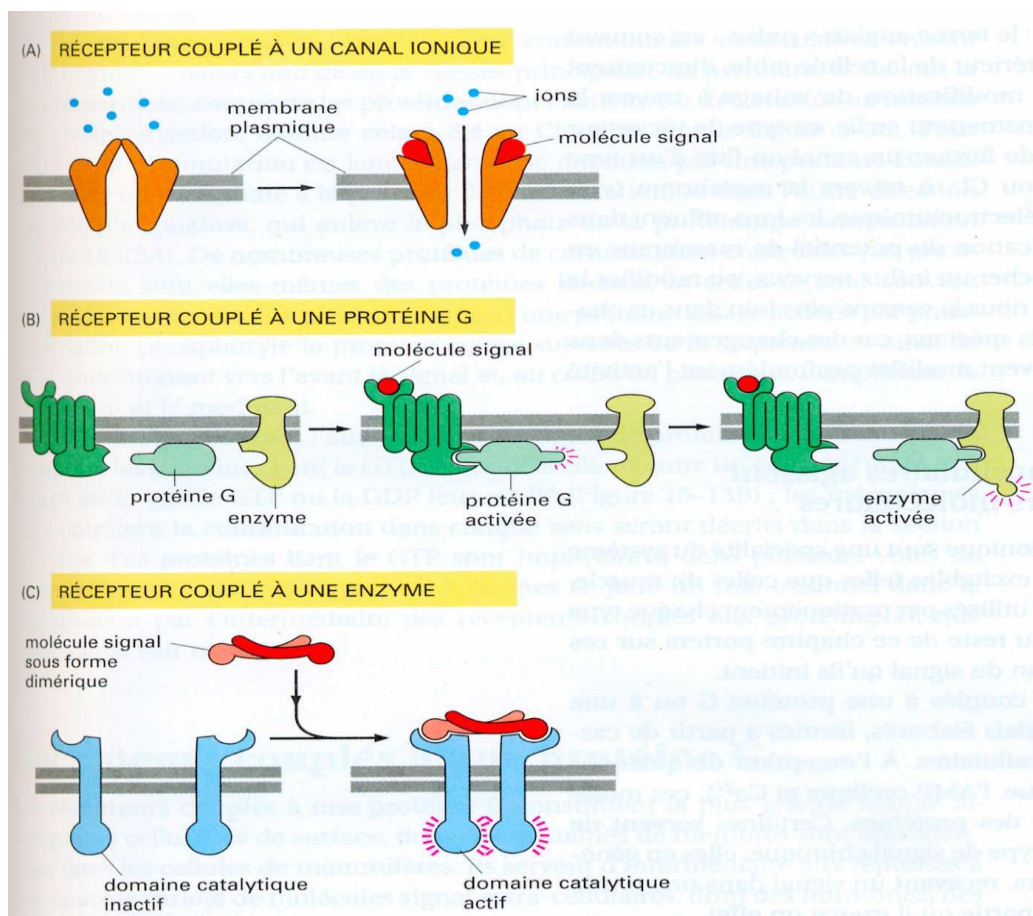


Figure 56 : Les différentes classes de récepteur protéique de surface.

III.3. Activation des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et aux enzymes

Les signaux reçus à la surface d'une cellule par les deux classes de récepteurs, couplés aux protéines G et aux enzymes, sont souvent transmis au noyau, où ils modifient l'expression de gènes spécifiques et donc le comportement de la cellule. Des systèmes complexes de protéines de transmission intracellulaire en constituent le relais.

En réponse au signal, ces protéines sont soit phosphorylées par des protéines kinases, soit fixent le GTP. Dans les deux cas, elles gagnent un ou plusieurs groupement phosphate dans leur état d'activation et perdent ces groupements phosphates lorsque le signal décroît. A leur tour, elles entraînent généralement la phosphorylation de protéines en aval, constituant ainsi une cascade de phosphorylation.

Les cascades de phosphorylation sont médiées par deux types principaux de protéines kinases ; les kinases à sérine/thréonine, qui phosphorylent des protéines sur des résidus sérines et moins souvent sur des thréonines, et les kinases tyrosines, qui phosphorylent les protéines sur des résidus tyrosines.

RQ : pour les tyrosines kinases (petite minorité) jouent un rôle essentiel dans la transmission des récepteurs couplés aux enzymes.

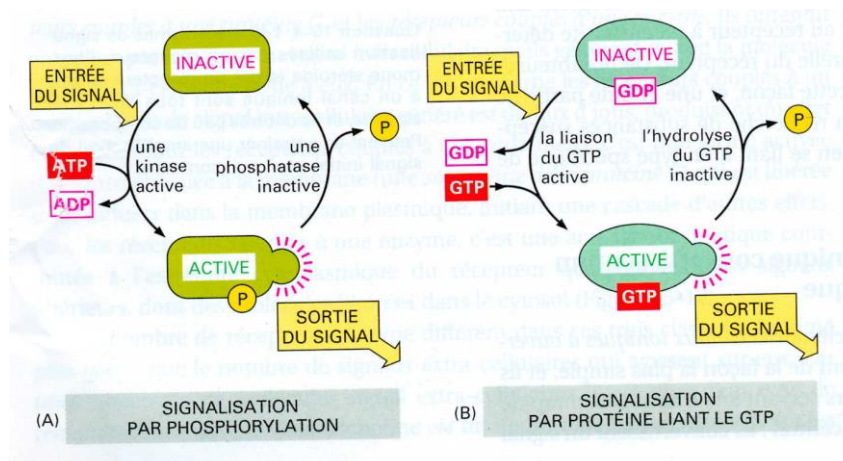


Figure 57: Activation et inactivation des récepteurs membranaires.

III.4. Récepteurs couplés à une protéine G

Les récepteurs couplés à une protéine G, servent d'intermédiaires aux réponses à une énorme variété de molécules signal extracellulaire. Ces molécules sont aussi diverses dans leur structure qu'elles le sont dans leur fonction.

III.4.1. Stimulation des récepteurs couplés à une protéine G

Quand une molécule de signalisation extracellulaire se lie à un récepteur transmembranaire, le récepteur subit un changement de conformation qui modifie la face intracellulaire du récepteur, le rendant capable d'interagir avec une protéine G localisée du côté intracellulaire de la membrane plasmique.

Il y'a plusieurs variétés de protéines G, chacune est spécifique d'un jeu particulier de récepteur et d'un jeu particulier de protéines cibles en aval. Cependant toutes ces protéines G ont une structure généralement similaire et fonctionnent de la même façon. Elles sont composées de trois sous unités protéiques α , β , γ . A l'état non stimulé, la sous unité α est liée au GDP, et la protéine G est inactive. Quand un ligand extracellulaire se lie au récepteur, le récepteur stimulé se lie à la protéine G, et l'active en amenant la sous unité α à éjecter son GDP lié et à le remplacer avec du GTP, et en un complexe $\beta\gamma$ détaché et activé, donnant ainsi naissance à deux molécules séparées qui peuvent diffuser librement le long de la membrane plasmique. Les deux parties activées de la protéine G (la sous unité α et le complexe $\beta\gamma$) peuvent toutes deux interagir directement avec des cibles localisées dans la membrane plasmique, qui peuvent elles même relayer le signal vers encore d'autres destinations. Plus durable est la liaison aux cibles d'une sous unité α ou $\beta\gamma$, plus fort et plus durable sera le signal relayé.

La période durant laquelle les sous unités α et $\beta\gamma$ restent dissociées et disponibles pour agir, est limitée par le comportement de la sous unité α . la sous unité α a une activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP (GTPase), et elle hydrolyse au bout d'un certain temps le GTP en GDP ; la sous unité α se réassocie alors à un complexe $\beta\gamma$, et la transmission du signal est interrompue. Ceci survient en général quelques secondes après que la protéine G a été activée.

Il y'a aussi des mécanismes qui interrompt la transmission du signal, cela offre autant de possibilité de contrôle, et autant de danger de mésaventure.

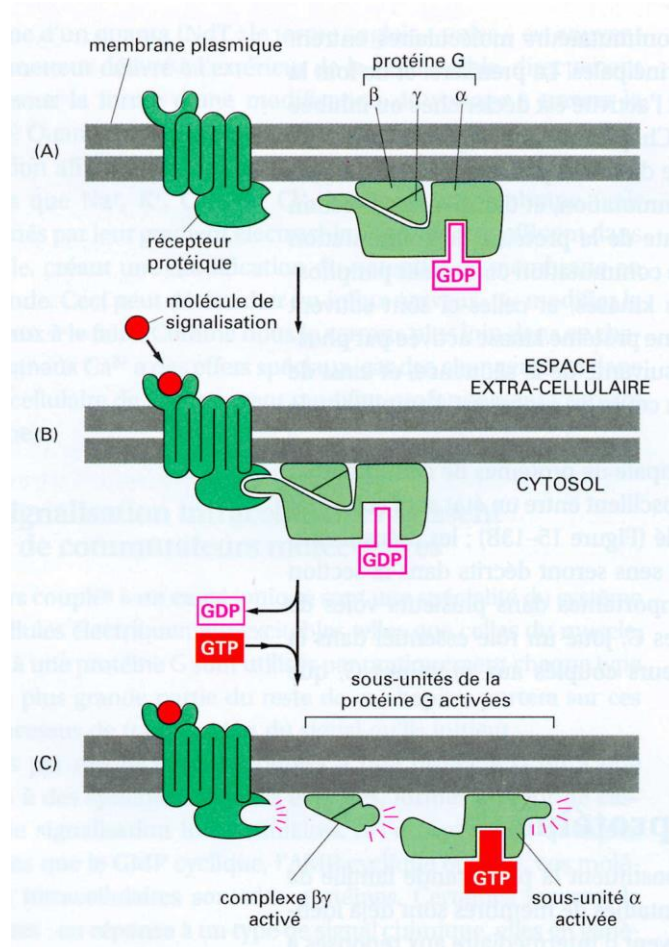


Figure 58: Stimulation des récepteurs couplés à une protéine G

Exemple : Le choléra : maladie due à une bactérie qui se multiplie dans l'intestin, où elle produit une toxine cholérique. Celle-ci pénètre dans les cellules bordant la lumière intestinale, et elle modifie la sous-unité α d'une protéine G de façon telle que cette sous-unité ne peut plus hydrolyser son GTP lié. La sous-unité altérée reste ainsi indéfiniment dans un état actif, continuant à transmettre un signal à ses protéines cibles. Cela entraîne dans les cellules intestinales une sortie permanente de Na^+ et d'eau dans la lumière d'intestin, déterminant une diarrhée catastrophique et une déshydratation conduisant souvent à la mort, sauf si des mesures sont prises pour remplacer l'eau et les ions perdus.

III.4.2. Protéines cibles des protéines G

Les protéines cibles des sous unités des protéines G sont soit des canaux ioniques, soit des enzymes liées à la membrane plasmique. Les cibles différentes sont concernées par des types différents de protéines G (environ 20 protéines G différentes), et ces protéines G variées, sont-elles même activées par des classes différentes de récepteurs cellulaires de surface.

III.4.3. Contrôle de canaux ioniques membranaires par une protéine G : La contraction musculaire cardiaque est contrôlée par deux types de fibres nerveuses ; un type accélère le rythme cardiaque, l'autre le ralentit. Les fibres nerveuses qui ralentissent le cœur le font en libérant de l'acétylcholine, qui se lie aux récepteurs couplés à une protéine G des cellules du muscle cardiaque. Quand l'acétylcholine se lie à son récepteur couplé à une protéine G, cette dernière est activée, se dissociant en une sous unité α et en complexe $\beta\gamma$. Dans cet exemple, le complexe $\beta\gamma$ est le composant actif de la signalisation ; il se lie à la face intracellulaire du canal K^+ de la membrane plasmique de la cellule myocardique, imposant au canal une conformation ouverte, cela altère les propriétés électriques de la cellule du muscle cardiaque, l'amenant à se contracter moins souvent. L'action du complexe $\beta\gamma$ se termine, et le canal du K^+ se referme lorsque la sous unité α est inactivé (par hydrolyse de son GTP), et quelle se réassocie pour former une protéine G trimérique inactive.

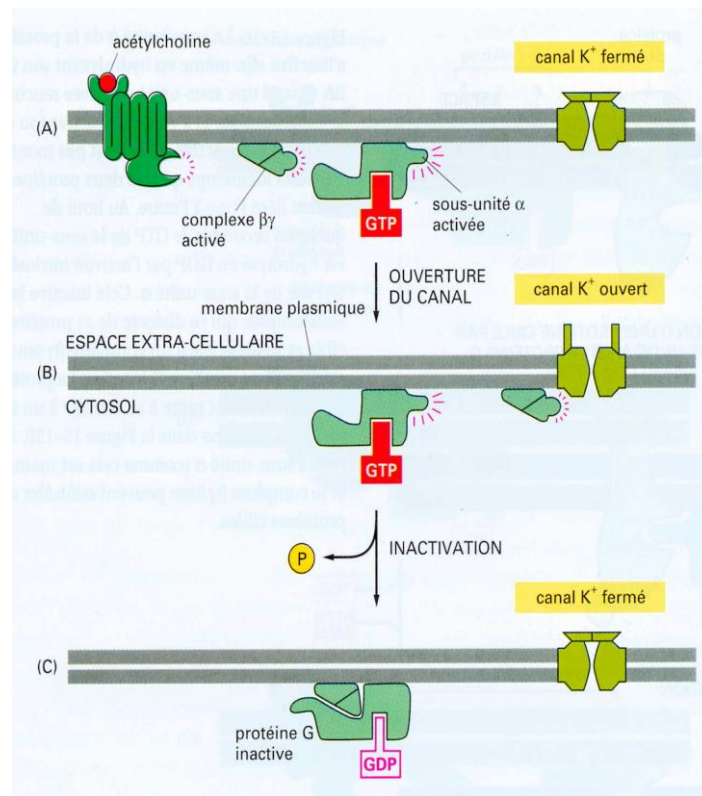


Figure 59 : Contrôle de canaux ioniques membranaire par une protéine G.

III.4.4. Activation des enzymes membranaires par les protéines G : Les interactions des protéines et des canaux ioniques entraînent une modification immédiate de l'état et du comportement de la cellule. Leurs interactions avec les enzymes cibles membranaires ont des conséquences plus complexes, conduisant à la production de nouvelles molécules de signalisation intracellulaire.

Les enzymes cibles des protéines G les plus fréquents sont l'adénylate cyclase, responsable de la production de l'AMPc, et de la phospholipase C, responsable de la production des petites molécules de signalisation que sont l'inositol triphosphate et le diacylglycérol. Ces deux enzymes sont activées par des types de protéines G différentes, couplant la production de petites molécules de signalisation intracellulaire à différents signaux extracellulaire.

III.4.4.1. Voie de l'AMPc : Le plus souvent, la sous unité α activée de la protéine G commute sur l'adénylate cyclase, entraînent une augmentation soudaine de la synthèse de l'AMPc à partir de l'ATP qui est toujours présent dans la cellule. Une seconde enzyme, l'AMP cyclique phosphodiéstartase, qui est continuellement

active, rompt rapidement l'AMPc en AMP ordinaire. Parce que l'AMPc est ainsi rapidement dégradé dans la cellule, sa concentration peut se modifier en réponse à des signaux extracellulaires, s'élevant ou s'abaissant dix fois en l'espace de quelques secondes. L'AMPc est soluble dans l'eau. Alors peut transporter le signal de la membrane où il est synthétisé à des protéines localisées dans le cytosol, le noyau ou dans d'autres parties de la membrane.

Exemple : Quand nous sommes effrayés ou excités, la surrénale libère l'adrénaline, qui circule dans le sang et se lie à une classe de récepteur couplé à une protéine G (récepteur adrénergique) présents dans de nombreux types de cellule. Les conséquences varient d'un type de cellule à un autre, mais toutes contribuent à préparer le corps à l'action soudaine. Dans le muscle squelettique par exemple, la liaison de l'adrénaline à son récepteur a pour conséquence la stimulation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G, provoquant la synthèse de l'AMPc qui entraîne le catabolisme du glycogène afin de rendre plus de glucose disponible comme combustible pour l'activité musculaire à venir. L'adrénaline agit aussi sur les cellules graisseuses, stimulant la dégradation de triacylglycérol en acide gras, forme immédiatement utilisable comme combustible cellulaire, et peuvent être exporté dans d'autres cellules. L'AMPc exerce ces effets variés principalement en activant une enzyme, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA= Kinase A) ; cette kinase est normalement maintenue inactive dans un complexe avec une autre protéine; la liaison de l'AMPc entraîne une modification de sa conformation, qui libère l'activité enzymatique. La protéine kinase active catalyse alors la phosphorylation des résidus sérines ou thréonines de certaines protéines intracellulaires, modifiant ainsi leur activité. Dans des types cellulaires différentes, des ensembles différents de protéines cibles sont disponibles pour la phosphorylation, ce qui explique pourquoi les effets de l'AMPc varient avec la cellule cible.

Les effets sont rapides dans certains cas, alors que dans d'autres ils sont lents. Dans les cellules des muscles squelettiques par exemple, la kinase A activée phosphoryle des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène. A l'autre extrémité se situent les effets de l'AMPc qui demandent des minutes ou des heures

pour se développer. Une importante classe d'effets lents est celle impliquant des modifications de l'expression génique. Ainsi dans certaines cellules, la kinase A phosphoryle des protéines de régulation de gène activant la transcription de gènes sélectionnés.

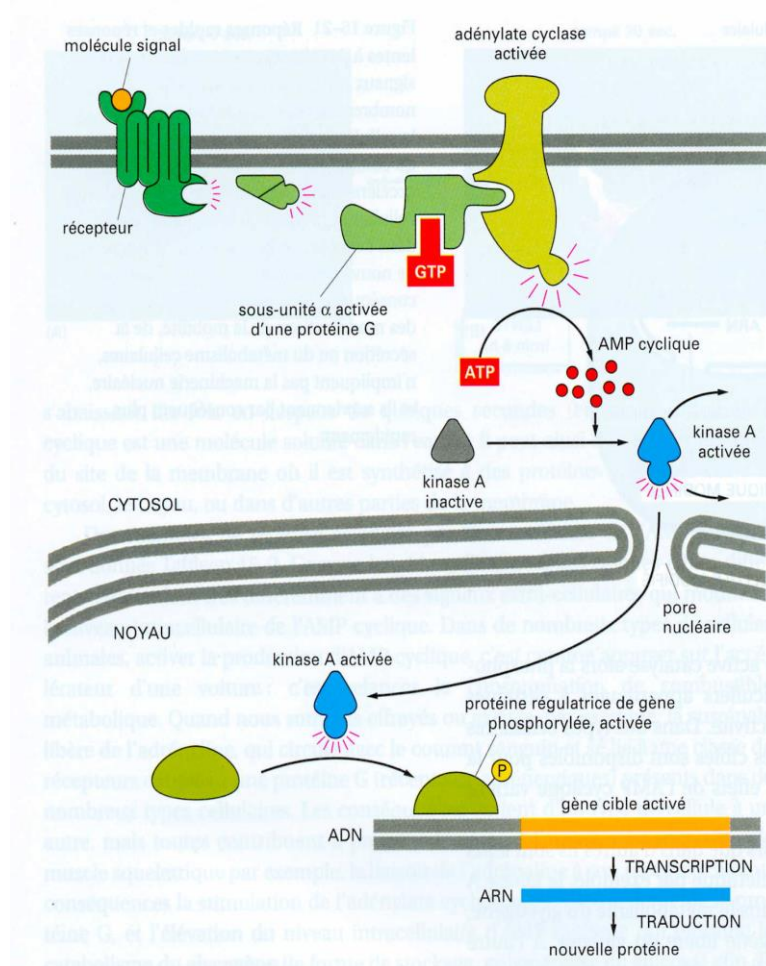


Figure 60 : Voie de l'adénylate cyclase.

III.4.4.2. Voie de la phospholipase C : Parmi les récepteurs couplés à une protéine G connus, plus de 25 exercent leurs effets par l'intermédiaire d'un type de protéine G qui active une enzyme liée à la protéine G qui active une enzyme liée à la membrane, la phospholipase C.

La phospholipase C agit sur un inositol phospholipide membranaire (phospholipide auquel est attaché un inositol), présent en petite quantité dans la moitié interne de la bicouche lipidique de la membrane plasmique. La phospholipase C clive l'inositol phospholipide (Ndt = phosphatidyl inositol 4, 5 diphosphates = PIP₂) en sucre phosphate (inositol 1, 4, 5 triphosphate = IP₃) et en

diacylglycérol (DAG) qui est une queue lipidique du PIP₂, qui reste enchâssée dans la membrane plasmique. Ces deux molécules signales (seconds messagers) jouent un rôle crucial dans la signalisation à l'entrée de la cellule.

L'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP₃) quitte la membrane et diffuse dans le cytosol, quand il atteint le réticulum endoplasmique, il se lie à celui-ci et ouvre les canaux Ca²⁺ de la membrane du réticulum endoplasmique. Le Ca²⁺ stocké dans le réticulum endoplasmique afflue dans le cytosol par ces canaux ouverts, élevant en flèche la concentration cytosolique du Ca²⁺ libre, qui normalement est maintenue très basse.

Le diacylglycérol (DAG) reste attaché à la membrane plasmique, où il contribue à activer une protéine kinase. Celle-ci est appelée protéine kinase C (kinase C= PKC), parce que elle a aussi besoin de lier le Ca²⁺ pour devenir active. Une fois activée, la kinase C phosphoryle un ensemble de protéine intracellulaire qui varie en fonction du type cellulaire. Les principes sont les mêmes que pour la protéine kinase A, encore que la plus part des protéines cibles soient différentes.

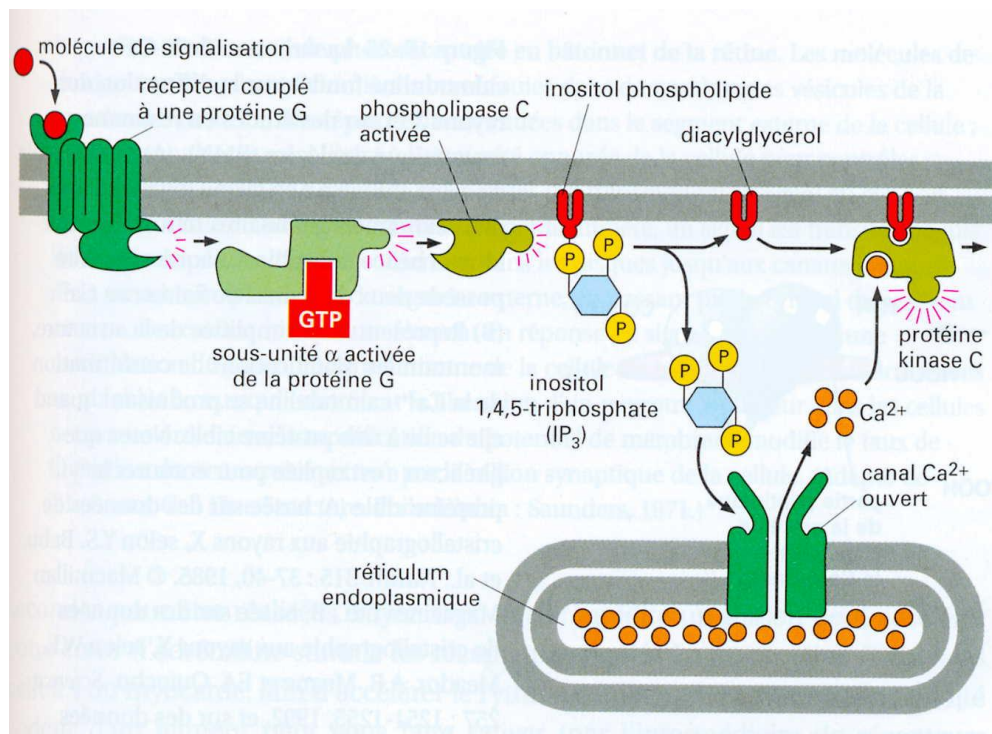


Figure 61 : Voie de la phospholipase C.

IV. Récepteurs couplés aux enzymes

IV.1. Récepteurs-enzymes

Les récepteurs enzymes sont des récepteurs qui lorsqu'ils sont activés par la fixation d'un ligand, développent une activité enzymatique ex: kinases, phosphatases, guanylate cyclase, sphingomyélinases.

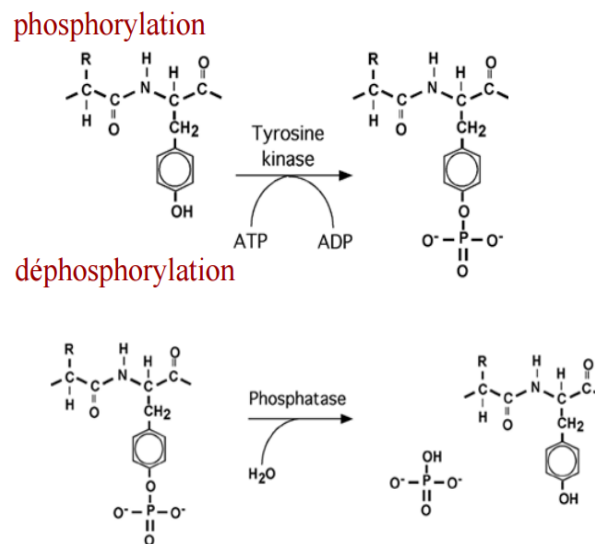


Figure 62: Régulation de l'activité de la tyrosine kinase.

IV.2. Structure et activité enzymatique des récepteurs catalytiques

Chaque monomère d'un récepteur-enzyme possède un seul segment intra membranaire sous la forme d'une hélice α . Les récepteur-enzyme possèdent une extrémité extracellulaire réceptrice du ligand et une extrémité intracellulaire qui possède l'activité catalytique. Deux possibilités :

- Le récepteur agit comme une enzyme (par ex: le récepteur est lui-même une protéine kinase) ;
- Le récepteur est couplé à une enzyme (à une protéine kinase).

En fonction de l'activité enzymatique, on distingue les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs sérine / thréonine kinase, les récepteurs guanylate cyclase etc...

IV.2.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase (ou TKR): C'est la famille la plus importante des récepteurs liés aux enzymes. Ils interviennent principalement dans le contrôle de la croissance et de la différenciation des cellules. Plus de 50 récepteurs à activité tyrosine kinase sont identifiés. Parmi les TKR, à retenir: les récepteurs des facteurs de croissance et hormones comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF : Fibroblast Growth Factor), des facteurs de croissance des cellules endothéliales (VEGF : Vascular Epidermal Growth Factor), des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF : Platelet-Derived Growth Factor), des facteurs de croissance des cellules épithéliales (EGF), l'insuline ou encore les facteurs de croissance de type insuline-like (IGF-1 et IGF-2).

Les récepteurs non actifs, sont généralement des monomères. La fixation du ligand sur le domaine extra cellulaire du récepteur déclenche la dimérisation et l'autophosphorylation des sites tyrosines situées dans la partie cytoplasmique (dans ce cas autophosphorylation croisée) (Figure 63). Cette autophosphorylation active des kinases et recrute de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire, en créant des sites de liaison spécifiques pour des protéines complémentaires qui transmettent des signaux intracellulaires en aval des récepteurs activés. Les sites les mieux connus sont appelés les domaines SH2 (Src-Homology domain 2, domaine homologue à Src : Sarcoma Rous virus: protéine oncogène de virus de sarcome De Rous) (Figure 63).

Les domaines SH2 comprennent environ une centaine d'acides aminés et se lient à des séquences peptidiques courtes contenant des phosphotyrosines (récepteur). Ces domaines se retrouvent sur des protéines comme Grb2 qui est un adaptateur protéique.

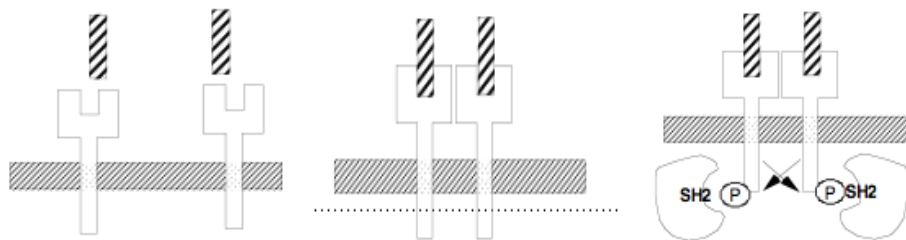


Figure 63: Activation des récepteurs à activité tyrosine kinase par autophosphorylation croisée.

La protéine Ras est une GTPase monomérique qui joue un rôle majeur dans la signalisation des récepteurs à activité tyrosine-kinase. Elle est recrutée par des protéines adaptatrices ayant des domaines SH2 et SH3. Comme toutes les protéines de liaison au GTP, l'activité de Ras dépend de sa liaison au GDP ou au GTP. Ras activée stimule une voie de signalisation impliquée dans la croissance cellulaire et la réponse inflammatoire : la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein kinases*). La voie de PI3K (PI3 kinase) est une autre voie de signalisation importante de survie cellulaire stimulée par Ras.

L'activation de Ras dépend de la protéine Sos (*son of sevenless*), un facteur d'échange des nucléotides guanyliques ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), qui est recrutée au récepteur à activité tyrosine-kinase par la protéine adaptatrice Grb2. Ras-GTP activé stimule la kinase Raf et la voie de MAP kinase ERK (Figure 64).

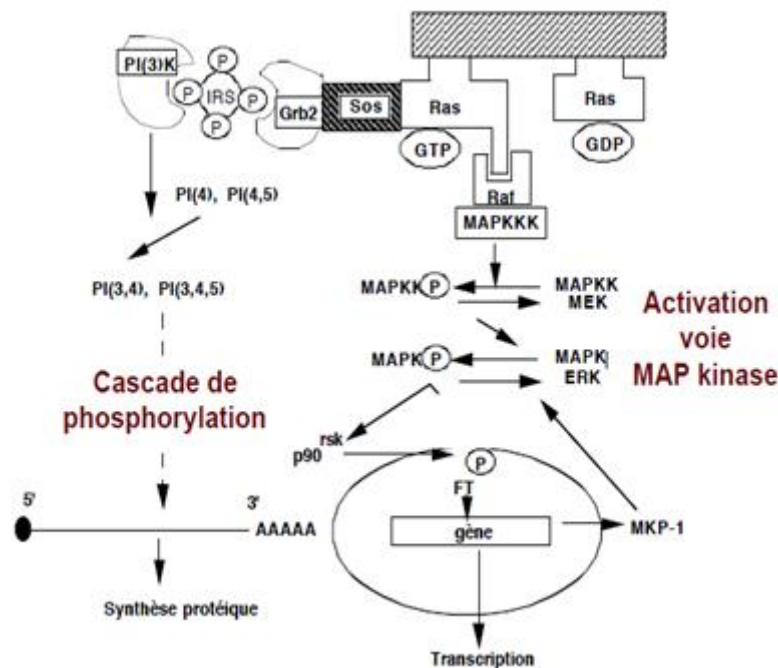


Figure 64 : Activation des voies des MAP-kinases et de PI3 kinase.

Les voies de signalisation intracellulaires

a. Les voies des MAP kinases (ser/threo Kinases)

La famille des MAP kinases comporte plusieurs enzymes interactives organisées en module à trois niveaux d'activation successive (Figure 65). Les trois

voies principales des MAP kinases, définies par les derniers éléments de la cascade qui comportent tous plusieurs isoformes, sont les voies des kinases ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases*), de p38 MAP kinases (avec 4 isoformes dénommés α , β , γ et δ) et de *C-Jun N-terminal kinases* (JNK1, JNK2 et JNK3).

Les MAP kinases sont activées par phosphorylation par des MAP kinase-kinases (MKK ou MAP2K) qui sont elles-mêmes stimulées par des MAP kinase-kinase-kinases (MAP3K) situées les plus en amont de la voie. L'activation des voies MAPK est régulée étroitement (de façon temporelle et spatiale) dans chaque cellule et son inactivation dépend des sérine/thréonine-phosphatases, des tyrosine-phosphatases et des phosphatases à double spécificité (*dual specificity phosphatases DUSP*).

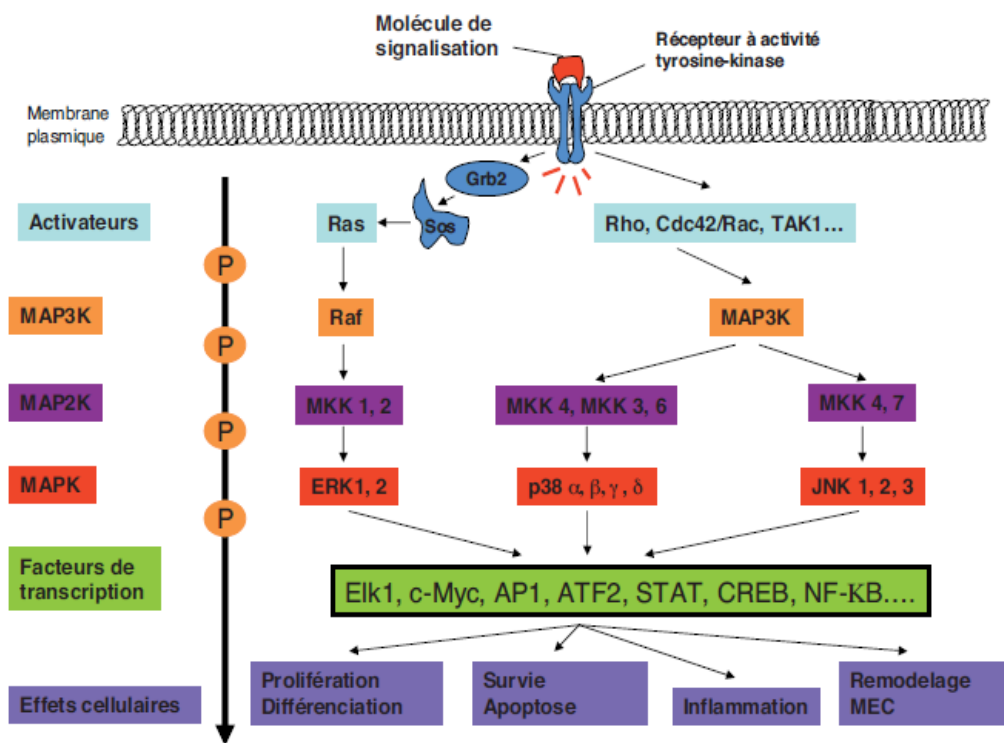


Figure 65 : Voie des MAP kinases.

Les voies des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) sont divisées en trois voies: ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), p38 et JNK (*C-Jun Nterminal kinases*). Ces trois protéines ont plusieurs isoformes et sont les dernières protéines kinases des trois voies respectives. Chaque protéine-kinase est activée par des MAPK kinases (MKK ou MAP2K) spécifiques qui elles-mêmes sont activées par d'autres kinases, les MAPK kinase-kinases (MAP3K). Les MAP3K ont des activateurs spécifiques en fonction du signal extracellulaire initial et du type de cellule.

Les MAP kinases ont une expression ubiquitaire et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. ERK1 et ERK2 régulent habituellement la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Les MAP kinases, p38 et c-JUN sont impliquées dans la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire, etc...

b. La voie de PI3 kinase/Akt

La phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) peut être activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase mais aussi par d'autres types de récepteurs comme les récepteurs couplés aux protéines G. Elle est impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaires. PI3K est classée en plusieurs familles qui contiennent plusieurs isoformes. PI3K activée stimule la phosphorylation des inositol phospholipides membranaires sur le cycle inositol et génère des lipides membranaires appelés PI(3, 4)P2 (phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate) et PI(3, 4, 5)P3 (phosphatidylinositol -3, 4, 5 trisphosphate). Ces phospholipides membranaires sont déphosphorylés par des inositol phospholipides phosphatases (PTEN). PI(3, 4) P2 induite par PI3K peut aussi être converti en IP3 et DAG par une PLC γ activant ainsi les CaM-kinases.

L'activation de PI3K génère un signal qui recrute la protéine-kinase B (ou Akt) à la membrane cellulaire. Celle-ci se lie alors avec la PI(3, 4, 5)P3 et change de conformation permettant son activation par une protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (la PDK1). Akt activé est relâché dans le cytosol où il favorise la survie cellulaire en inhibant des protéines pro-apoptotiques et/ou la transcription des gènes qui les codent (Figure 66).

RQ : Cette voie peut être activée, soit directement par activation du récepteur à activité tyrosine-kinase EGFR (ou autre), soit par l'intermédiaire de la protéine RAS.

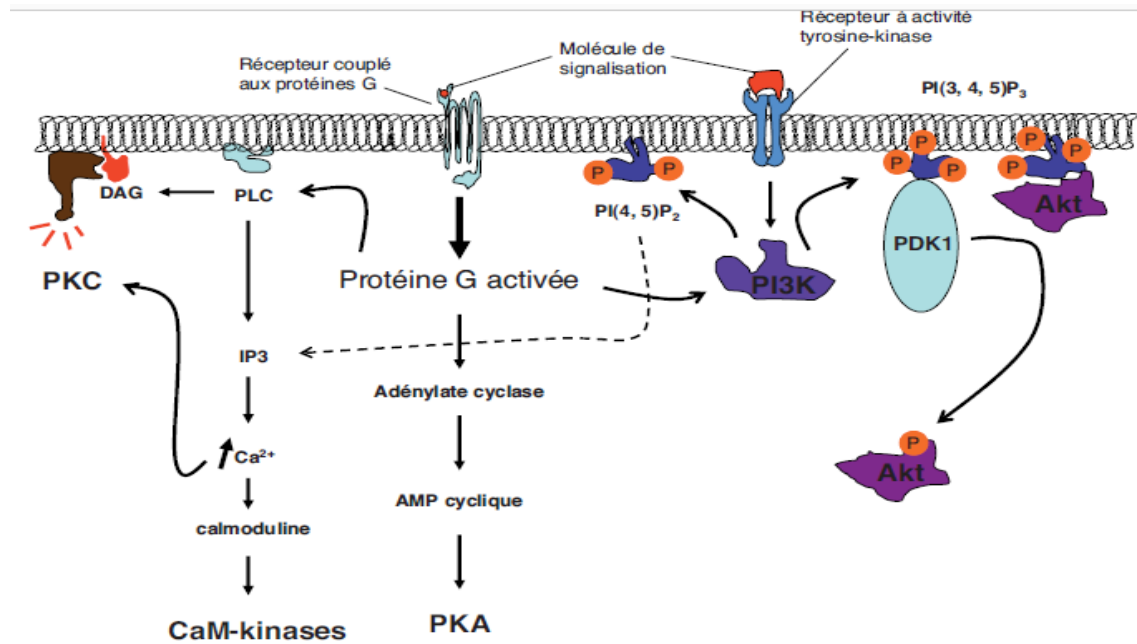


Figure 66 : Quelques voies de signalisations activées par les récepteurs couplés aux protéines G.

La liaison du signal extracellulaire au récepteur couplé aux protéines G active celles-ci. L'activation de la protéine G stimule l'adénylate cyclase qui produit une augmentation de l'AMP cyclique induisant l'activation de la protéine-kinase A (PKA). D'autres récepteurs peuvent induire la phospholipase C (PLC) aboutissant à la production de l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 augmente le Ca^{2+} intracellulaire via le relargage du Ca^{2+} stocké dans le réticulum endoplasmique. Le Ca^{2+} intracellulaire peut stimuler directement la protéine-kinase C (PKC) qui est aussi stimulée par le DAG et/ou se lie à la calmoduline et activer les protéine-kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (CaM-kinases). Les protéines G peuvent aussi activer la phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3) kinase tout comme les récepteurs à activité tyrosine-kinase. PI3K activé induit la production de phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PI (4, 5) P₂) et de (PI(3,4,5)P₃). Ce dernier recrute alors la protéine-kinase B (ou Akt) et la protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (PDK1). Akt phosphorylé par PDK1 se dissocie de PI(3,4,5)P₃ et passe dans le cytosol. Les protéine-kinases PKA, PKB (Akt), PKC et CaM-kinases activent ensuite les protéines/gènes cibles et modifient le comportement de la cellule.

c. La voie JAK/STAT (cas de récepteur associé à une tyrosine kinase)

La voie JAK (*Janus kinase*) est la voie d'activation de nombreuses cytokines telles que l'interféron, l'IL-6, IL-15 et de facteurs de croissance comme l'hormone de croissance et le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*). Les JAK (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques. Elles régulent l'expression de gènes impliqués dans l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaires.

L'activation des JAK stimule la phosphorylation des protéines STAT (*signal transducers and activator of transcription*) qui induisent alors la transcription de gènes cibles. JAK stimule aussi les voies de Ras/MAPK et de PI3K et Akt.

Sept protéines STATs sont actuellement identifiées. Elles possèdent toutes un domaine SH2 qui permet leur liaison sur la tyrosine phosphorylée du récepteur activé (par JAK). Le domaine SH2 permet aussi la formation de dimères (homodimères et hétérodimères) entre les protéines STAT (activées par JAK). Les dimères activés de STAT migrent ensuite dans le noyau nucléaire pour stimuler des gènes spécifiques. La voie des STAT est souvent accompagnée d'un rétrocontrôle négatif. En effet, STAT stimule aussi la production de protéines inhibitrices telle que SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) qui va inactiver JAK, et STAT5 qui par rétrocontrôle inactive la STAT phosphorylée. L'autre mécanisme de désactivation passe par les tyrosine-phosphatases. Ainsi, les JAK sont inhibés par la tyrosine-phosphatase SHP-1 (Figure 67 (a) et (b)).

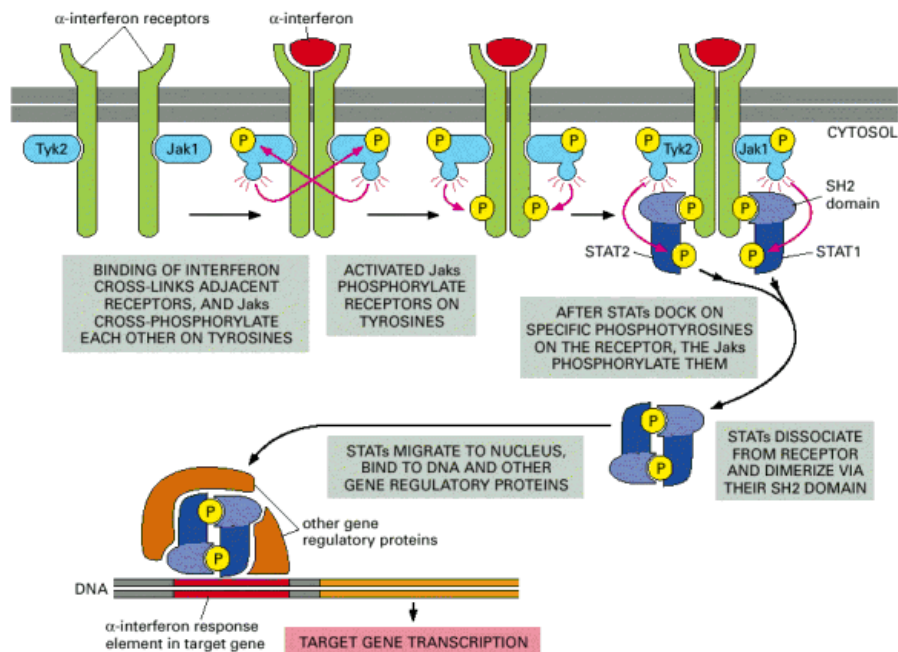


Figure 67 (a): Récepteur associé à une tyrosine kinase (JAK).

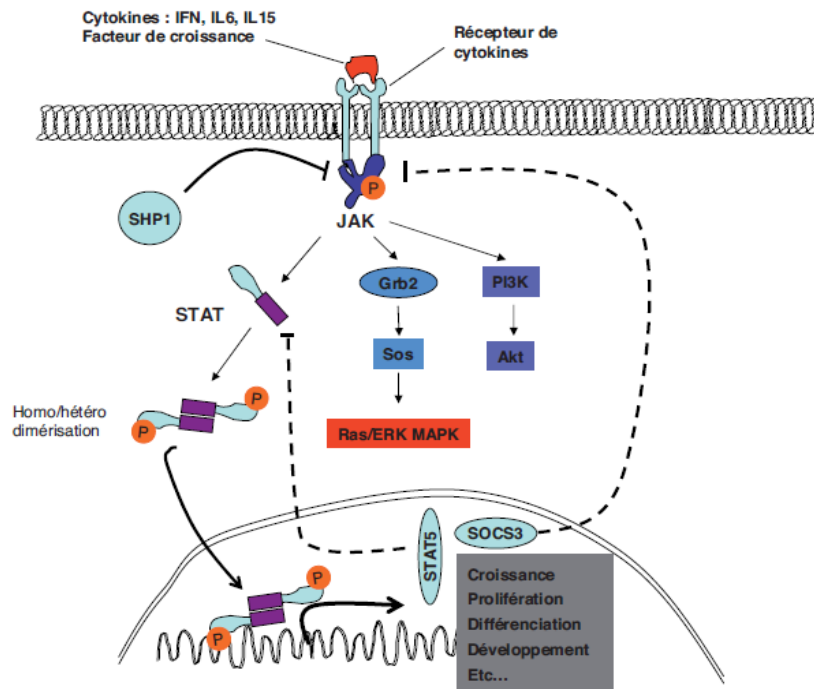


Figure 67 (b) : Voie d'activation de JAK/STAT.

Les *JAK* sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques qui peuvent être activés par les récepteurs des cytokines. *JAK* activé phosphoryle les récepteurs pour créer un site de fixation pour les domaines SH2 *STATS*. Après la fixation de *STATS* au récepteur, l'enzyme *JAK* stimule la phosphorylation et active *STAT* qui peut alors former des homo/hétérodimères. Les dimères de *STAT* migrent dans le noyau nucléaire et stimulent des gènes cibles à l'origine des modifications du comportement cellulaire. *STAT* induit aussi la production de protéines qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie de *JAK* comme les protéines *SOCS3* et *STAT5*. *JAK* peut être inhibé par une tyrosine-phosphatase, la *SHP1*. Par ailleurs, l'activation de *JAK* peut aussi stimuler les voies de *Ras/MAPK ERK1/2* et la voie de *PI3K* et d'*Akt*.

IV.2.2. Récepteurs à activité serine/thréonine kinase

- **La voie de signalisation TGF- β / SMAD**

Les membres de la superfamille du TGF β (TGF β 1 et les isoformes TGF β 2 et TGF β 3, activines et BMP, *bone morphogenic protein*) jouent un rôle très important dans les communications intercellulaires. Le TGF β , en particulier, est une des cytokines les plus étudiées en raison de ses effets dans plusieurs processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la formation de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire ou le développement embryonnaire. La dérégulation de la transduction du signal du TGF β conduit à différentes maladies incluant des fibroses tissulaires (destruction) et est associée à divers cancers. Les

protéines Smad sont les médiateurs intracellulaires de la voie du TGF β et des autres membres de la superfamille du TGF β .

Le TGF- β présent dans la matrice extracellulaire est au sein d'un complexe appelé *large latent complex* (LLC). Une fois libéré, le TGF- β s'associe à la membrane de la cellule avec une faible affinité à un récepteur largement exprimé de type β -glycane. Ensuite, le TGF- β est présenté au récepteur TGF- β RII, ce qui conduit à la formation d'un complexe hétéro-tétramérique entre le TGF- β RII et le TGF- β RI. Le TGF- β RII actif a une activité serine/thréonine kinase, phosphoryle le TGF- β RI, qui lui-même induit le recrutement à la membrane et la phosphorylation des sérines situées dans la partie carboxyterminale de Smad2 et Smad3, lesquelles forment un complexe avec Smad4 qui pénètre dans le noyau et participe à la formation d'un complexe transcriptionnel avec des corépresseurs et des coactivateurs régulant l'expression de gènes varies.

La protéine Smad7 a un effet inhibiteur sur la voie de signalisation et limite la phosphorylation de Smad2/3 par le TGF- β RI. Le TGF- β active d'autres cascades de signalisation, dont TRAF6-TAK1-p38/JNK, RhoA-Rock1 et Par6.

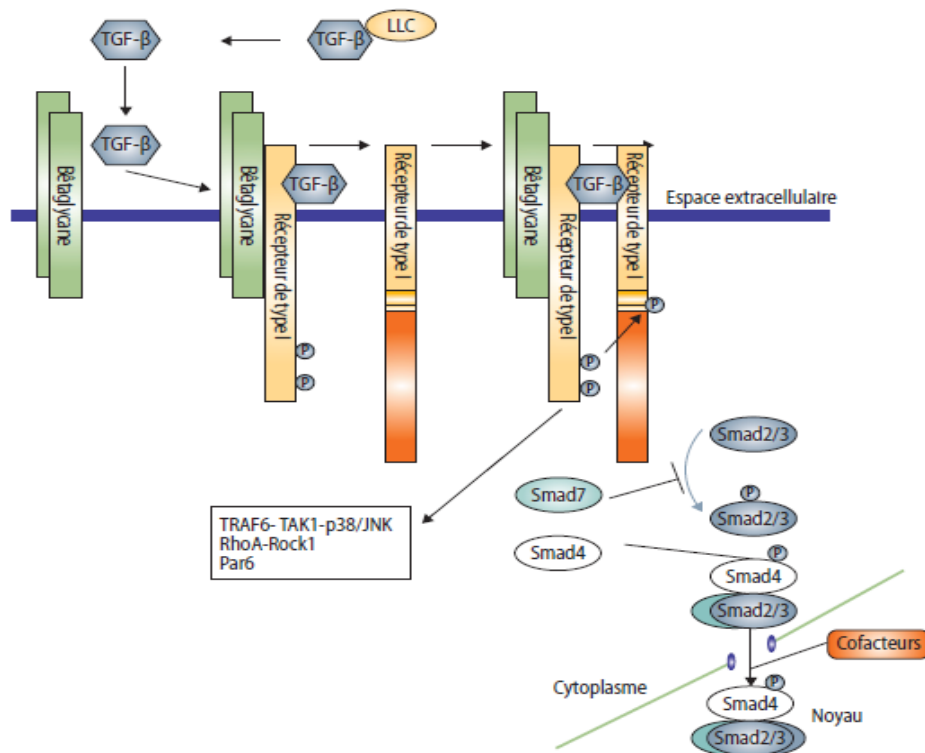


Figure 68 : Voie d'activation du TGF- β .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographies

- Antony, B., 2002. Contrôle de l'assemblage des manteaux protéiques COP par les petites protéines G Arf et Sar. *Médecine/Science*. 18(10): 1012–1016.
- Badadani, M., 2012. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. International Scholarly Research Network ISRN Cell Biology. Volume 2012. 1-11.
- Benmerah, A., Lamaze, C. 2002. Endocytose: chaque voie compte! *Medecine/Sciences*. 18 : 1126-36
- Blouin, C.M. 2013. Endocytose sans clathrine. La voie est libre ! *Médecine/Sciences*. 29 (10): 890-896.
- Boucrot, E., McMahon, H.T. 2011. Initiation de l'endocytose par vésicules de clathrine Des « sculpteurs de membrane » au travail. *Médecine/Sciences*. 27 (2).
- Bouscary, W.D., 2011. La transduction du signal : voies de signalisation oncogéniques accessibles aux thérapies ciblées en oncologie. L. Correspondances en Onco-Hématologie . 6 (4) : 168-183.
- Branger, A., Richer, M.M., Roustel, S. 2007. Microbiochimie et alimentation. Editions Educagri. pp : 237-250
- Cluzeau, T., Robert, G., Puissant. A., Jacquel, A., Luciano F.E., Auberger, P., 2015. Autophagie et hémapathies. *Hématologie*. 21 (8).
- Codogno, P., 2004. Les gènes *ATG* et la macro-autophagie. *Médecine/Sciences*. 20 (8-9) :734- 736.
- Cosson, P., Letourneur, F. 2000. Transport et triage membranaire dans les cellules eucaryotes. *Médecine/Sciences*. 16 (5) : 635-43
- DE Robertis, E.D.P., DE Robertis, E.M.F., 1983. Lysosomes, système digestif cellulaire et peroxysomes In : Biologie cellulaire et moléculaire. Les presses de l'université LAVAL, Quebec. MALOINE S.A. EDITEUR Paris. pp : 320- 340.
- Ea H.K., Lioté F., les communications intercellulaires par les voies de signalisation. L'immunopathologie pour le praticien. Pp : 1-11.
- Favre, G., 2014. Le devenir des thérapeutiques ciblant la voie RAS/RAF/ MEK/ERK en cancérologie : l'exemple des mélanomes. *Bull. Acad. Natle Méd.* 198 (2) : 321-338.
- Galli, T., Martinez-Arca, S., Paumet, F., 2002. Mécanisme de la fusion membranaire. *Médecine/Sciences*. 18 (11)
- Gauthier, J.M., 1999. Les protéines Smad et TGF β : l'heure est à l'intégration... *Médecine/Sciences*. 15 : 1039-41.

- Gilles, R., 2006. Mouvement transmembranaire. In *Physiologie animale*. Edition DE Boeck. Pp 77- 85.
- Goud, B., 1992. Le transport des cellules est contrôlé vésiculaire eucaryotes par des GTP-ases. *Médecine/Sciences*. 8 : 326-33
- Gruenberg, J., 1993. Mécanismes de la régulation du trafic membranaire. *Médecine/Sciences*. 9 : 141- 7.
- Gruenberg, J., Stenmark H., 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 317–323.
- Julien, L.A., Roux, P.P., 2010. mTOR, la cible fonctionnelle de la rapamycine. *Médecine/Sciences*. 26 : 1056-60.
- Karp, G.C., 2010. Les systèmes membranaires du cytoplasme. In *Biologie cellulaire et moléculaire*. 3^{ème} édition. Edition De Boeck. Pp 277-330
- Kierszebaum, A.L., 2006. Glande exocrine in *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*. Edition De boeck.
- Lièvre, A., Laurent-Puig, P., 2010. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro dig*. 2 (1) : 38-42.
- Lüllmann-Rauch, D.R., 2008. Jonction cellulaire ; organites cellulaires et cytosol. In : *Histologie*. Edition De Boek .Pp : 33-65
- Male, D., 2005. Les systèmes réponses immunitaire *In : Immunologie*. Edition DE Boeck. Pp : 67 -71.
- Moreau K. 2011. La biogenèse des autophagosomes perd de son mystère. *Médecine/Sciences*. 27 (12)58:1075-1077.
- Morel, E., 2017. La formation de l'autophagosome Un nouveau défi pour le biologiste cellulaire. *Médecine/Sciences*. 33 : 217-29
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A.P., Raymond ,H E., Faivre S., 2012. Inhibition de la voie de MEK. *La Lettre du Cancérologue*. Vol. XXI (7): 334-344. |
- Petit, J-M., Arico, S., Julien, R., 2013. *Mini-Manuel de biologie cellulaire*. 3^{ème} édition Dunod, Paris,
- Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., Truttmann, A.C., Clarke, P.G.H., 2006. Les deux visages de l'autophagie dans le système nerveux. *Médecine/Sciences*. 25 : 383-390.
- Randall-Demllo, S., Chieppa, M., Rajaraman Eri. 2013. Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Front. Immunol*. 30.

Roberts, R., Ktistakis, N.T., 2013. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays In Biochemistry*. 27: 5517-27.

Rouayrenc, J.F., 1996. La famille des facteurs TGF- β et leur connexion au noyau. *Médecine/Sciences*. 12 : 1265-8.

Singh-cundy, A., 2017. Les membranes cellulaires, le transport et la communication. *Découvrir la biologie*. 2^{ème} édition. Edition De Boeck supérieur. Pp : 84-101.

Tixier-Vidal, A., 2002. Les compartiments membranaires de la cellule eucaryote *Médecine/Sciences* 18 : 1004-1011.

Toussirot, E., 2010. Les voies de Signalisation intracellulaire. *Réflexions Rhumatologiques*. N°129. Tome 14. 1-46.

Verlhac, P., Viret, C., Faure, M., 2015. NDP52, autophagie et pathogènes « *Et le combat cessa faute de combattants* ». *Médecine/Sciences*. 31(6-7) : 594-597.

Vignais, M.L., 1997. Protéines JAK et STAT dans la transmission du signal cellulaire. *Médecine/Sciences*. 13 : 1277-84.

Viollet, B., Foretz, M., 2011. « Se manger soi-même » pour survivre. Régulation coordonnée de l'autophagie par les nutriments. *Médecine/Sciences*. 27 : 569-96.

Voet, D., Voet, J.G., 2007. La vie In : *Biochimie*. 2^{ème} Edition De boeck. Pp 8-39.

Willems, L., Bouscary D., 2011. La transduction du signal : voies de signalisation oncogéniques accessibles aux thérapies ciblées en oncologie. *Correspondances en Onco-Hématologie*. VI (4):168 – 183.

[http://application.sb-roscoff.fr/download/fr2424/enseignement/lbm/LBM2/2012/S3 / Comm%20cell/cours%2004%20octobre.R.%20Y%20kinases.pdf](http://application.sb-roscoff.fr/download/fr2424/enseignement/lbm/LBM2/2012/S3/Comm%20cell/cours%2004%20octobre.R.%20Y%20kinases.pdf)

http://monsterddl.free.fr/CD%20M%E9decine%202006-2007/Biocell/PL_Sys_Endom.pdf

<http://sebastien.tronel.free.fr/Physiologie/Transduction%20du%20signal.pdf>

http://umvf.omsk-osma.ru/premannee/PELLETIER_Laurent/PELLETIER_Laurent_P07/PELLETIER_Laurent_P07

http://virologie.free.fr/documents/virologie/03-transport_intracell_prot/transport_intracell_prot3.pdf

http://www.cri-et.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_7

<https://www.ebiologie.fr/cours/s/97/transfert-des-proteines-dans-les-membranes-et-organites>