

UE1 Bases Moléculaires et Cellulaires des Pathologies
Pr Hélène Cavé
Le 26/09/2017 de 15h30 à 17h30
Ronéotypeur : Sophie Boudot
Ronéolecteur : Jessica Ly

Cours 1 (1^{ère} partie) : Mécanismes moléculaires de la transduction des signaux : le métabolisme de l'information

L'UE1 est composée de 2 parties : la biochimie et biologie moléculaire enseignées par le Pr Cavé et la biologie cellulaire par le Pr Larghero. Cette UE a pour objectif de nous fournir les bases biologiques nécessaires à la compréhension des manifestations, mécanismes et traitements des pathologies. En bref, la biologie va nous permettre de comprendre et d'expliquer les maladies et leurs traitements aux patients.

*Attention avec l'UE1 qui a fait l'objet de beaucoup de rattrapages les années précédentes. La présence en amphi est vivement conseillée par le professeur.
9 cours magistraux et 2 ED seront dispensés.*

Concernant l'épreuve, elle dure désormais 2 heures et demande pour les questions rédactionnelles un bon esprit de synthèse, une bonne compréhension du cours et de la réflexion.

Questions rédactionnelles [notation /15] (75%)

Biochimie et Bio Mol : [notation /10]

- *Question rédactionnelle*
- *QROCs*
- *Exercice pratique sur donnée expérimentale en lien avec les 2 ED*

Biologie cellulaire : [notation /5]

- *1 question rédactionnelle*

10 QCM (4 Biochimie et Bio Mol, et 6 Biologie cellulaire) [notation /5] (25%)

Les deux premiers cours sont des cours d'introduction à la signalisation.

➔ Comment l'information circule-t-elle de l'extérieur à l'intérieur d'une cellule ?

SOMMAIRE

- I) Introduction
 - A) Généralités
 - B) Comment l'information est transmise à la cellule ?
 - 1) Le passage du ligand
 - 2) La transduction du signal

- II) La transduction du signal
 - A) Les récepteurs à 7TM
 - B) Les commutateurs moléculaires
 - C) Les protéines G
 - D) Les seconds messagers
 - E) Les voies relayant le signal à l'intérieur de la cellule
 - 1) La voie de la PKA (adénylate cyclase, AMPc, PKA)
 - 2) La voie de la PKC (phospholipase C, phosphoinositides, PKC)
 - 3) Le signal calcique

- III) L'extinction du signal des récepteurs à 7TM

- IV) Le choléra : un exemple de pathologie en lien avec la transduction du signal

I) Introduction

A) Généralités

La cellule n'est pas isolée mais elle communique avec l'environnement et les autres cellules afin de constituer un organisme. Elle répond à des signaux spécifiques de son environnement. De fait, la cellule est en permanence soumise à de très nombreuses informations, stimuli. Ces informations sont transmises sous forme de signaux qui sont la plupart du temps des molécules chimiques.

Ces signaux témoignent d'une modification de l'environnement et vont permettre à la cellule de s'adapter en modifiant elle-même son propre comportement en s'engageant par exemple vers la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire...

Les molécules de signalisation sont classées en différents groupes tels que les hormones, les cytokines, les facteurs de croissance, les neuromédiateurs, les ions. La matrice extracellulaire (le milieu même de la cellule) est aussi une source d'information tout comme les stimuli sensoriels : arômes, odeurs, lumière.

Le métabolisme de l'information se déroule en 3 étapes :

- 1) la **détection** du signal par la cellule
- 2) l'**intégration** par la cellule des différents signaux reçus soit une synthèse des différents signaux pour en faire quelque chose de cohérent
- 3) la **traduction d'un signal extérieur en une réponse intracellulaire** appropriée via des modifications biochimiques (changement d'activité enzymatique, expression de gènes, ouverture de canaux ioniques...)

La signalisation est très diversifiée (grand nombre de signaux, signaux différents selon le type et la localisation des cellules) mais la transduction du signal utilise un **nombre réduit de processus fondamentaux**. On va donc pouvoir comprendre un grand nombre de processus à partir de ces processus fondamentaux.

Il existe deux voies de signalisation plus fréquentes :

- la **variation de la localisation intracellulaire des protéines**
- les **modifications post-traductionnelles** (principalement la **phosphorylation/ déphosphorylation**).

La signalisation a une importance en physiologie dans le cas de la régulation de l'homéostasie par exemple mais aussi en pathologie lors d'altération de la signalisation.

B) Comment l'information est transmise à la cellule ? (On se limite ici aux récepteurs membranaires)

Le ligand contenant l'information est reconnu par un récepteur : une protéine de la membrane plasmique (constituée d'une bicouche lipidique). **L'affinité entre le ligand et le récepteur est très élevée** avec une kd (constante de dissociation) de 10^{-10} équivalente à l'affinité enzymatique.

On distingue ensuite deux situations :

1) le passage du ligand dans la cellule

Cela concerne les petites molécules comme les ions, les sucres. Le récepteur peut alors être un canal ionique, un transporteur. Ce phénomène s'applique à l'endocytose et aboutit à **l'entrée d'une nouvelle molécule dans la cellule : le premier messager**.

2) la transduction du signal où le ligand reste en extracellulaire

Cela concerne la plupart des molécules qui sont soit trop grosses soit trop hydrophiles pour traverser la membrane. L'information est alors dématérialisée et le ligand agit par modification intracytoplasmique de la conformation tertiaire ou quaternaire du récepteur (nouvelles interactions, fonctions enzymatiques...). Il y a donc **apparition d'une nouvelle fonction dans la cellule**.

II) La transduction du signal

Il existe 2 grands types de récepteurs/ 2 grands types de mécanismes : **les récepteurs à activité enzymatique** qui activent une kinase dans la cellule et **les récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui activent une protéine G**.

A) Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TM)

Les récepteurs couplés à une protéine G transduisent le signal d'un **grand nombre de récepteurs**. On connaît plus de 200 ligands des récepteurs G qui ont des structures moléculaires très variées. Ces ligands peuvent être :

- la lumière avec des photons excitant la rhodopsine des bâtonnets sur la rétine
- des ions comme le Ca^{2+}
- des stimuli sensoriels via des molécules olfactives, gustatives ou des phéromones
- des petites molécules endogènes comme les acides aminés (l'acide glutamique et acide γ -aminobutyrique = GABA), des amines (acétylcholine, adrénaline, noradrénaline, dopamine, histamine, mélatonine, sérotonine), des nucléosides (adénosines) et nucléotides (ADP, ATP, UTP), des lipides (anandamide, leucotriènes, *Platelet Activating Factor*, prostaglandines, thromboxane A2)
- des protéines comme les hormones (glucagon, thyrotropine TSH, lutropine LH, follitropine FSH, choriogonadotropine HCG) ou des protéases (thrombine).

Les récepteurs G ont une structure commune constituée de 7 domaines protéiques transmembranaires hydrophobes enchâssés dans la membrane avec une partie N terminale extracellulaire pour la fixation du ligand et une partie C terminale pour la fixation d'une protéine G trimérique.

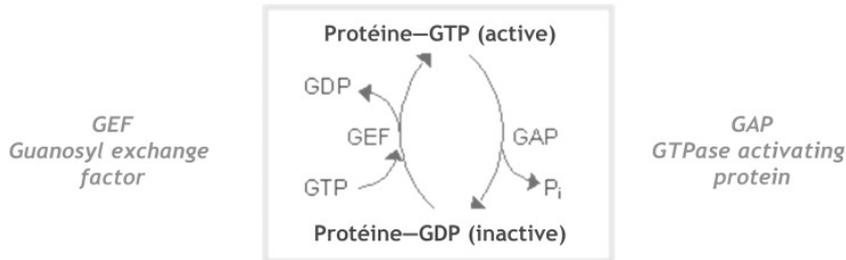
B) Les commutateurs moléculaires

Il existe des réactions graduelles ou des réactions qui oscillent entre un état activé ou inactivé. Ce va-et-vient est contrôlé par un ensemble particulier de protéines qu'on appelle commutateurs moléculaires. Un commutateur moléculaire est une protéine qui a la capacité de fixer un nucléotide, dans notre cas la guanosine phosphate (GDP ou GTP). Les commutateurs moléculaires ont pour point commun un changement conformationnel selon que ces protéines soient liées à un nucléotide triphosphate ou diphosphate.

➔ **L'activité du commutateur est gouvernée par le nucléotide qui lui est associé.**

Les commutateurs moléculaires les plus fréquents sont les protéines G qui sont **actives sous forme triphosphorylée et inactive sous forme diphosphorylée**. L'activation se fait par **échange** du GDP en GTP disponible dans le cytoplasme. Cet échange est favorisé par les protéines **GEF** (guanosyl exchange factor). L'inactivation se fait par **hydrolyse** du GTP en GDP. L'activité hydrolase est intrinsèque et stimulée par des protéines **GAP** (GTPase activating protein) d'où le nom de protéine G.

COMMUTATEURS MOLECULAIRES PROTEINES FIXANT LE GTP



C) Les protéines G

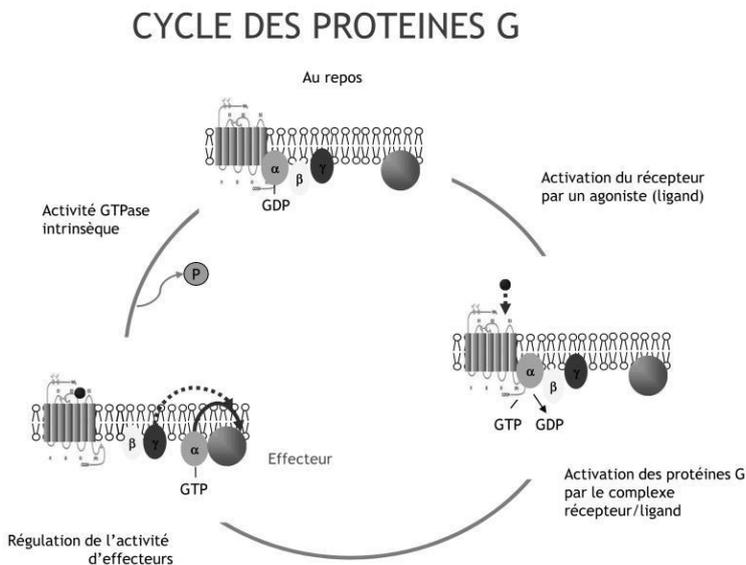
Les protéines G sont **trimériques** : 3 chaînes d'acides aminés α , β et γ liées par des liaisons faibles (électrostatiques et hydrophobes) et ancrées à la face interne de la membrane cytoplasmique via des groupements lipidiques hydrophobes.

La **sous-unité α** porte :

- le site de liaison avec le récepteur
- le site de liaison avec un nucléotide guanosine phosphate
- le site catalytique d'hydrolyse du GTP : activité GTPase
- le site de liaison avec l'effecteur (ex adénylate cyclase).

Les sous-unités β et γ portent aussi des sites de liaisons avec d'autres effecteurs.

La fonction des protéines G repose sur leur capacité à se dissocier en monomères α et β, γ induite par l'activation d'un récepteur associé.



Pour résumer le schéma ci-contre, le récepteur est activé par fixation du ligand qui induit une **modification intracytoplasmique de sa conformation**. Cette modification entraîne une modification de la sous-unité alpha qui se sépare des deux autres sous-unités et libère le GDP. Puis un GTP vient se fixer permettant ainsi l'activation de la protéine G qui va pouvoir réguler l'activité d'effecteurs. Enfin, un retour au repos est possible rapidement par hydrolyse du GTP.

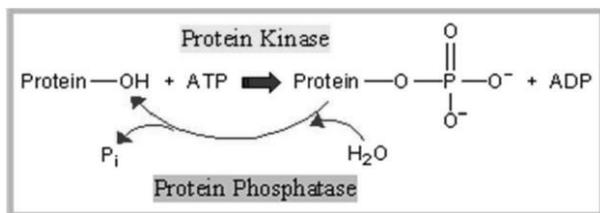
Les protéines G activent ou inhibent leur cible : les effecteurs. L'ensemble des sous-unités agissent sur les récepteurs mais la sous-unité α est concernée dans la vaste majorité des effecteurs. Il existe de **nombreuses isoformes de chacune des sous-unités** telles que α_s/i , α_q , α_o , α_t (transducine). Chacune des sous-unités agit sur un effecteur spécifique et chaque effecteur agit sur différents types de seconds messagers.

D) Le second messenger

Alors que le ligand est le premier messenger, le second messenger en est le relai et permet la transmission de l'information du ligand dans la cellule par **variation de sa concentration**.

Les seconds messagers recouvrent **diverses catégories de corps chimiques** : des nucléotides modifiés (AMP cyclique par ex), des lipides membranaires (diacylglycérol), des ions, des dérivés de phospholipides (IP₃).

Un second messenger aboutit directement ou indirectement à l'activation/inactivation de protéines kinases (le plus souvent) et donc à des modifications post-traductionnelles de protéines par phosphorylation/déphosphorylation. Ces modifications sont réversibles et correspondent à l'ajout ou le retrait d'un phosphate inorganique sur un groupement hydroxyle OH.



La phosphorylation est catalysée par des protéines kinases et ajoute un phosphate par **consommation d'un ATP** alors que la déphosphorylation est catalysée par une protéine phosphatase et clive le phosphate.

Seuls 3 acides aminés possèdent un groupement OH : **la sérine, la thréonine et la tyrosine**. Quand on voit un de ces acides aminés, il faut toujours penser que c'est un potentiel site de phosphorylation.

Il existe **520 protéines kinase** regroupées en **Ser/Thr kinase majoritaires** et en **90 Tyr kinase**.

Du fait d'une formule chimique proche entre Ser et Thr, les kinases capables de reconnaître la sérine reconnaissent le plus souvent la thréonine et inversement. De plus, il existe des **kinases à double spécificité** : reconnaissant à la fois la Ser/Thr et la Tyr. Les sites de phosphorylation sont à **86% des sérines, 12% des thréonines et 2% des tyrosines**.

250 protéines phosphatases sont connues.

Les protéines kinases et phosphatase recouvrent **1-2% du génome**.

Nous avons donc vu qu'une fois la protéine G activée, celle-ci via ses sous-unités : le plus souvent la sous-unité α va activer ou inhiber un effecteur cible. Cet effecteur va engendrer la variation de la concentration d'un second messenger qui va activer une protéine kinase responsable de la phosphorylation de protéines soit l'ajout d'un groupement phosphate.

Cette phosphorylation/déphosphorylation va **réguler 30 % des protéines par action directe ou indirecte**.

-Dans le cas direct, le groupement phosphate ajouté étant très ionisé va **modifier la conformation spatiale de la protéine** par liaisons ioniques et donc modifier sa fonction. Ce qui aboutit à une activation ou inactivation de la protéine.

-Dans le cas indirect, le phosphate devient un **site de reconnaissance par d'autres protéines** ce qui peut induire un changement de la localisation cellulaire ou une modification de sa capacité à interagir avec les autres protéines et donc une activation ou inactivation de celles-ci. En effet, il existe des domaines récurrents contenus dans des protéines capables de reconnaître des groupements phosphates. Par exemple, les tyrosines phosphorylées peuvent être reconnues par les protéines ayant un domaine SH2 dans leur composition.

Autre exemple, les protéines de la famille 14-3-3 peuvent fixer un radical RXXX[pS/pT]XP correspondant à une séquence consensus dans laquelle la sérine ou une thréonine est phosphorylée. **La protéine est donc reconnue seulement si elle est phosphorylée et est alors retenue dans le cytosol** (pas d'entrée dans le noyau). Ainsi, si la protéine est un facteur de transcription alors sa rétention dans le cytosol empêchera son activité. Mais la phosphorylation peut aussi permettre l'activation d'une protéine en la relocalisant par exemple vers son site d'action.

E) Les voies relayant le signal à l'intérieur de la cellule (effecteur, second messenger, protéine kinase)

1) La voie de la PKA : protéine kinase A (adénylate cyclase, AMPc, PKA)

L'adénylate cyclase est stimulée par les RCPG possédant une sous-unité α de type *s* pour stimulatrice, on parle de *G_{as}*.

La sous-unité αs séparée des autres sous-unités $\beta \gamma$ et activée par la fixation du ligand au récepteur active à son tour l'effecteur adénylate cyclase qui produit alors un second messenger : l'AMPc (cyclique) par cyclisation de l'ATP qui provoque le départ d'un PPi (pyrophosphate inorganique). Cette étape permet d'amplifier le signal, d'augmenter la sensibilité de la signalisation. En effet, pour un seul ligand, plusieurs molécules d'AMPc vont être produites.

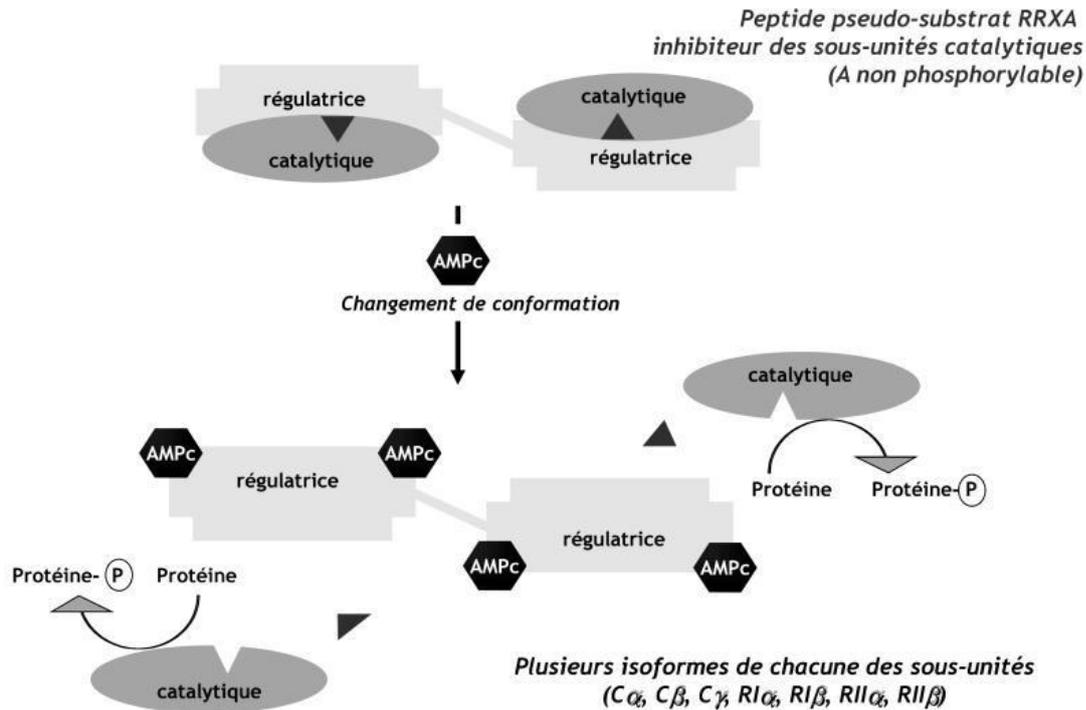
L'augmentation de la concentration d'AMPc active ensuite les protéines kinase A (PKA).

La PKA est constituée de **2 sous-unités régulatrices et de 2 sous-unités catalytiques**.

Elle phosphoryle les protéines ayant une séquence consensus RRX(S/T) soit Arg-Arg-X-Ser ou Thr.

Les sous-unités régulatrices bloquent l'activité du site catalytique par un peptide pseudo-substrat agissant comme un bouchon sur le site actif. Ce pseudo-substrat possède une séquence proche des substrats à l'exception du dernier acide aminé : l'alanine qui est lui non phosphorylable. Ainsi, lorsque la concentration en AMPc augmente, les molécules d'AMPc provoquent un changement de conformation de la PKA par fixation sur la sous-unité régulatrice. Le pseudo-substrat se détache alors et la sous-unité catalytique est libérée. La PKA est donc activée.

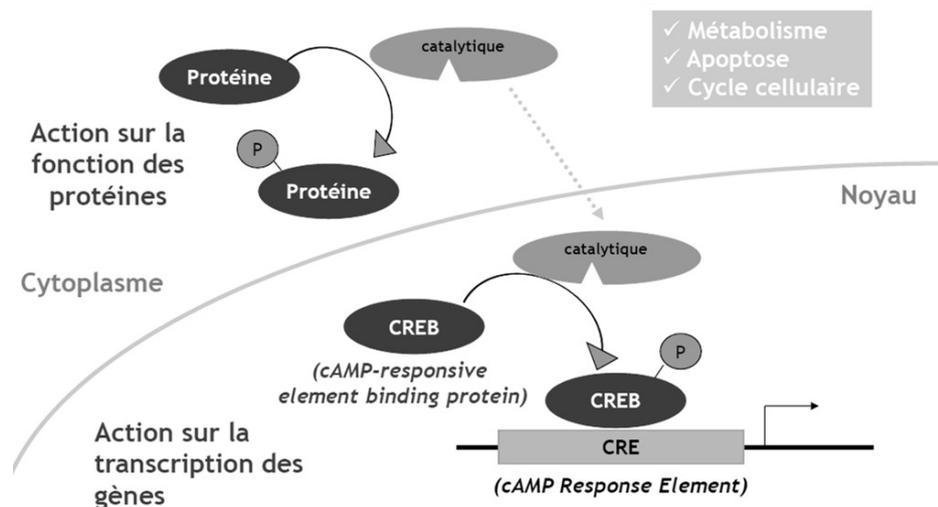
L'action dans la cellule est très rapide car la PKA est déjà synthétisée et il suffit du départ du pseudo-substrat pour l'activer.



Les PKA modulent l'activité des protéines cytoplasmiques et nucléaires par phosphorylation.

Dans le cytoplasme, la PKA a une action sur la **fonction des protéines** (modification de la conformation). Dans le noyau, la PKA a une action sur la **transcription des gènes**. Elle phosphoryle CREB : une protéine liant l'élément répondant à l'AMPC. **CREB est un facteur de transcription qui peut se lier uniquement lorsqu'il est phosphorylé** à une séquence régulatrice de l'ADN en amont des gènes : CRE, une séquence particulière de réponse à l'AMPC.

L'enzyme adénylate cyclase est alors un effecteur de l'action cellulaire. Elle participe au métabolisme, à l'apoptose, au cycle cellulaire ...



Importance de l'intégration :

La réponse cellulaire finale est la résultante d'un équilibre entre production et dégradation du second messenger. Le niveau de second messenger (*et non pas sa présence ou son absence*) détermine la réponse cellulaire.

Prenons pour exemple l'AMPC :

- le glucagon, les amines et les β adrénergiques augmentent sa concentration via la sous-unité α s (stimulatrice)
- l'acétylcholine, les amines et les α adrénergiques diminuent sa concentration via la sous-unité α i (inhibitrice) recrutant une phosphodiesterase qui dégrade l'AMPC en 5' AMP.
- l'insuline qui attention ne se lie pas à des récepteurs G (*mais tyrosine kinase*) active une phosphodiesterase également.

La concentration en AMPC est alors augmentée ou diminuée. **La cellule va donc devoir intégrer les informations venant de plusieurs récepteurs pour produire une réponse cellulaire univoque malgré des signaux contradictoires.** La résultante de l'activation de plusieurs récepteurs va réguler la concentration d'AMPC et donc le niveau d'activation de la PKA et par conséquent l'état de phosphorylation des protéines et à terme la réponse cellulaire. Tout cela est permis par la **convergence des signaux sur un même second messenger.**

Le second messenger a donc plusieurs rôles :

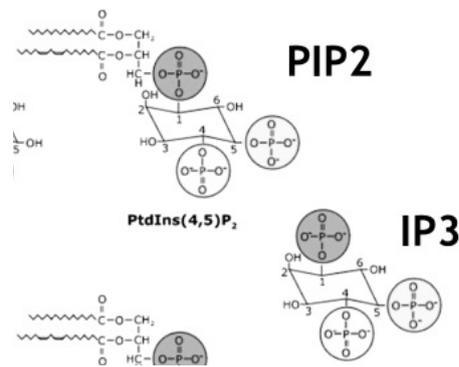
- l'amplification du signal
- l'intégration d'une réponse cellulaire
- la diffusion du signal aux autres compartiments cellulaires que la membrane lorsqu'il est soluble (ce qui est le cas de l'AMPC)

2) La voie de la PKC : protéine kinase C (Phospholipase C (PLC), phosphoinositides et PKC)

Les phosphoinositides sont une autre catégorie de seconds messagers que l'AMPc. Ce sont des dérivés phosphorylés de phosphatidylinositol. Il en existe différents types selon le profil de phosphorylation de l'inositol.

Un phosphoinositide est composé :

- d'un inositol (un cycle carbohydrate avec des hydroxyles et 6 carbones qui peut être phosphorylé de manière variable)
- d'un glycérol (structure à 3 carbones avec 3 OH) relié à l'inositol par une fonction ester (entre un alcool et un phosphate)
- 2 acides gras reliés au glycérol.



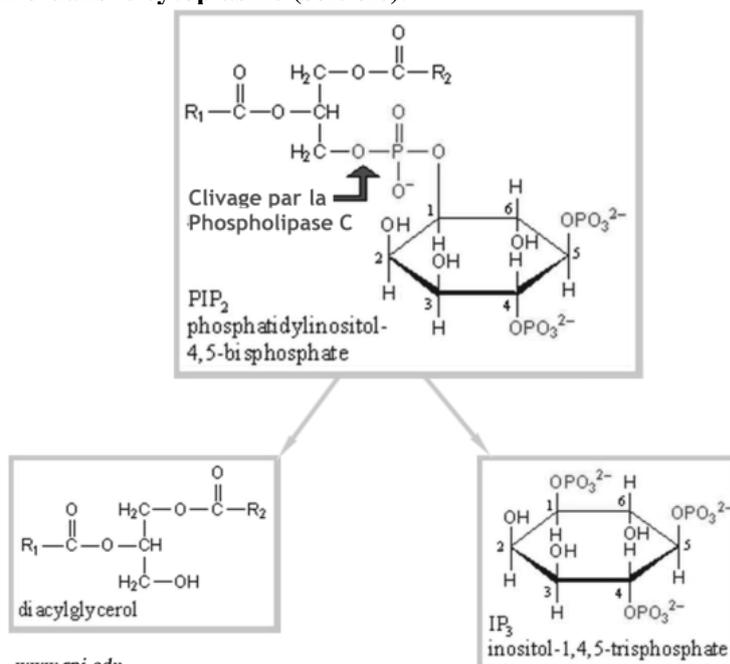
Sur le schéma : le phosphatidylinositol-diphosphate = PIP2 (le 3^e phosphate étant engagé dans la liaison ester) et l'inositol triphosphate (sans glycérol et acides gras) = IP3.

Ces phosphoinositides ont une localisation bien particulière à relative proximité des récepteurs membranaires. En effet, ils sont figés dans la membrane par leur partie hydrophobe : les acides gras et possèdent via le glycérol et ses groupements OH une partie hydrophile. Ils vont donc permettre la formation rapide de seconds messagers par la phospholipase C (effecteur) après activation du récepteur puisqu'ils sont situés à proximité.

La phospholipase C hydrolyse la liaison ester des phospholipides, ici de PIP2.

PIP2 situé à la membrane est donc clivé en 2 seconds messagers :

- le diacylglycérol qui reste à la membrane (lipophile)
- IP3 dans le cytoplasme (soluble).



Le diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC).

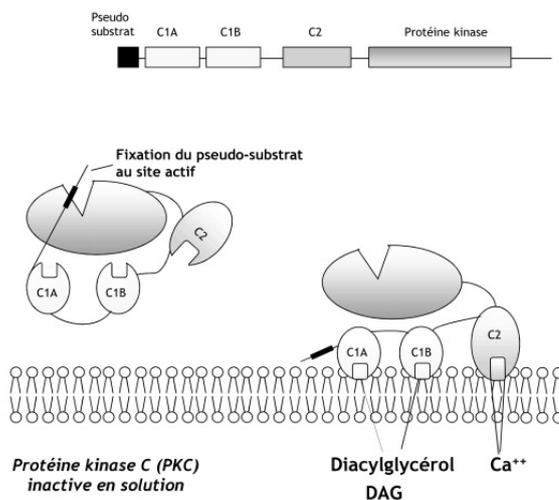
La PKC est constituée de plusieurs domaines : un domaine kinase qui porte l'activité enzymatique, un domaine C2 de liaison à la membrane, deux domaines C1A et C1B de liaison de DAG et un pseudo-substrat (interne à la protéine contrairement à la PKA).

La fixation de C1A et C1B au DAG va permettre le **déploiement de la PKC et donc une mise à jour du site actif bloqué par le pseudo-substrat**.

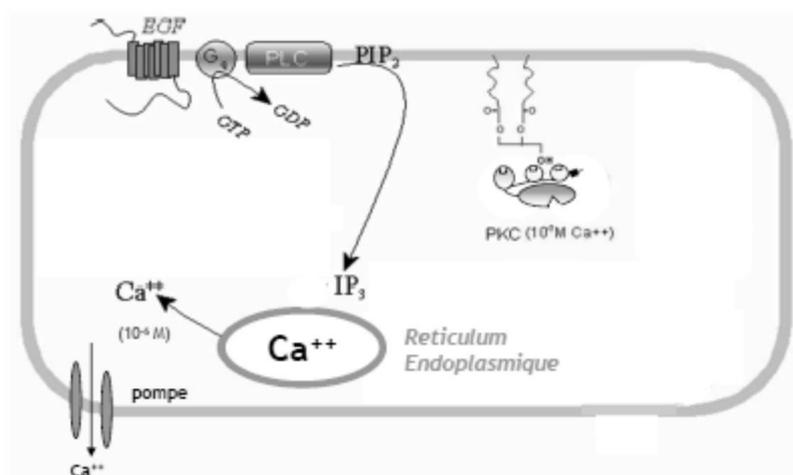
Comme pour les PKA, les PKC ont des substrats avec une séquence consensus de reconnaissance phosphorylable. (*ne pas apprendre les séquences*)

La PKC est donc enchâssée dans la membrane, il y a donc création d'une fonction enzymatique dans la membrane.

LE DIACYLGLYCEROL ACTIVE LA PROTEINE KINASE C



L'INOSITOL TRI-PHOSPHATE (IP₃) PROVOQUE LA LIBERATION DE Ca⁺⁺ INTRACELLULAIRE



- Association de l'IP₃ à une protéine de la membrane du réticulum qui fait fonction de canal Ca⁺⁺
- Conséquence : taux augmenté de Ca⁺⁺ dans le cytosol

3) Le signal calcique

Le calcium peut aussi être considéré comme un second messager. La variation de sa concentration dans le cytosol va entraîner une variation de la concentration en calmoduline qui va se fixer sur un autre type de kinase : la CAM-kinase.

Le signal calcique possède des propriétés particulières :

- L'entrée de calcium dans la cellule est médiée par des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (les RCPG) via la cascade des phosphoinositides et par des pompes/canaux ioniques.
- Les complexes calciques des composés phosphorylés ou carboxylés sont indispensables au fonctionnement cellulaire mais représentent un danger car le calcium peut précipiter et provoquer la destruction de la cellule. C'est pourquoi le **taux intra-cellulaire de Ca^{2+} est maintenu faible, est très régulé** par des pompes et le **gradient est très important** avec :

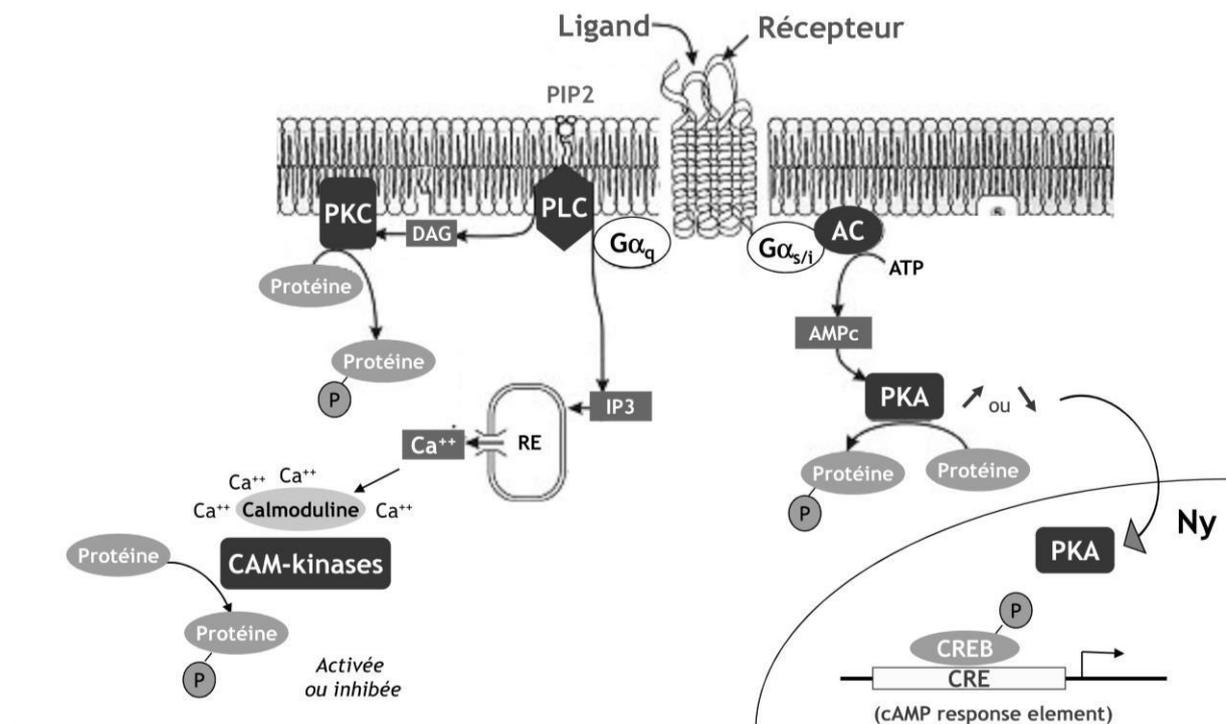


→ Une légère variation de la concentration permet donc un **signal très rapide**.

- Sa **capacité de fixation aux protéines** via les charges négatives (Glu, Asp) ou les oxygènes des carbonyles (Asn, Gln) entraîne un repliement des protéines et donc une modification de conformation donc de fonction.

Schéma récapitulatif à maîtriser :

LES RECEPTEURS A 7 DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES Voies relayant le signal : effecteurs des protéines G



III) L'extinction du signal des récepteurs à 7TM

Les réponses cellulaires à de nombreuses hormones ou neurotransmetteurs sont en général de courte durée (secondes à quelques minutes). Une extinction du signal est alors nécessaire.

Attention l'extinction du signal décrite dans ce cours est spécifique aux récepteurs G à 7 domaines transmembranaires et aux neurotransmetteurs.

L'extinction peut avoir lieu au niveau :

- 1) Du ligand
 - Dissociation récepteur/ligand
 - Dégradation extra-cellulaire du ligand (acétylcholinestérase)
 - Recaptage du ligand (terminaisons pré-synaptiques /neurotransmetteurs)

La cocaïne inhibe le recaptage de la dopamine, noradrénaline.

Les antidépresseurs inhibent le recaptage de la sérotonine.

- 2) Du récepteur
 - **Désensibilisation des récepteurs à 7TM** par soit
 - ➔ **Découplage fonctionnel par phosphorylation** (inactivation) par une kinase associée : GRK (G-protein-coupled-receptor kinase) qui phosphoryle la partie intra-cytoplasmique du récepteur et donc cause un découplage entre celui-ci et les sous-unités de la protéine G. La Beta-arrestine bloque définitivement l'activation de nouvelles protéines G et permet le recrutement pour endocytose.
 - ➔ **Internalisation ligand/récepteur** (recyclage ou dégradation) par endocytose dépendante de la clathrine. Le récepteur dans l'endosome est soit recyclé à la membrane soit dégradé dans le lysosome.

Les médicaments agonistes β_2 adrénergiques subissent une perte d'activité par désensibilisation du récepteur. Le mode d'administration d'un médicament est donc important.

- Diminution de synthèse (transcription) uniquement pour les signaux prolongés (plus d'une heure)

- 3) Du post-récepteur (après la production de seconds messagers)
 - Activité GTPase des protéines G
 - Catabolisme des 2nd messagers (phosphodiesterase/AMPC)

IV) Le choléra : un exemple de pathologie en lien avec la transduction du signal

Le choléra, pathologie infectieuse est un exemple d'action directe de produits bactériens sur les mécanismes de transduction du signal. La toxine produite par le vibrillon cholérique se fixe au niveau du côlon sur la protéine Gs. Cette modification covalente empêche la régulation du signal, la protéine G est en permanence activée et provoque l'ouverture de canaux responsables de diarrhées aiguës (sécrétion d'eau et d'électrolytes).

Bilan : À la fin de ce cours vous devez être capables de répondre de façon synthétique aux questions suivantes:

- Qu'est-ce qu'un second messager (exemples) ?
- Qu'est-ce qu'un commutateur moléculaire ?
- Comment fonctionne un récepteur à 7TM (cycle des protéines G, principales voies d'aval, extinction du signal)

Vous devrez avoir compris :

- La notion de transduction du signal
- La notion de pseudo-substrat, points communs PKA et PKC, moyen utilisé par la cellule pour mettre en oeuvre très rapidement une fonction biologique en réponse à un signal extérieur.