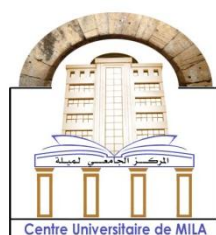


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Centre Universitaire de Mila
Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Polycopié Cours de

Communication et signalisation

cellulaire

Auteur : Dr. GHOUT Aghena

2022/2023

Sommaire

Listes des figures

Avant propos

Introduction.....01

Chapitre I : Principes généraux de la communication cellulaire

I.1. Principes généraux de la signalisation intracellulaire.....	03
I.2. Les différents types de communication intercellulaires.....	08
I.2.1. Jonction perméables (ou communicantes).....	08
I.2.2. Interaction membranaires.....	09
I.2.2.1. L'adhérence cellule-cellules.....	09
I.2.2.1.1. Les cadhérines.....	09
I.2.2.1.2. Protéines d'adhésion apparentées aux immunoglobulines : CAM.....	10
I.2.2.2. L'adhérence cellules –matrice extracellulaire.....	10
I.2.2.2.1. Les sélectines.....	10
I.2.2.2.2. Les intégrines.....	10
I.2.2.2.3. Le CD 44.....	11
I.2.3. La signalisation de proximité.....	11
I.2.3.1. la communication paracrine.....	11
I.2.3.2. La communication autocrine.....	11
I.2.4. La signalisation de distance.....	11
I.2.4.1. La communication synaptique.....	12
I.2.4.2. La communication endocrine.....	12
I.3. Mécanisme d'action des molécules de signalisation.....	14
I.3.1. L'oxyde nitrique.....	15
I.4. Les variétés de molécules de signalisation.....	15
I.4.1. Les peptides.....	16
I.4.2. Les neurotransmetteurs.....	16
I.4.3. Les eicosanoïdes et les leucotriènes.....	16
I.5. Les récepteurs et leurs ligands.....	17
I.5.1. Définition.....	17
I.5.2. Les caractéristiques des récepteurs.....	19
I.5.3. Classification des récepteurs selon leur localisation.....	20
I.5.3.1. Les récepteurs membranaires.....	20
I.5.3.1.1. Définition.....	20
I.5.3.1.2. Types de récepteurs membranaires.....	21
I.6. Réseau de signalisation intracellulaire.....	23
I.6.1. Les seconds messagers.....	23
I.6.2. Les molécules protéiques.....	25
I.6.3. Les molécules cibles.....	26

Chapitre II : Les récepteurs membranaires

II. Les récepteurs membranaires.....	27
II.1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	27
II.1.1. Définition.....	27
II.1.2. Structure.....	29
II.1.3. Classification.....	30
II.1.4. Les protéines G trimériques.....	30

II.1.4.1. Structure tridimensionnelle.....	30
II.1.4.2. Cycle d'activation de la protéine G.....	31
II.1.4.3. Sous types de la protéine G.....	31
II.1.4.4. Effecteurs activés par la protéine G.....	32
II.1.4.5. Couplage aux RCPG	33
II.1.5. Régulation de l'activité des RCPG.....	35
II.1.5.1.Élimination du ligand.....	35
II.1.5.2.Régulation par les RGS (régulator of G protein signaling).....	35
II.1.6. Désensibilisation des RCPG.....	36
II.1.6.1. Désensibilisation hétérologue.....	37
II.1.6.2. Désensibilisation homologue.....	37
II.1.6.3. Internalisation des RCPG dépendante des B-arrestines.....	40
II.1.6.3.1. Internalisation constitutive des RCPG.....	40
II.1.6.3.2. Internalisation dépendante du ligand.....	40
II.2. Récepteurs à activité enzymatique.....	41
II.2.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).....	41
II.2.1.1. Généralité.....	41
II.2.1.2. définition.....	41
II.2.1.3. Structure des RTK.....	42
II.2.1.4. Activation des RTK.....	45
II.2.1.4.1. Fixation du ligand.....	45
II.2.1.4.2. Dimérisation des récepteurs.....	45
II.2.1.4.3. Autophosphorylation des tyrosines.....	47
II.2. 1.5. Voies de signalisation des RTK.....	49
II.2.1.6. Modules protéiques et effecteurs.....	49
II.2.2. Récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (RST).....	50
II.2.3. Récepteurs à activité guanylyl cyclase- RGC.....	51
II.2.4. Récepteurs à activité phosphatase.....	52
II.3. Autres types de récepteurs.....	52
II.3.1. Récepteurs de mort et apoptose.....	52
II.3.1.1. Les récepteurs de mort.....	52
II.3.1.2.L'apoptose.....	53

Chapitre III : Les voies de signalisation intracellulaires

III. Les voies de signalisation intracellulaires.....	56
III.1. Voie de l'adénylyl-cyclase-AMP _c	56
III.1.1. L'adénylyl-cyclase.....	56
III.1.1.1. Cycle d'activation-inactivation de l'adénylyl-cyclase.....	56
III.1.2. La protéine kinase A.....	57
III.2. Voie de la phospholipase C-Ca ⁺⁺	59
III.3. Voie du GMP _c	60
III.4.La voie Ca ⁺⁺ -calmoduline.....	62
III.5. La voie de signalisation du facteur de transcription NF-KB.....	63
III.5.1. Les composants de la voie de signalisation NF-KB.....	63
III.5.2.Voie classique ou canonique d'activation de NF-KB.....	63
III.5.3. Voie non classique ou alternative d'activation de NF-KB.....	64
III.6. La voie des MAP kinase (MAPK).....	64
III.6.1. La voie Ras/MAPK ou voie ERK1/2.....	66

III.6.1.1. Présentation de la famille Ras.....	66
III.6.1.2. Régulation de l'activité de Ras.....	67
III.6.1.3. La protéine Ras.....	68
a) Structure des isoformes de Ras.....	68
b) Activation de Ras.....	68
c) Mécanisme de régulation négative de l'activation de Ras.....	69
d) Effecteurs de Ras.....	69
III.6.1.4. Description de la voie Ras/MAPK ou voie ERK1/2.....	70
III.6.1.5. Régulation de la voie MEK/ERK.....	71
III.6.2. La voie JNK.....	72
III.6.3. La voie P38	74
III.6.3.1. Composantes de la voie P38.....	75
III.7. La voie de signalisation JAK/STAT.....	76
III.8. La voie de la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K/Akt).....	79
VI. Références bibliographiques.....	83

Les figures

Figure 01 : Cascade de signalisation intracellulaire

Figure 02 : La communication cellulaire

Figure 03 : La communication autocrine

Figure 04 : La communication paracrine

Figure 05 : La communication endocrine

Figure 06 : La communication synaptique

Figure 07 : Schéma descriptif de la régulation de différentes cellules suite à la réception d'un même signal

Figure 08 : Les différents types de récepteurs

Figure 09 : Structure générale des RCPG

Figure 10 : Protéines G couplé au récepteurs RCPG

Figure 11 : Cycle d'activation des protéines G

Figure 12 : Le cycle des GTPases

Figure 13 : Représentation schématique des domaines architecturaux des GRK

Figure 14 : Phénomène de désensibilisation des RCPG

Figure 15 : Représentation schématique de trois récepteurs à activité tyrosine kinase

Figure 16 : Activation d'un récepteurs tyrosine kinase

Figure 17 : Structure des récepteurs de mort

Figure 18 : La cascade des amplifications déclenchées par l'activation de l'adényl cyclase et la production d'AMP cyclique

Figure 19 : La voie d'activation protéine G, phospholipase C, phosphoinositide

Figure 20 : La voie du GMP_c (phénomène de transduction du signal et son amplification après la réception d'un seul photon de-lumière)

Figure 21 : L'activation de Ras par un récepteur tyrosine kinase

Figure 22 : Activation de la p 38 kinase

Figure 23 : La voie JAK/STAT

Figure 24 : Inhibition de la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT

Figure 25 : Représentation schématique de la structure de la kinase de type PI3K

Figure 26 : Voie de la PI3 kinase

Avant-propos

La communication cellulaire est indispensable à la vie des organismes pluricellulaires les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. Les principes de la communication cellulaire sont universels : des molécules de signalisation sont émises par une cellule, reconnues par une autre, qui met alors en œuvre une voie de transduction du signal reçu, qui aboutit à un système effecteur qui prend en compte le signal. La variété des systèmes de transmission de l'information est immense, tant au niveau de la réception des signaux qu'à celui de la mise en jeu des effecteurs. Pourtant, il est certainement possible de trouver des *patterns* généraux, des structures communes du cheminement de l'information, pour peu que l'on se donne la peine de les rechercher.

Les différentes voies de transduction ne sont que quelques exemples parmi de nombreuses voies utilisables par les cellules. Ce domaine de recherche est extrêmement actif, et ses implications thérapeutiques sont potentiellement importantes

Déjà il existait des livres qui évoquent la communication cellulaires et ses mécanismes, réputés pour leur précision, leurs détails et leur caractère exhaustif, mais on sentait le besoin d'une autre sorte de document, un que les étudiants aborderaient et maîtriseraient aisément, sans leur voiler la passion qui anime les chercheurs devant les défis de ce domaine révolutionnaire des sciences biologique.

Ce cours est la synthèse d'années d'enseignements de la signalisation et communication cellulaire. Il est destiné plus particulièrement aux étudiants de Master en Biochimie pour les aider à renforcer leurs connaissances, et pourront naviguer dans chaque chapitre entre les connaissances actualisées de la cascade de signalisation.

Ce cours trouvera aussi son utilité auprès de tous les étudiants de sciences, de médecine, de pharmacie ainsi qu'auprès des nombreux enseignants de disciplines diverses recouvrant en partie ou en totalité un fort intérêt pour la biologie

Toutes les données sont présentées de façon claire, concise et agréable à appréhender grâce à la présentation de nombreux schémas en couleurs et photographies illustrant les données à acquérir. Certains schémas reprennent les données du texte en les résumant, d'autres leur apportent une information complémentaires ou plus précise

Les étudiants devraient trouver cette approche imagée tout à fait adaptée à la révision de concepts complexes de la signalisation, facilitant leur mémorisation lors de la préparation de leurs examens

Comme tout travail, il peut être sujet à des erreurs et de manques. De ce fait il est toujours encourageant et motivant de recevoir des corrections, conseils ou recommandations de la part des collègues enseignants et chercheurs activant sur terrain.

Introduction

Un organisme pluricellulaire doit communiquer pour survivre, qu'elles fassent partie d'un organisme complexe ou qu'elles fonctionnent de manière isolée, les cellules sont constamment soumises à de grandes quantités et variétés de signaux. Provenant de l'extérieur ou de l'intérieur des cellules, ces multiples informations doivent être captées, intégrées et relayées efficacement afin de générer la réponse cellulaire adéquate. Les mécanismes de signalisation cellulaire, par leurs fonctions de relais et d'intégrateurs, permettent aux cellules d'évoluer dans un environnement en mouvement, afin qu'elles croissent, se différencient, se protègent contre des stress, répondent à des stimuli, migrent, se divisent ...etc

La signalisation intracellulaire peut être assimilée à un réseau informatique (ou un système d'engrenages complexes) et est constituée de multiples protéines ou molécules de signalisation qui s'interagissent et se chevauchent.

La liaison du signal extracellulaire (ou ligand) qui peut être une cytokine inflammatoire ou non, un composant microbien, une structure microparticulaire, un acide aminé, un nucléotide, un gaz, etc... à son récepteur spécifique déclenche une cascade d'activation de protéines intracellulaires aboutissant à une modification du comportement de la cellule. L'intégration par la cellule de ces informations dépend non seulement de ces récepteurs (protéines de reconnaissance du signal), mais aussi de protéines de signalisation intracellulaire qui distribuent le signal dans la cellule.

L'activation d'une protéine de signalisation s'effectue habituellement par addition d'un groupement phosphate, le plus souvent au moyen d'une phosphorylation par une protéine kinase qui, selon le résidu phosphorylé, est une tyrosine-kinase, une sérine-kinase ou une thréonine-kinase. Son inhibition s'effectue par soustraction du groupement phosphate par une protéine-phosphatase.

Les voies de signalisation intracellulaire permettent de transmettre une information de la surface cellulaire, le plus souvent à partir d'un récepteur cellulaire, vers le noyau cellulaire au niveau duquel l'expression des gènes va être modulée en passant par une cascade d'activation protéique intracytoplasmique .

Les protéines kinases, plus particulièrement, représentent une des plus grandes familles de protéines, ce sont des enzymes comptant plus de 500 membres dans le génome humain. Sur le plan physiologique, ces enzymes jouent un rôle dans les voies de transduction du signal. De très nombreuses protéines kinases dérégulées sont à l'origine de cancers que ce soit des tumeurs solides ou des hémopathies malignes. Sur le plan thérapeutique, ces enzymes sont des cibles de choix de la thérapie moléculaire ciblée.

Les voies de signalisation intracellulaire sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération et la différenciation cellulaires, l'apoptose ou mort cellulaire programmée, l'inflammation et l'immunité en général. Les trois plus importantes

sont celles de NF- κ B, des MAP kinases et JAK/STATs. Une compréhension fine de leur mode de fonctionnement permet de mieux comprendre nombre de phénomènes biologiques et notamment leur implication dans la pathogenèse des maladies inflammatoires.

Les voies de signalisation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) font parties des mécanismes de signalisation intracellulaire les plus omniprésents impliqués dans la régulation des cellules eucaryotes. Ces voies sont activées par de nombreux stimuli (cytokines, mitogènes, facteurs de différenciation, signaux de stress, inflammation) et elles régulent de manière coordonnée l'embryogenèse, la différenciation, la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation cellulaire, la mort, etc

L'activation incontrôlée de la voie MEK/ERK (MAP-kinase/ERK) est un évènement fréquemment retrouvé dans les cellules cancéreuses. Elle peut survenir soit par un excès de sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales (mécanisme autocrine), soit par suractivation des récepteurs membranaires

De nombreuses maladies inflammatoires rhumatologiques ont une altération de la signalisation intracellulaire. Ainsi, une meilleure compréhension de ces différentes voies permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques avec l'utilisation de petites molécules capables de réguler les protéines de signalisation.

Ce document reprend l'essentiel du cours de la communication et signalisation cellulaire qui s'adressent aux étudiants de master en biochimie pour leur permettre de bien préparer leur examens, ce document comprends trois chapitre dont le premier est consacré aux principes généraux de la signalisation suivi dans le deuxième chapitre des différents récepteurs membranaires et on termine dans le troisième chapitre sur les différentes voies de signalisation intracellulaire et celle décrites ici concernent les voies d'activation du NF- κ B (« nuclear factor kappa B »), des MAP kinases (MAPKs) et des JAK/STATs, de la PI3K et la voie de l'AMP_C, la voie de la Ca⁺⁺-calmoduline ainsi que la voie de phospholipase C-Ca⁺⁺.

I.1. Principes généraux de la signalisation cellulaire

○ Des récepteurs aux effecteurs

La communication cellulaire est indispensable à la vie des organismes pluricellulaires : les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. Pourtant, elle existe déjà dans les organismes unicellulaires comme les levures qui doivent, elles aussi, échanger des informations, ne serait ce que pour trouver des partenaires sexuels. Les principes de la communication cellulaire sont universels : des molécules de signalisation sont émises par une cellule, reconnues par une autre, qui met alors en œuvre une voie de transduction du signal reçu, qui aboutit à un système effecteur qui prend en compte le signal.

Les signaux transmis entre des cellules sont beaucoup plus simples que les messages humains : typiquement, un type particulier de molécules est produit par une cellule- la cellule de signalisation- est détecté par une autre cellule- la cellule cible- au moyen d'un récepteur protéique, qui reconnaît et répond spécifiquement à la molécule signal (appelée aussi molécule informative), le récepteur protéique effectue, à l'extrémité réceptrice de la voie de signalisation, la première étape d'une série de processus de transduction dans la cellule cible, où le signal extracellulaire entrant est converti en signaux intracellulaires qui dirigent le comportement de la cellule.

Les premiers acteurs de la communication cellulaire sont les molécules-signal produites par des cellules-signal. Chez les animaux supérieurs, ces messagers sont nombreux et diversifiés. Ils peuvent être des protéines, des peptides, des acides aminés et leurs dérivés, des nucléotides, des stéroïdes, des rétinoïdes, des dérivés d'acides gras et même des gaz solubles comme le NO, ...

La survie des organismes pluricellulaires dépend de cette communication intercellulaire qui coordonne le métabolisme, la croissance, la différenciation et la division de cellules dans différents tissus et organes.

La variété des systèmes de transmission de l'information est immense, tant au niveau de la réception des signaux qu'à celui de la mise en jeu des effecteurs. Pourtant, il est certainement possible de trouver des *patterns* généraux, des structures communes du cheminement de l'information, pour peu que l'on se donne la peine de les rechercher.

Pour ce qui concerne la première étape, celle de la réception, les mécanismes sont dépendants de la nature chimique des messagers :

- Les messagers de nature hydrophile (acides aminés et leurs dérivés, peptides, protéines) ne peuvent entrer dans les cellules, faute de pouvoir traverser les membranes ; il existe donc nécessairement un récepteur membranaire apte à recevoir le message, à le comprendre, et à transduire l'information au-delà ;
- Les messagers de nature lipidique (dérivés stéroïdiens, acides gras et leurs dérivés, etc.) et les composés de structure très simple (oxygène, oxyde nitrique) sont capables de diffuser à travers les membranes et d'atteindre directement leurs cibles, dans le cytoplasme ou dans le noyau (récepteurs nucléaires) ;
- Les messagers de nature ionique (Na^+ , K^+ , Cl^- et Ca^{2+}) sont capables d'induire l'ouverture ou la fermeture transitoire de canaux ioniques permettant la génération de courants transmembranaires ; ces courants correspondent au passage de l'influx nerveux dans les neurones, mais ils sont aussi à l'origine de nombreux événements intracellulaires.

La transduction des signaux perçus par les récepteurs fait intervenir de multiples processus, mais les mécanismes généraux mis en jeu sont en petit nombre, les principaux étant :

- Le « recrutement » de protéines capables de contracter des interactions avec d'autres : il existe ainsi de très nombreuses protéines « adaptatrices » ;
- Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation par des kinases et des phosphatases, qui modifient la conformation tridimensionnelle des protéines, donc leur réactivité ;

-La mise en jeu de petites protéines G selon un mécanisme quasi constant d'échange et d'hydrolyse de nucléotides guanyliques ;

-La production de « seconds messagers » intracellulaires relayant l'information apportée au niveau de la membrane.

Enfin, les effecteurs sont également très divers, mais, là encore, il est possible de les regrouper en quelques entités :

-Les régulateurs transcriptionnels, couramment appelés « facteurs de transcription », qui commandent la transcription de gènes cibles ; ce sont les effecteurs les plus généraux et les plus souvent rencontrés en aval des voies de transduction des signaux ;

-Les régulateurs traductionnels, qui sont directement mis en jeu dans quelques voies de signalisation et qui interviennent sur le niveau de synthèse protéique ;

-Les protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire, qui commandent les phénomènes d'adhésion, de motilité et de dispersion cellulaires ;

-Les canaux ioniques enfin, que l'on retrouve ici en tant qu'effecteurs, mis en jeu en particulier, mais pas seulement, dans la transmission synaptique.

○ **La réponse d'une cellule à un signal peut être rapide ou lente**

Le temps nécessaire à une cellule pour répondre à un signal extracellulaire varie beaucoup et dépend de ce qui va se produire une fois que la cellule a reçu le message. Certains signaux extracellulaires agissent rapidement : l'acétylcholine peut stimuler la contraction d'un muscle squelettique en quelques millisecondes, et la sécrétion d'une glande salivaire en environ une minute. De telles réponses rapides sont possibles parce que le signal affecte l'activité de protéines ou d'autres molécules, qui sont déjà présentes dans la cellule, attendant leur ordre de marche.

D'autres réponses prennent plus de temps. La croissance et la division cellulaires, quand elles sont déclenchées par les molécules de signalisation appropriées, peuvent prendre des heures pour se produire. En effet, la réponse à ces signaux extracellulaires nécessite des modifications de l'expression génique et la production de nouvelles protéines

- **Certaines hormones traversent la membrane plasmique et se lient à des récepteurs intracellulaires**

Les molécules de signalisation extracellulaire se répartissent en deux classes. La première, et la plus grande, est formée de molécules trop grosses ou trop hydrophiles pour traverser la membrane plasmique des cellules cibles. Elles dépendent de récepteurs situés à la surface de la cellule cible, pour relayer leur message à travers la membrane.

La deuxième classe de signaux, plus petite, comporte des molécules qui sont assez petites ou assez hydrophobes, pour se glisser facilement à travers la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur, ces molécules de signalisation activent des enzymes intracellulaires, ou se lient à des récepteurs protéiques qui contrôlent l'expression des gènes.

Une classe importante de molécules dépendant d'un récepteur intracellulaire est constituée par les **hormones stéroïdes** – entre autres *cortisol*, *oestradiol*, *testostérone* – et les *hormones thyroïdiennes* comme la *thyroxine*. Toutes ces molécules hydrophobes traversent la membrane plasmique des cellules cibles et se lient à des récepteurs, protéines situées soit dans le cytosol, soit dans le noyau. Qu'ils soient dans le cytosol ou dans le noyau, ces récepteurs sont appelés *récepteurs nucléaires*, car lorsqu'ils sont activés par la liaison de l'hormone, ils agissent comme régulateurs de la transcription dans le noyau. Dans les cellules non stimulées, ces récepteurs sont habituellement présents sous une forme inactive.

Quand une hormone se lie au récepteur, celui-ci subit un changement de conformation qui l'active, lui permettant d'activer ou d'inhiber la transcription de gènes spécifiques. Chaque hormone se lie à un récepteur différent, et chaque récepteur agit sur des sites différents de régulation au niveau de l'ADN. De plus, comme une hormone donnée contrôle généralement des groupes de gènes divers dans les différents types cellulaires, elle entraîne des réponses physiologiques différentes dans les diverses cellules cibles.

- **Certains gaz dissous traversent les membranes et activent directement des enzymes intracellulaires**

Les hormones stéroïdes et les hormones thyroïdiennes ne sont pas les seules molécules de signalisation qui peuvent passer la membrane plasmique. Certains gaz dissous peuvent se glisser à travers la membrane plasmique jusqu'à l'intérieur de la cellule et contrôler directement l'activité de protéines intracellulaires particulières. Cette approche directe permet à ces signaux de modifier la cellule en quelques secondes ou minutes. Le **monoxyde d'azote (NO)** agit de cette manière. Le gaz dissout diffuse facilement hors de la cellule qui l'a produit et pénètre dans les cellules voisines. NO est produit à partir de l'arginine (acide aminé) et agit comme un médiateur local dans de nombreux tissus. Le gaz n'agit que localement car il est rapidement converti en nitrates et nitrites (avec une demi-vie de 5 à 10 secondes) en réagissant avec l'oxygène et l'eau à l'extérieur des cellules.

Les cellules endothéliales – cellules aplaties qui bordent les vaisseaux sanguins – libèrent NO en réponse à une stimulation par des terminaisons nerveuses. Le signal NO entraîne la relaxation des muscles lisses dans les parois vasculaires, permettant aux vaisseaux de se dilater pour que le sang circule plus librement. C'est l'effet de NO sur les vaisseaux sanguins qui explique l'action de la nitroglycérine, utilisée depuis plus de 100 ans pour traiter l'angine de poitrine (une douleur due à une mauvaise vascularisation du muscle cardiaque). Dans le corps, la nitroglycérine est convertie en NO qui relâche rapidement les vaisseaux sanguins, allégeant ainsi le travail du cœur et réduisant la demande du muscle en sang riche en oxygène. De nombreuses cellules nerveuses utilisent également NO pour envoyer des signaux aux cellules voisines : NO libéré par les terminaisons nerveuses dans le pénis, par exemple, provoque la dilatation des vaisseaux sanguins, responsable de l'érection. Dans de nombreuses cellules cibles, NO se lie à l'enzyme *guanylate cyclase*, et l'active, stimulant ainsi la formation de *GMP cyclique* à partir de GTP. Le GMP cyclique est lui-même une petite molécule de signalisation intracellulaire et représente l'étape suivante de la chaîne de signalisation qui conduit finalement à la réponse cellulaire. Le Viagra, médicament contre l'impuissance, augmente l'érection en bloquant l'enzyme qui dégrade le GMP cyclique, prolongeant l'effet de NO. Le GMP cyclique ressemble beaucoup, par sa structure et son mécanisme d'action, à l'*AMP cyclique*, qui est beaucoup plus souvent utilisé comme messenger intracellulaire et dont nous verrons les actions plus loin.

I. 2. Les différents types de communications intercellulaires

Les cellules des organismes multicellulaires utilisent des centaines de variétés de molécules extra-cellulaires pour s'adresser des signaux entre elles – des protéines, des peptides, des acides aminés, des nucléotides, des stéroïdes, des dérivés d'acides gras et même des gaz dissous- mais il n'y a qu'une poignée de modalités de base pour la communication

I.2.1. Jonctions perméables (ou communicantes) : (gap junctions)

La communication cellulaire peut se faire par **les jonctions communicantes (Jonction GAP)**. Celle-ci assurent le couplage métabolique et un couplage électrique entre les cellules.

Les cellules voisines des organismes multicellulaires possèdent différents types de jonctions membranaires. Les principales sont les jonctions serrées (tight junctions) et les jonctions perméables (gap junctions). Les premières participent à la constitution de barrières au niveau de nombreux épithéliums séparant ainsi des milieux de compositions différentes. Par exemple, la barrière testiculaire au niveau des tubes séminifères est formée par les cellules de Sertoli qui contrôlent la composition du fluide séminifère dans lequel sont libérés les spermatozoïdes.

Les jonctions perméables(Connexines et connexons) sont des structures où les membranes plasmiques de deux cellules voisines sont rapprochées (2-4 nm) et dans lesquelles des structures protéiques appelées connexons, formées de 6 connexines dans chacune des membranes plasmiques, s'associent pour constituer des demi-canaux qui se connectent pour former des pores d'environ 1,5 nm de diamètre permettant le passage passif des molécules de petite taille (< 1 500 Da) du cytoplasme d'une cellule à celui de l'autre

Ce type de communication ne permet donc pas le passage de protéines mais autorise une coopération métabolique entre les cellules voisines. Ces jonctions permettent également le passage de molécules de petite taille jouant des rôles importants dans la transduction intracellulaire des messages intercellulaires et que l'on appelle « seconds messagers ». Il s'agit par exemple de l'AMPc, de l'IP3, et de l'ion Ca^{++} . En outre, il a été montré récemment le passage de siARN au travers de ces jonctions perméables.

Chez les mammifères, il existe une vingtaine de gènes codant des connexines et les connexons sont homo- ou hétéromériques. La composition des connexons en différentes connexines affecte leurs propriétés de perméabilité ainsi que leurs interactions avec différentes autres protéines (tubuline, actine, spectrine, drebine, protéines des jonctions serrées ou des jonctions d'adhésion, cadhérines, caténines, ainsi qu'avec des récepteurs ionotropiques). En outre, les connexines subissent des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, déphosphorylations) qui influencent leurs propriétés.

I.2.2. Interactions membranaires

Les membranes plasmiques de toutes les cellules portent des protéines d'adhérence permettant des interactions transitoires ou permanentes avec d'autres cellules ou la matrice extracellulaire.

Les principales classes de protéines membranaires d'adhésion cellulaire sont les cadhérines, les immunoglobulines d'adhésion, les sélectines et les intégrines et on distingue :

I.2.2.1. L'adhérence cellule- cellule : implique les molécules appelées CAM (Cell Adhesion Molecules) , il existe plusieurs famille de CAM, les deux principales sont :

-la superfamille des immunoglobulines

-la famille des cadhérine (adhésion Ca^{++} dépendante)

I.2.2.1.1. Les cadhérines :

Assurent le contact Cellules/cellules. Ce sont des glycoprotéines portant des domaines de liaison au calcium impliquées de manière très importante dans les interactions directes entre cellules.. leur domaine terminal (α et β -caténine) peut, dans certaines situations se transloquer dans le noyau et interagir avec des récepteurs aux facteurs de croissance. Ces protéines établissent essentiellement des interactions intercellulaires homophiles entre cadhérines du même type et semblent principalement connectées, du côté intracellulaire, aux microfilaments d'actine et aux filaments intermédiaires du cytosquelette au travers des caténines, en particulier la β -caténine.

I.2.2.1.2. Protéines d'adhésion apparentées aux immunoglobulines : CAM

Les CAM (cell adhesion molecule) sont apparentées aux immunoglobulines dans leur partie N-terminale extracellulaire. Elles établissent surtout des interactions homophiles mais également avec des intégrines ou avec la matrice extracellulaire (MEC). C'est essentiellement le niveau d'expression de chacune des CAM (N-CAM, I-CAM, ELAM, etc.) et de leurs isoformes respectives qui détermine la nature et la solidité de l'association entre cellules voisines sans provoquer directement de réponses cellulaires car, du côté intracellulaire, les CAM ne semblent connectées à aucune voie de signalisation.

I.2.2.2. L'adhérence cellule-matrice extracellulaire : est assurée par les intégrines et les sélectines et le CD44.

I.2.2.2.1. Les sélectines :

Les sélectines sont des protéines d'adhésion, actuellement connues que dans le système circulatoire des vertébrés (endothélium vasculaire et cellules sanguines) et qui interagissent avec des motifs saccharidiques des protéines membranaires hyperglycosylées. Ces interactions des sélectines avec leurs ligands jouent un rôle crucial dans l'adhésion initiale des leucocytes à l'endothélium. Secondairement, leur coopération avec des intégrines et des immunoglobulines membranaires va conduire à un ciblage plus précis de l'action du leucocyte au cours de l'inflammation. Les sélectines paraissent donc spécifiques du système immunitaire acquis, spécifique des vertébrés.

I.2.2.2.2. Les intégrines

Sont des glycoprotéines transmembranaires ; qui interagissent avec des molécules impliquées dans la polarisation intracellulaire (enzyme à activité tyrosine kinase, Src...) qui, dans de nombreux cas, conduisent à l'activation des MAP kinase (mitogen activated protein kinase). La famille des intégrines compte une vingtaine de membres dont la fonction majeure est de connecter, physiquement et fonctionnellement, le cytosquelette des cellules aux protéines extracellulaires d'adhésion de la matrice extracellulaire.

Les intégrines sont des hétérodimères membranaires $\alpha\beta$ et les 24 assortiments connus des sous-unités (18 α et 8 β) dans les hétérodimères confèrent à chacune ses propriétés

particulières de liaison. Du côté intracellulaire, les intégrines interagissent avec de nombreuses protéines, dont des protéine kinases, et indirectement avec le cytosquelette.

I.2.2.2.3. Le CD 44

Est un protéoglycane transmembranaire relié au cytosquelette actinique qui, par son rôle de présentation des facteurs de croissance, est impliquée dans la prolifération cellulaire

On distingue plusieurs modes :

I.2.3. La signalisation de proximité :

Dans ce cas, les cellules émettrices et les cellules cibles sont proches. il y a deux types :

I.2.3 .1. La communication paracrine :

Les cellules émettrices et les cellules cibles appartiennent à deux types cellulaires différents. Les cellules cibles sont à proximité des cellules émettrices.

I.2.3.2. La communication autocrine :

Les cellules émettrices et cibles sont de même type cellulaire. Les cellules produisent un signal qui peut se fixer sur leurs propres récepteurs. Ce type de communication permet de coordonner l'action de groupes de cellules.

I.2.4. La signalisation de distances : elle se fait par l'intermédiaire de molécules sécrétées. Ces molécules sécrétées peuvent être :

- Des hormones : hormones stéroïdiennes (lipide), glycoprotéines. on parle de la signalisation endocrine
- Des neurotransmetteurs (acides aminés ou dérivés d'acide aminés)
- Des facteurs de croissances (et parfois des morphogènes)

Dans la signalisation de distance : deux types de cellules sont spécialisés dans la transmission des signaux à distances :

I.2.4.1. La communication synaptique :

Par les neurones : on parle de la transmission synaptique. Les cellules émettrices (neurones) rentrent en contact avec les cellules cibles (parfois très éloignées) par l'intermédiaire de leurs axones.

I.2.4.2. La communication endocrine :

Les cellules endocrines qui libèrent des molécules dans le sang (les hormones) et les cellules cibles qui sont situées dans tout l'organisme, on parle alors de la signalisation endocrine.

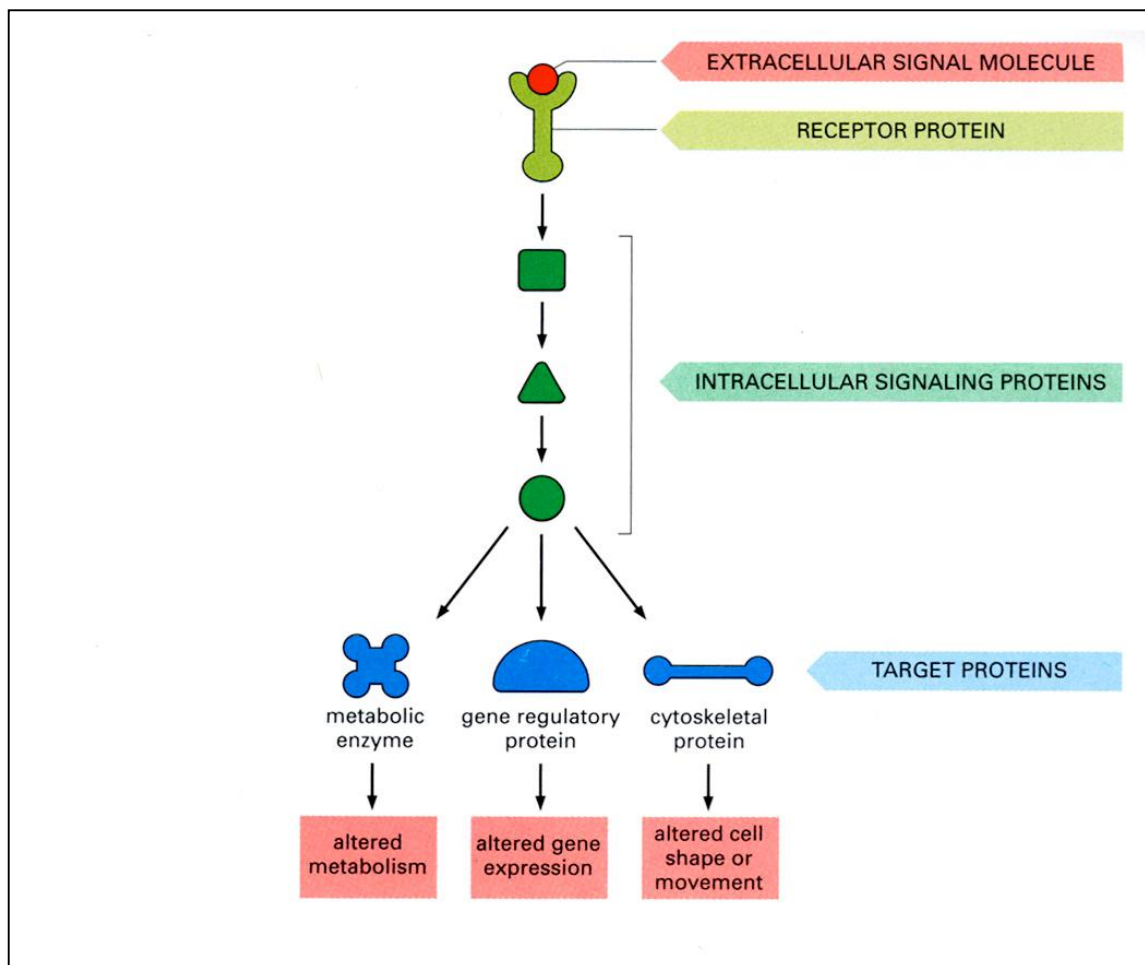


Figure 01 : cascade de signalisation intracellulaires (Allberts *et al*,2012)

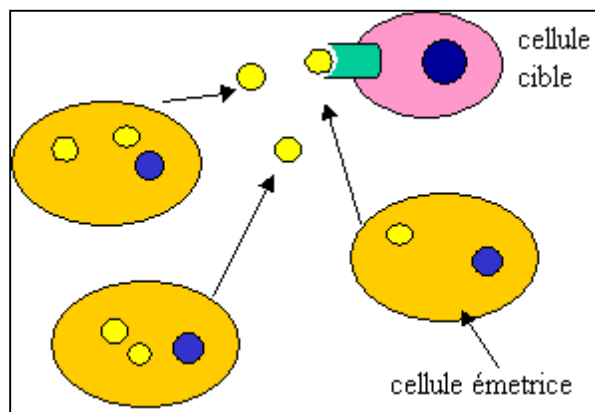
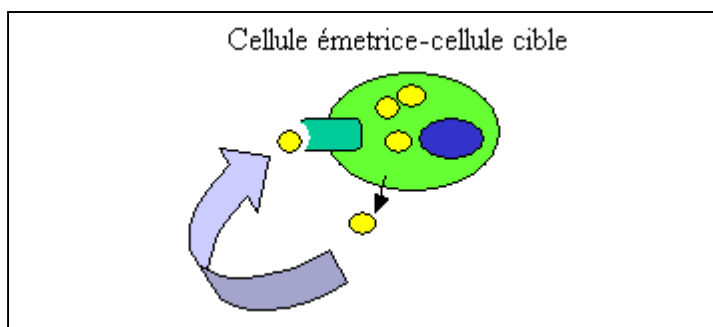
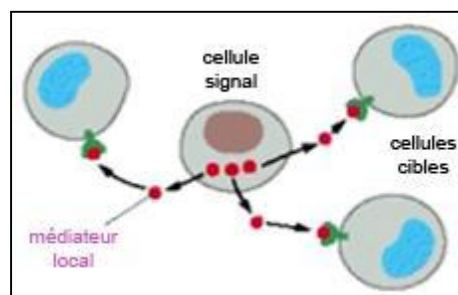


Figure 02 : La communication cellulaire (Bassaglia, 2013)



**Figure 03 : La communication autocrine
(Kierszenbaum, 2006)**



**Figure 04 : La communication paracrine
(Kierszenbaum, 2006)**

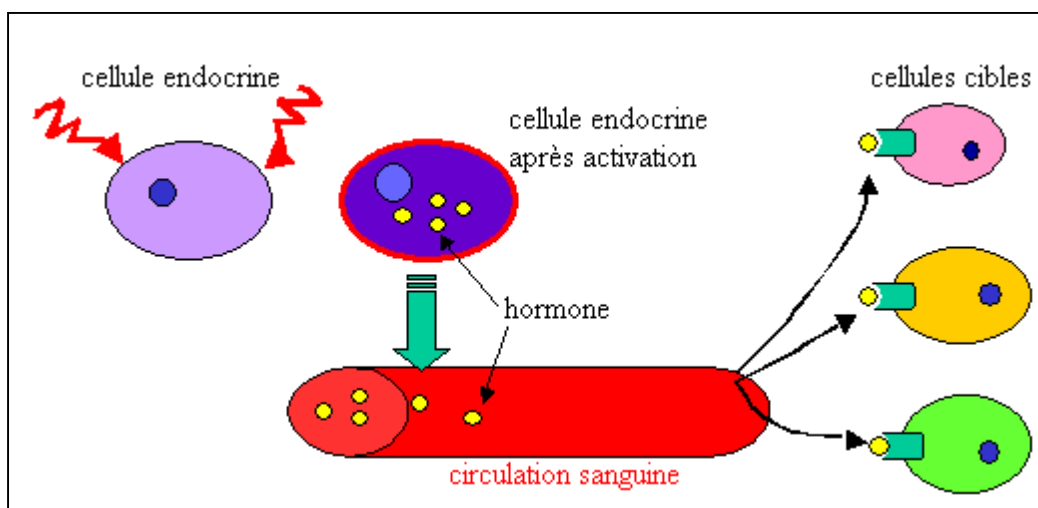


Figure 05 : La communication endocrine (Kierszenbaum, 2006)

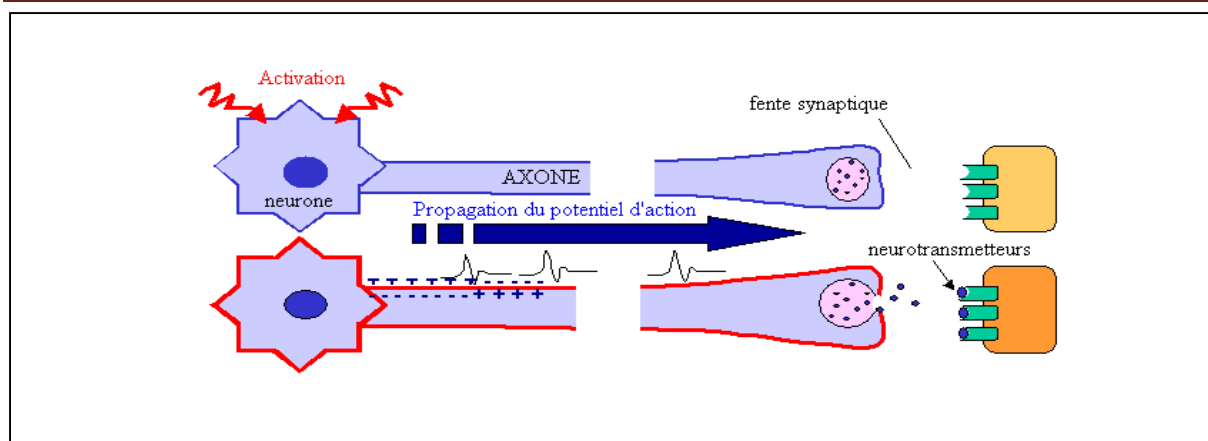


Figure 06 : La communication synaptique (Kierszenbaum, 2006)

I.3. Mécanisme d'action des molécules de signalisation cellulaire

Les molécules de signalisation cellulaire exercent leur action après fixation sur des récepteurs exprimés par leurs cellules cibles. Les cellules cibles, à leur tour, peuvent réguler la libération de l'hormone qui les a stimulées par un mécanisme de feed-back (rétro-contrôle) négatif ou positif.

Les récepteurs cellulaires peuvent être exprimés à la surface des cellules –cible. Certains récepteurs sont des protéines intracellulaires du cytosol ou du noyau des cellules cibles. Les récepteurs intracellulaires requièrent la diffusion des molécules de signalisation à travers la membrane plasmique.

Les hormones stéroïdes appartiennent à cette classe de molécules signaux. Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol et incluent la testostérone, les œstrogènes, la progestérone et les corticostéroïdes.

La testostérone, les œstrogènes et la progestérone sont des stéroïdes sexuels, et sont produit par les gonades.

Les corticostéroïdes sont produits par le cortex de la glande surrénale et se répartissent en deux classe essentielles : les glucocorticoïdes, qui stimulent la production du glucose, et les minéralocorticoïdes, qui adissent sur le rein pour contrôler l'équilibre entre l'eau et le sodium.

Il existe trois molécules de signalisation structurellement et fonctionnellement distinctes des stéroïdes mais qui agissent sur des cellules cibles par fixation sur des récepteurs intracellulaires après avoir pénétré dans la cellule par diffusion à travers la membrane plasmique. Il s'agit de **l'hormone thyroïdienne** (produite dans la thyroïde pour réguler le développement et le métabolisme), **la vitamine D** (qui contrôle le métabolisme du calcium et la croissance osseuse) et des **rétinoïdes** (synthétisés à partir de la vitamine A pour contrôler le développement)

I.3.1. L'oxyde nitrique :

L'oxyde nitrique est une molécule signal. C'est un gaz simple synthétisé à partir d'un acide aminé, l'arginine, par une enzyme appelé **oxyde nitrique synthase**. Elle agit comme une molécule de signalisation paracrine dans le système nerveux, immunitaire et circulatoire. Comme les hormones stéroïdes, l'oxyde nitrique peut diffuser à travers la membrane plasmique de ses cellules cibles. Mais contrairement aux hormones stéroïdes, l'oxyde nitrique ne se fixe pas sur un récepteur intracellulaire pour réguler la transcription. En réalité, il régule l'activité d'enzyme intracellulaires cibles.

L'oxyde nitrique possède les caractéristiques suivantes :

1-C'est une molécule instable à demi-vie limitée (seconde)

2-Il provoque des effets locaux

3- Une fonction bien connue de l'oxyde nitrique est la dilatation des vaisseaux sanguins. Par exemple, la libération d'acétylcholine, un neurotransmetteur, par les terminaisons des cellules nerveuses dans la paroi musculaires du vaisseau sanguin stimule la libération d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales.

L'oxyde nitrique augmente l'activité du second messager guanosine monophosphate cyclique (GMP_c) dans les cellules musculaires lisses, provoquant un relâchement de la cellule musculaire et une dilatation du vaisseau sanguin. La nitroglycérine, un agent pharmacologique utilisée dans le traitement des cardiopathies, est transformée en oxyde nitrique, qui augmente le débit sanguin cardiaque par dilatation des vaisseaux coronariens.

I.4. Les variétés des molécules de signalisation

Une grande variété de molécules-signaux se fixent sur des récepteurs de la surface cellulaire. On en reconnaît plusieurs groupes :

I.4.1. Les peptides :

Ce groupe inclue des **hormones peptidiques** (insuline, glucagon et hormone sécrétées par l'hypophyse), des neuropeptides sécrétés par les neurones (**enképhaline et endorphine**, qui atténuent les réponses douloureuses dans le système nerveux centrale), et **des facteurs de croissances** qui contrôlent la croissance et la différenciation cellulaires (**facteur de croissance nerveux, nerve growth factor, NGF ; facteur de croissance épidermique, epidermal growth factor, EGF ; facteur de croissance d'origine plaquettaire, platelet-derived growth factor, PDGF, et cytokine**)

Le NGF est un membre de la famille des peptides appelés neurotrophine qui régule le développement et la viabilité des neurones . L'EGF stimule la prolifération cellulaire et joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. Le PDGF est stocké dans les plaquettes sanguines et libéré au cours de la formation du caillot.

I.4.2. Les neurotransmetteurs :

Ces molécules de signalisation cellulaires sont libérées par les neurones et agissent sur des récepteurs cellulaires de surface présents sur les neurones et d'autres types de cellules cibles (comme les cellules musculaires). Ce groupe inclue **l'acétylcholine, la dopamine, l'adrénaline (épinéphrine), la sérotonine, l'histamine, le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA)** . La libération des neurotransmetteurs par les neurones est déclenchée par un potentiel d'action. Les neurotransmetteurs libérés diffusent à travers la fente synaptique et se fixe sur des récepteurs de surface des cellules cibles.

Tous les neurotransmetteurs n'ont pas le même mécanisme d'action. Par exemple, l'acétylcholine est un canal ionique ligand-dépendant. Elle induit un changement de conformation des canaux ioniques pour contrôler le flux des ions à travers la membrane plasmique des cellules cibles.

I.4.3. Les eicosanoides et les leucotriènes :

Ce sont des molécules de signalisation cellulaire contenant des lipides qui, contrairement aux stéroïdes, se fixent sur des récepteurs cellulaires de surface.

Les prostaglandines, la prostacycline, les thromboxanes et les leucotriènes font partie de ce groupe de molécules. Ils stimulent l'agrégation des plaquettes, les réponses inflammatoires et la contraction musculaire lisse.

Les eicosanoides sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique. Au cours de la synthèse des prostaglandines, l'acide arachidonique est converti en prostaglandine H_2 par une enzyme, la prostaglandine synthase. Cette enzyme est inhibée par l'aspirine et par les anti-inflammatoires. L'inhibition de la prostaglandine synthase par l'aspirine diminue la douleur, l'inflammation, l'agrégation plaquettaire et la formation du caillot sanguin.

I.5. Les récepteurs et leurs ligands :

I.5.1. Définition :

Un récepteur peut être défini comme une structure moléculaire de nature polypeptidique qui interagit spécifiquement avec un messenger, hormone, médiateur, cytokine, ou à un contact intercellulaire spécifique.

Les récepteurs sont situés soit au niveau de la membrane cytoplasmique, soit à l'intérieur de la cellule, dans le noyau notamment. La même cellule comporte en général plusieurs types de récepteurs différents.

En biologie, un ligand (du latin *ligandum*, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. La liaison se réalise grâce aux forces entre molécules, telles que les liaisons ioniques, les liaisons d'hydrogène et les forces van der Waals.

L'association avec un récepteur spécifique est la première étape du transfert de l'information du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

Une sémiomolécule agit uniquement sur des cellules-cibles car elles seules possèdent des récepteurs qui lui sont spécifiques.

Les récepteurs sont de nature protéique, ils sont génétiquement déterminés pour reconnaître et lier de façon stéréospécifique une sémiomolécule du milieu extracellulaire. Chaque récepteur ne reconnaît en général qu'une seule molécule-signal avec laquelle il a une affinité élevée.

On peut considérer que le rôle du récepteur est triple :

1°) Reconnaissance et fixation du messager : La molécule-signal agit comme un ligand qui se lie à un site du récepteur (site de liaison du ligand).

2°) Transduction du message : L'interaction ligand-récepteur entraîne un changement de conformation du récepteur au niveau du site exécutif

3°) Sollicitation du système effecteur : Le récepteur possède également au niveau de son site exécutif, une spécificité pour l'effecteur ou pour son relais. Ceci permet le déclenchement d'une série d'événements intracellulaires qui aboutissent à un changement d'activité cellulaire et/ou dans le programme de transcription de gènes dans les cellules cibles.

Il est à noter cependant, que :

- Différents types de cellules peuvent présenter différents types de récepteurs pour le même ligand, chacun induisant une réponse cellulaire différente. Ainsi par exemple, les cellules du muscle cardiaque ont des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine alors que les cellules du muscle squelettique possèdent des récepteurs nicotiniques. Les deux types cellulaires répondent différemment au même ligand.

- Le même récepteur peut exister sur des cellules différentes, et la liaison du même ligand sur le même récepteur dans ces cellules induit des réponses différentes. C'est le cas des cellules du muscle cardiaque et des cellules de la glande salivaire

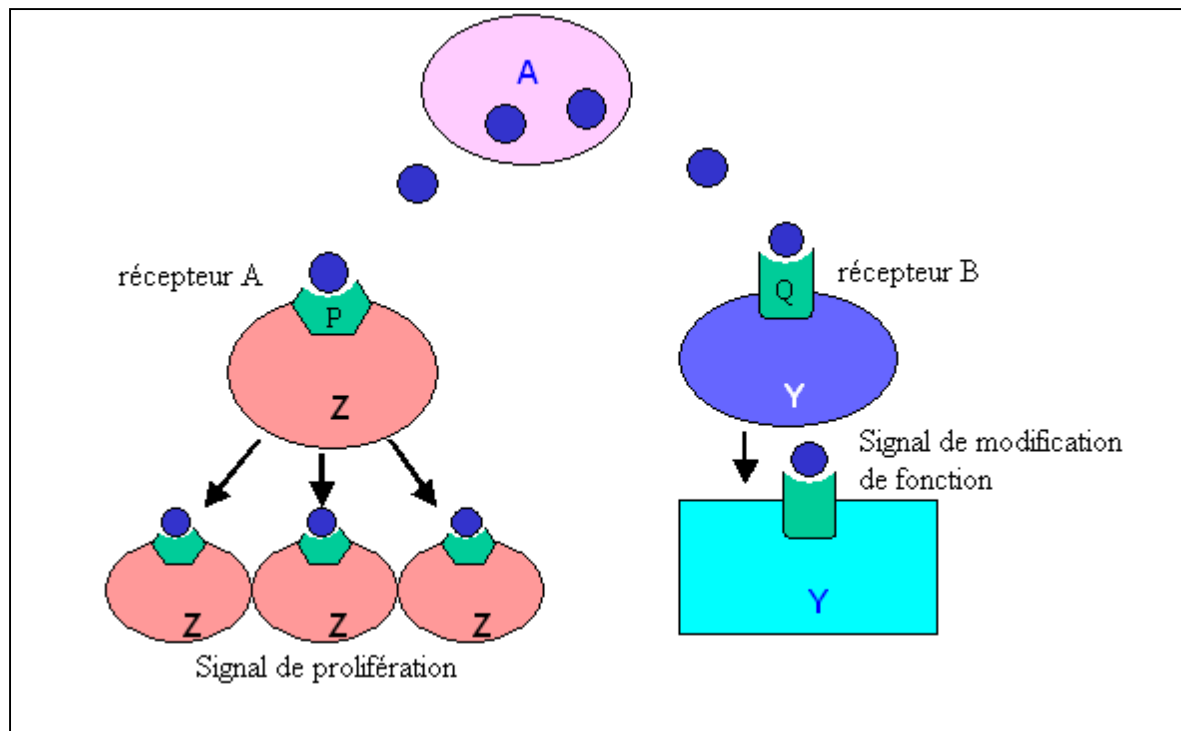


Figure 07: Schéma descriptif de la régulation de différentes cellules suite à la réception d'un même signal (Alberts *et al*, 2012)

I.5.2. Les caractéristiques des récepteurs :

- **Spécificité** : il fixe un type de ligand donné
- **Saturabilité** : le nombre des molécules de récepteur dans une cellule étant fini le nombre de molécules de ligand pouvant se fixer est limité.
- **Réversibilité** : la liaison en récepteur et ligand étant de nature non covalente, le complexe ligand –récepteur se dissocie lorsque la concentration du ligand diminue.
- **Couplage** : la fixation du ligand au récepteur transmet un signal à la cellule, c'est la caractéristique la plus importante.

I.5.3. Classification des récepteurs selon leur localisation

Sur la base de leur localisation dans la cellule, on distingue deux grands types de récepteurs : les récepteurs membranaires et les récepteurs intracellulaires.

- **Les récepteurs sont membranaires** lorsque les molécules ne traversent pas, ou passent difficilement, la membrane plasmique (hormones et parahormones peptidiques, cytokines, catécholamines, eicosanoïdes, ...).
- **Ils sont intracellulaires** pour les molécules plus lipophiles dont la perméabilité membranaire est plus élevée comme les hormones stéroïdes et thyroïdiennes. Selon leur type, les récepteurs libres (sans ligand) peuvent être localisés dans le cytoplasme ou dans le noyau.

I.5.3.1. Récepteurs membranaires

I.5.3.1.1. Définition

Les récepteurs membranaires sont des glycoprotéines transmembranaires complexes fichées dans la membrane plasmique. Leurs fonctions principales est de reconnaître le message chimique, de le traduire et de l'amplifier, on distingue 3 régions :

- une extracellulaire glycosylée reconnaissant et fixant la molécule,
- une transmembranaire (hydrophobe) ancrée dans la membrane,
- une intracellulaire responsable des événements biochimiques.

Ils peuvent produire trois types de réponse cellulaire :

- une réponse électrophysiologique, elle correspond aux récepteurs canaux-ioniques et permet une réponse très rapide : moins d'une seconde;
- une réponse métabolique responsable de modifications post-traductionnelles des protéines, donc réponse enzymatique rapide de l'ordre de la minute;
- une réponse transcriptionnelle activant ou inhibant l'expression de certains gènes, réponse donc plus lente se comptant en heures.

Généralement ces types de réponses se traduisent par la production d'un second messenger ou de cascade de phosphorylation. A chaque molécule informative correspond un récepteur mais une molécule informative peut avoir plusieurs récepteurs. On définit donc des familles de récepteurs.

5.3.1.2. Types de récepteurs membranaires

Il existe trois grandes classes de récepteurs membranaires

1)-Les récepteurs couplés à un canal ionique :

Laissent passer à travers la membrane, un flux d'ions qui produit un courant électrique sont impliqués essentiellement dans la signalisation synaptique rapide entre les cellules électriquement excitables. Ce type de signalisation s'effectue par l'intermédiaire de neurotransmetteurs qui ouvrent et ferment transitoirement le canal ionique formé par des protéines à plusieurs domaines transmembranaires.

2)- Les récepteurs couplés à une protéine G :

Activent une classe spéciale de protéines liées à la membrane (une protéine trimérique de liaison au GTP ou protéine G), qui activent ensuite soit une enzyme soit un canal ionique dans la membrane plasmique, déclenchant une cascade d'autres effets.

3)- Les récepteurs liés à une enzyme :

Agissent comme des enzymes ou s'associent à une enzyme à l'intérieur de la cellule quand ils sont activés, les enzymes activent tout une série de voies de signalisation intracellulaire. Ils sont formés de protéines à un seul domaine transmembranaire qui ont leur site de liaison au ligand situé à l'extérieur de la cellule et leur site catalytique ou de liaison enzymatique situé à l'intérieur. La grande majorité de ces récepteurs sont des protéine-kinases, ou sont associés à des protéine-kinases et les ligands qui s'y fixent provoquent la phosphorylation de groupes spécifiques de protéines dans la cellule cible.

Il existe 5 classes de récepteurs couplés aux enzymes :

a) les récepteurs à activité tyrosine-kinase ;

- b) les récepteurs associés aux tyrosine-kinases ;
- c) les récepteurs à activité sérine/thréonine-kinase ;
- d) les récepteurs associés aux histidine-kinases et
- e) les guanylates cyclases transmembranaires.

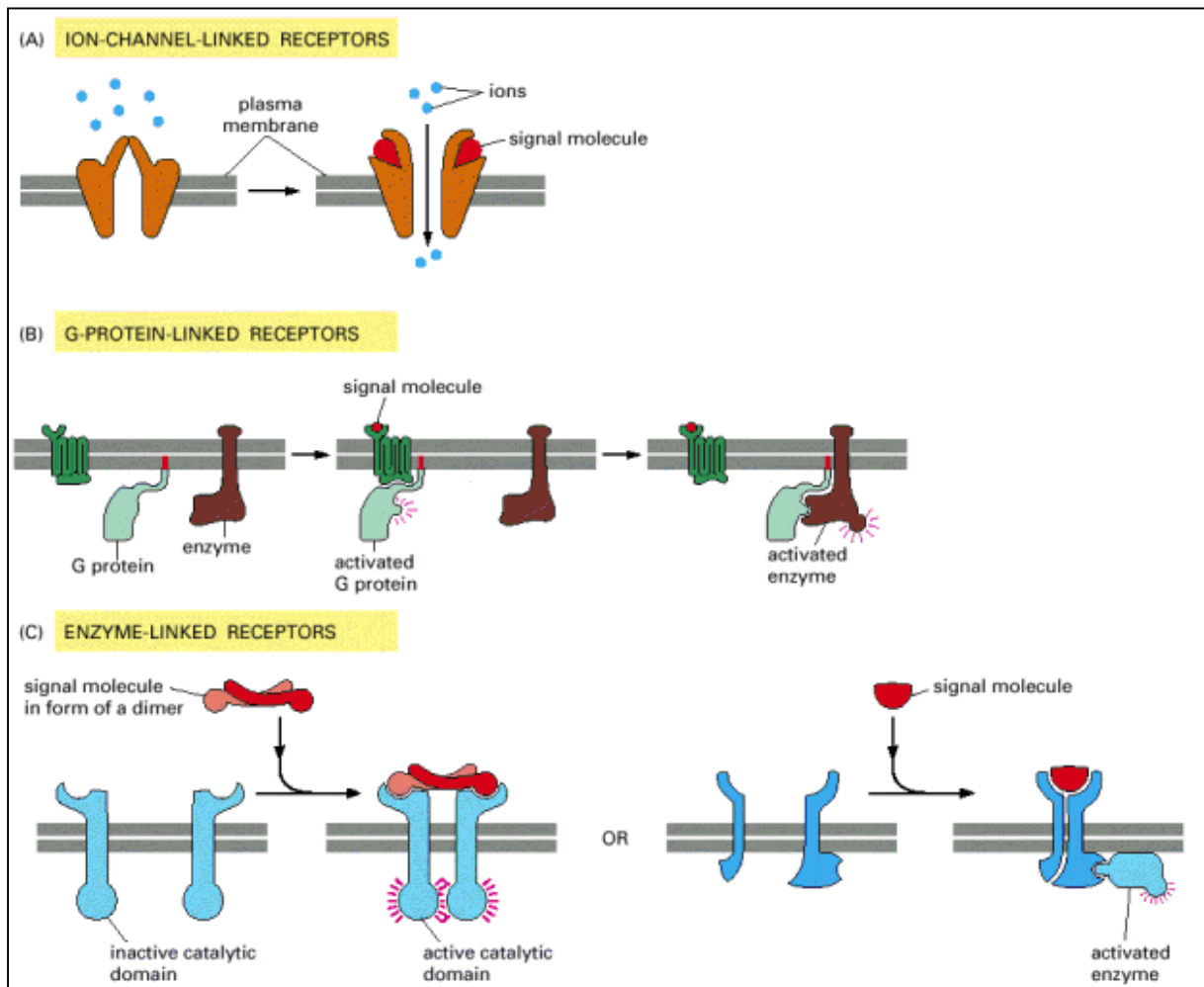


Figure 08 : Les différents types de récepteurs (*Alberts et al,2012*)

I.6. Le réseau de molécules de signalisation intracellulaire :

Avant d'arriver à la molécule-cible finale, le signal reçu au niveau du récepteur est relayé à l'intérieur de la cellule par une combinaison de molécules de signalisation intracellulaire de nature protéique ou non.

I.6.1. Les seconds messagers

Généralement, on appelle "seconds messagers" des molécules non protéiques, de petite taille (faible poids moléculaire) qui sont produites en grand nombre en réponse à l'activation du récepteur par certaines sémiomolécules (premiers messagers).

Les seconds messagers diffusent rapidement dans les différentes parties de la cellule-cible pour y propager le signal. Ils font passer le signal en se liant à des protéines de signalisation spécifiques ou directement à la protéine-cible, modifiant ainsi leur activité. Les seconds messagers les plus connus sont les nucléotides cycliques (AMP_c et GMP_c), le calcium (Ca⁺⁺) et certains dérivés du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP₂) notamment le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃).

❖ L'AMP_c (Adénosine Monophosphate Cyclique)

A été le premier second messenger découvert en 1967, il agit dans un très grand nombre de types cellulaires pour participer à la régulation d'une très grande variété de processus physiologiques, un grand nombre de messenger chimique stimule la synthèse d'AMP_c via l'activation d'une protéine G_s, Il intervient dans la régulation de nombreuses enzymes, en particulier dans le cadre du métabolisme intermédiaire. La cible du cAMP est la protéine kinase A (PKA), une sérine/thréonine kinase tétramérique, faite de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités régulatrices, elle phosphoryle un grand nombre de protéines, ce qui a pour conséquences majeurs :

- 1- d'induire la l'activation de la phosphorylase b (impliquée dans le métabolisme énergétique)
- 2- de stimuler la calcium ATP ase du réticulum (stimulation du repompage du calcium)
- 3- d'induire l'ouverture de canaux ioniques membranaires sensible au voltage (K⁺ , Ca⁺⁺)

4-de moduler la synthèse protéique via son action sur la MAPK (mirogin activated protein kinase)

5- La PKA exerce également un effet majeur sur la transcription des gènes, en phosphorylant et en activant un facteur de transcription (voir Annexe B) nommé CREB (*cAMP responsive element binding protein*) qui migre dans le noyau et reconnaît des séquences nucléotidiques dans le promoteur de gènes cibles, séquences appelées CRE (*cAMP responsive element*).

❖ **Phospholipases C, diacylglycérol et inositol triphosphate :**

La **phospholipase C** spécifique des phosphoinositides (phospholipase C β) qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphonate pour former deux médiateurs intracellulaires : l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) et le DAG.

-**L'IP3** provoque une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (iCa^{2+}) par relargage du Ca^{2+} situé dans le réticulum endoplasmique (RE). L'augmentation du iCa^{2+} peut activer directement de nombreuses voies de signalisation et/ou indirectement après sa liaison avec la calmoduline activant alors des sérines/thréonine-kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (CaM-kinases). La CaM-kinase II est une des plus importantes CaM-kinases.

- **Le DAG**, molécule liposoluble qui reste dans la membrane plasmique, va activer la protéine-kinase C (PKC) qui est aussi dépendante du Ca^{2+} . L'activation des protéine-kinases PKA, PKC et CaM-kinases induit la phosphorylation de protéines cibles qui vont modifier le comportement de la cellule.

❖ **Le calcium :**

La teneur en calcium cytoplasmique Ca^{++} est un paramètre fortement régulé. La concentration cytoplasmique, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-10}$ M, est très faible, si on la compare au teneur du calcium extracellulaire ou au calcium contenue dans les sites de stockage (de l'ordre de 10^{-3}), la variation de la $[\text{Ca}^{++}]$ constituent un message pour un grand nombre d'actions enzymatiques. Le calcium peut agir directement ou via la calmoduline, une protéine qui lie le calcium

I.6.2. Les molécules protéiques

Les molécules protéiques de signalisation intracellulaire appartiennent à plusieurs catégories et interviennent selon le type de récepteurs et de la cellule-cible. Nous en citons ici les principales classes:

➤ **Les protéines G** qui agissent comme des commutateurs moléculaires dans les voies de signalisation. En absence de signal, elles lient le GDP et sont inactives ("Off"). Le signal entraîne le remplacement du GDP par le GTP au niveau de la protéine G qui devient alors active ("On"). Les protéines G manifestent une activité GTPasique qui leur permet de retourner à l'état inactif en hydrolysant le GTP en GDP et phosphate inorganique (Pi).

➤ **Les protéines qui jouent le rôle d'amplificateurs.** Elles peuvent être des enzymes ou des canaux ioniques qui augmentent largement le signal qu'elles reçoivent, soit en produisant des taux élevés en seconds messagers, soit en activant un grand nombre de protéines de signalisation intracellulaire en aval de la cascade.

➤ **Les protéine-kinases** : Ce sont des enzymes qui phosphorylent des molécules protéiques de la voie de signalisation au niveau de certains acides aminés, modulant ainsi leur activité. Il existe deux principales protéine-kinases de la signalisation intracellulaire dans les cellules animales. Les tyrosine-kinases qui phosphorylent certaines tyrosines (Tyr ou Y) et les serine/thréonine-kinases, plus nombreuses, qui phosphorylent certaines serines (Ser ou S) et/ou thréonines (Thr ou T). À noter que certaines protéine-kinases ont une double spécificité ; elles phosphorylent à la fois les résidus tyrosine et serine/thréonine.

➤ **Les protéine-phosphatases** : leur activité s'oppose à celle des protéine-kinases. Ce sont des enzymes qui déphosphorylent les protéines au niveau des acides aminés Tyr ou Ser/Thr.

➤ **Les protéines adaptatrices:** Elles n'ont pas d'activité catalytique. Elles consistent seulement en deux ou plusieurs domaines de liaison (voir ci-dessous). Leur rôle se limite à lier entre elles, d'autres protéines de signalisation.

➤ **Les protéines « scaffold » ou d'agrégation temporaire :** Ce sont des protéines possédant plusieurs domaines leur permettant de lier plusieurs molécules intervenant dans une même voie de signalisation. Le rapprochement de ces molécules facilite la propagation du signal, tout en évitant sa déviation vers d'autres voies de signalisation inappropriées. Certaines protéines scaffold peuvent avoir également une activité enzymatique qui intervient dans la propagation du signal.

I.6.3. LES MOLECULES CIBLES

À la fin de chaque voie de signalisation, le message arrive au niveau de protéines cibles dont la modulation va entraîner un changement dans le comportement de la cellule. En fonction du signal, ces molécules peuvent être des protéines régulatrices de gènes, des composants d'une voie métabolique, des canaux ioniques, des transporteurs, une partie du cytosquelette, ...etc. Ceci peut se traduire par une ou plusieurs actions ou effets : synthèse protéique, modification d'une sécrétion, ouverture ou fermeture d'un canal, contraction ou relâchement d'une fibre musculaire, ...etc.

II. Les récepteurs membranaires :

II.1. Les récepteurs couplés aux protéines G(RCPG) :

II.1.1. Définition :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), famille de protéines à sept hélices transmembranaires réunis en faisceau, constitués d'acides aminés très hydrophobes et reliés par trois boucles externes et trois boucles cytoplasmiques, avec un domaine extracellulaire (ectodomaine N-terminal) et un domaine intracellulaire (endodomaine C-terminal). constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez l'Homme.

Ils sont ubiquitaires et contrôlent les principales fonctions de l'organisme tels que l'odorat, le goût, la vision, ainsi que la réponse cellulaire aux hormones et neurotransmetteurs. Il a été démontré qu'environ mille gènes codent ces récepteurs, ce qui représente environ 2% du génome humain, à ce jour, plus de 800 RCPG ont été identifiés dans le génome humain.

Des signaux extracellulaires de nature chimique très diversifiée, telles que des hormones, des neurotransmetteurs, des lipides, des aminoacides, la lumière, des monoamines (adrénaline, sérotonine), des acides aminés (acide glutamique), des glycoprotéines, des lipides, des nucléosides ou nucléotides (adénosine, ATP, ...). des ions, ciblent les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Cela aboutit à de multiples voies de signalisation qui sont autant de cibles thérapeutiques dans divers domaines (cancer, maladies cardiovasculaires et du système nerveux, diabète, obésité, inflammation, ...).

La transmission de la majorité des signaux cellulaires à travers la membrane plasmique se fait par l'intermédiaire des RCPG. Ainsi, toute perturbation dans leur fonctionnement peut conduire à des pathologies comme l'allergie, l'hypertension artérielle, la maladie d'Alzheimer ou encore la schizophrénie. De nombreux médicaments sont agonistes ou antagonistes des RCPG qui représentent la cible d'environ 50% d'entre eux.

Ces récepteurs ont une structure tridimensionnelle flexible, qui oscille d'une façon dynamique entre des conformations inactives et actives, stabilisées par le ligand spécifique et par le couplage aux protéines de transduction du signal.

Le système **RCPG** concerne une séquence de transduction d'un message porté par une molécule-signal « premier messenger » à l'extérieur de la cellule, vers le milieu intracellulaire. Il comprend :

- 1) la liaison du ligand (molécule-signal) à son récepteur spécifique ;
- 2) l'activation d'une protéine G ;
- 3) l'activation d'un système enzymatique effecteur impliqué dans la production de « seconds messagers ». Ces seconds messagers vont induire des effets physiologiques par l'intermédiaire d'une modulation de l'activité de différentes protéines surtout de type kinasique, mais également de canaux ioniques et des GEF (Facteurs d'échange guanilique).

Les récepteurs du système RCPG constituent la famille la plus nombreuse des récepteurs membranaires. Les ligands de plus de 200 récepteurs couplés aux protéines G sont connus actuellement. Mais le nombre de sous-types de ces récepteurs dépasse le millier si l'on tient compte des récepteurs sensoriels gustatifs et surtout olfactifs qui constituent une famille à part de RCPG. Ce chiffre représente environ 1-2 % de l'ensemble des gènes du génome des mammifères.

Les RCPG présentent tous des caractéristiques structurales fondamentales communes. Ils sont tous constitués d'une seule chaîne polypeptidique possédant 7 segments transmembranaires en hélice . L'extrémité N-terminale est localisée dans le milieu extracellulaire. L'extrémité C-terminale est cytoplasmique.

Le rôle des RCPG est triple :

- 1) ils fixent spécifiquement une molécule-signal donnée ;
- 2) ils transmettent le signal au sein de la membrane ;

3) ils interagissent avec des protéines G permettant ainsi la sollicitation de systèmes effecteurs.

II.1.2. Structure

Tous les RCPG possèdent une structure générale identique, malgré une faible homologie de séquence. Ils sont composés d'une région N-terminale extracellulaire qui peut faire l'objet de modifications post-traductionnelles de type N-glycosylation, de sept domaines (hélices alpha) transmembranaires (TM 1 à 7) liés par 3 boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2 et I3). Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent respectivement du côté extracellulaire et intracellulaire, la région C-terminale intracellulaire peut être phosphorylée sur différents résidus par la kinase A, la protéine kinase C ou les GRK (G-protein-receptor kinase). L'extrémité N-terminale constitue la région la plus variable, pouvant être constituée de 7 acide aminé comme dans le cas du récepteur A2 de l'adénosine comme de 5900 acide aminé dans le cas du VLGR (Very Large G-protein coupled Receptor). Ces variations de taille importantes dans la longueur des extrémités N-terminale et des boucles constituent un des critères permettant de caractériser les différentes familles de RCPG.

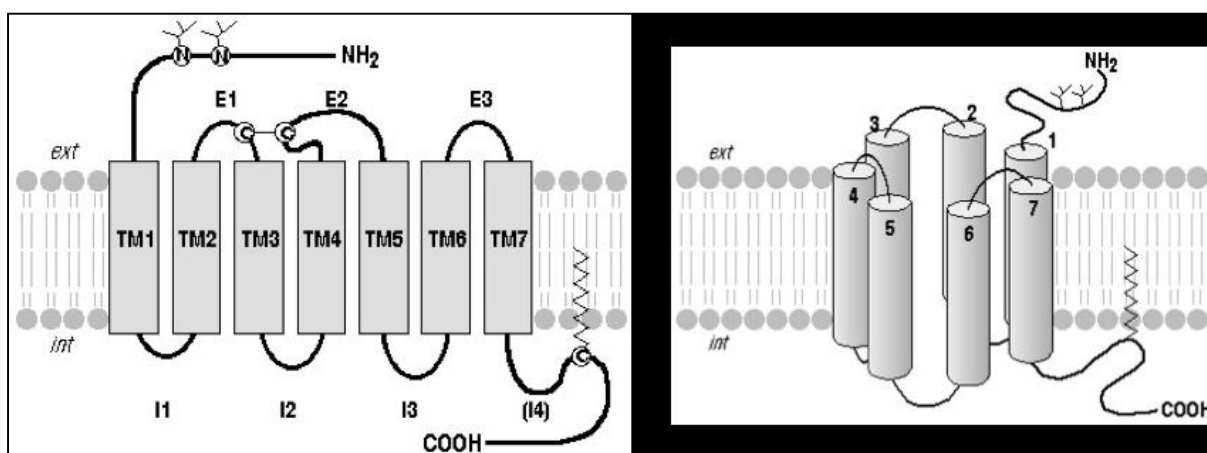


Figure 09 : Structure générale des RCPG (Déséchaliers, 2016)

II.1.3. Classification

De nombreux systèmes de classification des RCPG ont été proposés. Ils répartissent les récepteurs en sous-groupes ou familles en se basant sur des critères variés tels que le mode de liaison du ligand, la structure, la phylogénie ou encore la composition en aa.

La classification la plus répandue est celle établie par Kolakowski en 1994, qui attribue une lettre à chaque famille de RCPG

1 – La famille **A** : « **Rhodopsin like** »

2 – La famille **B** : « **Secretin like** »

3 – La famille **C** : « **Metabotrope-glutamate/pheromone** »

4 – La famille **D** : « **fungal pheromone** »

5- La famille **E** : « **AMP cyclique** »

6-La famille **F** : « **Frizzled/smoothened** »

II.1.4. Les protéines G trimériques

II.1.4.1. Structure tridimensionnelle

Les protéines G trimériques permettent la transduction de signaux transmembranaires. Ce sont des protéines à activité GTPase qui correspondent au principal partenaire intracytoplasmique des RCPG.

Les protéines G trimériques interagissent avec les RCPG par l'intermédiaire de quelques résidus amino-acyles localisés principalement sur les boucles intracellulaires 2 et 3, et sur la partie proximale de l'extrémité C-terminale. Le complexe que forme la protéine G est composé de trois chaînes peptidiques : les sous-unités alpha ($G\alpha$), beta ($G\beta$) et gamma ($G\gamma$). Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ sont étroitement liées et fonctionnent seulement en tant que complexe (dimère $\beta\gamma$).

Les sous-unités $G\alpha$ ont une masse moléculaire entre 39 et 52 kDa et sont constituées de deux domaines structuraux principaux, un domaine hélical et un domaine GTPasique. Pour sa part, le domaine GTPasique comprend sept hélices α formant des jonctions de type crossovers pour un feuillet β composé de 5 brins parallèles et 1 brin antiparallèle. Par ailleurs, ce repliement est conservé chez les autres membres de la famille des protéines G comme les petites protéines G monomériques et est très important pour la fonction des sous-unités $G\alpha$ car il définit le site catalytique de l'hydrolyse du GTP en GDP et les interfaces d'interaction avec le complexe $G\beta\gamma$, les récepteurs et les effecteurs de signalisation.

Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ ont une masse moléculaire d'environ 36 et 8 kDa respectivement. La sous-unité $G\beta$ a deux domaines, une hélice α à l'extrémité N-terminale et un domaine replié en β -propeller à 7 lames induit par la présence dans la séquence protéique de sept motifs répétés de type WD40. Plus petite, la sous-unité $G\gamma$ est constituée de deux hélices α formant un dimère indissociable avec $G\beta$. Lié au GDP, la sous-unité $G\alpha$ forme un hétérotrimère avec le complexe $G\beta\gamma$ dont l'interface est constitué des régions N-terminal et switch I/II de la sous-unité $G\alpha$ et du domaine β -propeller de la sous-unité β .

II.1.4.2. Cycle d'activation de la protéine G

Au repos, le site catalytique de la sous-unité α du trimère $\alpha\beta\gamma$ est occupé par une molécule de GDP. La liaison d'un agoniste au récepteur induit l'activation des protéines G trimeriques concrétisée par une diminution de l'affinité de α pour le GDP et une augmentation d'affinité pour le GTP. Il se produit un échange entre le GDP, préalablement fixé, et le GTP cytosolique. L'occupation de α par le GTP induit la dissociation de α et $\beta\gamma$ qui peuvent chacune interagir avec des effecteurs, enzymes et canaux ioniques, pour générer des messagers intracellulaires. Cependant, l'activité GTPasique de α hydrolyse rapidement le GTP en GDP, et α se retrouve occupé par le GDP. Ainsi, α , perdant son affinité pour l'effecteur mais récupérant son affinité pour $\beta\gamma$, se réassocie avec $\beta\gamma$ pour reformer le trimère $\alpha\beta\gamma$ à nouveau disponible pour un nouveau cycle d'activation.

II.1.4.3. Sous-types de protéines G

L'existence d'un grand nombre de sous-unités (au moins vingt sous-unités α , cinq sous-unités β et treize sous-unités γ), codées par des gènes distincts, est à l'origine d'une grande diversité importante du trimère $\alpha\beta\gamma$. La classification des protéines G trimeriques reste basée

sur les analogies de structure des sous-unités α , avec les familles Gs, Gi, Gq et G12. Une sous famille de protéine G peut être activée par différents RCPG. Ainsi, la protéine Gs est activée par de nombreux récepteurs tels que les récepteurs beta-adrénergiques, le FSHR, le récepteurs a la calcitonine, le récepteurs au glucagon, ... Réciproquement, le même RCPG peut activer plusieurs sous-familles de protéines G. Par exemple, le R2-AD est lié classiquement a une protéine Gs, mais il peut également se lier aux protéines Gq et Gi.

II.1.4.4. Effecteurs activés par la protéine G

L'activation des protéines G conduit à la modulation de l'activité de systèmes effecteurs amplificateurs (enzymes ou canaux) aboutissant à une modification de concentration de messagers intracellulaires (seconds messagers).

Les différents seconds messagers produits vont induire des effets physiologiques surtout par l'intermédiaire d'une modulation de l'activité de différentes kinases, enzymes activant ou inhibant par phosphorylation une variété de protéines présentant des activités biologiques (enzymes, canaux, transporteurs, facteurs de transcription).

- **Effecteurs des sous-unités α des protéines G**

Les principaux effecteurs modulés par l'interaction avec les sous-unités α des protéines G trimeriques sont des systèmes enzymatiques, générant des médiateurs intracellulaires, ainsi que canaux ioniques. Une fois dissociée du complexe $\alpha\beta\gamma$, la sous-unité $G\alpha_q$ va directement activer différentes classes d'effecteurs. Les adénylates cyclases (AC) et les phospholipases C (PLC) représentent les cibles principales. L'activation de la PLC ou de l'AC mène à la production de messagers secondaires correspondants, à savoir l'AMPc pour l'AC, l'IP3 et le DAG pour la PLC. Ces messagers vont alors activer de nouveaux effecteurs entraînant ainsi l'amplification du signal. A titre d'exemple, la production d'IP3 et DAG conduit à la mobilisation des stocks de Ca^{2+} et à l'activation des PKC.

- **Effecteurs des sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G**

Le dimère $G\beta\gamma$ est impliqué dans l'activation de nombreux effecteurs tels que : l'AC, la PLC, la calmoduline, les canaux calciques, les GRK, la protéine kinase (PKD), la tubuline, le phosphatidyl-inositol, ...etc

II.1.4.5. Couplage au RCPG

Plusieurs études démontrent que le couplage de la protéine G hétérotrimérique au récepteur activé se fait principalement par la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$. De plus, le couplage des protéines G de la famille G_{ai} est inhibé par l'ajout d'une molécule d'ADP-ribose, catalysé par la toxine de la pertussis, sur la cystéine de la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$. De plus, la queue C-terminale de la sous-unité $G\alpha$ est importante dans la sélectivité de couplage des protéines G.

Des études suggèrent que d'autres domaines de la sous-unité $G\alpha$ proches de la membrane plasmique comme la queue N-terminale, la jonction 1, l'hélice α_4 , les boucles reliant l'hélice α_N et le brin β_1 (α_N - β_1), l'hélice α_2 et le brin β_4 (α_2 - β_4), l'hélice α_3 et le brin β_5 (α_3 - β_5), ainsi que l'hélice α_4 et le brin β_6 (α_4 - β_6) sont impliqués dans le couplage ou la sélectivité du couplage au récepteur. Cependant, parmi ces régions de la sous-unité $G\alpha$, seules les queues N et C-terminales ainsi que l'hélice α_4 interagissent directement avec le récepteur dans la structure cristalline du complexe $G\alpha\beta_1\gamma_2$ lié au β_2AR suggérant qu'il existe plusieurs façons d'engager le complexe hétérotrimérique aux récepteurs et que ces modes de couplage pourraient être spécifiques à chaque famille de protéines G hétérotrimériques et aux récepteurs. En fait, le couplage est aussi sensible à la conformation induite sur les récepteurs puisque pour certains RCPGs qui peuvent recruter plus d'un type de complexe hétérotrimérique, les sous-unités engagées sont fonction du ligand utilisé.

Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ ont aussi un rôle dans le couplage du complexe hétérotrimérique au récepteur. Bien que toutes les combinaisons de sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ soient possibles, certains complexes $G\beta\gamma$ peuvent se coupler de manière préférentielle avec certains récepteurs.

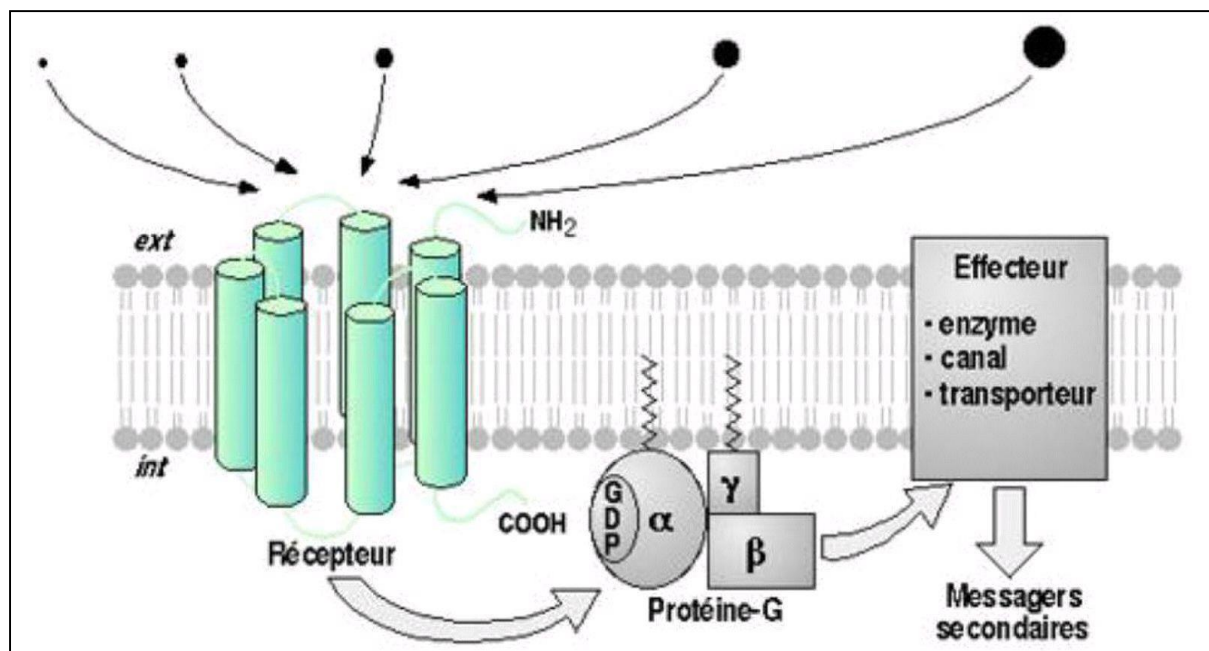


Figure 10 : Protéine G couplé au récepteur RCPG (Bockaert,2012)

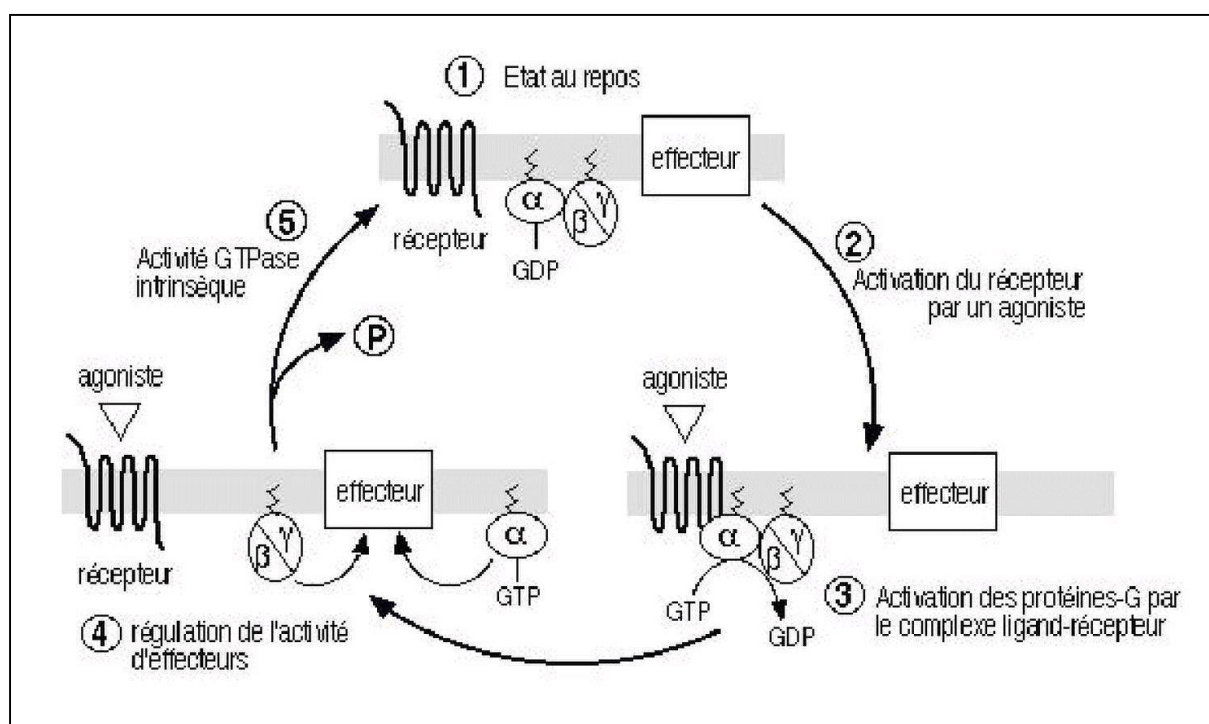


Figure 11 : Cycle d'activation des protéines G (Flouzis, 2015)

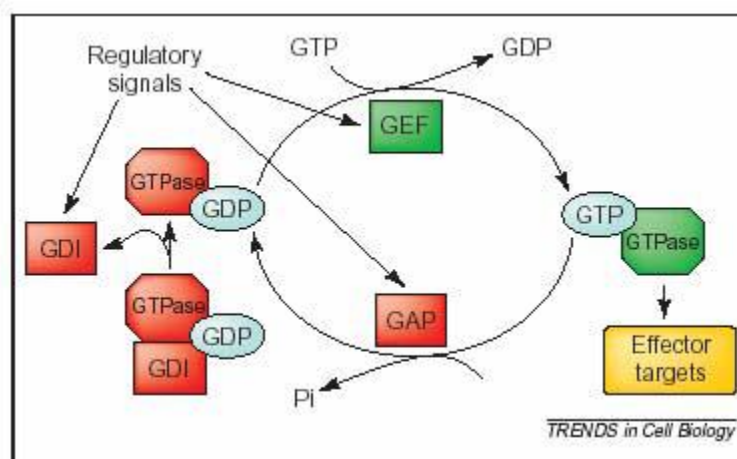


Figure 12 : Le cycle des GTPases (Sampaio, 2008).

Le cycle des GTPases est contrôlé par deux classes principales de protéines régulatrices: les GEF (Guanine-nucleotide-Exchange Factors) qui permettent la formation de la forme active liée au GTP, et les GAP (GTPase-Activating Proteins) qui permettent la formation de la forme inactive liée au GDP. Il existe une autre classe d'inhibiteurs, les GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors)

II.1.5.Régulation de l'activité des RCPG :

L'activité des RCPG repose sur un équilibre entre les mécanismes d'activation de la cascade de réactions qu'ils déclenchent et ceux qui aboutissent à leur inactivation et gouvernent l'arrêt de la réponse, permettant ainsi une meilleure adaptation de la cellule à un environnement en perpétuel changement

II.1.5.1. Elimination du ligand

Le signal intracellulaire peut être limité par l'arrêt de la présence du ligand dans le milieu extracellulaire. Deux mécanismes conduisent à la suppression du ligand du milieu extracellulaire. Soit il est éliminé par recapture via des transporteurs spécifiques, comme c'est le cas de nombreux neurotransmetteurs (*sérotonine, noradrénaline, ...*) au niveau des synapses cérébrales, soit il est dégradé par des enzymes protéolytiques contenues dans le milieu extracellulaire, comme cela peut être le cas des chimiokines tel que le CCL2.

II.1.5.2.Régulation par les RGS (Regulator of G protein Signalling)

Bien que les protéines G soient capables d'hydrolyser, elles-mêmes, le GTP qu'elles portent, le processus est extrêmement lent et n'est pas représentatif de la vitesse à laquelle le signal des RCPG est arrêté in vivo. Par exemple, le temps de demi vie de l'hydrolyse du GTP

est de 15s pour la sous-unité α purifiée tandis que la désactivation des signaux visuels associés est de 0,2s.

Dans le milieu des années 1990, une famille de protéines, les RGS, a été identifiée pour sa capacité à réguler le signal des RCPG. Les RGS ont été identifiés pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* pour leur rôle dans l'inhibition des protéines G. Ces protéines sont des GAP (GTPase-Accelerating Protein). Les RGS ne possèdent pas d'activité GTPasique à proprement parler mais elles modulent le signal des RCPG en accélérant le taux d'hydrolyse du GTP par la sous unité α réduisant ainsi la durée et l'amplitude du signal des RCPG dépendant des protéines G. La protéine G retourne alors dans son état inactif, liée au GDP. Puisqu'elles facilitent la réassociation de la sous unité α avec le complexe $\beta\gamma$, on considère que les RGS inhibent également la signalisation induite par le dimère $\beta\gamma$. La famille des RGS comprend plus de 30 membres, dont les tailles varient de 17 à 160 kDa et qui peuvent être soit membranaires soit cytosoliques. La signature des protéines de cette famille consiste en un domaine RGS de 120 résidus par lequel elle lie la sous-unité α et qui est responsable de la fonction GAP. On distingue deux classes de RGS : les petites protéines RGS (160 à 217 aa) qui ne possèdent que le domaine RGS encadré par de courtes extrémités N- et C-terminales et les grandes protéines RGS (372 à 1387 aa) qui contiennent des motifs additionnels permettant des liens entre les protéines G hétérotrimériques et d'autres voies de signalisation. Globalement leur rôle est de permettre la réassociation de l'hétérotrimère en fin de cycle.

II.1.6. Désensibilisation des RCPG :

La désensibilisation des RCPG est un processus adaptatif par lequel la réponse cellulaire, suite à l'activation d'un RCPG, décroît après une exposition prolongée avec leur agoniste.

La désensibilisation représente un mécanisme essentiel pour empêcher une surstimulation en réponse à une stimulation soutenue, c'est est un processus de régulation crucial pour la cellule dans le but Il consiste à contrôler finement la durée de la stimulation cellulaire induite par un RCPG donné.

On distingue deux types de désensibilisation : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue

II.1.6.1. Désensibilisation hétérologue

La désensibilisation des RCPG commence quelques secondes après la liaison de l'agoniste et est initiée par la phosphorylation de ceux-ci. Les protéines kinases dépendantes des seconds messagers, de la PKA et de la PKC, phosphorylent des résidus sérines et thréonines sur les boucles intracellulaires et les domaines C-terminaux de la queue cytoplasmique de plusieurs RCPG. La phosphorylation de ces sites altère le couplage des récepteurs avec les protéines G. La présence de l'agoniste n'est pas nécessaire pour ce processus. Donc, les récepteurs qui n'ont pas été en contact avec leur agoniste peuvent être désensibilisés par l'action de ces protéines kinases. Cette situation, en absence de ligand a donné naissance au terme désensibilisation hétérologue

II.1.6.2. Désensibilisation homologue

Comme la désensibilisation hétérologue, la désensibilisation homologue implique la phosphorylation des récepteurs. Cependant, la phosphorylation se fait par des kinases spécialisées pour les RCPG, les GRK (G-protein coupled receptor kinases). Ce type de désensibilisation se fait en plusieurs étapes dans lesquelles la phosphorylation est suivie de la liaison d'une protéine, l'arrestine, qui a comme rôle de découpler physiquement le récepteur et les protéines G suite à la stimulation du récepteur par son ligand

❖ GRK

La famille des kinases GRK est composée de sept membres partageant une homologie de séquence élevée. Chacune des GRK partage une organisation protéique similaire. Un domaine catalytique central, un domaine RGS à l'extrémité N-terminale pour la reconnaissance de substrats et un domaine C-terminal qui contribue à la localisation membranaire des kinases. Les membres de la famille des GRKs peuvent être sous-divisés en trois groupes basés sur leur séquence et leur fonctionnalité: 1) GRK1 et GRK7; 2) GRK2 et GRK3; et 3) GRK4, GRK5 et GRK6. La figure 13 illustre les distinctions entre les différents membres.

Le ciblage à la membrane plasmique de chacune des GRK se fait par l'entremise de mécanismes distincts qui impliquent les domaines de leur portion C-terminale. Par exemple, GRK1 et GRK7 sont farnesylés en C-terminal de la séquence CAAX.

Les domaines C-terminaux des GRK2 et GRK3 contiennent un domaine de liaison aux sous-unités $G\beta\gamma$, lequel possède une grande homologie avec celui de la pleckstrine (PH). Le domaine C-terminal de la GRK5 contient une séquence de 46 résidus d'acides aminés basiques qui lui permet d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique. GRK4 et GRK6 sont palmitoylés sur des résidus cystéine.

Les GRK phosphorylent les RCPG sur des résidus sérines et thréonines localisés dans la troisième boucle intracellulaire et sur la queue C-terminale. Aucune séquence consensus n'a été identifiée quant au site de phosphorylation des GRK. Cependant, la localisation de résidus acides proximaux au site de phosphorylation semble favoriser la phosphorylation par la GRK2. Contrairement aux protéines kinases PKA et PKC, les GRK phosphorylent préférentiellement les récepteurs qui sont dans leur conformation activée. De plus, la phosphorylation seule des GRK a peu d'effet sur le découplage des récepteurs avec leurs protéines G. Plutôt, la principale fonction des GRK dans la désensibilisation des RCPG est celle d'augmenter l'affinité du récepteur pour l'arrestine .

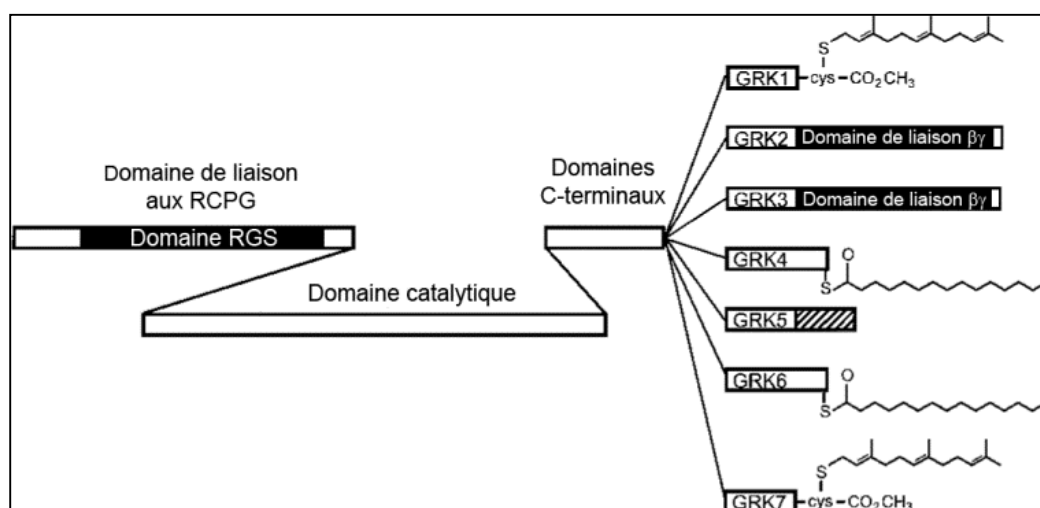


Figure 13 : Représentation schématique des domaines architecturaux des GRK (Roy, 2014)

Le domaine de liaison aux RCPG contient une région RGS conservée. Le ciblage aux membranes de chacune des GRK se fait par des mécanismes distincts impliquant leur région C-terminale. Les GRK1 et 7 sont farnesylées. Les GRK2 et 3 contiennent une région d'interaction avec les sous-unités $\beta\gamma$. La GRK5 contient une région d'acides aminés basiques pour s'associer aux phospholipides membranaires. Les GRK4 et 6 sont palmitoylées.

❖ Arrestines

La phosphorylation des RCPG dépendante des GRK n'est pas suffisante pour promouvoir une inactivation complète des récepteurs. Les arrestines sont requises pour une inactivation complète. Ces protéines contribuent à la désensibilisation des RCPG de deux manières. D'une part, elles participent au découplage physique des RCPG avec les protéines G hétérotrimériques. D'autre part, elles guident les RCPG dans la voie d'internalisation, de resensibilisation ou de dégradation.

Quatre membres de la famille des arrestines ont été identifiés. Elles peuvent être divisées en deux groupes basés sur leur homologie de séquence, leurs fonctions et leur distribution tissulaire. Le premier groupe est composé de l'arrestine visuelle (antigène S) et de l'arrestine cone (X-arrestine ou C-arrestine). Elles sont exprimées majoritairement à la rétine et régulent les fonctions des photorécepteurs. Le second groupe est composé des arrestines non visuelles, β -arrestine 1 (arrestine 2) et β -arrestine 2 (arrestine 3). Les β -arrestines sont exprimées de manière ubiquitiste (à l'exception de la rétine) et leur fonction est de réguler l'activité des autres RCPG. Les quatre arrestines lient les RCPG activés et phosphorylés par les GRK. Les queues C-terminales des β -arrestines contiennent des motifs de liaison pour la clathrine et la sous-unité $\beta 2$ -adaptine du complexe AP-2. Ces caractéristiques leur permettent d'agir comme protéines adaptatrices dans le ciblage des RCPG dans les puits d'endocytose tapissés de clathrine. Globalement, les arrestines régulent les processus d'endocytose, de trafic intracellulaire, de resensibilisation et de régulation négative des RCPG.

Les RCPG sont classés en deux catégories selon leur patron d'interaction avec les deux isoformes des β -arrestines. Les récepteurs de classe A, incluant $\beta 2$ -adrénergique et β -opioïde, lient la β -arrestine 2 avec une plus grande affinité que la β -arrestine 1. De plus, cette interaction est transitoire. La β -arrestine est recrutée au récepteur à la membrane plasmique et

est internalisée dans des puits de clathrines. Après internalisation du récepteur, il y a dissociation de la β -arrestine avec ce dernier. La β -arrestine est ensuite recyclée à la membrane plasmique tandis que le récepteur chemine dans les compartiments endosomaux. Les récepteurs de classe B, représentés par angiotensine AT1AR et vasopressine V2R, lient la β -arrestine 2 avec autant d'affinité que la β -arrestine 1. Ces récepteurs forment des complexes stables avec les β -arrestines. Ceci a pour conséquence la co-internalisation du complexe récepteur/ β -arrestine. De plus, les récepteurs ne sont pas efficacement recyclés à la membrane plasmique.

II.1.6.3. Internalisation des RCPG dépendante des β -arrestines

II.1.6.3.1. Internalisation constitutive des RCPG

A l'état inactif, les RCPG subissent une internalisation, dont le taux est relativement bas par rapport à une internalisation induite par le ligand. En plus de contribuer à l'homéostasie cellulaire, l'internalisation constitutive des RCPG pourrait servir à maintenir une réserve interne de récepteurs pour remplacer ceux qui sont désensibilisés après une exposition aux ligands.

II.1.6.3.2. Internalisation dépendante du ligand

Après l'étape de désensibilisation par les GRK, la liaison des β -arrestines au récepteur permet le découplage de la protéine G et engage le récepteur dans le processus d'endocytose. Les RCPG sont en général internalisés par une voie classique passant par la formation de puits recouverts de clathrine autour du récepteur. Si le plus souvent cette endocytose participe au recyclage des récepteurs phosphorylés et donc à la re-sensibilisation du système, elle peut également marquer la première étape de la dégradation des récepteurs. Dans les deux cas de figure, les β -arrestines 1 et 2 vont jouer un rôle primordial. En se fixant préférentiellement à un RCPG phosphorylé (Rasmussen, Novak et al. 2004), elles établissent un pont moléculaire entre le récepteur à internaliser et les protéines clés de la machinerie d'endocytose. En effet, les β -arrestines vont recruter un ensemble de partenaires, dont l'adaptateur AP-2 et la clathrine et participer à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine, au sein de laquelle se retrouve le récepteur à internaliser. Cette vésicule s'invagine vers l'intérieur de la cellule. Une petite GTPase, la dynamine, va ensuite assurer la scission des membranes pour créer une vésicule d'endocytose contenant les récepteurs toujours attachés à la membrane. Cette

vésicule nouvellement formée rejoindra, grâce au cytosquelette de la cellule, le réseau vésiculaire où son contenu sera trié

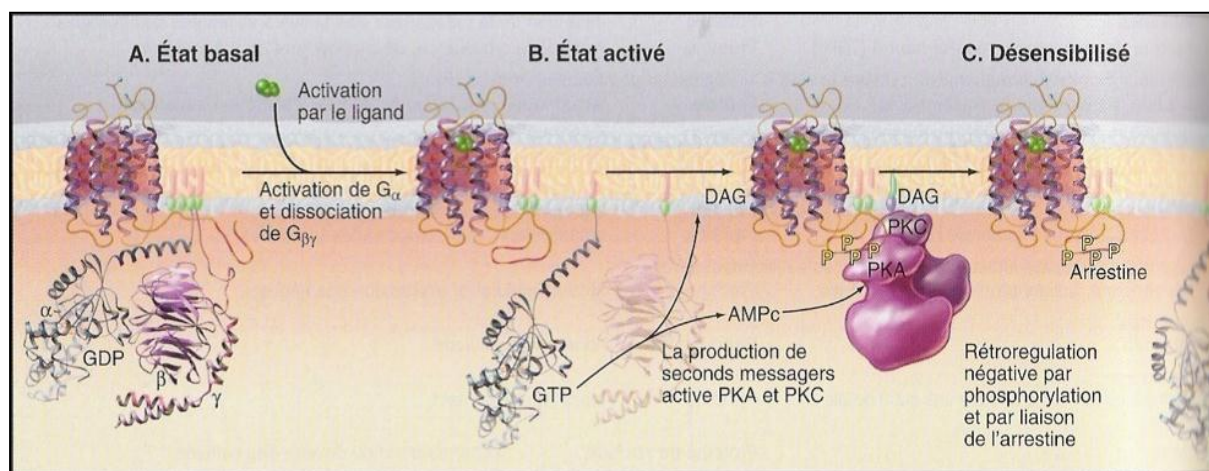


Figure 14 : phénomène de désensibilisation des RCPG (Flouzis, 2015)

II.2. Récepteurs à activité enzymatique intrinsèque

Il s'agit de récepteurs dont le domaine intracellulaire possède une activité enzymatique propre qui varie selon le type de récepteur.

II.2.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)

II.2.1.1. Généralités :

Le séquençage du génome humain (Human Genome Project) a révélé qu'environ 20% des 32000 gènes humains codent des protéines impliquées dans la transduction du signal. Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires, des sous-unités des protéines G et des enzymes impliqués dans la génération de signaux. Parmi ces protéines, plus de 520 sont des protéines kinases et 130 des protéines phosphatases, qui exercent un contrôle rigoureux et réversible sur la phosphorylation. Ces enzymes ont une activité catalytique spécifique des tyrosines ou des sérines/thréonines. En 2001 on compte plus de 90 gènes codant des protéines à activité tyrosine kinase, dont 58 codent des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (Blume-Jensen et Hunter, 2001). Les RTKs ont été découverts il y a 20 ans par Hunter et Sefton (Hunter et Sefton, 1980).

II.2.1.2.Définition

Les récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK) également appelés récepteurs des facteurs de croissance, sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'un domaine extracellulaire très variable capable de fixer le ligand, d'un domaine transmembranaire permettant l'ancrage dans la membrane cellulaire et d'un domaine intracellulaire (cytoplasmique) qui renferme l'activité tyrosine kinase et permet la transduction du signal au sein de la cellule.

L'activité enzymatique des RTK est localisée dans le cytoplasme et permet le transfert du phosphate γ de l'ATP vers l'hydroxyle des tyrosines des protéines cibles et/ou du récepteur lui-même, c'est ce qu'on appelle l'autophosphorylation .

Les RTKs permettent la transmission d'un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule sont d'importants régulateurs de la communication intercellulaire, ils jouent en effet un rôle important dans le contrôle de nombreux processus biologiques, tels que le cycle cellulaire, la migration cellulaire, le métabolisme, la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire

Les RTKs sont classés en 20 familles selon la structure de leurs domaines extracellulaire et intracellulaire. Parmi ces différentes familles, on distingue les récepteurs à l'insuline (IR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR).

Les récepteurs tyrosine kinase sont des protéines de type I, c'est à dire que la partie N terminale de la protéine est située dans le milieu extracellulaire et la partie C terminale dans le milieu intracellulaire. Les RTKs sont présents à la surface cellulaire sous forme d'une seule chaîne polypeptidique et monomérique en l'absence de ligand. L'exception à cette règle inclut la famille HGFR et la famille des récepteurs à l'insuline.

II.2.1.3. Structure des RTK

Les RTK sont composés de trois domaines distincts : le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire.

- **Le domaine extracellulaire**

Le domaine extracellulaire des RTK, qui permet la fixation de ligands est très diversifié et très glycosylé. Ce domaine extracellulaire présente une variété d'éléments conservés tels que les domaines de type immunoglobuline (IgD), de type fibronectine III (FNIII), de type facteur de croissance épidermique (EGFD), riche en cystéine et riche en leucine. Ces différents domaines déterminent la spécificité de la liaison au ligand. En effet, la liaison du ligand au domaine extracellulaire provoque des changements conformationnels qui induisent et stabilisent la dimérisation du récepteur

- **Le domaine transmembranaire**

Est constitué d'un seul segment de 22 à 26 acides aminés, organisé en une seule hélice. Le domaine transmembranaire est caractérisé par une séquence hydrophobe dont la fonction est l'ancrage du récepteur à la membrane. Des mutations ont été identifiées dans les domaines transmembranaires d'au moins deux familles de RTK, fibroblast growth factor receptor (FGFR) et epidermal growth factor receptor (EGFR) aboutissant à une activation constitutive du récepteur par une dimérisation indépendante du ligand. Même si ce domaine ne joue pas un rôle dans l'activation du récepteur, il pourrait jouer un rôle au niveau de sa conformation et de la stabilisation des récepteurs dimériques.

- **Le domaine intracellulaire et l'activité tyrosine kinase**

Le domaine intracellulaire se compose d'une région juxta-membranaire suivie par le domaine catalytique tyrosine kinase et terminé par la région carboxy-terminale. Ces régions contiennent des sous-domaines régulateurs influençant négativement ou positivement la liaison du substrat et la phosphorylation, ainsi que les sous-domaines impliqués dans la dimérisation et/ou dans les changements structuraux pendant l'activation de la kinase après la liaison du ligand. La longueur et la séquence des domaines juxta-membranaire et carboxy-terminal varient suivant les RTK et contiennent des sites de phosphorylation tyrosine et

sérine/thréonine. Ces sites peuvent être phosphorylés par le récepteur lui-même (autophosphorylation) ou par des protéines kinases.

Il a été établi que le domaine tyrosine kinase comporte onze sous-domaines majeurs (I à XI). Les domaines I à V forment le domaine de liaison à l'ATP, complexé aux ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} . Les domaines VI et VII sont dotés de l'activité phospho-transférase. Les kinases possèdent une boucle d'activation comprenant les sous-domaines VII et VIII comportant entre une et trois tyrosines. L'activité kinase est cruciale pour l'activation des voies de transduction aboutissant à l'induction des réponses cellulaires comme la survie, la prolifération et la différenciation. Un domaine tyrosine kinase intact est absolument nécessaire dans la signalisation du récepteur. En effet, des mutations d'un seul résidu dans ce domaine peuvent entraîner la perte de la fonction du récepteur.

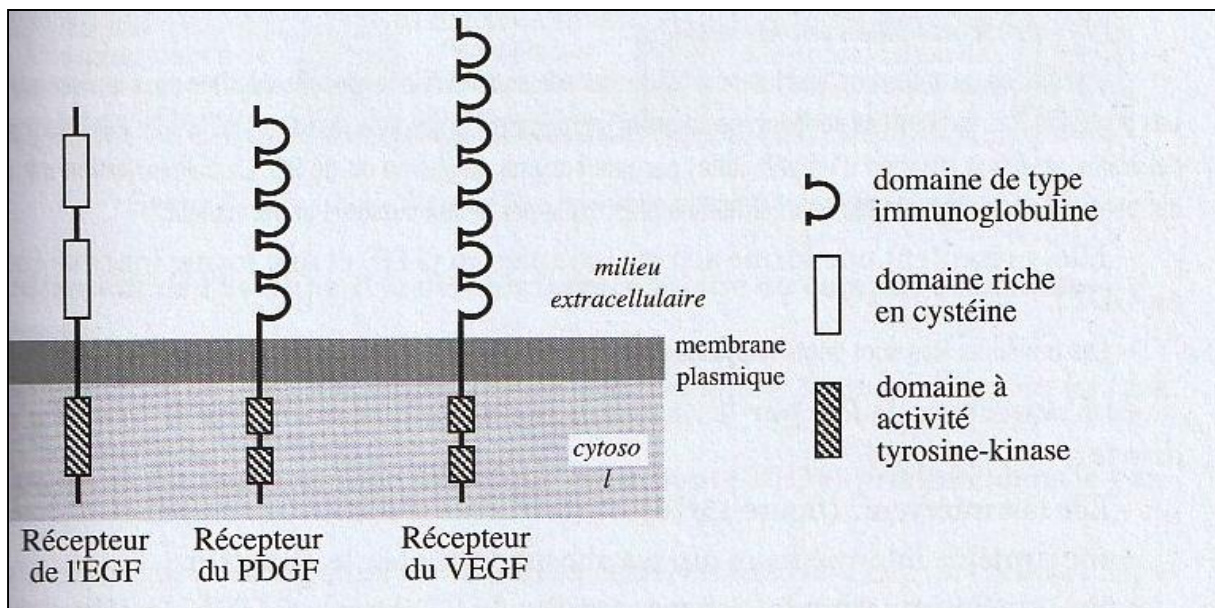


Figure 15 : Représentation schématique de trois récepteurs à activité tyrosine kinase (Cau et Seïte, 2007)

II.2.1.4. Activation des RTKs

II.2.1.4.1. Fixation de ligand

Il existe différentes voies d'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase : l'élément déclencheur de l'activation est la fixation de ligand, qui conduit à la dimérisation non covalente des récepteurs.

Les études structurales menées sur GH (hormone de croissance) et son récepteur GHR, ainsi que sur l'EPO (erythropoïétine) et son récepteur EPOR, ont montré que ces cytokines se fixent sur leur récepteur avec une stœchiométrie 1:2 (ligand : récepteur). Un ligand se fixe simultanément sur deux récepteurs.

II.2.1.4.2. Dimérisation des récepteurs

L'activation des RTKs passe par le mécanisme crucial de la dimérisation des récepteurs. En effet, la dimérisation (ou oligomérisation) non covalente des RTKs, induite ou stabilisée par la fixation de ligand, est le mécanisme déclencheur de l'autophosphorylation des tyrosines. La fixation de ligand au domaine extracellulaire peut induire un réarrangement structural des récepteurs hétérotétramériques (exemple du récepteur à l'insuline), facilitant l'autophosphorylation des tyrosines dans le domaine cytoplasmique. A l'heure actuelle, les mécanismes liés à la transduction du signal du domaine extracellulaire vers le domaine intracellulaire, via la dimérisation des récepteurs, ne sont pas bien connus. De plus les mécanismes mis en jeu en aval sont certainement dépendant du couple ligand/récepteur.

Mais dans certains cas, la dimérisation est certes nécessaire pour l'activation tyrosine kinase mais n'est pas suffisante. L'exemple est celui de l'étude de ErbB2 appartenant à la famille de l'EGFR, où la dimérisation forcée par mutation de résidus en cystéine permettant la création de ponts disulfures entre les hélices transmembranaires, indique que l'activation du récepteur est dépendante de l'orientation relative de chaque monomère dans le dimère.

Un autre exemple est celui du récepteur tyrosine kinase Eph, pour lequel la dimérisation est suffisante pour l'autophosphorylation des récepteurs, à la condition d'une organisation des récepteurs en tétramère pour susciter toutes les réponses biologiques dans la cellule.

Cependant, dans la plupart des cas, la dimérisation des RTKs est probablement suffisante pour la transduction du signal.

La fixation de ligand stabilise la configuration dimérique du domaine extracellulaire mais les conséquences au niveau du domaine cytoplasmique contenant le domaine tyrosine kinase ne sont pas bien comprises. Les domaines cytoplasmiques pourraient s'associer transitoirement comme des couples enzyme/substrat, ou pourraient interagir de manière stable pour former un dimère symétrique ou asymétrique avant ou après l'autophosphorylation. Une boucle activatrice est présente dans les domaines tyrosine kinase cytoplasmiques. En conformation fermée, cette boucle empêche la fixation de substrat. Lorsque les résidus tyrosines appartenant à la boucle sont phosphorylés par un récepteur voisin (trans autophosphorylation), elle se stabilise dans une conformation ouverte laissant l'accès libre au site actif tyrosine kinase.

Pour les RTKs qui ont une activité kinase stimulée via l'autophosphorylation de la boucle activatrice, le modèle d'association transitoire des domaines cytoplasmiques semble cohérent avec les données biochimiques actuelles. Tous les sites pourraient raisonnablement être phosphorylés dans le dimère.

Si les deux domaines cytoplasmiques forment un dimère stable, après fixation de ligand avant l'autophosphorylation, des contraintes stériques pourraient empêcher l'autophosphorylation de certains sites, les plus proches des domaines kinases. Dans ce cas une association très ordonnée des récepteurs pourrait être nécessaire pour compléter l'autophosphorylation.

La dimérisation des récepteurs implique également l'association des domaines transmembranaires. Il y a peu d'informations sur la façon dont l'hélice transmembranaire interagit physiquement avec son partenaire lors de la dimérisation du récepteur. La mutation ponctuelle d'une valine en acide glutamique dans le segment transmembranaire entraîne chez le récepteur Neu/ErbB2 dimérisation et activation constitutive. Cette mutation montre l'importance du domaine transmembranaire dans la transduction du signal. Cet aspect de la dimérisation sera traité dans le chapitre « B le domaine transmembranaire ».

II.2.1.4.3. Autophosphorylation des tyrosines

L'augmentation de l'activité catalytique intrinsèque du récepteur et la création de sites de fixation dans le domaine intracellulaire pour recruter les protéines de signalisation sont les deux étapes clés de l'activation des récepteurs. Pour la plupart des RTKs, la réalisation de ces deux étapes nécessite l'autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine intracellulaire, permise par l'oligomérisation des récepteurs déclenchée par la fixation de ligand. L'autophosphorylation des résidus tyrosines de la boucle activatrice du domaine tyrosine kinase génère des sites de fixation pour les protéines de signalisation pouvant reconnaître les séquences contenant des phosphotyrosines. Les RTKs contiennent entre 1 et 3 tyrosines dans la boucle activatrice.

Les deux domaines protéiques reconnaissant les phosphotyrosines sont les domaines SH2 (domaine homologue à src de type 2) et PTB (phosphotyrosine binding).

Pour un grand nombre de RTKs, la phosphorylation des résidus tyrosines de la boucle activatrice est un événement crucial pour la stimulation de l'activité catalytique et l'induction de la réponse biologique. Parmi ces récepteurs on peut citer le récepteur à l'insuline, le récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR), le récepteur aux facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR), le récepteur aux facteurs de croissance des plaquettes (PDGFR), le récepteur aux facteurs de croissance des hépatocytes (Met) et le récepteur TrkA. Le cas du récepteur au facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) est une exception : en effet la mutation de la tyrosine 845 de la boucle activatrice en phénylalanine ne produit aucun effet sur la fonction tyrosine kinase de l'EGFR.

L'autophosphorylation des tyrosines peut être cis, dans ce cas la phosphorylation est effectuée par le récepteur même ou trans où la phosphorylation s'effectue entre les récepteurs. La cis autophosphorylation est probablement due à un changement conformationnel provoqué par la fixation de ligand sur le récepteur. La trans autophosphorylation ne nécessite aucun changement conformationnel : le simple effet de proximité engendré par la dimérisation suffit à déclencher la phosphorylation des tyrosines. Les structures du récepteur à l'insuline seul et complexé avec un substrat peptidique et un analogue de l'ATP indiquent que les résidus tyrosines dans la boucle activatrice sont phosphorylés uniquement en trans.

A partir de ces structures Hubbard et collaborateurs ont établi un modèle de stimulation de l'activité tyrosine kinase par dimérisation des récepteurs. Sous forme monomérique, l'accès au site actif du domaine tyrosine kinase est partiellement obstrué par la boucle activatrice. La boucle est en équilibre entre un état majoritaire bloquant l'accès au site actif et un état minoritaire laissant l'accès libre au site. Les tyrosines dans la boucle activatrice sont très conservées au cours de l'évolution. Leur phosphorylation provoque un déplacement d'équilibre de la conformation où la boucle activatrice empêche l'accès au site actif vers la conformation laissant l'accès libre au site catalytique.

En plus du contrôle de l'activité tyrosine kinase, l'autophosphorylation des tyrosines est importante pour le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs. Beaucoup de sites d'autophosphorylation de tyrosine sont localisés dans des régions non catalytiques du domaine intracellulaire des RTKs. Ces sites ont pour fonction de fixer les domaines SH2 et PTB des effecteurs. La fixation de protéines sur un site d'autophosphorylation entraîne une cascade de réactions dont l'assemblage et le recrutement de complexes de signalisation. Les RTKs sont comparables à des plates-formes de reconnaissance et de recrutement de protéines de signalisation.

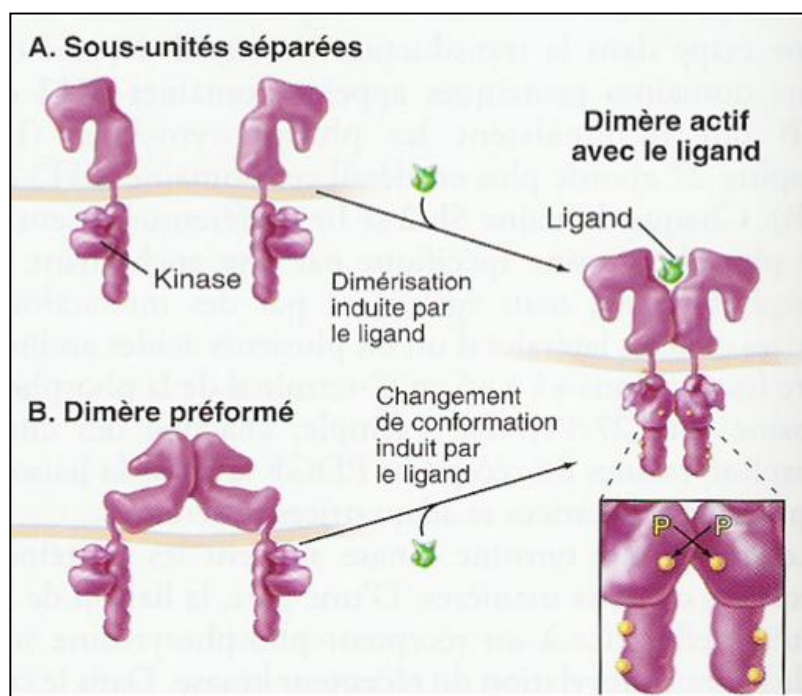


Figure 16: Activation d'un récepteur tyrosine kinase (Aller, 2005)

II.2.1.5. Voies de signalisation des RTKs

L'activation des RTKs permet la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Les RTKs activés mettent en jeu différentes voies de signalisation via des protéines possédant des modules protéiques pour transmettre le signal au noyau ou à différentes enzymes. Les principales voies de signalisation sont : Ras/MAP kinase et celle du métabolisme du phosphoinositol. Ces voies jouent un rôle important dans des processus métaboliques, le cycle cellulaire, la migration cellulaire, la prolifération et différenciation cellulaire.

II.2.1.6. Modules protéiques des effecteurs

Les protéines possédant les domaines SH2 et PTB interviennent dans la reconnaissance de sites d'autophosphorylation et dans la cascade de réactions en aval. Ces protéines peuvent posséder une activité enzymatique et modifier d'autres protéines, des phospholipides ou des acides nucléiques, pendant leur interaction.

Les protéines effectrices participant à la signalisation intracellulaire possèdent une multitude de petits modules constitués de 50 à 200 acides aminés qui permettent des associations avec d'autres protéines, des membranes ou des composants cellulaires.

Le domaine SH2 est défini comme une séquence conservée de 100 acides aminés environ, qui fixe une séquence peptidique particulière (jusqu'à 6 résidus) contenant une phosphotyrosine dans la partie C terminale (intracellulaire) du récepteur.

Le domaine PTB, composé d'environ 200 acides aminés, fixe une séquence de 3 à 5 résidus en N terminal de la région intracellulaire du récepteur. La fixation de nombreuses protéines possédant un domaine PTB est indépendante de la présence d'une tyrosine phosphorylée

Les domaines SH3 (src homology 3) et WW reconnaissent et fixent des régions riches en proline. Le domaine SH3 fixe spécifiquement la séquence PXXP (P :proline et X représentant n'importe quel acide aminé), mais peut reconnaître d'autres séquences telles que RXXK, comme dans le cas du domaine SH3 de Gad dans les cellules T. Le domaine WW, petit module de 35-40 acides aminés, reconnaît les motifs : PPXY.

Le domaine PH (pleckstrin homology) est composé de 120 acides aminés environ. De nombreuses protéines possédant ce domaine sont impliquées dans la régulation de l'actine du cytosquelette, et dans le ciblage intracellulaire au niveau de la membrane. Le domaine PH interagit spécifiquement avec le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP2) et le phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3).

Le domaine FYVE comprend un peu moins de 80 acides aminés et tient son nom des protéines de sa famille (Fab1, YGLO23, VPS27 et EEA1). La structure de ce domaine présente deux doigts de zinc et reconnaît spécifiquement le phosphatidylinositol 3-phosphate.

Le domaine PDZ se compose d'environ 90 acides aminés et reconnaît de courts motifs peptidiques hydrophobes de 4 résidus situés à l'extrémité C terminale de la protéine cible.

Il existe une large famille de protéines possédant un domaine SH2 et une activité enzymatique comme l'activité protéine tyrosine kinase (Src kinases), l'activité protéine tyrosine phosphatase (Shp2), ou phospholipase C (PLC γ), etc. D'autres protéines possèdent seulement les domaines SH2 et SH3 et assurent un relais entre différentes protéines. Un exemple est la protéine Grb2 qui interagit avec les RTKs activés par son domaine SH2 et avec Sos-Ras via son domaine SH3.

II.2.2. Récepteurs à activité sérine/thréonine kinase – RST

Les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase reconnaissent et fixent des ligands de trois familles de facteurs de croissance : les TGFs (*Transforming Growth Factors*), les activines et les protéines de morphogénèse osseuse (BMP, pour *Bone Morphogenetic Proteins*). Ces facteurs interviennent surtout dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

Le mécanisme d'activation de ces récepteurs fait intervenir deux types de récepteurs dimérisés différents. Le ligand se fixe d'abord sur un récepteur de type II (RII) qui se lie alors à un récepteur de type I (RI) formant ainsi un hétérotétramère. L'activité kinasique de RI est induite par phosphorylation de certains de ses résidus sérine par RII. Cette activation est responsable de la phosphorylation de constituants cytoplasmiques mobiles appelés Smad qui agissent directement sur l'expression génique. Il existe trois types de Smad :

- Les R-Smad (*regulated Smad*) qui sont phosphorylés et activés par le récepteur activé (RI).

Ils comprennent les Smad 2 et 3 qui interviennent dans le cas où les ligands sont des TGFs ou des activines, et les Smad 1, 5 et 8 pour les ligands BMP.

- Les co-Smad représentés par Smad 4.
- Les I-Smad (Smad 6 et 7) qui jouent le rôle d'inhibiteurs ou antagonistes pour les R-Smad.

Quand les R-Smad sont phosphorylés, ils forment un complexe hétérotrimérique avec Smad 4. Ce complexe pénètre dans le noyau et, en s'associant avec d'autres facteurs, module la transcription de différents gènes cibles.

Parmi les protéines induites par certains ligands comme le TGF β par exemple, on trouve des I-Smad, en particulier Smad 7 qui bloque la phosphorylation des R-Smad par les RI. C'est un rétrocontrôle négatif qui met fin à la stimulation.

II.2.3. Récepteurs à activité guanylyl cyclase – RGC

On trouve ces récepteurs au niveau des muscles lisses des parois vasculaires, de l'intestin et des épithélia olfactif et visuel. Ces récepteurs sont des homodimères qui possèdent un domaine cytoplasmique à activité guanylyl-cyclase qui transforme le GTP en GMPc. Le récepteur activé produira donc du GMPc qui agit comme second messenger sur ses systèmes-cibles (canaux, kinases, ...).

Le ligand majeur de ces récepteurs est l'ANF (facteur natriurétique auriculaire), libéré au niveau des oreillettes cardiaques suite à une augmentation du volume sanguin par exemple. L'ANF va agir au niveau de récepteurs guanylyl-cyclase se trouvant sur la membrane des cellules musculaires lisses des parois vasculaires. Ces récepteurs activent, via le GMPc, une protéine kinase PKG. Celle-ci activerait la pompe Ca²⁺-ATPase du réticulum endoplasmique, induisant ainsi une diminution du Ca²⁺ cytoplasmique. Ceci aboutit à l'inhibition du complexe actine-myosine et par conséquent, il y a relâchement des cellules musculaires lisses et donc une vasodilatation.

II.2.4. Récepteurs à activité phosphatase

Certaines tyrosines phosphatases sont transmembranaires et fonctionnent comme récepteurs. Puisque leur ligand n'est pas encore bien identifié, elles sont alors désignées comme étant des «récepteurs-like». Elles possèdent un seul segment transmembranaire et souvent elles ont deux domaines tyrosines-phosphatases (D1 et D2) dans leur partie intracellulaire.

Un exemple important est celui de la protéine CD45 qui se trouve à la surface de tous les globules blancs. Elle a un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T ; elle contribue au déclenchement de la cascade de signalisation en activant une enzyme Lck .

Lck est une tyrosine kinase de la famille Src. Lorsqu'elle est inactive, elle est pliée par une interaction intramoléculaire entre son domaine SH2 et un groupe tyrosine-phosphate à l'extrémité C-terminale. CD45 agit en enlevant le phosphate à ce groupe, ce qui ouvre la structure moléculaire de la Lck permettant ainsi son activation. Au niveau des lymphocytes T par exemple, Lck phosphoryle des sites ITAM au niveau du complexe TCR-CD3

II.3. Autres types de récepteurs :

II.3.1. Récepteurs de mort et apoptose:

II.3.1.1. Les récepteurs de mort

Ils appartiennent à la superfamille du récepteur $\text{TNF}\alpha$ (TNFR) ; 7 membres forment le sous groupe des récepteurs de mort (DR : Death Receptor) : Fas (CD95/APO-1; ligand: FasL), TNFR1 (p55/CD120a; ligands : $\text{TNF}\alpha$ et β), DR3 (ligand: VEGI), DR6, p75NGFR (récepteur au facteur de croissance neuronale ; ligand: NGF) et les 2 récepteurs TRAIL : DR4 (TRAILR1) et DR5 (TRAIL-R2).

Les récepteurs sont composés d'un nombre variable de domaines riches en cystéine (DRC), dans leur partie extracellulaire. Les DRC permettent la stabilité des structures trimériques des récepteurs. Seuls quelques-uns des TNFR possèdent le domaine de mort intracellulaire (DD : Death domain). La fixation du TNF sur son récepteur conduit à sa

Dr. GHOUTA

trimérisation, ce qui permet à TRADD (TNFR-associated death domain), molécule adaptatrice, de se fixer par interaction entre les domaines de mort (DD). TRADD s'associe ensuite à FADD (Fas-associated Death Domain), ce qui induit l'apoptose via l'activation de la caspase 8

II.3.1.2.L'apoptose :

L'apoptose ou mort cellulaire programmée (MCP) est un processus de mort physiologique. Elle se différencie de la nécrose, processus dégénératif qui intervient dans des cellules ayant subi des dommages physiques, chimiques ou osmotiques.

L'apoptose implique une séquence précise d'événements cellulaires, décrits en 1972 par Kerr et al. (tissus humains et murins). Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui induit la destruction d'une cellule, tout en préservant l'intégrité cellulaire environnante. Elle survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire en conditions pathologiques et de stress intense de l'organisme.

L'apoptose est caractérisée par des modifications :

- **Morphologiques** : diminution du volume cellulaire, avec maintien de l'intégrité structurale de la membrane plasmique, relocalisation des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine puis fragmentation du noyau et de la cellule en corps apoptotiques,
- **Biochimiques** : externalisation de la phosphatidylsérine, chute du potentiel de membrane au niveau des mitochondries, activation des caspases et dégradation de l'ADN en fragments oligonucléosomiaux.

Il existe deux voies de signalisation aboutissant à l'apoptose :

- La voie des récepteurs de mort ou **voie extrinsèque**,
- La voie mitochondriale ou **voie intrinsèque**.

Ces deux voies conduisent à l'activation de molécules effectrices de l'apoptose, les caspases.

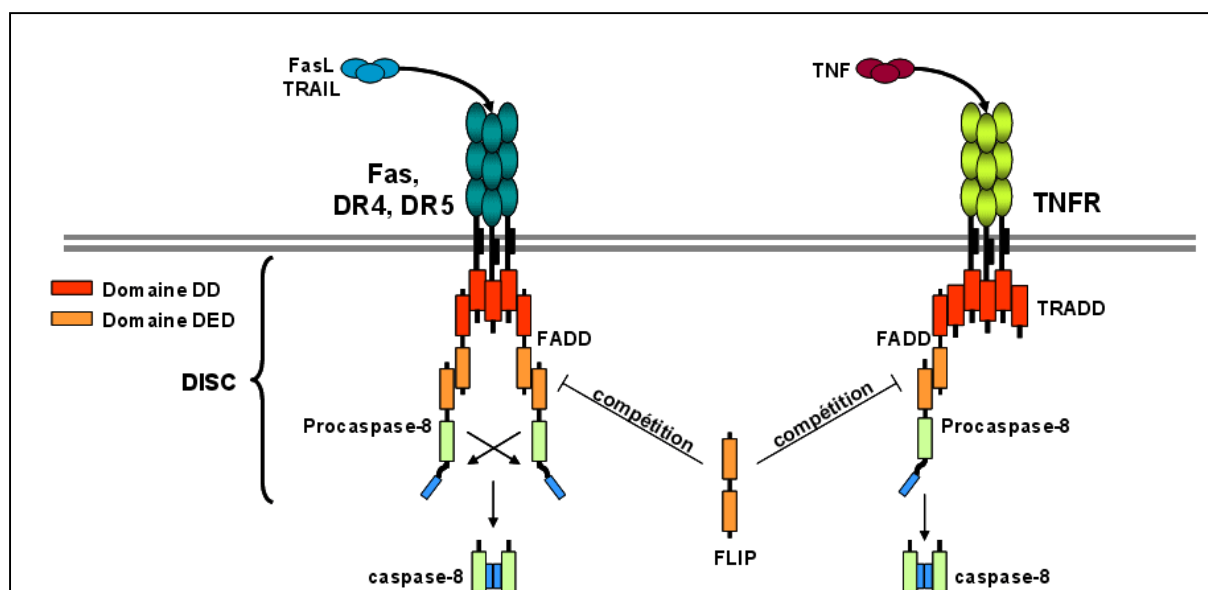


Figure 17 : Structure de récepteurs de mort, DD : Death Domain ; DED : Death Effector

Domain ; FADD (Chatel, 2014)

❖ Les caspases

Les caspases, protéases à cystéine, clivent leurs substrats après un acide aspartique, d'où leur nom générique de Cysteine Aspartate Proteases (Alnemri et al., 1996). Elles ont une structure très conservée et sont synthétisées sous forme de zymogène ou pro-caspase. Ces pro-caspases contiennent un pro-domaine N-terminal de taille variable et un domaine catalytique C-terminal, constitué de deux sous-unités de 20 et 10 KDa. Les caspases à pro-domaine long (caspase 8, 9 et 10) sont appelées caspases initiatrices ; elles clivent et activent les caspases effectrices. Les caspases à pro-domaine court (caspases 3, 6 et 7) clivent différents substrats comme PARP (PolyADP Ribose Polymerase), enzyme de réparation cellulaire, ou la lamine A.

❖ **Bcl-2 et cytochrome c**

La famille Bcl-2 peut être divisée en deux sous familles : les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-10) et les protéines pro-apoptotiques (Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Bax, Bak, BLK, Bmf, Hrk/DP5, Bcl-xS) (Fig. 12). Tous les membres de cette famille possèdent l'un des 4 motifs conservés au cours de l'évolution, BH1 à BH4 (Bcl2 Homology Domain), indispensables pour les interactions protéiques. Seules les protéines anti-apoptotiques possèdent les 4 domaines BH.

La balance entre le taux des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques conditionne l'entrée en apoptose d'une cellule. Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en se liant aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.

Dans des cellules saines, Bad est phosphorylé et séquestré dans le cytoplasme par une protéine adaptatrice, 14-3-3. Dans les cellules apoptotiques, le taux cytoplasmique de Bad augmente, favorisant la formation de complexes Bcl-2/Bad et Bcl-xL/Bad. Bax et Bak ainsi libérés, s'insèrent dans la membrane mitochondriale où ils créent des pores. Le cytochrome c passe alors dans le cytoplasme où il forme un complexe, appelé apoptosome, constitué de Apaf1 et de la pro-caspase 9, ce qui active la caspase 9.

- Après avoir présenté dans le chapitre 2 les acteurs essentiels de la transduction membranaire proprement dite, les RCPG et les protéines G, les RTK ...etc, dans ce chapitre nous décrirons plus précisément les principales voies de signalisation en aval de l'activation des protéines G suite à l'occupation des RCPG et autres types de récepteurs.

III. Les voies de signalisation intracellulaire :

III.1. Voie de l'adénylyl-cyclase – AMPc

III.1.1. L'adénylyl-cyclase

L'adénylyl-cyclase (ou adénylate cyclase) est une enzyme membranaire constituée de 12 régions transmembranaires réparties en 2 motifs identiques à 6 hélices α chacun.

Actuellement, il existe 9 isoformes connues de l'adénylyl-cyclase membranaire. L'adénylyl-cyclase (AC) est activée par les sous-unités de type $G_{\alpha s}$. Elle catalyse la réaction de formation de l'**AMP cyclique (AMPc)**, qui est le second messenger produit, à partir d'ATP

III.1.1.2. Cycle d'activation - inactivation de l'adénylyl cyclase :

- 1) La liaison avec le ligand entraîne un changement dans la conformation du récepteur. Celui-ci va s'associer avec la protéine $G_{\alpha s}$.
- 2) Cette association entraîne un changement dans la conformation de la sous-unité $G_{\alpha s}$. Elle remplace le GDP par le GTP et se dissocie de $G\beta\gamma$.
- 3) La sous-unité $G_{\alpha s}$ se lie à l'adénylyl cyclase en l'activant. Il y a synthèse de l'AMPc.
- 4) L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne la dissociation de $G_{\alpha s}$ avec l'adénylyl cyclase et sa réassociation avec $G\beta\gamma$. L'AC redevient alors inactive.

Dans certains cas, des ligands entraînent non pas une stimulation mais une inhibition de

l'activité de l'adénylyl-cyclase. Dans ces cas, la protéine G impliquée est alors appelée protéine G_i (i pour inhibitrice) dont la sous-unité α_i liée au GTP (α_i .GTP) inhibe l'activité de l'AC. La concentration intracellulaire de l'AMPc est contrôlée d'une part, au niveau de sa synthèse par l'adénylyl-cyclase, mais également au niveau de sa dégradation en 5'AMP non cyclique (et non actif) par une phosphodiesterase (PDE) qui atténue la réponse au signal.

Le site d'action principal de l'AMPc est une enzyme, la protéine-kinase A (A pour AMPc-dépendante). Cependant, l'AMPc peut agir directement sur certains types de canaux ioniques, notamment dans le cas des RCPG du système olfactif.

III.1.2. La Protéine-kinase A

La protéine-kinase A (PKA) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la phosphorylation de protéines spécifiques sur certains de leurs résidus sérine et/ou thréonine

- **Activation de la PKA**

La protéine kinase A est composée de 4 sous-unités : deux sous-unités catalytiques (C) et deux sous-unités régulatrices (R).

Les gènes cibles de la PKA contiennent, au niveau de leur région régulatrice, une séquence d'ADN appelée CRE (*Cyclic AMP Response Element*). Dans ce cas, les sous-unités catalytiques C de la PKA activée, entrent dans le noyau où elles phosphorylent un facteur de transcription appelé CREB (*CRE-Binding protein*). Le CREB phosphorylé reconnaît et se fixe sur la séquence CRE, puis recrute un coactivateur de transcription CBP (*CREB-Binding Protein*) ; ce qui permet de moduler la transcription de ces gènes.

- **Effets de toxines**

Certaines toxines comme celles responsables du choléra et de la coqueluche, affectent le fonctionnement des protéines G par ADP-ribosylation. L'ADP-ribose est transféré à partir du NAD⁺ intracellulaire vers la sous-unité α .

- ❖ La **toxine du choléra** libérée par la bactérie *Vibrio cholerae*, est une enzyme qui modifie la sous-unité α_s de la protéine G_s , de telle sorte qu'elle ne peut plus

hydrolyser son GTP lorsqu'elle est sous forme α .GTP (fig.28). Par conséquent, elle reste irréversiblement activée et stimule constamment l'adénylyl-cyclase. La concentration élevée en AMPc qui en résulte, entraîne dans les cellules épithéliales de l'intestin, de grandes pertes de sels et d'eau provoquant diarrhée et déshydratation caractéristiques du choléra.

- ❖ **La toxine de la coqueluche** libérée par la bactérie *Bordetella pertussis*, entraîne une inactivation irréversible de la protéine G_i suite à une ADP-ribosylation au niveau C-terminal de la sous-unité α_i . La protéine G_i ne peut pas faire de couplage avec le récepteur et reste alors bloquée à l'état inactif. Elle ne peut plus inhiber l'adénylyl-cyclase et par conséquent, la concentration en AMPc augmente. Quand l'infection atteint les voies respiratoires, les cellules épithéliales pulmonaires sécrètent en abondance des fluides et du mucus causant la toux caractéristique de la coqueluche.

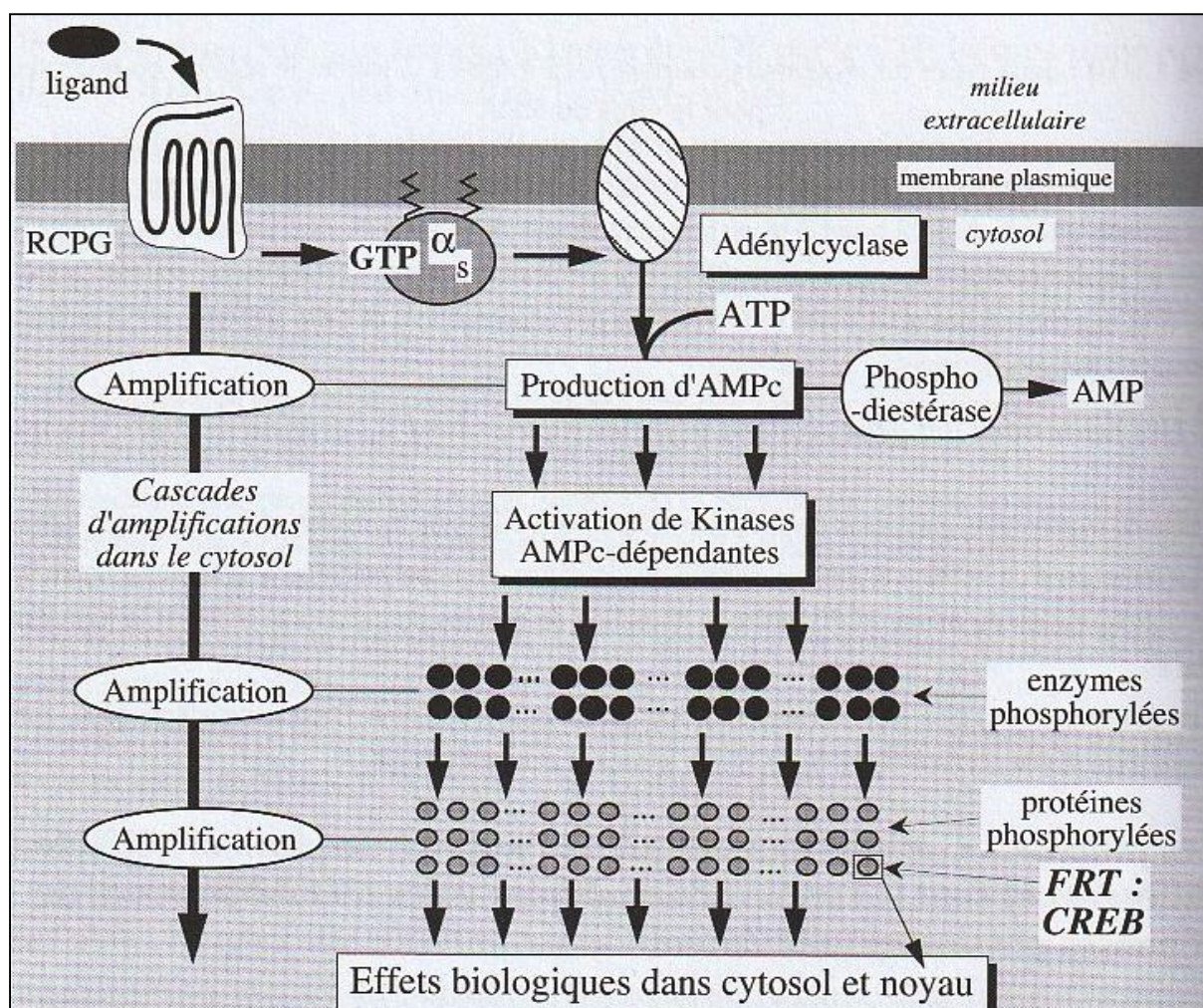


Figure 18 : La cascade des amplifications déclenchées par l'activation de l'adénylyl cyclase et la production d'AMP cyclique (Cau et Seïte, 2007)

III.2. Voie de la phospholipase C -Ca⁺⁺

Plusieurs RCPG exercent leur effet à travers des protéines G (de la famille Gq) qui activent la phospholipase C (PLC-β) de manière semblable que Gs active l'adénylyl cyclase.

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons esters des phospholipides. La phospholipase C (PLC), activée par la sous-unité Gαq, catalyse la réaction d'hydrolyse du PIP₂ (phosphatidyl inositol biphosphate) présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique en deux second messenger : L'IP₃ (inositol 1,4,5-tri-phosphate) et le DAG (diacylglycérol)

Ces deux messenger stimulent en aval deux voie de signalisation en cascade : celle de la protéine-kinase C et celle de la mobilisation du Ca⁺⁺.

Ils existe deux forme de PLC : la PLC-β et la PLCγ . La PLC-β est activée par une protéine G. La PLC γ contient des domaines SH2 lui permettant de s'associer à un récepteur de type tyrosine kinase. La phosphorylation de la tyrosine augmente l'activité de la PLC-γ qui à son tour stimule la dégradation du PIP₂.

- Le DAG, qui reste enchâssé dans la membrane, va activer la protéine kinase C (PKC) une sérine thréonine kinase qui active d'autres cibles intracellulaire.
- L'IP₃, molécule soluble dans l'eau, va diffuser à travers le cytoplasme pour agir au niveau de récepteurs qui lui sont spécifiques, situés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Il active ainsi l'ouverture de canaux à Ca²⁺ au niveau de cette structure, favorisant la libération de Ca²⁺ et son accumulation dans le cytoplasme. Les ions calcium libérés, dans le cas de la PKC, jouent un rôle dans le déplacement de cette enzyme du cytosol vers la membrane plasmique où elle est activée par le DAG.

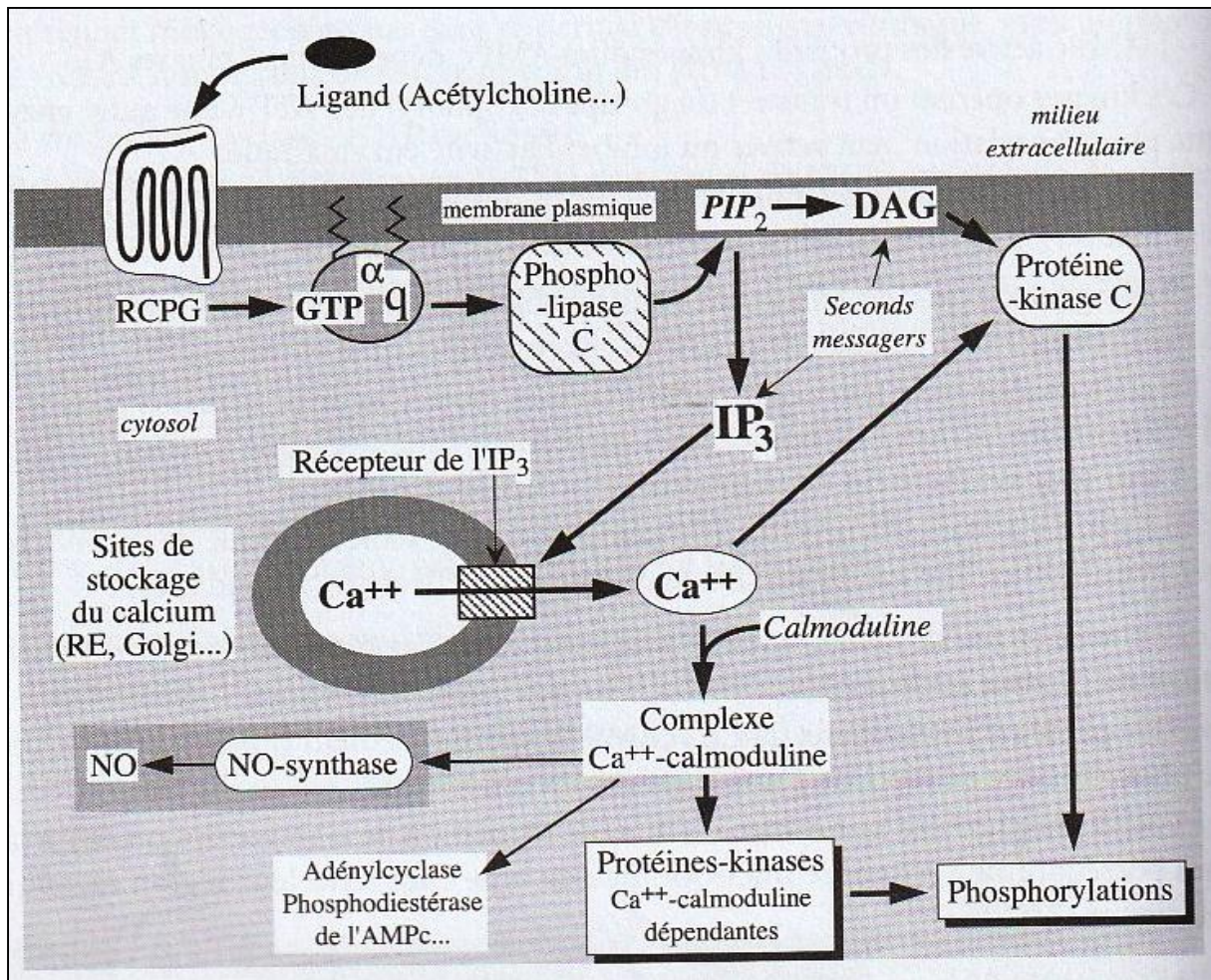


Figure 19 : La voie d'activation protéine G, phospholipase C, phosphoinositide (Cau et Seïte, 2007)

III.3. La voie du GMP_C :

Dans la transmission des signaux visuels chez les vertébrés, le fonctionnement de canaux cationiques (Na^+ , Ca^{++}), responsables de la génération et de la propagation du potentiel d'action dans ces cellules, est sous le contrôle du GMP cyclique : ces canaux sont dits cationiques GMP_C dépendants.

La concentration de ce nucléotide dépend de sa synthèse rapide (par une guanylate cyclase) et de sa dégradation rapide (par une phosphodiesterase).

a) Cette voie a été particulièrement étudiée dans le cas de la cellule photoréceptrice de la rétine, de type bâtonnet. Cette cellule est responsable de la vision monochromatique en

luminosité faible, alors que le deuxième type de cellule photoréceptrice, le cône, participe à la vision des couleurs en lumière forte :

- Le segment externe des bâtonnets est formé de disques empilés (1 000 par cellules environ) qui contiennent une molécule photosensible, la rhodopsine.
- La membrane plasmique entourant le segment externe contient des canaux cationiques GMP cyclique –dépendants, canaux qui sont ouverts dans l'obscurité par des molécules de GMP_C qui sont fixées sur leur face cytosolique.

b) La lumière active la rhodopsine :

- C'est une chromoprotéine à 7 domaine transmembranaire, comportant une fraction protéique, l'opsine, et un chromophore absorbant de photons, le 11-cis-rétinal.

-L'énergie d'un photon isomérisé le rétinal et active l'opsine. Ce processus photochimique provoque une modification de la conformation tridimensionnelle de l'opsine en un temps très court (10 ms).

c) Une protéine G trimérique, la transducine est activée par la rhodopsine stimulée par le photon de lumière :

-La sous-unité α de la transducine se sépare du dimère $\beta\gamma$.

-La sous-unité α active une phosphodiesterase du GMP cyclique

d) L'hydrolyse du GMP_C fait chuter sa concentration cytosolique :

-Les canaux cationiques se ferment, ce qui induit l'hyperpolarisation membranaire et inhibe la transmission synaptique du photorécepteur aux neurones rétiniens

-Le signal lumineux a été transformé en signal électrique.

-Le phénomène d'amplification du signal est considérable dans le cas de la vision. un seul photon absorbé aboutit à l'hydrolyse de 500 molécules de GMP_C et la fermeture de 250 canaux cationiques. Au total, en une seconde, cette cascade aboutit à l'hydrolyse de 10^5 molécules de GMP_C par quantum de lumière.

III.5. La voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B

Le facteur nucléaire NF- κ B est une famille composée de 5 protéines fixant l'ADN et qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans des fonctions biologiques diverses telles que l'immunité, l'inflammation, le développement et l'apoptose. Elles se composent d'homodimères et d'hétérodimères qui sont séquestrés en l'absence d'activation dans le cytoplasme en s'associant à des protéines inhibitrices de NF- κ B (I κ B). (**Herbein, 2010**)

III.5.1. Les composants de la voie de signalisation NF- κ B

Ainsi la voie de signalisation de NF- κ B est constituée de dimères NF- κ B, de protéines I κ B, de complexes IKK et de protéines adaptatrices intracellulaires notamment de la famille des TRAFs (TNF receptor associated factors) (**Herbein, 2010**).

La famille NF- κ B est composée de 5 membres chez les mammifères : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2). Les membres de la famille NF- κ B partagent un domaine homologue Rel (RHD) au niveau de leur extrémité N-terminale qui permet la fixation à l'ADN et la formation d'homo ou d'hétérodimères. Les membres de la famille de NF- κ B diffèrent au niveau de leur extrémité C-terminale et en fonction de leur mode de synthèse. RelA/p65, RelB et c-Rel possèdent un domaine de transactivation (TAD) qui est nécessaire à l'action transcriptionnelle de NF- κ B et sont synthétisées sous leur forme mature. Au contraire, NF- κ B1/p50 et NF- κ B2/p52 ne possèdent pas de domaine de transactivation et sont synthétisées par protéolyse à partir de leur précurseur polypeptidique p105 et p100, respectivement. La protéolyse de p105 en p50 est constitutive, tandis que celle de p100 en p52 est étroitement régulée et inducible .

Les membres de la famille I κ B sont des protéines structurellement proches qui possèdent des motifs répétés.

III.5.2. Voie classique ou canonique d'activation de NF- κ B

La voie classique ou canonique est activée par de nombreux stimuli comme les cytokines inflammatoires, les produits bactériens ou viraux, le stress, les radicaux libres dérivés de l'oxygène, les ultraviolets et les rayonnements ionisants, ect...Ces signaux

induisent la dégradation de I κ B α et l'accumulation nucléaire, essentiellement, du dimère RelA-p50 qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la mort cellulaire.

III.5.3. Voie non classique ou alternative (non canonique) d'activation de NF- κ B

Est activée par des récepteurs impliqués dans l'organogenèse des tissus lymphoïdes et le développement des lymphocytes comme le récepteur à la lymphotoxine- β , ou encore le récepteur au facteur activateur des lymphocytes B (BAFF ou *B cell-activating factor*)

III. 6.La voie des MAP kinases (MAPK)

La voie des MAP kinases (« mitogen activated protein kinases ») constitue l'une des voies principales de transmission des signaux de prolifération apportés par les facteurs de croissance tels le NGF ("nerve growth factor").

Les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases font partie de la superfamille des protéines kinases. Ce sont des protéines ubiquitaires et d'importants médiateurs impliqués dans la transduction des signaux extracellulaires de la membrane plasmique au noyau.

Les MAP kinases sont des protéines qui possèdent une activité kinasique qui phosphoryle des sérine/thréonines en réponse à des stimuli extracellulaires tels que des mitogènes et qui ainsi régulent des activités cellulaires variées telles que l'expression génique, la mitose, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires et son corollaire, l'apoptose ou mort cellulaire programmée

Les MAP kinases sont activées par divers types de signaux, parmi lesquels des mitogènes, des cytokines, les antigènes des lymphocytes T, des phéromones, des esters de phorbol ou encore les UV (A, B, C), des radiations ionisantes, un stress osmotique, un choc thermique, un stress oxydant ; elles initient une variété de réponses cellulaires.

La voie des MAPKs peut être activée par une grande variété de stimuli externes ou internes mais le schéma classique d'activation de cette voie fait intervenir la fixation d'un ligand à son récepteur membranaire. Cette fixation induit une modification de la conformation du récepteur qui conduit à la phosphorylation du récepteur lui-même ou de protéines qui lui

sont associées. Ceci conduit généralement à l'activation directe ou indirecte de protéines de la famille des protéines G, qui sont couplées au récepteur ou bien sous forme libre comme la protéine Ras.

Une caractéristique de toutes les MAP kinases est leur activation par **double phosphorylation** au niveau des résidus Tyrosine et Thréonine présents dans un **motif consensus Thr-X-Tyr** (X = Glu, Gly ou Pro). Les MAP kinases sont finement régulées par des phosphatases qui, par déphosphorylation d'un seul résidu, les inactivent. En réponse à des stimuli extérieurs, elles régulent l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription *via* des phosphorylations sur des sites régulateurs activateurs ou inhibiteurs, et permettent ainsi l'expression d'une grande variété de gènes.

L'activation du récepteur et des protéines associées se situe en amont de la cascade des MAPKs qui est constituée de trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAP3K) activée par des stimuli extracellulaires, qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAP2K ou MKK) sur ses résidus sérine et thréonine, qui à son tour, active la MAPK kinase par le biais de la phosphorylation de ses résidus sérine et thréonine. Cette dernière, transloquée dans le noyau cellulaire, phosphoryle alors les facteurs de transcription qui activent la transcription de l'ensemble des gènes responsables de la réplication de l'ADN et de la mise en route du cycle cellulaire (ADN polymérases, cyclines, etc).

Les MAPKs se divisent en trois sous-familles 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 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.

III.6.1. La voie Ras/MAPK ou voie ERK1/2

Avant de développer la voie de signalisation Ras/MAPK, nous nous intéresserons tout d'abord, à la protéine Ras qui est le principal acteur dans l'activation de cette voie, puis ensuite, nous nous intéresserons aux autres voies de signalisation.

III.6.1.1. Présentation de la famille Ras

La superfamille des protéines Ras est une famille de petites GTPase (Guanosine triphosphate hydrolase) comprenant une vingtaine de membres répartis en plusieurs sous-familles. Ce sont des petites protéines monomériques capables de lier du GDP ou du GTP, qui ont été très conservées au cours de l'évolution. Chez l'homme, environ 150 de ces petites protéines de signalisation sont exprimées et servent à réguler la croissance, la mobilité cellulaire, la morphogenèse et le trafic membranaire. Cette superfamille comprend 5 sous-groupes: Ras, Rho, Ran, Rab et Arf qui sont associées à des fonctions spécifiques.

➤ La famille Ras:

La famille Ras (Ras sarcoma) est composée de 36 membres. Ras activé interagit avec de nombreux effecteurs qui régulent des voies de signalisation, qui contrôlent l'expression du gène et la régulation de la prolifération cellulaire, ainsi que la différenciation et la survie. La voie des MAPK demeure la voie de signalisation passant par Ras la mieux identifiée.

➤ La famille des Rho:

Les protéines de cette famille régulent l'organisation de l'actine, la progression du cycle cellulaire et l'expression de gène. Vingt membres ont été identifiés, dont RhoA, Rac1 et Cdc42 étant les plus étudiés. Certaines de ces protéines sont membranaires et d'autres sont principalement cytoplasmiques. Ainsi, la protéine RhoB est localisée sur les endosomes et la protéine Cdc42 sur le réticulum endoplasmique. Leur localisation peut dépendre de leur interaction avec d'autres protéines comme les GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors) et cette localisation peut être régulée au cours du cycle des GTPases. Bien que les protéines Miro aient été en premier décrites comme des protéines Rho, il est apparu que ces protéines constituent un groupe à part entière. Les protéines Miro sont localisées au niveau de la mitochondrie .

➤ **La famille Rab:**

Les protéines Rab (Ras-like proteins in brain) comprennent 61 membres. Elles régulent le transport vésiculaire et sécrétoire. Les protéines Rab vont être localisées dans des compartiments spécifiques selon leurs fonctions. Rab5 est localisée dans les endosomes précoces et régulent le transport médié par des vésicules recouvertes de clathrine.

➤ **La famille Ran:**

Les protéines Ran (Ras-like nuclear) sont les protéines GTPases les plus abondantes dans les cellules et les mieux connues de part leur fonction essentielle dans le transport nucléocytoplasmique des ARN et des protéines. La protéine Ran-GTP nucléaire interagit avec les importines, les exportines ou avec des protéines cargo. Ces protéines interviennent dans la réplication de l'ADN et dans l'assemblage de l'enveloppe nucléaire.

➤ **La famille Arf:**

Les protéines de la famille Arf (ADP ribosylation factor) sont impliquées dans la régulation du transport vésiculaire. La protéine Arf1 est la mieux caractérisée.

III.6.1.2. Régulation de l'activation de Ras :

Les petites protéines G existent sous deux états conformationnels dépendants de la nature du nucléotide fixé et correspondant à des états fonctionnels différents de la protéine, la forme liée au GTP étant active alors que la forme liée au GDP est inactive. Seule la forme active est capable de fixer les effecteurs. Le passage entre ces deux états est extrêmement contrôlé et régulé par des voies différentes (le cycle des GTPases) (figure 12). Ce cycle est régulé par deux classes de protéines : les protéines GAP (GTPases Activating proteins), favorisant l'activité GTPasique des petites protéines G, permet la formation de la forme inactive lié au GDP et les protéines GEF (Guanine Exchange Factor) qui permettent la formation de la forme active liée au GTP. La comparaison des structures tridimensionnelles des états liés au GDP ou au GTP montre essentiellement que deux régions de la protéine changent en fonction du nucléotide; on appelle ces régions switch I et II. Ces deux structures ne sont pas figées dans la conformation liée au GDP alors qu'elles sont stabilisées dans une position précise sous forme GTP. Les deux régions switch forment le domaine effecteur de Ras et des GTPases. Les

effecteurs interagissent au niveau de ces deux régions. Il existe une classe de protéines inhibitrices appelées GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors), faisant partie d'une sous-classe de petites GTPases. Le rôle précis de ces protéines dans le cycle des GTPases n'est pas très clair.

III.6.1.3. La protéine Ras

a) Structure des isoformes de Ras

Le prototype de la famille des petites protéines G est l'oncogène Ras, qui est une petite protéine de 21 kDa. Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de la protéine Ras codées par trois gènes différents : H-Ras, N-Ras et K-Ras4A et 4B. Les 85 premiers acides aminés sont identiques dans les quatre protéines et permettent la liaison de la guanosine diphosphate (GDP) et de la guanosine triphosphate (GTP). Le domaine G est composé de la boucle P, qui lie le γ -phosphate du GTP, et du switch I et II, régulant la liaison aux régulateurs et aux effecteurs de Ras.

b) Activation de Ras

Suite à la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase, des tyrosines phosphorylées du récepteur vont servir de sites d'ancrage à des protéines adaptatrices à domaine SH2 comme Grb2 (growth factor receptor binding Homology 2) ou Shc. Par ses deux domaines SH3, Grb2 est constitutivement associée au domaine carboxy terminal riche en proline de Sos (Son of sevenless), le facteur d'échange de la petite protéine G Ras. Ainsi, la liaison de Sos au récepteur par l'intermédiaire de Grb2 permet sa relocalisation membranaire proche de son substrat qu'elle va activer. Les GEF de Ras se répartissent en trois familles: Sos, GRF et GRP. Alors que Sos1 et Sos2 sont exprimées de façon ubiquitaire, Ras-GRF et Ras-GRP sont abondantes dans le cerveau. Sos existe dans un état auto-inhibé, de ce fait, les interactions avec Ras modulent l'activité de Sos. La liaison de Ras-GDP au site allostérique de Sos qui est distal au site catalytique induit une faible activité du GEF qui permet alors la production de Ras-GTP. Ras-GTP lie alors avec une plus forte affinité le même site. Des mutations de Sos qui interrompent leur auto-inhibition ont été récemment identifiées chez les patients ayant le syndrome de Noonan.

c) Mécanismes de régulation négative de l'activation de Ras

Les protéines GAP ont un rôle important dans la régulation de Ras. Ces protéines permettent d'interrompre le signal produit par l'activation de Ras. Il existe au moins 160 gènes humains qui codent pour des protéines GAP. Le premier membre de la famille des GAP à avoir été identifiée est la protéine p120GAP. Cette dernière a été la première protéine découverte comme interagissant avec le domaine effecteur de Ras. La protéine p120GAP peut s'associer au récepteur PDGF activé par ses domaines SH2 ou par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice p62Dok. En plus d'un domaine catalytique, cette protéine possède des domaines SH2, SH3 et PH, et des motifs liant les phospholipides. Les protéines GAP sont régulées par des interactions intramoléculaires. Ainsi, le domaine PH de p120 RasGAP régule l'activité de son domaine catalytique. La protéine p120 RasGAP semble être régulée par protéolyse et est dégradée par clivage par certaines caspases .

D'autres protéines GAP ont été identifiées comme par exemple, la neurofibromine. Cette dernière est codée par le gène suppresseur de tumeur NF1. Des mutations dans ce gène sont responsables d'une maladie génétique héréditaire qui est la neurofibromatose de type I (NFI). La neurofibromine est phosphorylée sur plusieurs sites dans sa région C terminale par la protéine kinase A. Cette phosphorylation permet l'interaction de la neurofibromine avec les protéines 14-3-3 et est corrélée avec une réduction de l'activité Ras-GAP. La neurofibromine subit une dégradation protéolytique rapide par ubiquitination. Cette régulation de la neurofibromine peut s'expliquer par une augmentation de la durée et de l'intensité de l'activation de Ras. Des études ont montré que des phospholipides et des acides gras ont des effets inhibiteurs sur l'activité catalytique de la neurofibromine et de la p120 RasGAP.

d) Effecteurs de Ras

L'activation de récepteurs comme les RCPG, les RTK ou les intégrines par différents ligands provoque l'activation de protéines Ras qui recrutent alors un certain nombre d'effecteurs. La liaison de ces effecteurs aux protéines Ras déclenche des cascades de signalisation bien distinctes. Les effecteurs de Ras sont caractérisés par la présence d'un domaine RBD (Ras-Binding Domain) ou un domaine RA (Ras Associating).

En 1993, la protéine kinase Raf a été identifiée comme étant un effecteur majeur de Ras. Les protéines Raf sont les premières kinases de la cascade des MAPK. L'autre effecteur majeur de Ras est la protéine PI3K. En effet, il existe une interaction directe entre la sous-unité catalytique p110 de PI3K avec la protéine Ras activée. Cette interaction se fait grâce à un domaine RBD que possède la PI3K. Parmi les isoformes de Ras, H-Ras est l'activateur le plus puissant de la PI3K comparé à K-Ras

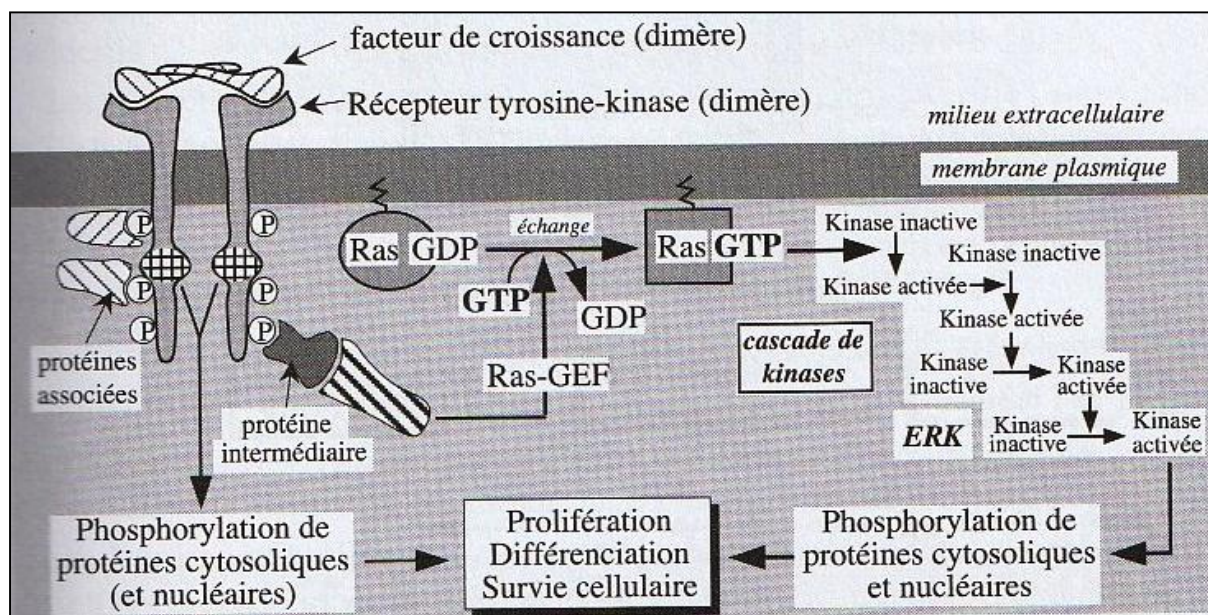


Figure 21 : L'activation de Ras par un récepteur tyrosine kinase (Cau et Seïte, 2007)

III.6.1.4. Description de la voie Ras/MAPK ou voie ERK1/2

ERK1 et 2 ont 83% d'acides aminés identiques et sont exprimées dans tous les tissus. Elles sont très fortement activées par des facteurs de croissance tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor), par les esters de phorbol, qui, par l'intermédiaire des récepteurs membranaires, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou couplés aux protéines G, transmettent des signaux activateurs à la cascade Raf/MEK/ERK via différentes isoformes de la protéine Ras.

Les MEK1/2 activent sélectivement les MAP kinases ERK 1/2 par phosphorylation au niveau d'un motif conservé **TEY (Thr-Glu-Tyr)** présent dans la boucle d'activation, selon un mécanisme distributif.

ERK1 et ERK2 sont des protéines de 43 et 41 kDa qui sont homologues à 85%. ERK phosphoryle à son tour de nombreux substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation

La voie MEK/ERK est une voie de signalisation intracellulaire, caractérisée par une cascade de phosphorylation protéique conduisant à une réponse cellulaire. Elle est activée par des facteurs de croissance, des hormones ou des cytokines qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase.

La liaison du ligand sur le domaine extracellulaire du récepteur entraîne sa dimérisation, ce qui déclenche l'autophosphorylation de son domaine cytoplasmique sur des résidus tyrosine, faisant apparaître des motifs protéiques nouveaux. Ils permettent l'ancrage au récepteur de protéines dites adaptatrices, telle que GRB2, contenant des domaines SH2 ou PTB (domaine de liaison à la phosphotyrosine).

Ces protéines vont ensuite recruter la protéine Sos, qui est un facteur d'échange du GDP pour les protéines RAS. Ce sont des protéines G monomérique (ou GTPase) qui cyclent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. La proximité de SOS et de RAS va favoriser l'échange du GDP par le GTP, induisant son activation. Ainsi activée RAS va se lier à différents effecteurs dont la kinase C-RAF qui va phosphoryler et activer les kinases MEK1 et MEK2 qui vont-elles-mêmes phosphoryler et activer les kinases ERK1 et ERK2 puis phosphoryler des protéines cytosoliques comme la S6 kinase ou des facteurs de transcription nucléaires tels que ELK, ETS, ou, fos, à l'origine des effets cellulaires

III.6.1.5. Régulation de la voie MEK/ERK

La voie MEK/ERK est finement régulée, notamment par un rétrocontrôle négatif exercé par ERK. La phosphorylation de SOS par ERK limite son association à GRB2 empêchant ainsi son recrutement à la membrane plasmique. De même, ERK est capable de phosphoryler directement RAF et le domaine intracellulaire du récepteur à l'EGF induisant leur inactivation. Par ailleurs, les facteurs de transcription de la famille ETS, stimulent la synthèse d'inhibiteurs de la voie MEK/ERK, tels que les protéines Sprouty, ou les phosphatases de la famille DUSP (Dual Specific Phosphatases)

La voie MEK/ERK est activée et interagit avec de nombreuses autres voies de signalisation instaurant des régulations croisées entre ces voies. Ces régulations complexes sont souvent à l'origine de la limitation des effets anti tumoraux observés avec des inhibiteurs spécifiques d'une voie. En effet, le blocage d'une voie induit des activations compensatoires d'autres cascades de signalisation, comme par exemple l'activation de Tyrosines kinases membranaires tels que Met, IGFR1, PDGFR β , EGFR ou C-KIT, surmontant ainsi les effets pharmacologiques des inhibiteurs.

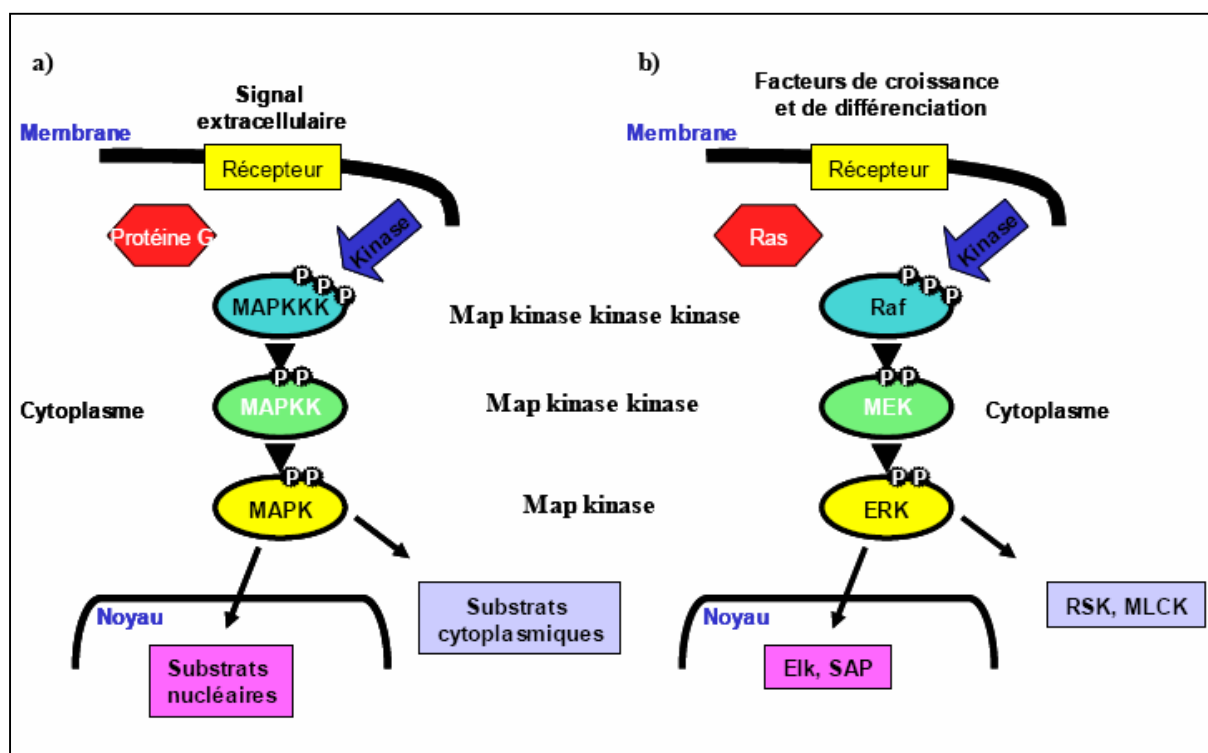


Figure 22 : Schéma de l'activation de la voie des MAPK (Sampaio, 2008).

III.6.2. La voie de JNK

La voie MAP kinase JNK est principalement activée par les cytokines et les stress cellulaires comme un choc osmotique, un stress oxydatif ou des radiations, de sorte que les MAP kinases JNK furent initialement nommées stress-activated protein kinases (SAPK). Les facteurs de transcription de la famille AP-1 figurent parmi les cibles les plus importantes des JNK. Ceux-ci sont des hétérodimères formés de Fos, Maf, ATF et/ ou de membres de la

famille Jun (c-Jun, JunB, JunD). Les facteurs AP-1 relient l'activation de la voie JNK à l'induction de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération, l'apoptose, l'inflammation et la réparation de l'ADN.

Ainsi, la voie JNK est impliquée dans la croissance, le développement du système nerveux, ainsi que dans la réponse aux cytokines et à l'insuline. Elle représente conséquemment une cible de choix en vue du traitement de la maladie de Parkinson, de l'inflammation, du diabète, du cancer et de nombreuses autres pathologies.

Les JUN N-terminal kinases, JNK ou SAPK (*Stress-activated protein kinase*), au nombre de trois, codées par trois gènes conduisant à la production d'au moins dix isoformes. Les isoformes identifiées sont JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , et JNK3/SAPK β , leurs domaines catalytiques présentent 85% d'homologie sont activées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, à des stress comme la chaleur, les radiations ionisantes, l'endommagement de l'ADN ou le stress oxydatif, et accessoirement par les facteurs de croissance. Le TNF (*Tumor necrosis factor*) et les ligands WNT activent également cette voie de signalisation.

Les JNK/SAPKs sont activées par phosphorylation sur deux sites, tyrosine et thréonine, comme toutes les autres MAP kinases L'activation de la voie de JNK implique de très nombreuses MAP3K dont l'action converge vers l'activation d'un nombre restreint de MAP2K. En effet, seulement deux membres de la famille des MAP2K, MKK4 (SEK1, MEK4, JNKK1, SKK1) et MKK7 (MEK7, JNKK2, SKK4), ont été impliqués dans les voies JNK/SAPK. L'activation de la voie de JNK est généralement associée à la régulation des processus de mort cellulaire, à la transduction du signal insulinique et à la régulation du cycle cellulaire.

○ **MAPKKK de la voie JNK**

Plusieurs MAPKKX activent la voie JNK à divers degrés d'intensité. Bien que cette spécificité semble liée à la nature du stimulus activateur, elle reste pourtant très cryptique. Il n'en demeure pas moins que MEKK1 est le premier activateur identifié de la voie JNK et le plus puissant. Par la suite, plusieurs autres MAPKKK de cette voie ont été découvertes :

MEKK2 et MEKK3, MEKK4, Mixed-lineage kinase 2 (MLK2) et MLK3, Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) et ASK2 et TGF- β -activated kinase 1 (TAK1). De plus, d'autres protéines comme Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) ainsi que Thousand and one amino acid kinase 1 (TAO1) et TAO2 peuvent aussi activer cette voie, mais à un degré moindre.

Comme elles sont nombreuses, l'inactivation génique de ces différentes MAPKKK n'a pas permis l'identification de l'une d'entre elles comme étant essentielle à la voie JNK. En effet, l'absence de MEKK1 ou d'autres MAPKKK n'empêche pas l'activation de la voie JNK par des stress comme les rayons ultraviolets (UV). Ces données suggèrent que plusieurs MAPKKK sont activées par un même stress, ou encore que la MAPKKK critique à la voie JNK n'a pas encore été inactivée.

III.6.3. La voie de p38

La voie MAP kinase p38 constitue un relais de prédilection pour les signaux de stress et d'inflammation. En effet, celle-ci est activée par les rayons UV, des chocs thermiques ou osmotiques, ainsi que par des facteurs de croissances et plusieurs cytokines inflammatoires. De plus, l'activation de la voie p38 est elle-même essentielle à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'enzymes antioxydants, de protéines du remodelage tissulaire et de nombreuses autres molécules de l'inflammation. Enfin, la voie p38 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules du système immunitaire.

La famille des MAPK p38 est constituée de quatre isoformes issues de l'expression de gènes différents : p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) et p38 δ (MAPK13). Les séquences en acides aminés des protéines p38 α et p38 β sont proches à 75%, celles de p38 γ et p38 δ à 70 % entre elles. En revanche, p38 γ et p38 δ ne partagent qu'environ 60 % d'identité avec p38 α . L'expression de ces isoformes diffère selon le tissu considéré.

Ces facteurs activent les MAP3K nommées MEKK4, TAK1 ou ASK1 qui vont à leur tour activer les MAP2K impliquées dans la voie de p38 mais peuvent également activer la voie de JNK. Deux protéines MAP2K, MEK3 (MKK3) et MEK6 (MKK6), activent fortement les p38 MAP kinases. MEK3 paraît favoriser la phosphorylation de p38 α et les

isoformes de p38 β , alors que MEK6 phosphoryle efficacement tous les membres de la famille p38.

L'activation de la voie de p38 est généralement associée à l'activation de facteurs de transcription et de protéines kinases impliqués dans la régulation des processus de mort cellulaire, de différenciation et de réponse inflammatoire.

De plus, l'activation de la voie p38 est elle-même essentielle à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'enzymes antioxydants, de protéines du remodelage tissulaire et de nombreuses autres molécules de l'inflammation. Enfin, la voie p38 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules du système immunitaire.

III.6.3.1. Composantes de la voie p38

Souvent activée par les mêmes stimuli, la voie p38 partage plusieurs MAPKKK importantes avec la voie JNK. Celles-ci incluent TAK1, ASK1, DLK, MEKK1, MEKK3, MEKK4, MLK1, MLK2 et MLK3, dont la surexpression active la voie p38 et la voie JNK avec des efficacités variables.

Les MAPKK MKK3 et MKK6 sont identiques à 80%. L'inactivation génique de l'une ou de l'autre engendre des défauts immunologiques qui n'affectent pas la viabilité ni la fertilité des souris. En revanche, la double inactivation de MKK3 et MKK6 engendre une létalité découlant de sévères défauts de vascularisation. Tandis que MKK6 active efficacement les quatre isoformes de p38, MKK3 est incapable d'activer p38 β . Par ailleurs, la MAPKK MKK4, activée dans la voie JNK peut conduire à l'activation de p38 α et p38 δ dans certaines conditions cellulaires. MKK4 contribue à l'activation des MAP kinases p38 par les rayons UV, mais MKK3 et MKK6 seuls relayent l'activation de p38 par le Tumor necrosis factor α (TNF α). En somme, MKK3 et MKK6 exercent chacun une spécificité malgré leur action largement redondante, et elles sont considérées comme les principales MAPKK de la voie p38.

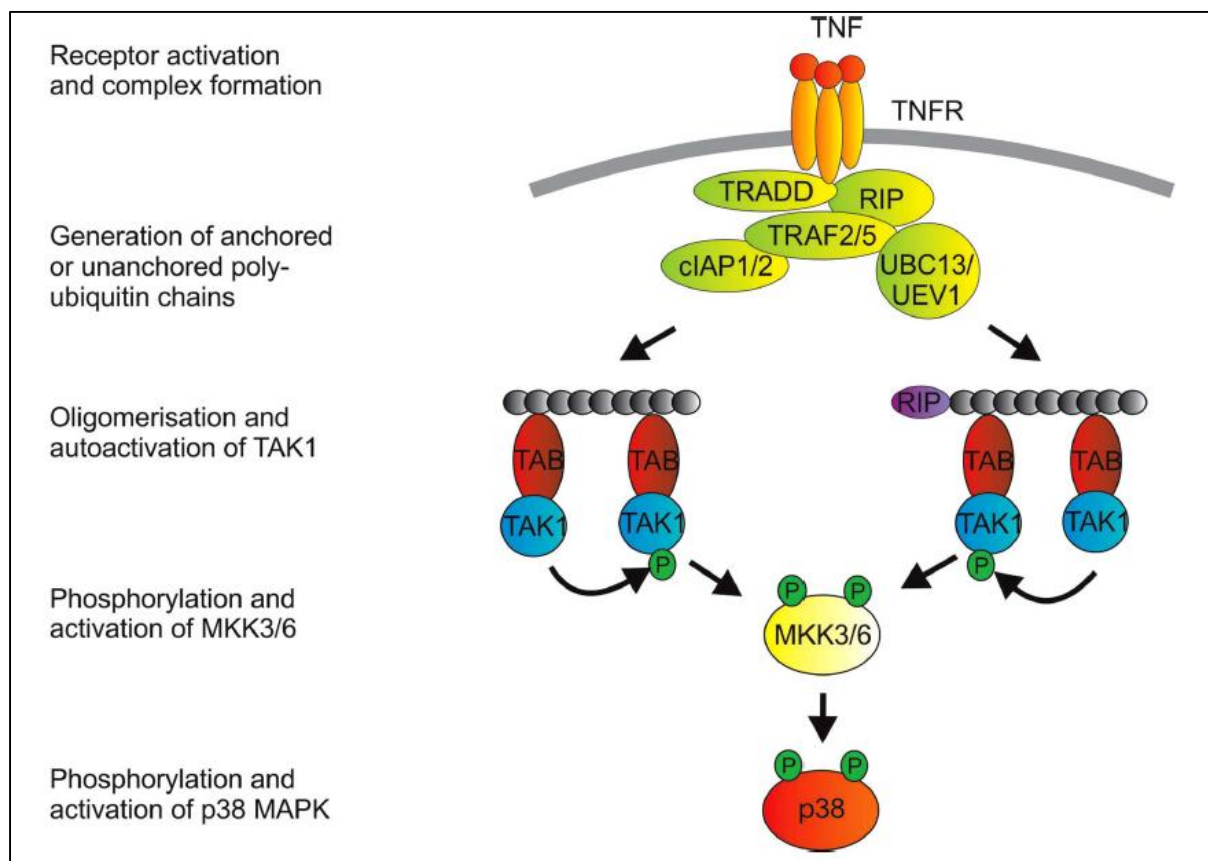


Figure 22 : Activation de la p 38 Map kinase (Clark et Dean, 2012)

III.7. La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT participe à la régulation de la réponse cellulaire aux cytokines et aux facteurs de croissance. Suite à l'activation par une cytokine ou un facteur de croissance, la voie de signalisation utilise **les protéines JAK (Janus kinases)** et **STATs (Signal transducers and activators of transcription)** pour transmettre le signal extracellulaire vers le noyau dans lequel les protéines STATs activées modulent l'expression génique. Cette voie de signalisation joue un rôle critique dans la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire et l'apoptose. Elle est particulièrement importante dans l'hématopoïèse.

Les protéines JAKs qui ont une activité tyrosine kinase se fixent sur certains récepteurs des cytokines. La fixation du ligand à son récepteur va activer JAK. L'activité kinasique de JAK étant augmentée va résulter en une phosphorylation accrue de résidus tyrosine sur le récepteur et ainsi créer des sites d'interaction avec des protéines qui contiennent des domaines

SH2 fixant les phosphotyrosines. Or les protéines STATs possèdent des domaines SH2 capables de fixer ces résidus phosphotyrosine qui sont ainsi recrutés sur les récepteurs et sont eux-mêmes phosphorylés au niveau de leurs résidus tyrosine par JAKs. Ces phosphotyrosines vont ensuite servir de fixation pour les domaines SH2 d'autres molécules STATs, favorisant ainsi leur dimérisation. Ainsi différentes protéines STATs peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. Ces dimères de STATs ainsi activés vont transloquer vers le noyau cellulaire et activer la transcription de gènes cibles. Par ailleurs les STATs peuvent aussi être directement phosphorylés au niveau de leurs résidus tyrosine par des tyrosines kinases présentes au niveau du récepteur (ex. récepteur de l'EGF ou « Epidermal growth factor ») ou par des tyrosines kinases de type c-src.

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

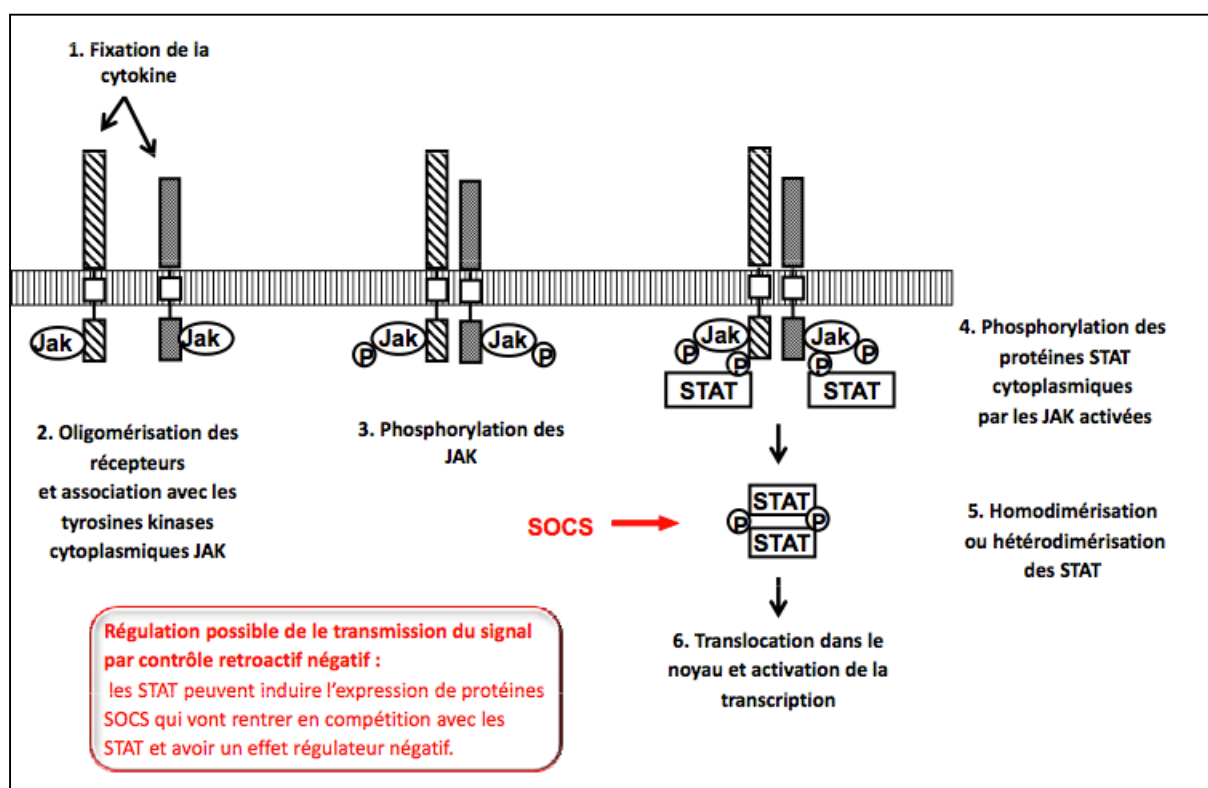


Figure 23: La voie JAK/STAT (Herbein, 2010)

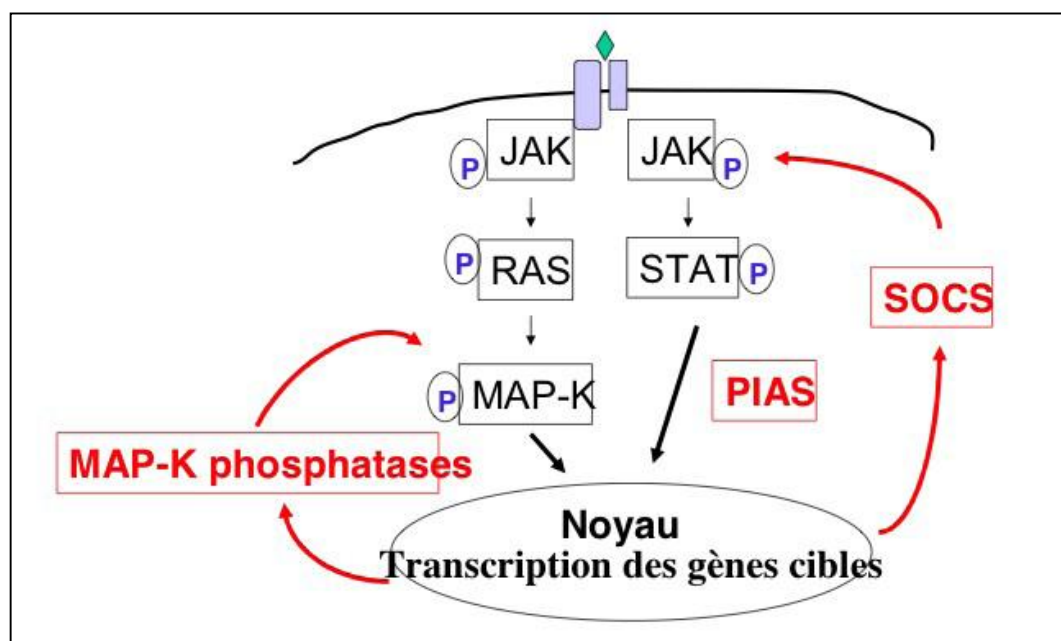


Figure 24 : Inhibition de la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT et MAPK
(COHEN-SOLAL, 2007)

- MAPK phosphatases pour la voie MAPK
- SOCS pour la voie STAT
- PIAS pour la voie STAT

III.8. La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase/ Akt (PI3K/Akt)

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est une des voies de signalisation qui s'ouvre en aval de l'interaction d'un facteur de croissance avec un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Elle suit donc un chemin parallèle à la voie des MAP kinases. Comme cette dernière, elle est mise en oeuvre à la suite de la reconnaissance d'une phosphotyrosine du récepteur activé par une protéine adaptatrice et comporte des activations séquentielles de kinases aboutissant à des effets multiples sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires.

Cette voie est interconnectée en particulier avec la voie des MAP kinases au niveau de RAS ; elle est en outre capable d'intégrer des signaux métaboliques et nutritionnels qui servent à associer la croissance et la prolifération cellulaires à la disponibilité en nutriments. C'est une des voies majeures de l'action de l'insuline

○ **De la phosphatidylinositol-3-kinase aux protéines AKT**

La principale phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase) est un hétérodimère composé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique (p110, PIK3CA) portant une activité de lipide kinase, et une sous-unité régulatrice (p85, PIK3R1) dotée d'un domaine SH2 qui lui permet de reconnaître des phosphotyrosines de RTK activés, et de transmettre cette activation à la sous-unité catalytique. Indirectement, l'activation de p85 peut se faire par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice, IRS1 ou 2 (*Insulin receptor substrate 1 or 2*), phosphorylée elle-même par certains récepteurs activés comme l'IGF1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*), et reconnue par un domaine SH2 de p85

La PI3 kinase peut également être activée par la protéine adaptatrice RAS que nous avons vue dans la voie des MAP kinases. En effet, la sous-unité catalytique possède, du côté C-terminal, un domaine de reconnaissance de RAS activé. Il s'agit d'une interconnexion majeure entre les deux voies de signalisation, et les conséquences thérapeutiques de cette interconnexion sont importantes dans le cadre des thérapies ciblées. Enfin, la PI3 kinase peut également être activée par des récepteurs couplés aux protéines G (*GPCR, G protein-coupled receptors*).

La PI3 kinase assure la phosphorylation en 3 d'un lipide membranaire particulier, le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, afin de le transformer en phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphate. Contrairement à la voie de signalisation impliquant une phospholipase C, qui libère un triphosphoinositol (IP3) comme second messager, c'est la présence du phosphate en 3 de l'inositol qui constitue le message proprement dit, du fait que ce phosphate est susceptible d'être reconnu par des protéines possédant un domaine particulier appelé PH (*Pleckstrin-homology domain*).

Il existe en fait quatre PI3 kinases de classe I, notées PIK3CA à PIK3CD, de spécificités tissulaire et fonctionnelle précises, qui ont une sous-unité catalytique p110 α , β , γ ou δ et qui sont activées par divers types de sous-unités régulatrices. Ces PI3 kinases diffèrent en particulier par leur capacité à être activées par un RTK, un GPCR, une cytokine, une intégrine et/ou une protéine RAS. Les fonctions des PI3 kinases de classes II et III sont moins bien connues que celles des PI3 kinases de classe I et concernent le trafic membranaire et

l'internalisation des récepteurs. Elles diffèrent également quant à leur substrat lipidique précis de la classe des inositides.

La présence d'un groupement phosphate en 3 sur l'inositide permet le recrutement à la membrane de protéines kinases à domaine PH, en particulier la PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) et la protéine AKT, anciennement nommée protéine kinase B (PKB). En raison vraisemblablement d'une disposition particulière au niveau de la membrane, liée à la reconnaissance du phosphoinositide, la PDK1 est susceptible de phosphoryler et d'activer une protéine AKT. Cette phosphorylation se fait sur la thréonine 308, au niveau du site catalytique. La protéine AKT est à l'origine de l'activation de multiples effecteurs

Il existe trois isoformes de Akt nommées Akt1, Akt2 et Akt3. Sur toutes les isoformes d'Akt on retrouve un domaine d'homologie avec la plekstrine (PH) qui se lie préférentiellement avec les PIP3. Cette interaction entre le domaine PH de Akt et le PIP3 conduit à des changements conformationnels de Akt qui conduisent au démasquage de deux sites de phosphorylation (Thr308 et Ser473). La phosphorylation d'Akt est alors régulée par la protéine kinase PDK1 (3'- phosphoinositide-dependent kinase 1) qui est également recrutée par son domaine PH au niveau du site de production de PIP3. Une fois activée la protéine Akt phosphoryle divers substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire.

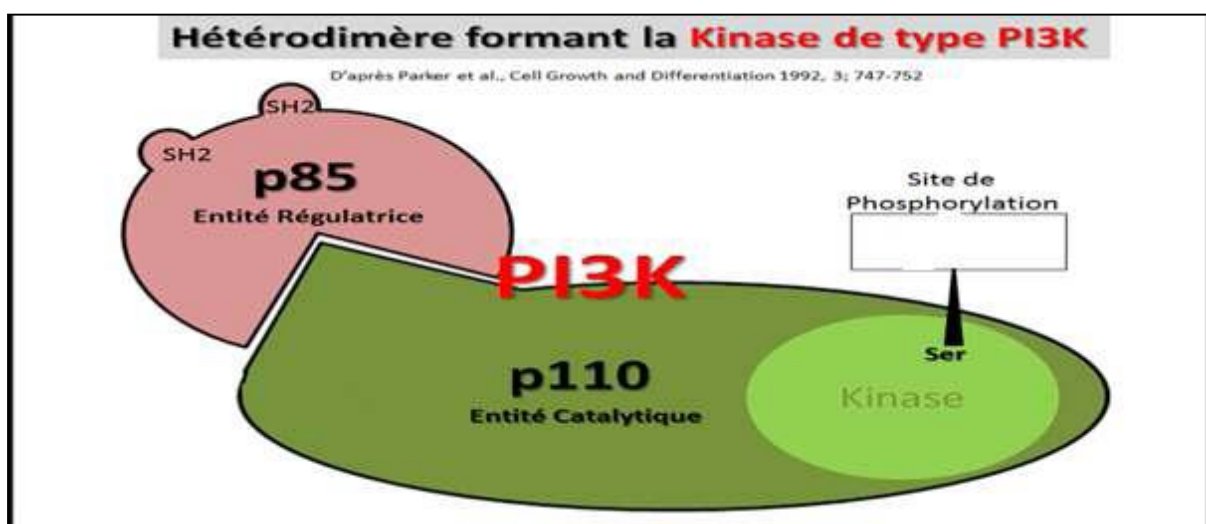


Figure 25 : Représentation schématique de la structure la kinase de type PI3K

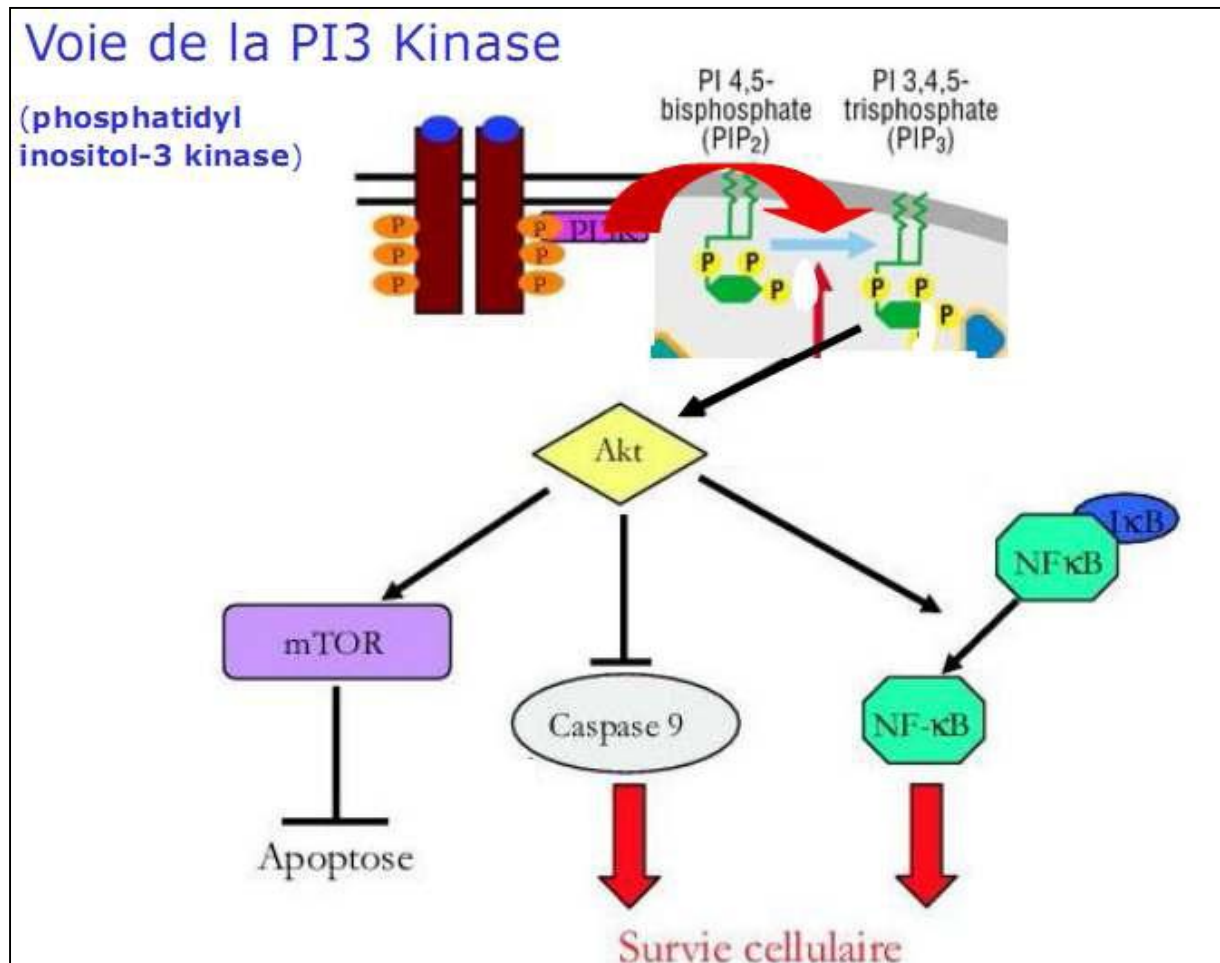


Figure 26 : Voie de la PI3 kinase (Robert, 2010)

- Albert., Bray., Hopkin., Jonhson., Lewis., Raff., Roberts., Walter., 2012.** L'essentiel de la biologie cellulaire. Chapitre 16, P : 531-562, 3^{ème} édition Médecine sciences publications. Lavoisier.
- Bassaglia,Y., 2013.**Biologie cellulaire. Chapitre 6, P : 170-175, 3^{ème} éditions Maloine, Paris.
- Cau, P.,Seite, R., 2007.**Cours de biologie cellulaire. Chapitre 13, P : 490-539, 4^{ème} édition Ellipses
- Clark,A.R., Dean,J.L.E.,2012.** The P38 MAPK pathway in rheumatoid Arthritis: A Sideways Look. The Open Rheumatology Journal , volume 6, 209-219.
- Descamps, M. C., 2007.** Biologie cellulaire. Chapitre 11, P : 275-288, Dunod,Paris
- Felouzis,V.,2015.** Etude du signal AMP cyclique déclenché par la chimiokine CX3CL1 en aval de son récepteur CX3CR1.Thèse de doctorat de l'université de Paris VI
- Herbein,G., 2010.** Les voies de signalisation intracellulaire : Aspects généraux.Tome 14 n°129.Réflexion Rhumatologique.
- Idelman, S., Verdeti, J., 2000.** Endocrinologie et communication cellulaire. EDP Sciences
- Kierszenbaum, A.L., 2006.** Histologie et biologie cellulaire.Chapitre 3 P : 77-92, 1^{ère} édition De boeck.
- Louet, M., Charlier, L.,Martinez,J.,Floquet,N., 2013.**Nos récepteurs déroulent leur mécanique.L'actualité chimique n°380. Recherche et développement. P :26-30.
- Manglik, A., & Kruse, A. C. (2017).** Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry*, 56(42), 5628–5634.
- O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C., & Roman, D. L. (2019).** Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: Progress and future potentials. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18571–18585.
- Robert, J., 2010.** Signalisation cellulaire et cancer .Un manuel pour les étudiants et les oncologues. Springer-Verlag France, Parie.

Roy , S., 2014. Étude des mécanismes gouvernant le transport intracellulaire et le contrôle de qualité des RCPG. Thèse de l'université de Sherbrooke, Québec, Canada.