

Signalisation (2/2)

Récepteurs à activité enzymatique

Localisation cellulaire des voies de signalisation et *cross-talk*

Pathologie touchant les circuits de signalisation

Plan de ce cours

Récepteurs à activité enzymatique **p. 3**

- I. La voie JAK-STAT** **p. 3**
1. Molécules impliquées **p. 3**
 2. Mécanisme de transduction **p. 4**
 3. Remarques diverses **p. 4**
- II. Les récepteurs à activité tyrosine-kinase** **p. 4**
1. Généralités **p. 4**
 2. Les acteurs de croissance et leurs récepteurs **p. 5**
 3. Activité enzymatique des RTK – Autophosphorylation des RTK **p. 6**
 4. Adaptateurs moléculaires – Grb2 et l'initiation des voies de signalisation **p. 7**
 5. La voie Ras **p. 7**
 6. La voie PI3K **p. 8**
 7. Bilan et comparaison avec d'autres types de récepteurs **p. 9**

Localisation cellulaire des voies de signalisation, *Cross-talk* **p. 10**

- I. Localisation cellulaire des voies de signalisation : exemple de la voie Ras/MAP-kinases** **p. 10**
1. Métabolisme de Ras **p. 10**
 2. Rôle des endosomes dans la localisation des voies de signalisation **p. 10**
 3. Rôle des complexes d'assemblage macromoléculaires **p. 11**
 4. Bilan sur la compartimentation de la signalisation **p. 11**
- II. Liens entre les voies de signalisation – *Cross-talk*** **p. 11**

Pathologies touchant les circuits de signalisation : exemples **p. 13**

- I. Mutations des gènes de la voie Ras** **p. 13**
1. Mutations de Ras impliquées dans les cancers **p. 13**
 2. Mutations d'autres éléments des voies de signalisation liées aux RTK **p. 13**
 3. Activations indirectes de la voie Ras impliquées dans les cancers **p. 14**
 4. Traitement des cancers liés aux mutations de la voie Ras **p. 14**
 5. Implication de Ras et d'autres molécules de la voie Ras dans d'autres pathologies **p. 14**
- II. Pathologies liées au métabolisme des phosphoinositides** **p. 14**
1. Implication dans les cancers et les maladies génétiques **p. 14**
 2. Lien avec les caractères pathogènes de bactéries : exemple de la listériose **p. 15**

III. Le choléra **p. 15**

IV. La lèpre **p. 15**

Nota le diaporama projeté en cours par le professeur est disponible sur le site de la faculté :

<http://www.medecine.univ-paris7.fr/PCEM2/Cours/Biochimie/biochimie.htm>

Ce diaporama (coupé en quatre) comprend tous les schémas nécessaires à l'illustration de ce cours, qui ne sont donc pas repris dans cette ronéo. Les pages du diaporama correspondant au texte de la ronéo sont indiquées à côté des titres de paragraphes (entre parenthèses : numéro du diaporama-numéro de la page)

Les récepteurs à activité enzymatique (2-5)

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G voient leur structure *tertiaire*, en particulier celle de leur partie intracellulaire, modifiée lors de la fixation de leur ligand. Ce sont de telles modifications qui permettent alors la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule (voir le cours précédent)

Il n'en est pas de même pour les récepteurs à activité enzymatique ; en effet la fixation de leur ligand induit des modifications de la structure *quaternaire* de ces récepteurs, en particulier leur dimérisation. C'est cette formation de dimères de récepteurs qui déclenche leur activité enzymatique.

Les plus courants de ces récepteurs sont les récepteurs à activité tyrosine-kinase. De façon générale le rapprochement de domaines à activité tyrosine-kinase portés directement ou indirectement par ces récepteurs est nécessaire car il permet leur autophosphorylation croisée. C'est cette phosphorylation des récepteurs qui initie le signal à l'intérieur de la cellule.

On peut distinguer deux types de récepteurs à activité enzymatique :

- les récepteurs-enzymes possédant une activité enzymatique intrinsèque (c'est le cas des récepteurs à tyrosine-kinase)
- les récepteurs-enzymes à activité enzymatique associée (qui n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais sont associés à des kinases, par exemple dans la voie JAK-STAT)

L'ensemble de ces récepteurs est en nombre moins important que les récepteurs à sept domaines transmembranaires, mais possèdent une très grande importance physiologique dans la signalisation à partir de cytokines ou de facteurs de croissance.

I. La voie JAK-STAT

La voie JAK-STAT est un système rapide de signalisation entre la membrane et le noyau. Elle est utilisée par des récepteurs d'un nombre relativement restreint de ligands :

- quasiment tous les récepteurs des cytokines
- certains récepteurs de facteurs de croissance
- le récepteur de l'hormone de croissance
- les récepteurs de la leptine
- les récepteurs de l'interféron...

1. Molécules impliquées dans la voie JAK-STAT (2-6,7)

Cette voie met en jeu deux intervenants : JAK et STAT.

JAK (*Janus Kinase*) désigne une famille de tyrosine-kinases associées au récepteur comprenant quatre membres : JAK-1, JAK-2, JAK-3 et TYK-2.

Les kinases JAK possèdent une structure spécifique comportant (de N-terminal et C-terminal) :

- un domaine FERM de liaison au récepteur membranaire
- un domaine récurrent SH2 médiant les interactions avec d'autres protéines (voir nota ci-après)
- un domaine pseudo-kinase, dont certains acides aminés nécessaires à l'activité catalytique (présents sur un domaine tyrosine-kinase normal) sont modifiés. Ce domaine sert à la régulation du domaine kinase.
- un domaine tyrosine-kinase

Les JAK possèdent des sites de phosphorylation intervenant dans la régulation de leur activité.

STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) désigne une famille de sept facteurs de transcription. Les membres de la famille STAT comportent donc un motif de liaison à l'ADN, ainsi que :

- en C-terminal : un domaine SH2 permettant la formation de dimères grâce à la fixation d'une tyrosine phosphorylée d'une autre molécule STAT (située en C-terminal du domaine SH2 et très conservée dans la famille)
- en N-terminal : un domaine de dimérisation (favorisant la dimérisation permise par SH2)

Nota il existe dans les protéines des domaines récurrents qui médient les interactions protéine-protéine. Parmi ceux-ci :

- SH2 (*Src-kinase Homology domain 2*)
- SH3 (*Src-kinase Homology domain 3*) qui lie des peptides riches en proline
- PTB (*Phospho-Tyrosine Binding*) qui reconnaît et fixe les tyrosines phosphorylées

2. Mécanisme de transduction du signal dans de la voie JAK-STAT (2-8,9,10,11,12)

A l'état basal un récepteur est associé à une molécule JAK sur sa partie intracytoplasmique.

Le ligand se fixe à deux molécules de récepteur et favorise leur dimérisation

Ce rapprochement permet la phosphorylation croisée des deux JAK, qui sont alors activées et phosphorylent d'autres substrats, tour à tour :

- le récepteur, qui possède dès lors des tyrosines phosphorylées servant de point d'ancrage au domaine SH2 de la molécule STAT (une STAT par récepteur, donc deux au total)
- STAT (après sa fixation sur le récepteur phosphorylé qui la rapproche de JAK)

La phosphorylation de STAT lui permet de créer, *via* ses domaines SH2, un dimère stable qui s'éloigne du récepteur pour aller dans le noyau exercer son action de facteur de transcription : il se fixe sur des régions régulatrices de gènes possédant des motifs de reconnaissance de protéine STAT et induit l'expression de ces gènes, qui sont les médiateurs de l'effet du ligand à l'intérieur de la cellule.

Parmi les molécules dont l'expression est activée par le dimère de STAT se trouve SOCS (*Supressor Of Cytokine Signaling*)

Après sa traduction SOCS va fixer le récepteur au niveau de la membrane, prenant la place de STAT. Ainsi SOCS empêche le recrutement de nouvelles STAT et l'activation de la voie de signalisation : il y a donc extinction du signal, qui reste transitoire.

3. La voie JAK-STAT : remarques diverses (2-13)

La simplicité de la voie JAK-STAT est à la fois un atout et un inconvénient :

- c'est une voie extrêmement rapide jouant sur l'expression des gènes... (les voies mises en oeuvre pour arriver à ce résultat sont souvent peu rapides comparées aux voies menant à des modifications post-traductionnelles de protéines, en particulier la modification de leur état de phosphorylation)
- ... mais qui est peu sujette aux processus d'amplification, en raison du faible nombre d'intermédiaires

Les récepteurs aux différents ligands sont relativement restrictifs par rapport aux protéines JAK qu'ils peuvent fixer. Par exemple les récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétiques fixent en général JAK-2. Il est rare qu'un récepteur utilise deux types de protéines JAK.

De même il existe des liens privilégiés et restrictifs entre certaines JAK et certaines STAT.

Enfin les gènes cibles dépendent du type de STAT mise en jeu ainsi que de la cellule-cible où a lieu la cascade, d'éventuels co-régulateurs, de l'état de l'ADN...

II. Récepteurs à activité tyrosine-kinase

1. Généralités (2-14)

Certains récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires possèdent une activité tyrosine-kinase intrinsèque au niveau de leur domaine intracellulaire, par exemple :

- les récepteurs de très nombreux facteurs de croissance
- le récepteur à l'insuline (voir le cours sur la régulation de la glycémie)

On les trouve exclusivement chez les organismes pluricellulaires. Ils proviennent de la fusion au cours de l'évolution de gènes codant pour des protéines extracellulaires avec des gènes codant pour des protéines à activité tyrosine-kinase.

En absence de ligands la plupart de ces récepteurs tyrosine-kinase sont des monomères, à l'exception du récepteur à l'insuline, formé par l'association de plusieurs chaînes.

Les propriétés communes des récepteurs tyrosine-kinase sont :

- un domaine extracellulaire qui associe plusieurs motifs globulaires très glycosylés (ce qui les rend résistant aux protéases) sur lequel se fixent les ligands, qui sont essentiellement de nature polypeptidique. Dans ces domaines extracellulaires peuvent se trouver des motifs récurrents formant des boucles de structure proche de la structure des immunoglobulines, appelés domaines *Ig-like* ; on trouve dans d'autres récepteurs des domaines récurrents riches en cystéine.
- un domaine transmembranaire très variable d'un récepteur à l'autre
- un récepteur cytoplasmique portant l'activité tyrosine-kinase. C'est une région très homologue d'un récepteur à l'autre, néanmoins les récepteurs tyrosine-kinase de classe III ont leur domaine tyrosine-kinase clivé par l'insertion d'une séquence d'environ 100 acides aminés. Les régions intracellulaires des différents récepteur faisant la différence dans la transduction du signal sont la partie juxta-membranaire et la région C-terminale, de longueur variable, qui contiennent quelques tyrosines qui sont autophosphorylées lors de la fixation du ligand.

On connaît environ 60 récepteurs tyrosine-kinase (RTK), que l'on sépare en fonction de leur structure en environ 20 sous-familles.

Classe de RTK	Exemples de récepteurs de cette classe et leurs particularités
I	Récepteurs à l'EGF (EGFR : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>) Récepteur produit du gène Erb-B2 Particularité : abondance de domaines extracellulaires riches en cystéine
II	Récepteur à l'insuline Récepteur à l'IGF1 Particularité : structure tétramérique formée de deux chaînes α extracellulaires liées à deux chaînes β portant l'activité TK intracellulaire, ces chaînes étant synthétisées sous forme d'un précurseur commun. Les chaînes α fixent le ligand et transmettent le signal aux chaînes β .
III	Récepteur au PDGF (PDGFR) Récepteur à KIT Récepteur au CSF-1 (CSF1R) Particularité : abondance de domaines <i>Ig-like</i> extracellulaires

2. Facteurs de croissance et leurs récepteurs (2-15)

Les récepteurs tyrosine-kinase jouent un rôle dans les signaux médiés par les facteurs de croissance (GF : *Growth Factor*)

Un facteur de croissance est un facteur ayant un effet mitogène (i.e un effet positif sur la prolifération cellulaire, qui se traduit en général par une activation du cycle cellulaire) Ils ont également un rôle important dans la survie cellulaire en s'opposant au processus d'apoptose. Les facteurs de croissance sont donc indispensables au développement de certains tissus tout au long de la vie de l'organisme et pendant

le développement.

En fonction des tissus-cible de ces facteurs (i.e possédant leur récepteur) on distingue différents facteurs de croissance (nommés sur le premier modèle permettant leur identification, leur nom n'indique donc pas forcément leur fonction réelle ou complète) :

Facteur de croissance	Récepteur du facteur de croissance	Rôle du facteur de croissance
EGF <i>Epidermal Growth Factor</i>	EGFR Récepteur à l'EGF	- Stimule la prolifération de nombreux types cellulaires
IGF1 et IGF2 <i>Insulin Growth Factor</i>	IGF1R Récepteur à l'IGF1	- Stimule la croissance et la survie cellulaire
NGF <i>Nerve Growth Factor</i>	NGFR Récepteur au NGF	- Stimule la croissance cellulaire - Stimule la survie de nombreux neurones
PDGF <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	PDGFR Récepteur au PDGF	- Stimule la croissance, la prolifération et la survie de nombreux types cellulaires
M-CSF <i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	M-CSFR Récepteur au M-CSF	- Stimule la prolifération et la différenciation des monocytes et macrophages
FGF <i>Fibroblast Growth Factor</i>	FGFR Récepteur au FGF	- Stimule la prolifération de nombreux types cellulaires - Inhibe la différenciation de certains précurseurs cellulaires

3. Activité enzymatique des récepteurs tyrosine-kinase – Autophosphorylation des RTK (2-16)

Deux processus interviennent dans l'activation d'un récepteur tyrosine-kinase :

- l'augmentation de l'activité catalytique (tyrosine-kinase) intrinsèque
- la création de sites de liaison permettant le recrutement des protéines de signalisation en aval de ces récepteurs

Dans la majorité des cas ces deux processus sont accomplis par l'autophosphorylation des récepteurs :

- en cis : phosphorylation par le récepteur de ses propres tyrosines
- en trans : phosphorylation croisée de et par deux récepteurs différents.

Le ligand qui lie deux monomères de récepteur pour former un dimère rapproche leurs extrémités intracytoplasmiques, ce qui permet cette autophosphorylation ; en effet un récepteur monomérique à l'état basal est enzymatiquement inactif : l'oligomérisation est nécessaire à l'autophosphorylation.

Dans le cas du récepteur à l'insuline, déjà "dimérisé" à l'état basal, la fixation du ligand provoque un changement de conformation spatiale qui active la fonction tyrosine-kinase.

D'autres protéines fixent les tyrosines autophosphorylées des récepteurs par leur domaines SH2. Le recrutement en aval de ces molécules de signalisation provoque les effets intracellulaire du phénomène de signalisation.

La principale molécule à domaine SH2 recrutée par les récepteurs tyrosine-kinase activés est Grb2 (*Growth receptor binding protein 2*)

Pour un récepteur tyrosine-kinase, le signal est terminé lorsque des phosphatases éliminent les phosphates créés lors de l'activation des récepteurs.

Il existe également des phénomènes d'endocytose des récepteurs activés (qui se retrouvent ainsi à l'intérieur d'endosomes) qui pourraient intervenir dans l'arrêt du signal.

4. Adaptateurs moléculaires – Grb2 et l'initiation des cascades de signalisation (2-17,18)

Les adaptateurs moléculaires sont une classe de protéines de transduction du signal caractérisée par le fait qu'il n'ont pas d'activité enzymatique propre mais sont composés d'une succession de domaines d'interactions protéine-protéine : de manière générale ils possèdent un domaine de liaison leur permettant de reconnaître spécifiquement un récepteur activé et un ou plusieurs domaines leur permettant de recruter des effecteurs cytoplasmiques (voir ci-dessous l'exemple de Grb2)

Ces protéines relient les récepteurs membranaires à des cibles intracellulaires et peuvent également lier différents types de protéines cellulaires les uns aux autres.

Les adaptateurs jouent un rôle double :

- ils couplent les récepteurs avec leur cible proximale
- il orientent le flux d'information parmi les réseaux intracellulaires qui contrôlent la réponse aux stimuli

Ils jouent donc un rôle important dans le relai du signal vers les molécules effectrices, ainsi que de la modulation de ce signal en fonction des molécules qu'ils fixent (ce rôle est similaire à celui joué par les AKAP, voir le cours précédent)

Grb2 est un adaptateur moléculaire. Il possède en plus de son domaine SH2 (qui reconnaît les tyrosines autophosphorylées d'un récepteur activé) deux domaines SH3 qui reconnaissent et fixent des motifs riches en proline sur d'autres protéines, en particulier Sos et Gab1 ou Gab2 (voir resp. II.5 ou II.6 pour les deux voies suivant l'activation de ces molécules)

5. Cascade de signalisation intracytoplasmique : la voie Ras (2-19,20,22)

Sos (*Son of sevenless*) est un facteur d'échange de nucléotide à guanine de la famille des GEF (*Guanine nucleotid Exchange Factor*)

Ras désigne une famille de petites protéines G (ou petites GTPases) monomériques comportant trois membres principaux – Kras, HRas et Nras – dont le type d'activité est proche.

Ras possède de nombreux motifs communs avec la sous-unité $G\alpha$ des protéines G trimériques ; elle peut cycliser entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP : c'est un commutateur moléculaire.

Lorsque Grb2 fixe Sos ce dernier, facteur d'échange de nucléotide, est mis en contact avec Ras fixé dans la membrane et provoque son activation : la fixation de Ras sur Sos change sa conformation tridimensionnelle en ouvrant la poche du GDP, qui part pour être remplacé par un GTP (car la concentration de GTP dans la cellule est dix fois supérieure à la concentration de GDP)

Ras possède une activité GTPasique intrinsèque hydrolysant le GTP en GDP, faisant ainsi passer Ras de sa forme active à sa forme inactive. Cette activité est très modeste mais est favorisée par les molécules régulatrices de la classe des GAP (*GTPase Activating Protein*), en particulier la protéine NF1 (*Neurofibromin 1*)

Ainsi, comme pour les protéines G trimériques, l'induction d'un signal par Ras est très fugace.

Ras activé par Sos induit différentes voies de signalisation en aval, la plus connue étant une cascade de MAP-kinases (les cascades de MAP-kinases sont des voies de signalisation intracellulaire passant par la phosphorylation successive de nombreux intermédiaires) :

- Ras fixe la kinase Raf, modifiant sa structure spatiale et la rendant ainsi active
- Raf phosphoryle la kinase MEK, la rendant active
- MEK phosphoryle la kinase ERK, la rendant active
- ERK phosphoryle plusieurs cibles protéiques dans le cytoplasme mais peut également se transloquer

- vers le noyau et y phosphoryler le facteur de transcription ELK, le rendant actif
- ELK joue sur l'expression de divers gènes (dont Myc, dont le produit a une action mitogène importante, voir le cours sur l'oncogénèse)
- La multiplicité des intermédiaires de cette voie des MAP-kinases permet un important phénomène d'amplification. Cette voie joue sur l'expression des gènes et le cycle cellulaire

Ces signalisations provoquées par les facteurs de croissance, très importantes pour la prolifération et la survie des cellules, ont donc deux sites d'impact : le cytoplasme (action rapide sur l'état de phosphorylation des protéines) et le noyau (induction de gènes et production de protéines du cycle cellulaire)

De façon générale il existe dans l'ensemble des phénomènes de signalisation cellulaire des convergences vers certaines protéines qui agissent à l'interface de nombreuses voies de signalisation en régulant de nombreuses voies en aval, ce qui leur confère un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La signalisation cellulaire n'est pas un ensemble de phénomènes linéaires mais un réseau.

Ras se situe à la convergence de multiples voies de signalisation :

- en amont : si l'activation de Ras passe principalement par l'activation des récepteurs tyrosine-kinase, elle peut également être provoquée par la voie des kinases JAK, par des voies de récepteurs couplés aux protéines G ou encore par des signaux calciques passant par l'activation de canaux ioniques.
- en aval : Ras-GTP active également d'autres voies que la voie des MAP-kinase, entre autres la voie PI3K, qui peut ainsi être indirectement activée par un récepteur à un facteur de croissance (la voie PI3K agit sur la survie cellulaire, voir II.5)

La voie Ras agit au final sur différents processus cellulaires, dont :

- l'expression des gènes et le cycle cellulaire
- la survie cellulaire
- le remodelage du cytosquelette

5. Cascade de signalisation intracytoplasmique : la voie PI3K (2-23)

Gab1 ou Gab2, une fois fixé par Grb2 lié au récepteur tyrosine-kinase activé, est phosphorylé par le récepteur et peut alors recruter à son tour plusieurs molécules grâce à ses tyrosines phosphorylées :

- la phosphatase SHP2 (qui intervient dans la régulation des voies de signalisation)
- la kinase PI3K

La PI3K (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*) ainsi activée est capable de phosphoryler différents dérivés phosphatidyl-inositol sur le carbone 3 de l'inositol.

En particulier la PI3K active la réaction de transformation du PIP2 en PIP3 (resp. phosphatidylinositol-4,5-diphosphate et phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)

On rappelle que le PIP2 est le substrat de la PLC (phospholipase C), qui le clive en deux seconds messagers DAG et IP3 impliqués resp. dans l'activation de la PKC (protéine kinase C) et des signaux calciques.

PIP2 étant également un élément de la voie de la PI3K (c'est le substrat de la PI3K, qui le transforme en un troisième second messenger : le PIP3) on peut dire qu'il s'agit d'une molécule jouant un rôle majeur dans la signalisation.

PIP3 agit comme un second messenger : il est activateur des PKB (ou AKT), sérine-thréonine-kinases cytoplasmiques qui phosphorylent des effecteurs qui sont alors activés ou désactivés (PKB a donc une action similaire à celle de PKA ou de PKC)

La voie de la PI3K est importante pour la transmission du signal par le récepteur à l'insuline.

7. Bilan sur les récepteurs à activité tyrosine-kinase (2-24,25)

Ce sont des récepteurs essentiels pour la signalisation des facteurs de croissance.

La fixation du ligand entraîne la dimérisation des récepteurs et leur phosphorylation croisée, qui a deux conséquences majeures :

- ouverture du site actif (activation enzymatique rendant possible la phosphorylation d'autres cibles)
- création de sites d'ancrage pour des protéines qui viennent se fixer sur la partie intracytoplasmique du récepteur *via* un domaine SH2

A partir de là plusieurs voies peuvent être activées pour relayer le signal :

- la voie Ras, qui intervient en particulier sur l'expression des gènes *via* la cascade des MAP-kinases
- la voie de la PI3K qui active PKB *via* la génération d'IP3
- l'activation de phospholipases C, différentes de celles activées par les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G mais ayant la même activité de production des seconds messagers DAG et IP3, ce qui conduit à l'activation des PKC (Protéines Kinases C) et CaM-K (kinases dépendantes de la calmoduline)

L'ensemble de ces voies de signalisations réalisent les effets de la fixation des facteurs de croissance sur leurs récepteurs en jouant sur l'activité des protéines et l'expression des gènes.

Comparaison des différents types de récepteurs présents sur les membranes cellulaires : récepteurs à sept domaines transmembranaires (7TM), récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK) et canaux ioniques :

Type de récepteur	Récepteurs à sept domaines transmembranaires		Récepteurs tyrosine-kinase		Canaux ioniques
Variété	Les plus nombreux : plus de 1000 connus				
Ligands	Très variés, de nombreux types moléculaires => Récepteurs peu spécialisés		Facteurs de croissance Cytokines, Hormones => Relativement spécialisés		Neuromédiateurs => Les plus spécialisés
Initiation du signal	Modification de la structure tertiaire (tridimensionnelle) du récepteur		Modification de la structure quaternaire du récepteur par dimérisation		Ouverture d'un canal ionique
	Activation des protéines G couplées aux récepteurs		Interactions protéine-protéine médiées par des adaptateurs		
Effecteurs	Adénylate cyclase (AC)	Phospholipase C (PLC)	Grb Sos Ras	PI3K	Les canaux ioniques sont récepteurs et effecteurs
Seconds messagers	AMPc	DAG IP3... ...Ca ²⁺		PIP3	Diffusion d'ions ayant une action sur des compartiments éloigné de la cellule
Ser/Thr-kinase	PKA	PKC	CaM-K	MAP-kinases	PKB
Effet	Effet sur les protéines et l'expression des gènes				

Nota la voie Ras peut également être activée par une voie suivant l'activation d'un récepteur à sept domaines transmembranaires.

Localisation cellulaire de la signalisation et *Cross-talk* (diaporama 3)

Dans la mesure où les récepteurs des signaux extracellulaires sont le plus souvent membranaires, on a longtemps considéré que la signalisation était cantonnée à la membrane interne de la cellule.

Néanmoins le développement des techniques d'études, qui a en particulier permis des analyses spatiales sur des cellules vivantes, a permis de montrer que certains composants des voies de signalisation présentaient une localisation éloignée de la membrane : RE, Golgi etc.

Ceci a particulièrement été mis en évidence pour la voie des MAP-kinases en aval de Ras.

Il semble donc que les processus de signalisation ne sont pas restreint à la membrane comme on le pensait communément.

Cette partie du cours s'intéresse au problème suivant : différentes hormones ou facteurs de croissance peuvent, au sein d'une même cellule, provoquer des réponses cellulaires distinctes en faisant appel au(x) même(s) second(s) messenger(s).

Il doit donc exister des mécanismes intracellulaires permettant de distinguer deux signaux faisant au même moment appel au même second messenger (par exemple deux signaux à AMPc)

Cela amène à formuler l'idée d'une compartimentation cellulaire de la signalisation.

I. Localisation cellulaire de la signalisation : exemple de la voie Ras/MAP-kinases

1. Métabolisme de Ras (3-1)

Ras est une protéine synthétisée sous forme hydrophile et sans signal d'adressage à la membrane, mais qui est pourtant localisée au niveau de la membrane cytoplasmique interne, localisation qui a longtemps été considérée comme indispensable à son action.

Ras néo-synthétisée possède un motif CAAX reconnue par des farnesyl-transférases. Ces enzymes créent un domaine hydrophobe à une extrémité de Ras, grâce auquel cette protéine est dirigée vers le reticulum endoplasmique (RE) Il s'agit d'une première modification post-traductionnelle de Ras.

Au niveau du RE les différentes Ras subissent d'autres modifications post-traductionnelles à la suite desquelles, après leur sortie du RE :

- K-Ras est directement adressée à la membrane cytoplasmique.
- N-Ras et H-Ras sont amenés à l'appareil de Golgi où ils sont à nouveau modifiés par l'ajout de deux résidus d'acide palmitiques, qui leur permettent à de se fixer à leur tour à la membrane cellulaire.

En cas de dépalmylation de N-Ras ou H-Ras ces protéines peuvent retourner vers le Golgi.

Ras peut donc être retrouvé à différents endroits de la cellule. Les protéines Ras sont donc des protéines qui ne sont pas stationnaires mais peuvent voyager d'un compartiment de la cellule à l'autre.

2. Rôle des endosomes dans la localisation des voies de signalisation

Ras peut-il être actif (activé) ailleurs qu'au niveau de la membrane cytoplasmique? Dans ce cas on devrait pouvoir trouver ailleurs ses molécules d'activation.

En effet on trouve des molécules d'échange comme Sos au niveau des endosomes où l'on trouve Ras (par exemple)

Les endosomes sont des dérivés de la membrane plasmique issus de l'endocytose. On a longtemps considéré que l'internalisation des récepteurs était un mécanisme ne servant qu'à les inactiver, et ce quel que soit le type de récepteur.

On suppose maintenant que ces récepteurs peuvent rester actifs dans les endosomes, et ainsi initier des voies de signalisation dans des régions de la cellule éloignées de la membrane plasmique : l'endocytose n'inactive pas *nécessairement* le récepteur.

Cela explique que l'on rencontre des effecteurs (par exemple la PLC) et des facteurs d'échange au niveau des endosomes.

3. Rôle des complexes d'assemblage macromoléculaires (3-2)

Dans la voie des MAP-kinases on rencontre à différents endroits de la cellule des complexes moléculaires de même type que les AKAP, i.e des protéines d'assemblage macromoléculaires pouvant fixer plusieurs éléments de la voie Ras. Il devient ainsi possible de compartimentaliser les MAP-kinases dans la cellule.

Par exemple la protéine de support KSR (*Kinase Suppressor of Ras*) assemble à proximité des récepteurs tyrosine-kinase de la membrane plasmique les molécules Raf-1, MEK1 ou MEK2 et ERK1 ou ERK2, intermédiaires de la voie des MAP-kinases qui sont ainsi localisés à proximité les uns des autres.

Autre exemple : la molécule MP1 joue le même rôle que KSR mais au niveau des endosomes, en ne rassemblant que MEK1 et ERK1. La différence des molécules présente permet de supposer que le signal sera différent du signal ayant pour origine la membrane plasmique.

Troisième exemple : la β -arrestine, capable de se fixer sur les sites phosphorylés des récepteurs à sept domaines transmembranaires en participant à leur inactivation par internalisation (voir 2-3), est également capable de recruter des molécules de la voie Ras (Raf-1, MEK1 et ERK2) : les récepteurs à sept domaines transmembranaires peuvent donc activer la voie Ras au niveau des endosomes grâce au complexe macromoléculaire ainsi formé.

Dernier exemple : la molécule SEF, capable de fixer MEK1 ou MEK2 et ERK1 ou ERK2 au niveau de l'appareil de Golgi.

4. Bilan sur la compartimentation de la signalisation

Grâce :

- à l'internalisation des récepteurs
 - aux assemblages macromoléculaires fixant dans l'espace différents processus métaboliques
- on peut avoir des effets différents des voies de signalisation à des sites différents de la membrane. Il y a une séparation des voies de signalisation spécifiques.

Chaque compartiment de signalisation recrute des molécules différentes en aval : l'action résultant de l'activation d'une voie de signalisation peut ainsi être différente à différents endroits de la cellule.

En pathologie les mutations respectives de K-Ras, N-Ras et H-Ras ont des effets différents, et on peut voir dans la compartimentation différente de ces molécules une explication à la différence de leurs activités.

II. Liens entre les différentes voies de signalisation – *Cross-talk* (3-3)

Il existe un petit nombre de circuits de signalisation utilisés de façon récurrentes, et qui contrôlent donc de très nombreux processus biologiques. Leur composants sont donc fréquemment partagés entre différentes voies de signalisation. Cela a deux conséquences :

- l'existence de liens ou de dialogues entre plusieurs voies de signalisation : c'est le phénomène de *cross-talk*
- le risque d'interférences (l'activation d'un circuit menant à l'activation des effecteurs d'un autre circuit)

L'isolement spatial des voies de signalisation grâce à des complexes macromoléculaires permet d'éviter ces possibles interférences négatives en permettant à des signaux pouvant avoir des molécules en commun d'exister indépendamment les uns des autres.

Il existe également des interactions positives qui permettent à la cellule d'intégrer les différents messages qu'elle reçoit pour pouvoir produire une réponse unifiée, unique et appropriée à l'ensemble des messages et des besoins de l'organisme.

On distingue deux types d'interférences positives des voies de signalisation dans la cellule : la convergence (de deux voies de signalisation vers un même effet) et la régulation (d'une voie par une autre)

Quand deux voies convergent vers un même effet il existe deux situations :

- les effets de ces deux voies sont additifs (l'effet nécessite l'activation de la voie A *ou* de la voie B, l'activation simultanée des deux mène à un effet plus important)
ex une voie activant l'adénylate cyclase et une voie inhibant la phosphodiesterase ont un but commun qui est l'augmentation de la concentration en AMPc dans la cellule
- il y a nécessité de l'intégration des signaux transmis par les deux voies (l'effet nécessite l'activation simultanée de la voie A *et* de la voie B)
ex deux voies activant chacune une kinase phosphorylant un site particulier d'un effecteur, qui nécessite ces deux phosphorylations pour être activé
ex une enzyme régulée par une voie, la présence de son substrat dépendant d'une autre voie

La cellule peut ainsi répondre de façon concertée à partir de deux signalisations distinctes.

Une voie de signalisation peut en réguler une autre.

ex une voie produisant un second messager nécessaire à une autre voie

Pathologies touchant les circuits de signalisation : exemples (diaporama 4)

Les circuits de signalisation sont la jonction entre l'environnement et des machineries cellulaires puissantes. Les récepteurs et les molécules qui relaient leurs effets à l'intérieur de la cellule doivent donc être coordonnés et régulés avec précision, car ils déterminent le devenir de la cellule.

Les aberrations de signalisation font donc prendre à la cellule des orientations inadaptées à son environnement, et ont donc des conséquences pathologiques potentiellement graves.

De plus de nombreux micro-organismes se sont adaptés à l'utilisation des circuits de signalisation pour leurs processus pathogènes.

I. Mutations de gènes de la voie Ras

1. Mutations de Ras impliquées dans les cancers (4-2)

Des mutations ponctuelles des gènes Ras sont associées à certains cancers.

Ras étant un intermédiaire de la signalisation de la prolifération cellulaire liée aux facteurs de croissance, une activation excessive des processus médiés par Ras peut favoriser un cancer.

On observe donc dans le développement de tumeurs des mutations activatrices de Ras : Ras est un des oncogènes les plus fréquemment impliqués dans les cancers.

Ces mutations touchent fréquemment l'activité phosphatase intrinsèque de Ras ou bien le site d'interaction avec les protéines GAP, qui activent cette activité. De telles mutations font que Ras est activé normalement mais ne peut être désactivé par l'hydrolyse $GTP \rightarrow GDP$; elles entraînent donc une prolongation anormale de la signalisation de Ras.

Un circuit normalement fugace devient donc activé de façon importante dans la cellule.

Des mutations des différentes Ras (K, N, H) sont associées à différents cancers. La plus fréquemment mutée des trois est K-Ras, la moins fréquemment mutée est H-Ras.

Type de cancer	Proportion de ces cancers présentant une mutation de Ras	Ras mutée(s)
Adénocarcinome du poumon	33 %	K
Adénocarcinome du côlon	44 %	K
Adénome du côlon	13 à 50 %	
Adénocarcinomes du pancréas	85 %	K
Carcinome de la thyroïde	55 %	K, N, H
Leucémie aigüe lymphoblastique	15 %	K, N (le plus souvent)

2. Mutations d'autres éléments des voies de signalisation liées aux récepteurs tyrosine-kinase (4-3)

D'autres éléments des voies de signalisation liées aux récepteurs tyrosine-kinase peuvent être mutés dans les cancers :

– les récepteurs : ils peuvent voir leur partie intra-cytoplasmique mutée et subir alors une activation constitutive (leur dimérisation et leur autophosphorylation ne dépend plus de la fixation du ligand mais est permanente) La cellule devient alors séparée de son environnement.

ex le récepteur à l'EGF (EGFR) est souvent muté dans divers types de cancers ; en particulier les EGFR ErbB1 et ErbB2 sont mutés dans les tumeurs solides

– les intermédiaires de la voie des MAP-kinases

ex Raf est souvent mutée dans les cancers ; en particulier b-Raf est muté dans une grande partie des mélanomes

On n'a pas encore décrit de mutation des adaptateurs et des facteurs d'échange dans les cancers.

3. Activations indirectes de la voie Ras impliquées dans les cancers

Dans certains cancers les voies de signalisation liées aux facteurs de croissances sont activées de façon indirecte en raison de mutations d'autres éléments convergeant sur l'activation de ces voies.

4. Traitements des cancers liés aux mutations de la voie Ras (4-4)

La connaissance des mutations de (et autour de) la voie Ras impliquées dans les cancers permet de soigner ces cancers par des traitements spécifiques (contrairement aux radiothérapies ou chimiothérapies, traitements non-spécifiques qui présentent un grand nombre d'effets secondaires)

Ces traitements ciblent l'anomalie afin de restaurer la (ou les) voie(s) de signalisation pathologique(s) grâce à des molécules capables d'inhiber spécifiquement les molécules impliquées dans le développement de la maladie, par exemple des inhibiteurs de MEK, de Raf etc.

Ces inhibiteurs peuvent jouer sur les activités kinase des molécules cibles ou bien sur leur localisation cellulaire (ex les inhibiteurs de farnésyl-transférases jouent sur les modifications post-traductionnelles de Ras permettant sa localisation à la membrane, et donc son fonctionnement)

Enfin l'herceptine est un inhibiteur des récepteurs à l'EGF qui empêche leur signalisation.

5. Implication de Ras et des autres molécules de la voie Ras dans d'autres pathologies (4-5)

Depuis quelques années on commence à distinguer une application de mutations de molécules de la voie Ras dans des maladies du développement, en particulier le syndrome de Noonan et la neurofibromatose

La neurofibromatose prédispose au cancer par l'inactivation de la neurofibromine (protéine GAP inactivant Ras)

Certains enfants naissent avec un seul allèle codant la neurofibromine, cette protéine a donc une activité réduite et ces enfants développent une neurofibromatose. La perte du second allèle dans certaines cellules permet le développement d'un cancer.

Une activation constitutionnelle (germinale, i.e dans toutes les cellules de l'organisme) de la voie Ras est à l'origine du syndrome de Noonan. Elle passe par des mutations activatrices de SHP2, de Sos-1 ou de K-Ras.

Le syndrome de Noonan est une maladie du développement touchant une naissance sur 2000, ce qui est important pour un syndrome génétique. Les enfants atteints par ce syndrome présentent une petite taille, des cardiopathies, dans certains cas un retard mental ainsi que divers autres signes.

Ces maladies permettent de mettre en lumière le lien entre cancer et développement : on sait que des gènes impliqués dans les cancers sont souvent impliqués dans des maladies génétiques.

Des mutations de H-Ras sont à l'origine du syndrome de Costello. On remarque là que des mutations de H-Ras sont à l'origine de maladies différentes de celles provoquées par des mutations de K-Ras.

Le syndrome CFC (syndrome cardio-facio-cutané) est provoqué par des mutations de K-Ras, BRAF, MEK1 ou MEK2.

II. Pathologies touchant le métabolisme des phosphoinositides

1. Implication dans les cancers et les maladies génétiques (4-6)

De nombreuses molécules du métabolisme des phosphoinositides sont impliquées dans les cancers ou les maladies génétiques.

2. Lien entre le métabolisme des phosphoinositides et les caractères pathogènes de certaines bactéries : exemple de la listériose (4-7)

La bactérie *Listeria monocytogenes* contamine les aliments mal conservés. La listériose est surtout diagnostiquée dans les pays industrialisés et touche en particulier les personnes présentant une immunodépression : nouveaux-nés et femmes enceintes (il y a alors risque d'avortement spontané). Une infection par cette bactérie se traduit par des signes relativement non-spécifiques et une infection du SNC avec des signes de méningite.

Listeria monocytogenes utilise une voie de signalisation de la cellule qu'elle active en se fixant à un récepteur tyrosine-kinase, ce qui entraîne l'activation de la PI3K. L'activation des cibles de la PI3K provoque entre autres des modifications du cytosquelette qui permettent l'internalisation de la bactérie, qui a un effet intracellulaire.

De façon générale on observe des liens entre les susceptibilités à certains pathogènes et les caractéristiques individuelles des voies de signalisation.

III. Le choléra (4-8)

Le choléra est une maladie essentiellement caractérisée par une diarrhée violente et aigüe qui entraîne un choc hypovolémique, une acidose, des vomissements etc. et peut provoquer le décès. Les diarrhées font que les patients peuvent éliminer jusqu'à deux fois leur poids de liquide en quatre à six jours.

L'agent pathogène, le vibron cholérique, est absorbé par voie orale. Il colonise le côlon, provoquant les diarrhées et les défécations, ce qui transmet la maladie.

Le vibron cholérique est actif de façon pathogène par la toxine cholérique. Cette toxine est composée de deux sous-unités :

- une sous-unité B qui se fixe aux gangliosides de l'épithélium intestinal (colonisation de l'intestin)
- une sous-unité A qui catalyse une modification covalente d'une protéine Gas, qui fixe alors un ADP-ribose sur une arginine. Cette modification fixe Gas dans une conformation active avec fixation du GTP : il y a donc une activation importante de l'adénylate cyclase par Gas entraînant une surproduction locale d'AMPc au niveau intestinal, ce qui entraîne des perturbations au niveau de canaux ioniques, en particulier d'un canal chlore, d'où une perte excessive de NaCl entraînant la perte d'eau.

Dans le cas du choléra, le point d'impact direct de l'agent pathogène est donc une voie de signalisation.

IV. La lèpre (4-9)

La lèpre est une maladie infectieuse relativement localisée dans des pays à l'hygiène encore peu développée. Elle est endémique dans certains pays d'Asie ou d'Afrique.

Cette maladie touche les nerfs périphériques, la peau et les muqueuses et provoque des infirmités sévères.

L'agent pathogène de la lèpre, *Mycobacterium leprae*, a une affinité pour les cellules nerveuses, en particulier pour les cellules de Schwann (cellules gliales du système nerveux périphérique). Il se fixe sur les récepteurs ErbB2 et active de façon inappropriée dans les cellules de Schwann la signalisation de ces récepteurs, ce qui entraîne la démyélinisation des fibres nerveuses périphériques suite à la phosphorylation de ERK1/2.

Erb-B2 est un récepteur très souvent activé dans les cancers du sein. Ainsi, le cancer du sein étant très fréquent dans le monde occidental, on connaît des inhibiteurs de ErbB2, dont l'herceptine (anticorps monoclonal appelé trastuzumab, développé sous le nom "Herceptin")
Il a été montré que l'herceptine pourrait être un médicament efficace contre le cancer.