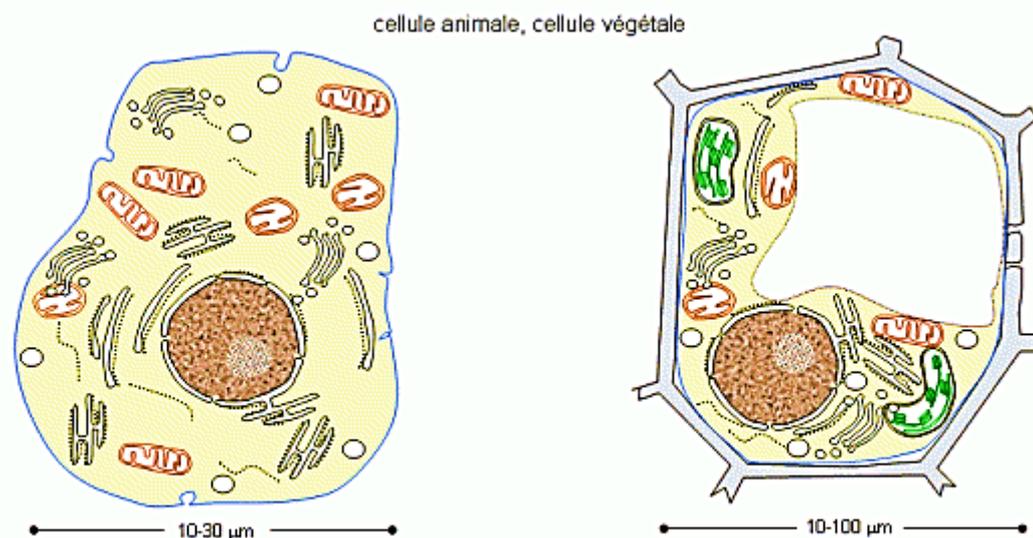


Biochimie cellulaire et fonctionnelle

1. Compartiment fonctionnel de la cellule (vue d'ensemble)

La cellule est un compartiment qui isole un ensemble de macromolécules du reste de l'univers. La compartimentation permet l'existence de zones de composition privilégiée dans un volume restreint. Cette disposition présente un avantage thermodynamique certain : elle augmente la probabilité de rencontre de molécules, par conséquent la probabilité de réalisation de réactions chimiques. On définit ainsi un compartiment cellulaire est un compartiment séparé par une limite matérialisée par une membrane (la membrane plasmique).

La cellule Eucaryote quant à elle, se subdivise en plusieurs compartiments (mitochondrie, appareil de Golgi, lysosomes et etc.), chacun d'eux assure une fonction primordiale pour la survie de la cellule, ainsi : pour la mitochondrie est notamment l'oxydation phosphorylante à fin de fournir de l'ATP, l'appareil de Golgi, régule le transport vésiculaire et se charge de modifier les protéines par glycosylation, sulfatation..., et surtout un rôle de stockage de l'eau et de molécules tel que certains pigments, molécules de défense, stockage transitoire des glucides, protéines et lipides et maintien de l'équilibre hydrique qui sont tous assurés par la vacuole (cellules végétales et fongiques).



mitochondrie, paroi, membrane plasmique, dictyosome (A. Golgi), lysosome, peroxysome, vacuole, tonoplaste, noyau, enveloppe nucléaire, nucléole, réticulum endoplasmique, ribosome, cytoplasme (cytosol), pore nucléaire, plasmodesme

Compartiments fonctionnels de la (eucaryote), cas des cellules : animale et végétale

2. Biomembrane

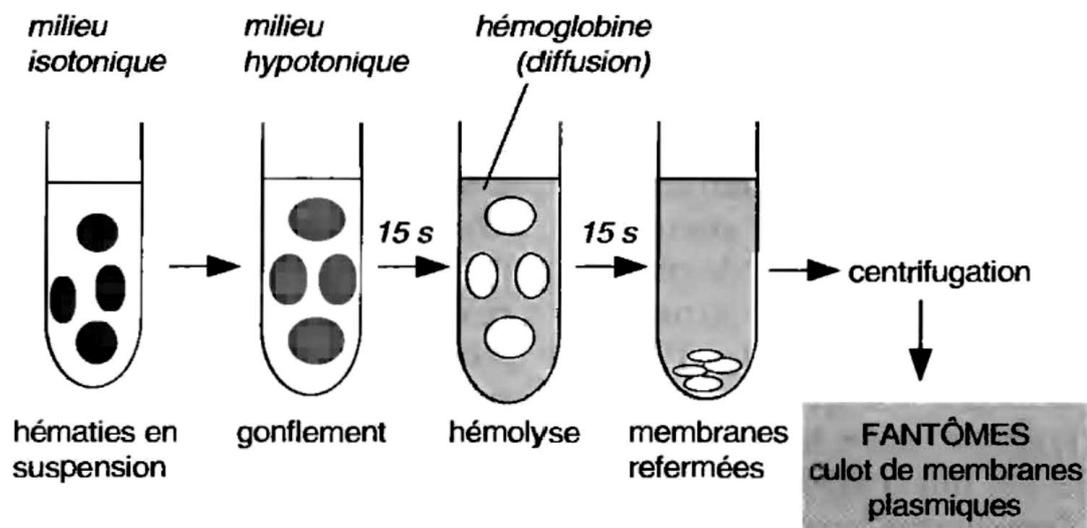
2.1. Composition des membranes (isolement et composition)

Une caractéristique de toutes les cellules est la présence de membranes qui délimitent la cellule et éventuellement les compartiments cellulaires qu'elle contient (dans le cas des Eucaryotes). Les membranes biologiques, on les verra, ont de multiples fonctions : définir, compartimenter et maintenir l'intégrité de la cellule, contrôler les mouvements - entrée et sortie - de substances dans la cellule et ses compartiments, détecter et reconnaître les signaux extérieurs, servir de lieu pour des fonctions spécifiques ...

Dans ce qui suit, on parlera plutôt de la membrane plasmique (ou plasmalemmes, du grec *plasma*, chose façonnée, et *lemma*, coque), c'est-à-dire la membrane qui constitue autour de la cellule une enveloppe, mince et continue, séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire, la plupart des concepts abordés s'appliquent également aux membranes internes.

A. Isolement des membranes

Il est relativement difficile d'obtenir une fraction de la membrane plasmique dépourvue d'autres contaminants membranaires. Nous ne rentrerons pas ici dans le détail des techniques d'isolement et de purification qui sont souvent complexes. En revanche nous décrirons les étapes d'isolement de membrane plasmique d'hématies qui constituent un matériel particulièrement favorable. Les hématies, ou globules rouges, de mammifères sont en effet des cellules anucléées et dépourvues de membranes internes lorsqu'elles ont atteint l'état mature. À partir d'une grande quantité de globules rouges il est donc possible de récupérer une fraction de membrane plasmique pratiquement pure.



Isolement de la membrane plasmique à partir des hématies

Les hématies sont dans un premier temps séparées du sérum par centrifugation de façon à éviter une contamination par les protéines de ce sérum. Elles sont recueillies dans un milieu physiologique le plus isotonique possible par rapport au sérum (on utilise généralement du NaCl à 0,9 %).

Les hématies sont ensuite traitées par un choc osmotique (transfert dans un milieu plus dilué, c'est-à-dire hypotonique) qui a pour effet de faire gonfler les cellules et de provoquer une hémolyse, c'est-à-dire une diffusion du contenu cellulaire et en particulier de l'hémoglobine hors des cellules. Après hémolyse les membranes se referment et sont récupérées par centrifugation. On recueille alors des fractions très enrichies en membranes plasmiques, sortes de cellules dépourvues de tout contenu : ce sont de véritables fantômes cellulaires.

B. Composition chimique

La membrane plasmique du globule rouge est un agrégat lipo-protéique qui comprend en moyenne 40 % de lipides et 60 % de protéines, dont beaucoup sont des glycoprotéines et des glycolipides.

Les lipides constituent l'élément architectural de la membrane, sa matrice. Il est aisé de s'en apercevoir en faisant agir sur la membrane, soit des détergents, soit des enzymes de type lipase : dans les deux cas la membrane s'effondre totalement.

Les lipides rencontrés dans la membrane sont principalement :

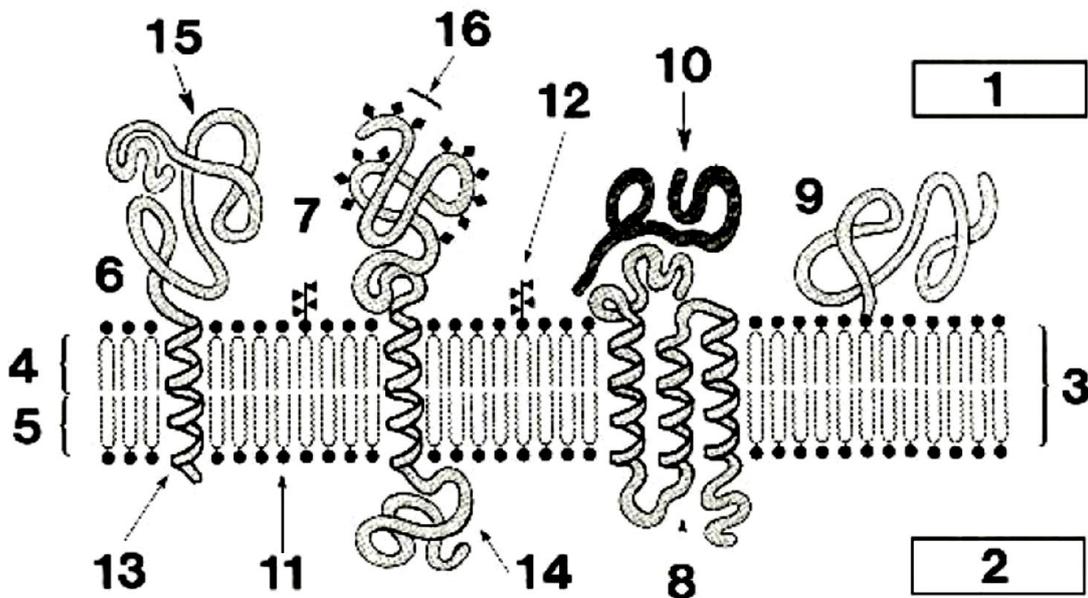
- des phospholipides, les plus nombreux. Ils comportent une tête phosphorylée hydrophile et une queue formée de deux chaînes aliphatiques d'acides gras saturés ou non : ce sont donc des molécules amphiphiles ou amphipathiques.
- du cholestérol, un lipide de type stéroïde, dont la quantité a une influence sur la rigidité des membranes et leur stabilité mécanique ; en comparaison avec les autres membranes biologiques le cholestérol est particulièrement abondant dans la membrane plasmique (30 à 50 % des lipides) mais est absent chez la plupart des Procaryotes ;
- des glycolipides, lipides dont l'antenne oligosaccharidique est orientée vers le milieu extracellulaire.

Les protéines de la membrane plasmique sont nombreuses et très diversifiées. Donc beaucoup plus difficiles à isoler et à caractériser que les lipides. Une des caractéristiques des protéines liées à la membrane plasmique est de posséder un ou plusieurs domaines hydrophobes qui seront en contact avec les lipides, et un ou plusieurs domaines hydrophiles qui seront en contact avec les régions riches en eau de l'environnement cellulaire (cytosol et milieu extracellulaire). Les protéines de la membrane sont des protéines amphiphiles.

En plus d'un rôle structural, ces protéines ont des fonctions extrêmement variées : elles peuvent être des enzymes, des transporteurs (pour les ions par exemple), des perméases, des récepteurs pour les hormones, des antigènes (histocompatibilité, groupes sanguins ...).

2.2. Architecture biomoléculaire des membranes

Elles sont toutes organisées selon le modèle d'une « bicouche lipidique fluide » dans laquelle sont enchâssées plus ou moins profondément les protéines membranaires. On en distingue deux types, celles dites **intrinsèques** (intégrales), et celles dites **extrinsèques** (périphériques). Les premières sont solidement associées à la bicouche, qu'elles peuvent traverser de part en part (elles possèdent alors un ou plusieurs domaines hydrophobes), ou dans laquelle elles sont ancrées par des chaînes de lipides ou d'acides gras. Les secondes sont hydrophiles et liées aux premières par des liaisons faibles de surface. Tout comme les lipides, les protéines peuvent se déplacer par **diffusion latérale**, au sein des membranes, mais sont incapables de basculer d'un feuillet à l'autre.



Organisation générale d'une membrane plasmique

- | | |
|--|---|
| 1. extérieur de la cellule | 9. Protéine extrinsèque à ancre lipidique |
| 2. intérieur de la cellule | 10. Protéine extrinsèque externe |
| 3. bicouche lipidique | 11. Phospholipide |
| 4. feuillet lipidique externe | 12. Glycolipide |
| 5. feuillet lipidique interne | 13. Hélice alpha hydrophobe |
| 6. protéine intrinsèque (à un passage) | 14. Domaine globulaire intracellulaire |
| 7. glycoprotéine intrinsèque | 15. Domaine globulaire extracellulaire |
| 8. protéine intrinsèque (à trois passages) | 16. Motifs glycosidiques |

2.3. Echange membranaires

La membrane plasmique sépare l'intérieur de la cellule de l'environnement extracellulaire et, dans les cellules eucaryotes, des membranes supplémentaires séparent les

compartiments spécialisés du cytosol. Les compartiments cellulaires diffèrent nettement dans la composition de leurs membranes et de leurs milieux internes. Tout au long de l'évolution, les cellules ont développé des mécanismes sophistiqués pour maintenir et réguler avec précision la composition de chaque compartiment. Le maintien des concentrations de solutés à travers les membranes est une condition préalable à l'homéostasie cellulaire, à savoir la capacité des cellules à maintenir un environnement interne relativement constant pour les processus métaboliques essentiels à la survie. La régulation homéostatique des concentrations en ions cytosoliques détermine également les pressions osmotiques relatives de chaque côté de la membrane cellulaire et régule ainsi le volume cellulaire. En outre, des changements rapides mais transitoires du taux de transport ionique à travers la membrane cellulaire peuvent être utilisés pour adapter la cellule à des situations métaboliques altérées, pour traiter des informations (telles que des signaux de stress) et pour transporter des nutriments dans la cellule.

La membrane plasmique marque la frontière entre le hyaloplasme cellulaire et le milieu extérieur. Pour vivre, la cellule a besoin de prélever des aliments dans le milieu extérieur et d'y rejeter des déchets. Ces substances, pour être échangées entre le hyaloplasme et le milieu extracellulaire, doivent traverser la membrane plasmique. On appelle « perméabilité de la membrane plasmique », la propriété qu'elle possède de laisser passer des substances du milieu extracellulaire vers le hyaloplasme ou inversement. Nous verrons donc, ici quels sont les facteurs et les mécanismes qui interviennent dans ce phénomène.

2.3.1. Transport passif

C'est le transport qui s'effectue dans le sens normal des forces de diffusion, c'est-à-dire dans le sens du gradient de concentration. On peut distinguer trois modalités de transport passif.

➤ **Le transport par simple diffusion physique**

C'est le cas le plus simple. Il concerne les substances liposolubles et peut-être en partie l'eau.

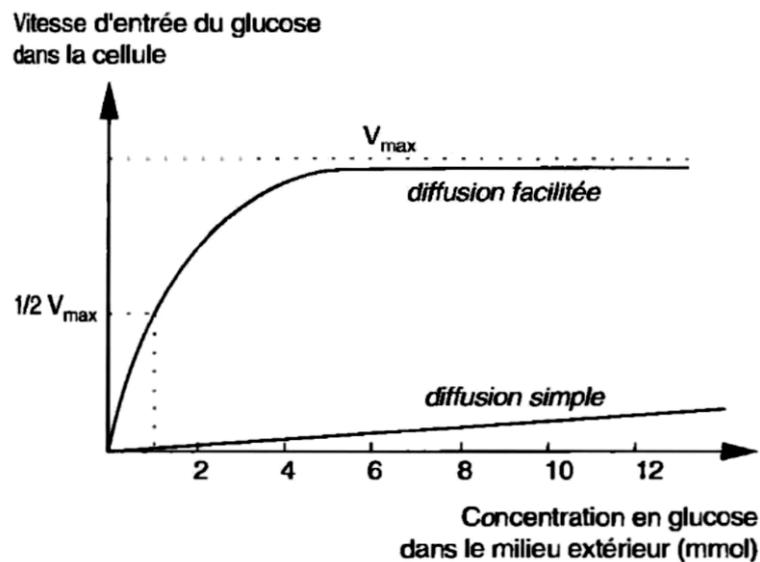
➤ **Le transport par diffusion accélérée**

Ce transport fait intervenir des protéines spécifiques intégrées dans la membrane. Elles forment souvent un conduit continu à travers cette membrane. Lorsque ce conduit transmembranaire permet le passage d'ions on parle de canal ionique. C'est aussi le mode de transport de petites molécules polaires.

➤ **Le transport par diffusion facilitée**

C'est l'exemple du transport de nombreux oses et acides aminés. Il fait intervenir des « protéines porteuses transmembranaires ». Le passage du glucose à travers la membrane plasmique en est un exemple type.

Le glucose est une substance peu liposoluble qui pénètre assez vite dans la cellule. On peut mesurer la vitesse de transport intracellulaire du glucose en fonction de sa concentration dans le milieu extérieur et la comparer à la vitesse théorique de transport si celui-ci était soumis aux lois de la diffusion simple. On obtient une courbe indiquant une vitesse maximum et traduisant un comportement tout à fait identique à celui déjà analysé pour les réactions enzymatiques. Il semble donc qu'il y a des protéines porteuses, appelées perméases qui accélèrent la vitesse de transport du glucose mais cela jusqu'à un maximum, atteint lorsque toutes les perméases sont sollicitées.



Il apparaît que les perméases pourraient être des protéines transmembranaires susceptibles de changer de conformation de manière réversible. Ainsi dans le modèle « ping-pong » la perméase exposerait son site de liaison d'un côté de la membrane (état ping) et, par un changement conformationnel, l'exposerait ensuite de l'autre côté de la membrane (état pong) favorisant ainsi la translocation de la substance à transporter.

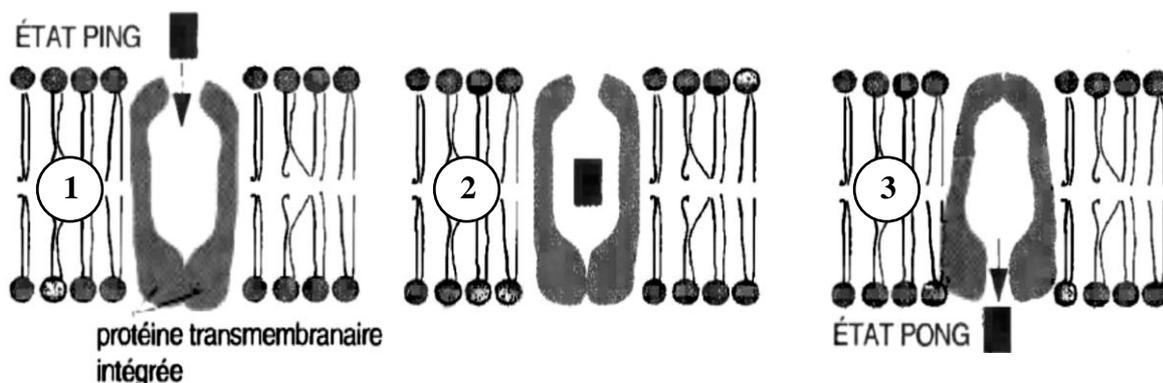
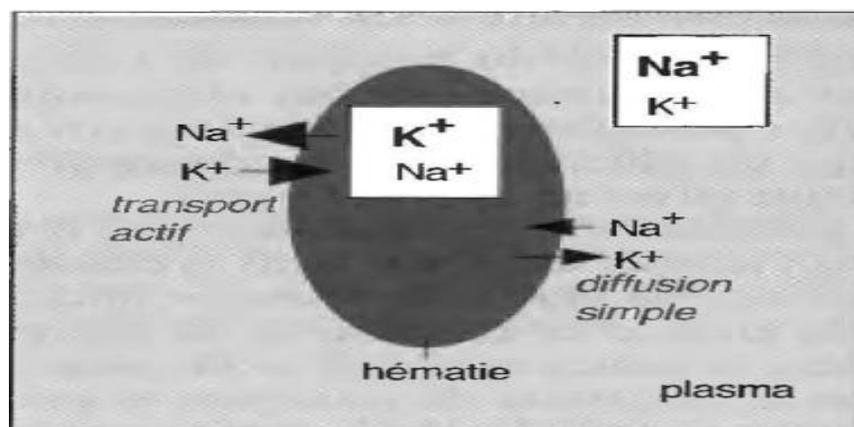


Schéma hypothétique expliquant la diffusion facilitée (exemple du glucose).

Les perméases peuvent aussi transporter simultanément (ou séquentiellement) deux substances différentes. On parle alors de cotransport. Les substances peuvent être cotransportées soit dans la même direction (cotransport unidirectionnel ou symport) soit dans des directions opposées (cotransport bidirectionnel ou antiport).

2.3.2. Transport actif

C'est le transport qui s'effectue à contrecourant des forces normales de diffusion, à l'opposé du gradient de concentration. Ce transport doit être couplé à une source d'énergie métabolique. On parle alors de pompes moléculaires. Un modèle de pompe moléculaire dont le fonctionnement est bien connu est la pompe à sodium/potassium.



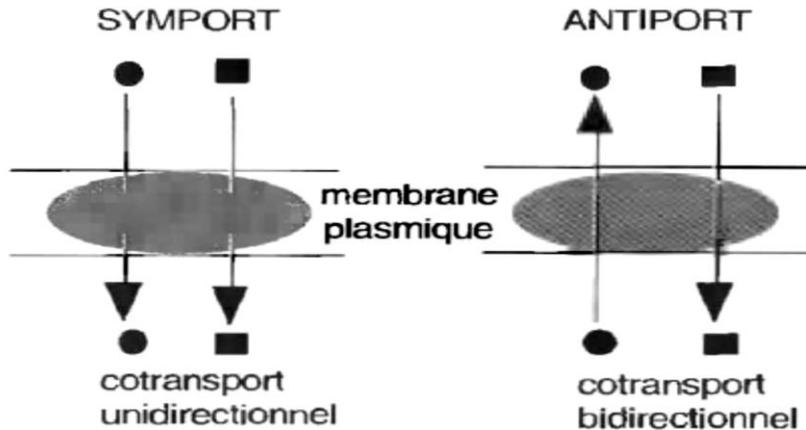
Mouvement du sodium et du potassium dans les hématies.

L'hématie dans son milieu environnant, c'est-à-dire le plasma sanguin. Les cellules sont fortement enrichies en potassium et pauvres en sodium alors que le plasma est fortement enrichi en sodium et pauvre en potassium.

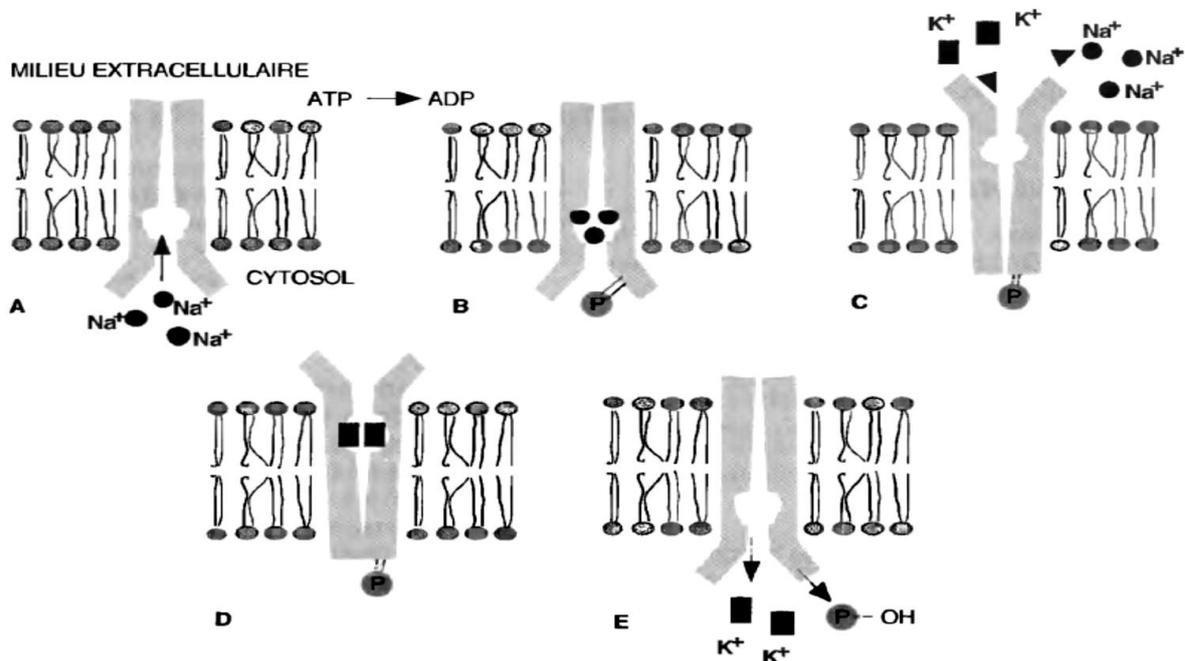
En fait si on marque le sodium par un traceur radioactif on s'aperçoit qu'il entre facilement dans la cellule, c'est-à-dire dans le sens du gradient de concentration, mais aussi qu'il est rejeté activement par la cellule. Il y a donc un transport actif qui contrebalance le transport passif.

La mise en évidence d'une pompe Na⁺/K⁺ a été surtout effectuée à partir d'expériences sur des axones géants des cellules nerveuses de calmars. Il s'agit de prolongements cellulaires très longs (de l'ordre de plusieurs centimètres), de diamètre environ 1 mm, dans lesquels, il est facile d'introduire des substances par micro-injection. Les axones sont vidés de leur contenu ; on injecte de l'ATP et du sodium radioactif ; après ligature des deux extrémités les axones sont placés dans de l'eau de mer, c'est-à-dire un milieu riche en sodium et pauvre en potassium. Au bout de quelque temps sort le sodium radioactif malgré la forte concentration en Na de l'eau de

mer. La même expérience est effectuée mais sans apport d'ATP : on n'observe plus de sortie de sodium. Il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il nécessite de l'énergie. La même expérience est effectuée (en présence d'ATP) mais l'axone est placé dans un milieu totalement dépourvu de potassium : on observe une diminution de la sortie de sodium radioactif. Il s'agit donc d'un cotransport bidirectionnel potassium/sodium.



Co-transport de deux substances : symport et antiport.



La pompe à sodium/potassium. Fonctionnement hypothétique.

- A) Liaison de 3 Na⁺ (pompe à conformation ouverte vers l'intérieur).
- B) Phosphorylation de la protéine par l'ATP.
- C) La phosphorylation a conduit à un changement de conformation qui provoque la translocation des 3 Na⁺ vers l'extérieur.
- D) La nouvelle conformation favorise la fixation de 2 K⁺.
- E) Déphosphorylation de la protéine qui retourne à sa conformation initiale et conduit à la translocation de 2 K⁺ vers l'intérieur de la cellule.

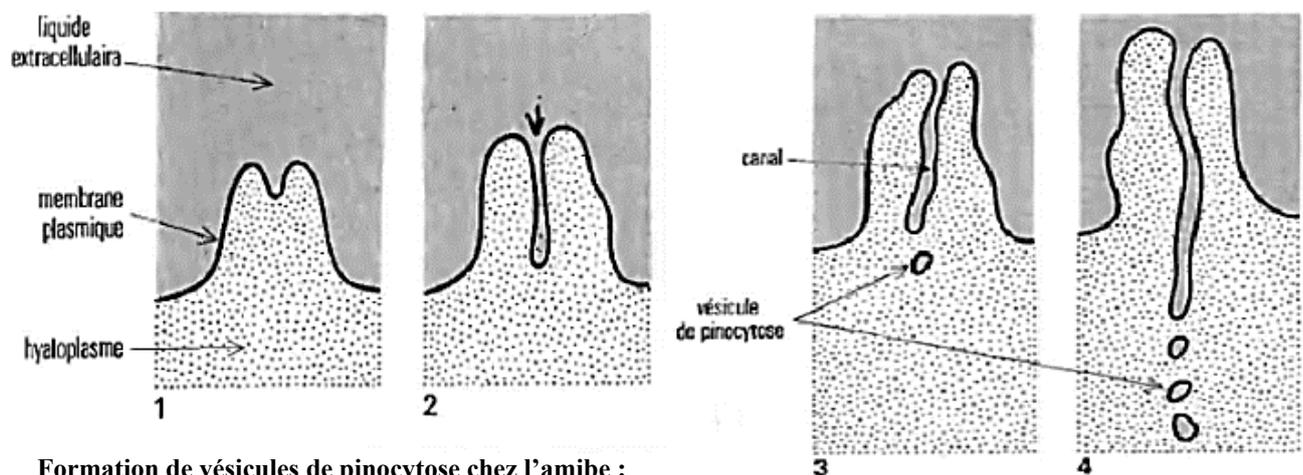
2.3.3. Transport vésiculaire

La membrane plasmique peut s'invaginer en formant une dépression à la surface de la cellule, puis une poche dans laquelle se trouve emprisonné un certain volume du milieu extracellulaire. En se détachant de la surface, cette poche passe dans le hyaloplasme, dont elle reste séparée par la portion de membrane plasmique qui lui a donné naissance.

Cette capture de substances extracellulaires est un phénomène très général auquel on a donné le nom « d'endocytose ».

Selon l'échelle à laquelle se fait l'endocytose, la cellule peut soit prendre des particules solides de grande taille, on parle alors de « phagocytose » (du grec *phagein*, manger), soit prélever des gouttelettes de liquide extracellulaire, on parle dans ce cas de « pinocytose » (du grec *pinein*, boire).

Quelle que soit cette échelle, la cellule englobe toujours une certaine quantité du liquide extracellulaire.



Formation de vésicules de pinocytose chez l'amibe :

La membrane plasmique s'invagine en un canal (1 et 2) qui s'enfonce de plus en plus dans le hyaloplasme (3) et au fond duquel se détachent des vésicules de pinocytose (4).

2.4. Protéines d'adhésion et de reconnaissance cellulaire

Certains organismes, tels que les bactéries, sont unicellulaires ; c'est-à-dire que l'organisme entier est une cellule unique. D'autres, comme les plantes et les animaux, sont multicellulaires et composés de nombreuses cellules. Souvent, ces cellules existent dans des blocs de cellules spécialisés ayant des fonctions similaires, appelées tissus. Nos corps ont environ 60 milliards de cellules, réparties dans différents types de tissus tels que les muscles, les nerfs, la peau, etc. Deux processus permettent aux cellules de s'organiser en groupes :

- Reconnaissance cellulaire, dans laquelle une cellule se lie spécifiquement à une autre cellule d'un certain type ;
- Adhésion cellulaire, dans laquelle la relation entre les deux cellules est "cimentée".

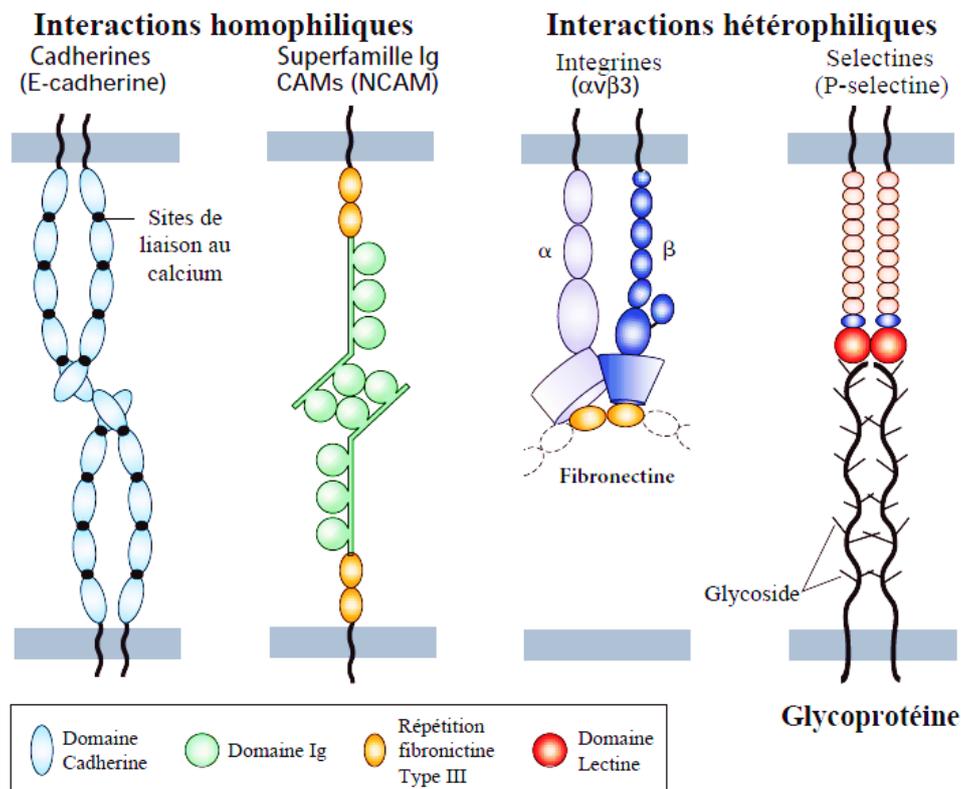
Les membranes plasmiques de toutes les cellules portent des protéines d'adhérence permettant des interactions transitoires ou permanentes avec d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire. Ces interactions constituent des éléments importants de régulation des réponses cellulaires des organismes pluricellulaires en particulier au cours du développement. Ainsi les interactions entre les protéines membranaires Delta et Notch de cellules neurectodermiques voisines chez la drosophile conduisent à l'activation de Notch chez un petit nombre d'entre elles à leur différenciation en cil sensitif tandis que l'ensemble des cellules voisines se différencie en cellules épidermiques. Les cellules ayant commencé leur différenciation en neurone sensitif inhibent cette même différenciation chez leurs voisines. Les interactions à courte distance peuvent néanmoins être indirectes. Ainsi les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes périvitubulaires du testicule produisent différents éléments de la matrice extracellulaire de la membrane basale qui les sépare. Les propriétés biologiques de la cellule de Sertoli sont très sensibles à la composition et à la structure de cette membrane basale. L'action des cellules myoïdes sur les cellules de Sertoli s'exerce donc au travers de leur production de protéines constitutives de la matrice extracellulaire. En outre, de nombreux facteurs de croissance s'associent à la matrice extracellulaire avant de pouvoir exercer leur action. Les interactions entre protéines membranaires des cellules jouent également un rôle considérable dans la fonction immunitaire (BcR, TcR, TLR) et les régulations fines des activités des diverses cellules de ce système. Des points communs existent cependant entre ces protéines membranaires et les récepteurs hormonaux des facteurs de croissance ou des neuromédiateurs.

Il existe deux groupes principaux de molécules d'adhésion cellulaire (Cell-Adhesion Molecules ou CAMs) :

- A) Molécules dépendantes du Ca^{2+} , y compris les cadhérines et les sélectines.
- B) Molécules indépendantes de Ca^{2+} qui composent la superfamille des immunoglobulines et les intégrines.

Comme l'illustrent les structures schématiques de la figure ci-après, de nombreuses CAM sont des mosaïques de plusieurs domaines distincts, dont la plupart se trouvent dans plusieurs types de CAM. On les appelle des « répétitions » quand elles existent plusieurs fois dans la même molécule. Certains de ces domaines confèrent la spécificité de liaison qui caractérise une protéine particulière. Certaines autres protéines membranaires, dont les

structures n'appartiennent à aucune des principales classes de CAMs, participent également à l'adhésion cellule-cellule dans divers tissus.

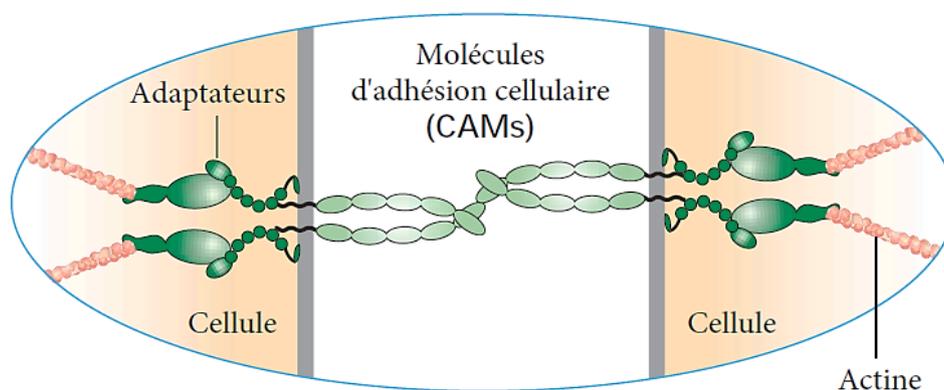


Principales familles de molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) et de récepteurs d'adhésion. Les E-cadhérines dimériques forment le plus souvent des ponts croisés homophiles avec les E-cadhérines sur les cellules adjacentes. Les membres de la superfamille des CAMs des immunoglobulines (Ig) peuvent former à la fois des liaisons homophiles (présentées ici) et des liaisons hétérophiles (non-soi). Les sélectines, présentées sous forme de dimères, contiennent un domaine de lectine se liant aux glucides qui reconnaît des structures sucrées spécialisées sur les glycoprotéines (présentées ici) et des glycolipides sur des cellules adjacentes. Les intégrines hétérodimériques (par exemple, les chaînes α et β) fonctionnent comme des CAMs ou comme récepteurs d'adhésion (présentées ici) qui se lient à de très grandes protéines matricielles multi-adhésives telles que la fibronectine, dont seule une petite partie est représentée ici. Notez que les CAMs forment souvent des oligomères d'ordre supérieur dans le plan de la membrane plasmique. De nombreuses molécules adhésives contiennent plusieurs domaines distincts, dont certains se trouvent dans plusieurs types de CAMs. Les domaines cytoplasmiques de ces protéines sont souvent associés à des protéines adaptatrices qui les relient au cytosquelette ou aux voies de signalisation.

Les CAM interviennent, à travers leurs domaines extracellulaires, dans d'interactions adhésives entre cellules du même type (adhésion homotypique) ou entre cellules de types différents (adhésion hétérotypique). Une CAM sur une cellule peut se lier directement au même type de CAM sur une cellule adjacente (liaison homophile) ou à une classe différente de CAM (liaison hétérophile). Les CAMs peuvent être largement distribuées le long des régions des membranes plasmiques qui sont en contact avec d'autres cellules ou regroupées en zones discrètes ou en taches appelées jonctions cellulaires. Les adhérences cellule-cellule peuvent être serrées et durables ou relativement faibles et transitoires. Les associations entre les cellules

nerveuses de la moelle épinière ou les cellules métaboliques du foie présentent une adhérence étroite. En revanche, les cellules du système immunitaire dans le sang ne peuvent présenter que des interactions faibles et de courte durée, leur permettant de rouler le long de la paroi d'un vaisseau sanguin et de traverser leur chemin pour combattre une infection dans un tissu.

Les domaines confrontés au cytosol des CAMs recrutent des ensembles de protéines adaptatrices multifonctionnelles (voir figure suivante). Ces adaptateurs agissent comme des lieurs qui connectent directement ou indirectement les CAM aux éléments du cytosquelette ; ils peuvent également recruter des molécules intracellulaires qui fonctionnent dans les voies de signalisation pour contrôler l'activité des protéines et l'expression des gènes. Dans certains cas, un agrégat complexe de CAMs, de protéines adaptatrices et d'autres protéines associées est assemblé à la surface interne de la membrane plasmique. Étant donné que les adhérences cellule-cellule sont intrinsèquement associées au cytosquelette et aux voies de signalisation, l'environnement d'une cellule influence sa forme et ses propriétés fonctionnelles (effets extérieurs) ; de même, la forme et la fonction des cellules influencent l'environnement de la cellule (effets « de l'intérieur »). Ainsi, la connectivité et la communication sont des propriétés intimement liées des cellules dans les tissus.

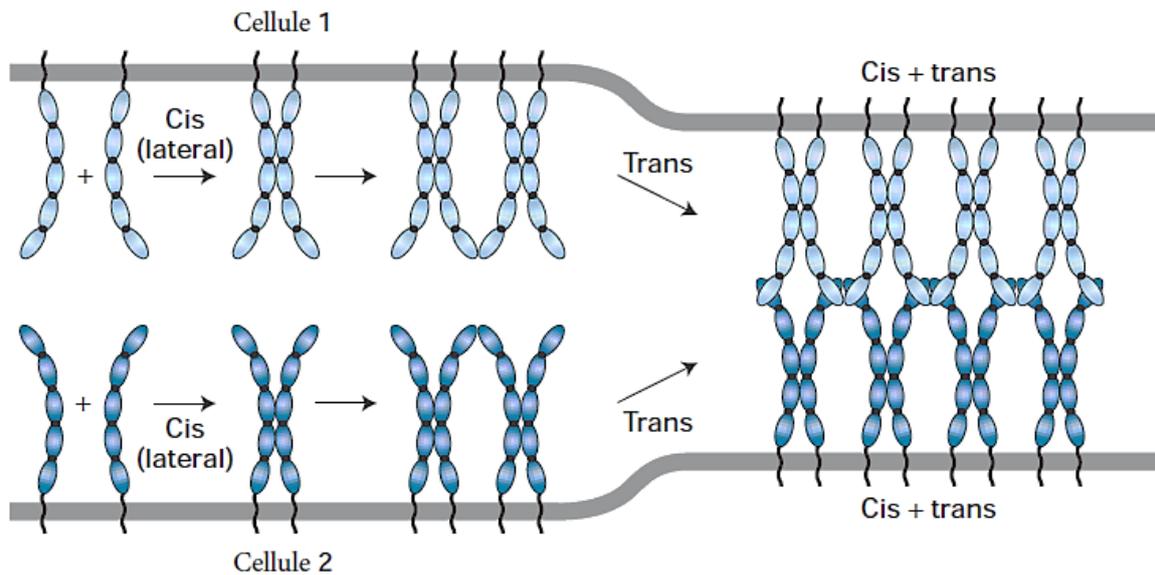


Adhésion cellule-cellule

Les CAMs sont liées avec certains éléments de cytosquelette via des protéines adaptatrices.

La formation de nombreuses adhérences cellule-cellule implique deux types d'interactions moléculaires (figure suivante). Tout d'abord, les CAMs sur une cellule s'associent latéralement à travers leurs domaines extracellulaires ou leurs domaines cytosoliques ou à la fois dans des homodimères ou des oligomères d'ordre supérieur dans le plan de la membrane plasmique de la cellule ; ces interactions sont appelées interactions intracellulaires, latérales ou cis. Deuxièmement, les oligomères CAMs sur une cellule se lient au même CAM ou à des CAMs différents sur une cellule adjacente ; ces interactions sont

appelées interactions intercellulaires ou trans. Les interactions trans induisent parfois des interactions cis supplémentaires et, par conséquent, encore plus d'interactions trans.



Modèle schématique pour la génération d'adhérences cellule-cellule.

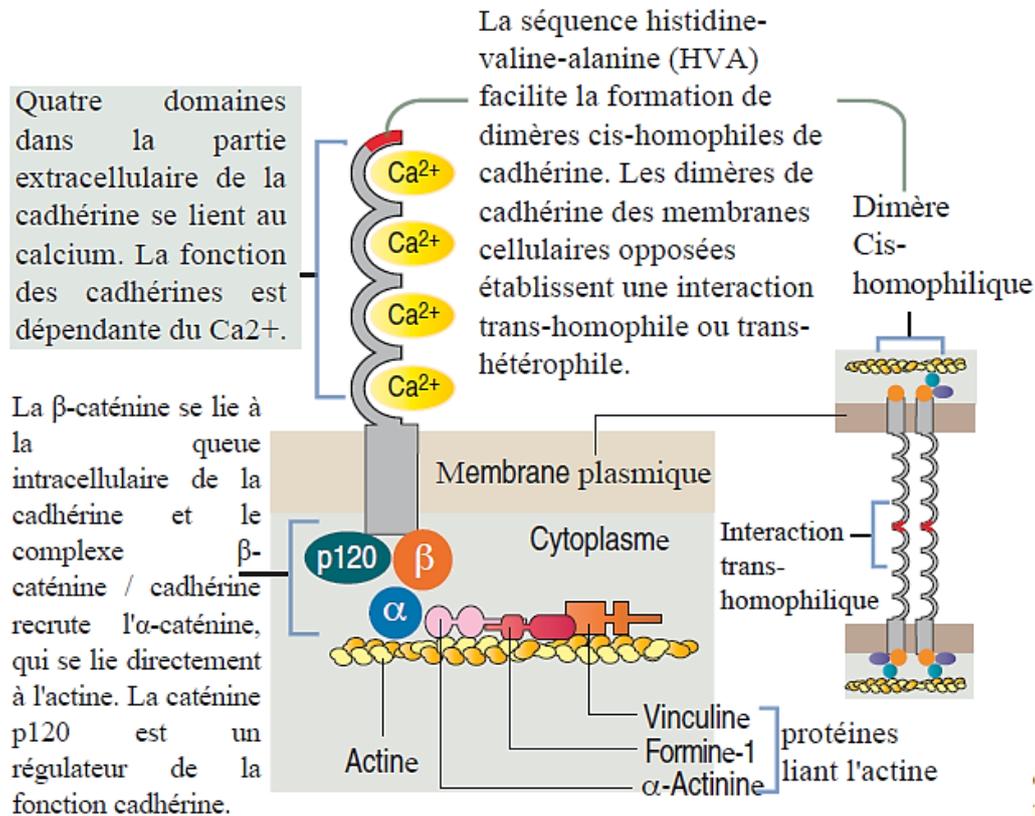
Les interactions latérales entre les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) au sein de la membrane plasmique d'une cellule forment des dimères et des oligomères plus grands. Les parties des molécules qui participent à ces interactions cis varient entre les différentes CAM. Les interactions trans ultérieures entre les domaines distaux des CAM sur des cellules adjacentes génèrent une forte adhésion entre les cellules.

Les interactions adhésives entre les cellules varient considérablement selon les CAMs participantes et les tissus. Une adhérence très serrée peut être générée lorsque de nombreuses interactions faibles sont combinées dans une petite zone bien définie. De plus, l'association de molécules intracellulaires aux domaines cytosoliques des CAMs peut influencer considérablement les interactions intermoléculaires des CAMs en favorisant leur association cis (groupement) ou en modifiant leur conformation. Parmi les nombreuses variables qui déterminent la nature de l'adhésion entre deux cellules figurent l'affinité de liaison des molécules en interaction (propriétés thermodynamiques); les taux d'association et de dissociation globaux «on» et «off» pour chaque molécule en interaction (propriétés cinétiques) ; la distribution spatiale (regroupement, haute ou basse densité) des molécules d'adhésion (propriétés géométriques); les états actifs versus inactifs des CAMs en ce qui concerne l'adhésion (propriétés biochimiques); et des forces externes telles que l'écoulement laminaire et turbulent des cellules dans le système circulatoire (propriétés mécaniques).

2.4.1. Cadhérines

Les cadhérines (figure ci-dessous) sont une famille des protéines transmembranaires dépendantes du Ca^{2+} et impliquées de manière très importante dans les interactions directes entre cellules et la morphogénèse cellulaires.

Ces protéines semblent principalement connectées, du côté intracellulaire, aux microfilaments d'actine et aux filaments intermédiaires du cytosquelette par l'intermédiaire des caténines (latin *catena*, chaîne). Le complexe comprend des caténines (α , β et p120) et des protéines liant l'actine (α -actinine, vinculine et formine-1).



Les cadhérines sont les principales protéines d'adhésion contenant les cellules épithéliales dans un arrangement de feuilles. L'élimination du calcium perturbe la cohésion des tissus. La queue cytoplasmique interagit avec les filaments d'actine à travers de nombreuses protéines de fixation intracellulaires, y compris trois protéines caténines. La β -caténine peut également jouer le rôle de cofacteur transcriptionnel.

Il y a plus de 70 cadhérines différentes qui sont déjà connues chez les mammifères pour seulement 18 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. E-cadhérine se trouve le long des surfaces cellulaires latérales et est responsable du maintien de la plupart des couches épithéliales. L'élimination du calcium ou l'utilisation d'un anticorps bloquant contre la E-cadhérine dans les cultures de cellules épithéliales décompose la fixation des cellules et la formation de jonctions stabilisantes est perturbée. Les molécules d'E-cadhérine forment des dimères cis-homophiles, qui se lient aux dimères de la même classe ou de différentes classes de cadhérines dans la membrane cellulaire opposée (interaction trans-homophile ou hétérophile).

La N-cadhérine se trouve dans le système nerveux central, le cristallin et dans le muscle squelettique et cardiaque. La P-cadhérine est observée dans le placenta (trophoblaste).

L'importance des cadhérines dans les maladies humaines est indiquée par le processus connu sous le nom de transition épithélial mésenchymateuse (EMT). L'EMT est le passage de cellules épithéliales polarisées à un phénotype de type fibroblaste ou mésenchymateux caractérisé par la perte d'adhésion intercellulaire et une migration cellulaire accrue. Pendant l'EMT, les cadhérines épithéliales (E-cadhérines), Crumbs (un groupe de protéines de polarité apicale) et les cytokératines (une protéine de filament intermédiaire cytosquelettique) sont régulées négativement, tandis que les marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine (une protéine de filament intermédiaire) est régulée positivement. Une perte d'E-cadhérines est associée à l'acquisition d'un comportement invasif par les cellules tumorales (métastases).

Le complexe de caténine a au moins trois rôles distincts dans la fonction des cadhérines ;

- Les caténines induisent un lien direct avec l'actine filamenteuse ;
- Ils interagissent avec les molécules régulatrices du cytosquelette d'actine ;
- Ils contrôlent l'état d'adhésion du domaine extracellulaire des cadhérines.

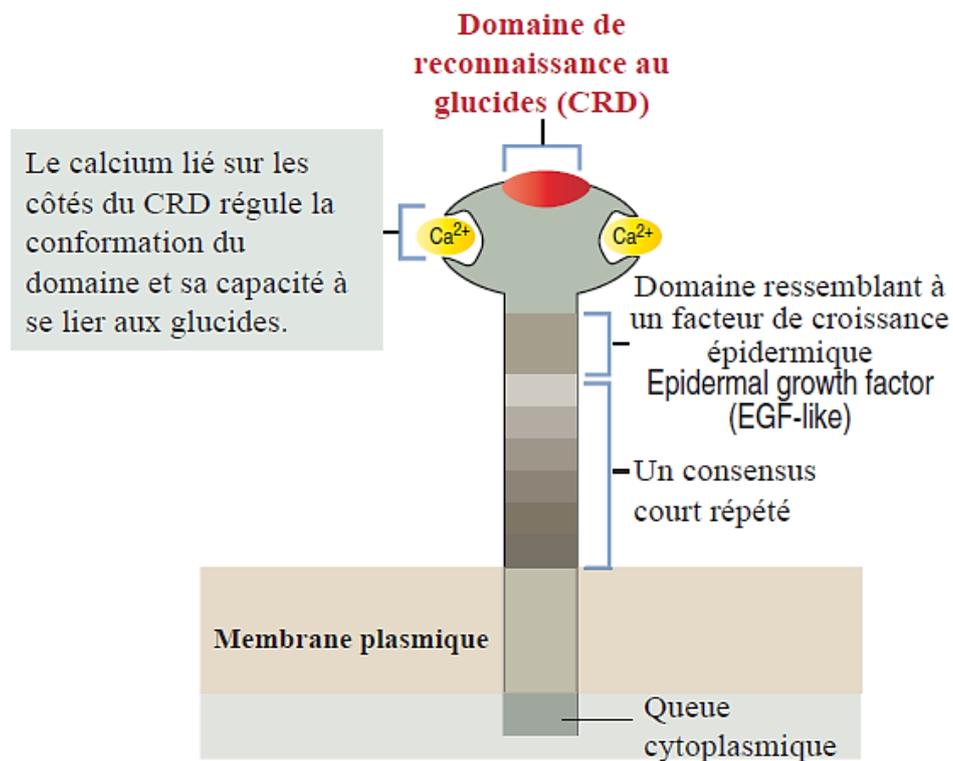
L'association de l'actine au complexe cadhérine-caténine est essentielle pour la morphogénèse cellulaire, les modifications de la forme cellulaire et l'établissement de la polarité cellulaire.

2.4.2. Sélectines

Les sélectines (figure ci-après), similaires aux cadhérines, sont des molécules d'adhésion cellulaire dépendantes du Ca^{2+} . Contrairement aux cadhérines, les sélectines se lient aux glucides et appartiennent à la famille des lectines de type C (du latin *Lectum*, pour sélectionner). Chaque sélectine possède un domaine de reconnaissance des glucides (carbohydrate-recognition domain ou CRD) avec une affinité de liaison à un oligosaccharide spécifique attaché à une protéine (glycoprotéine) ou à un lipide (glycolipide). La configuration moléculaire du CRD est contrôlée par le calcium.

Les sélectines, actuellement connues uniquement dans le système circulatoire des vertébrés (endothélium vasculaire et cellules sanguines) et qui participent au mouvement des leucocytes circulant dans le sang (neutrophiles, monocytes, cellules B et T) vers les tissus par extravasation (le mécanisme qui permet aux leucocytes d'échapper à la circulation sanguine et d'atteindre les sites d'inflammation). Les trois principales classes de sélectines de surface cellulaire sont les suivantes :

- P-sélectine, présente dans les plaquettes et les cellules endothéliales activées recouvrant les vaisseaux sanguins ;
- E-sélectine, trouvée sur les cellules endothéliales activées ;
- L-sélectine, trouvée sur les leucocytes.



Les sélectines ont trois domaines extracellulaires :

1. Un domaine de reconnaissance des glucides (CRD) spécifique d'un sucre particulier (galactose, mannose, N-acétylglucosamine et autres) ;
2. Un domaine homologue à une répétition trouvé dans le facteur de croissance épidermique (EGF-like) ;
3. De nombreuses répétitions de consensus se retrouvent dans les protéines régulatrices du complément.

Il existe trois principaux types de sélectines :

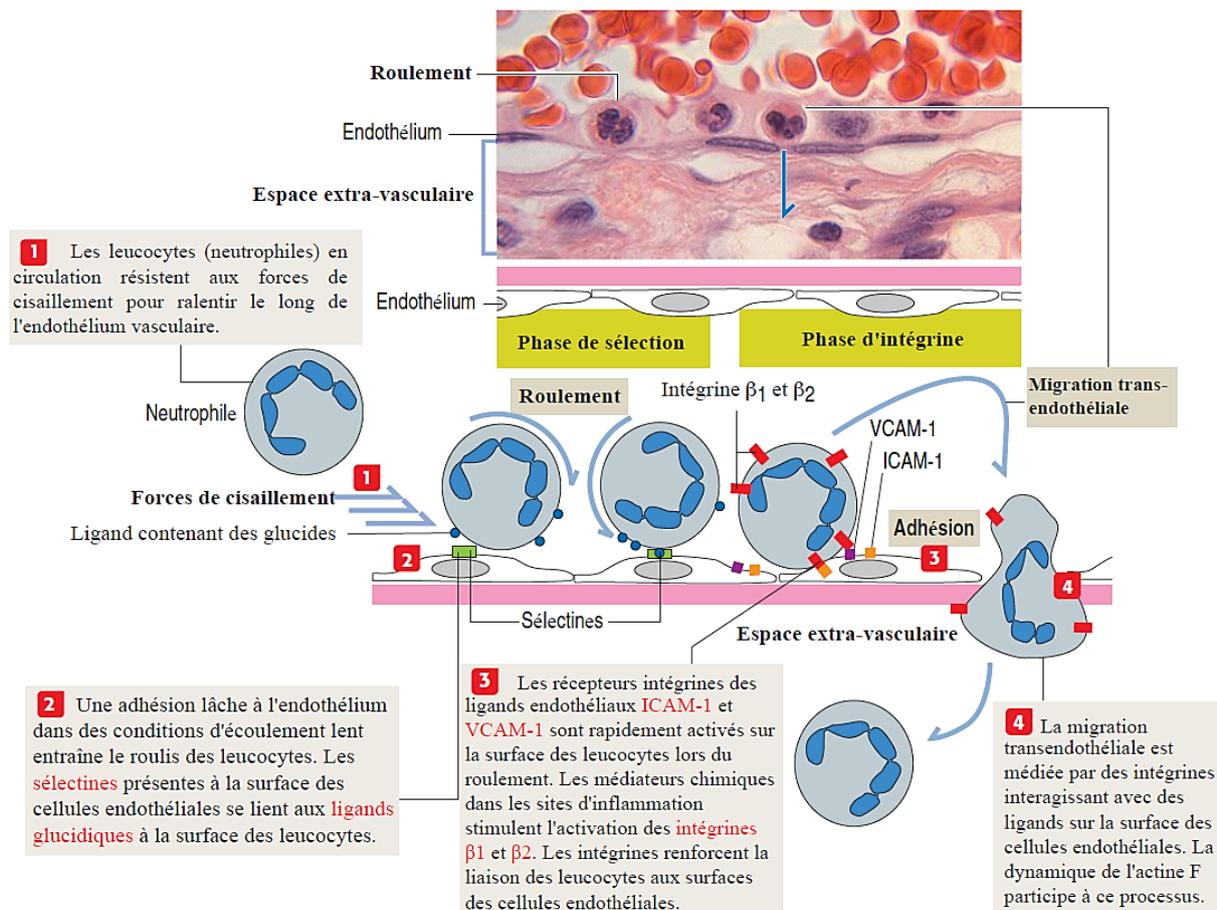
1. L-sélectine, portée par les lymphocytes et ayant une affinité de liaison pour les glucides sulfatés ;
2. E-sélectine, exprimée par les cellules endothéliales activées ;
3. P-sélectine, exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales activées ;

Les sélectines, ainsi que les intégrines et les Igs, jouent un rôle important dans l'inflammation et dans la migration périodique des lymphocytes de la circulation vers les organes lymphoïdes.

La P-sélectine est stockée dans les vésicules cytoplasmiques dans les cellules endothéliales. Lorsque les cellules endothéliales sont activées par une signalisation inflammatoire, la P-sélectine apparaît à la surface de la cellule.

A leur surface, les leucocytes contiennent de l'antigène Sialyl-Lewis X, un ligand oligosaccharidique spécifique de la P-selectine. La liaison de la sélectine P à l'antigène ralentit la circulation des leucocytes dans le sang et commence à rouler le long des surfaces des cellules endothéliales. Les P-sélectines reçoivent une aide supplémentaire des membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig) et des intégrines pour stabiliser la fixation des leucocytes, entraînant une extravasation (voir la figure suivante).

Les sélectines paraissent donc spécifiques du système immunitaire acquis, spécifique des vertébrés.



La plupart des leucocytes circulent dans le sang sans interagir avec les autres cellules sanguines ou les cellules endothéliales recouvrant les vaisseaux sanguins. Cependant, un sous-ensemble de lymphocytes participe à un processus de recirculation continue à travers les tissus lymphoïdes. Ce processus fait appel à de nombreuses molécules d'adhésion qui aident les lymphocytes à héberger divers compartiments lymphoïdes du corps.

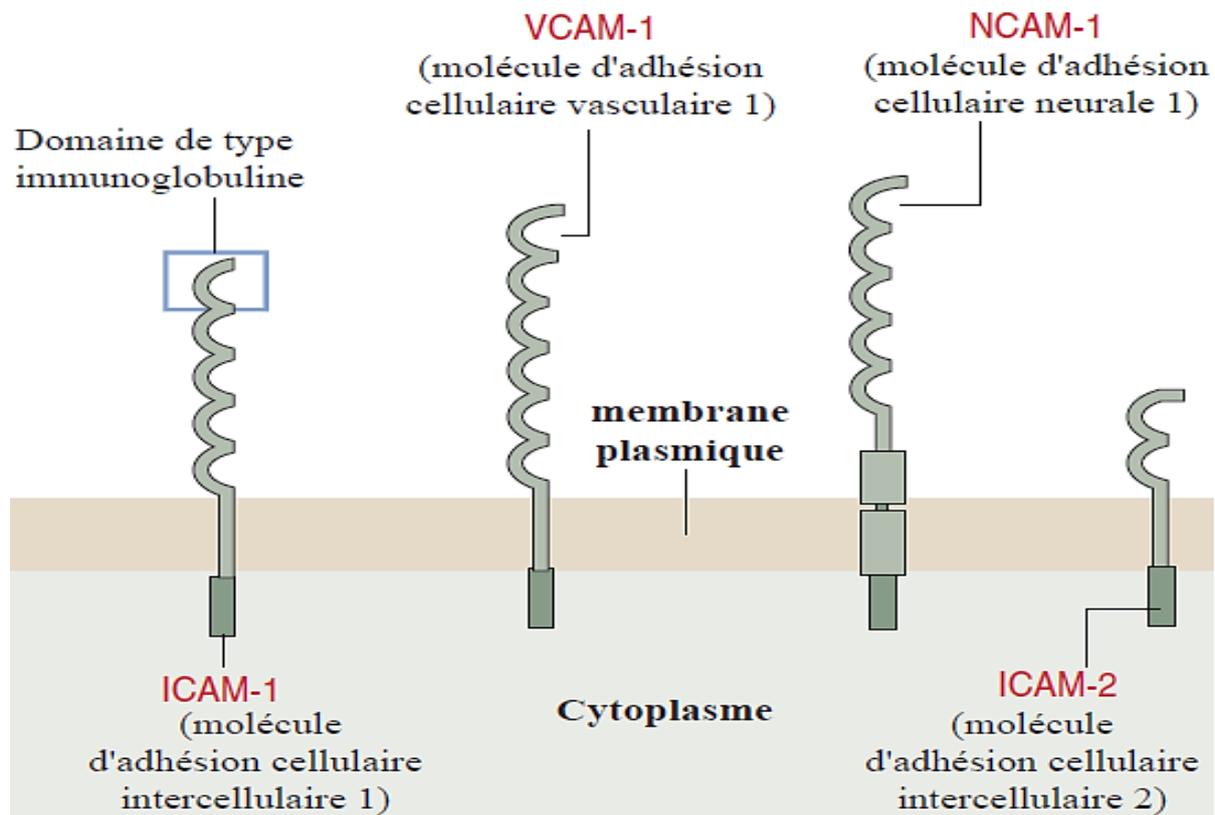
L'interaction lymphocytes-cellules endothéliales nécessite deux types de protéines d'adhésion cellulaire : les sélectines et les intégrines. Les neutrophiles utilisent un mécanisme similaire pour échapper aux vaisseaux sanguins, principalement les veinules post-capillaires, dans les sites inflammatoires. La migration des leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus se déroule en plusieurs étapes, comme illustré.

2.4.3. Superfamille des Ig (Immunoglobulines)

La N-CAM (pour molécule d'adhésion cellulaire neuronale de l'anglais neural cell adhesion molecule) appartient à la superfamille des Igs et intervient dans les interactions homophiles et hétérophiles.

Contrairement aux cadhérines et aux sélectines, les membres de la superfamille des Igs sont des molécules d'adhésion cellulaire indépendantes de Ca^{2+} et sont codées par un seul gène. Les membres de la superfamille des Igs sont générés par l'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) et présentent des différences de glycosylation.

Une caractéristique conservée partagée par tous les membres de la superfamille des Igs est un segment extracellulaire avec un ou plusieurs domaines repliés caractéristiques des immunoglobulines (figure suivante).



Superfamille des immunoglobulines (Ig) : Le segment extracellulaire d'une molécule d'adhésion cellulaire, ou CAM, est plié en deux à six domaines analogues à l'immunoglobuline. Les molécules de superfamille des Igs sur une cellule peuvent se lier à des molécules identiques sur une autre cellule (liaison trans-homophile) ou aux autres membres de la famille (liaison trans-hétérophile). Les molécules ICAM et VCAM jouent un rôle important dans les interactions des cellules T et la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales activées ou au repos.

Le CD4, un membre de la superfamille des Igs et le récepteur du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) dans une sous-classe de lymphocytes appelés lymphocytes T ou cellules auxiliaires, présentent un intérêt particulier.

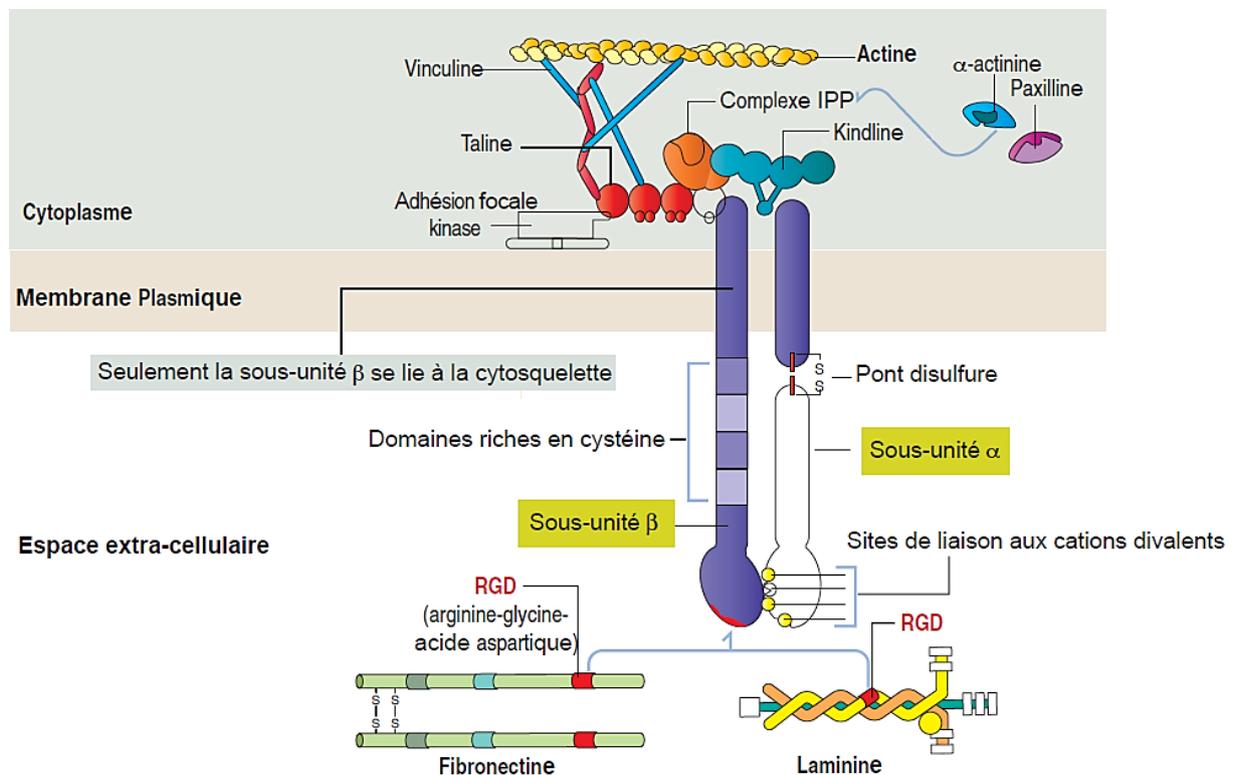
D'autres membres de la superfamille des Igs jouent des rôles importants dans le processus de référencement pendant l'inflammation. Des exemples incluent les molécules d'adhésion intercellulaire 1 et 2 (ICAM-1 et ICAM-2) sur les surfaces des cellules endothéliales. ICAM-1 est exprimée lorsqu'une inflammation est en cours pour faciliter la migration trans-endothéliale des leucocytes.

Les ICAMs ne provoquent pas directement de réponses cellulaires car, du côté intracellulaire, ces CAMs ne semblent connectées à aucune voie de signalisation.

2.4.4. Intégrines

Les intégrines (figure suivante) diffèrent des cadhérines, des sélectines et des membres de la superfamille des Igs, car les intégrines sont des hétérodimères formés par deux sous-unités α et β associées codées par des gènes différents.

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. Une très courte séquence Arg-Gly-Asp (RGD dans le code à une lettre), constitue un motif fonctionnellement important dans les protéines de la matrice extracellulaire « MEC » (fibronectines, laminines, collagènes ...) pour leur liaison aux intégrines.



L'intégrine, un récepteur de signalisation bidirectionnel.

Les intégrines diffèrent des autres protéines d'adhésion cellulaire :

1. Ils se composent de deux sous-unités différents.

2. Ils ont une double fonction: ils se lient à la matrice extracellulaire et au cytosquelette interne.

La sous-unité α d'une intégrine a deux chaînes liées par une liaison disulfure et une tête globulaire avec des sites de liaison pour les cations divalents. La sous-unité β présente deux caractéristiques significatives :

(1) La chaîne extracellulaire contient des régions répétitives riches en cystéine. (2) La partie intracellulaire interagit avec les filaments d'actine par la liaison de protéines : la taline et la kinase d'adhésion focale, les premières protéines à être recrutées. Dans sa conformation active, la taline se lie au domaine cytoplasmique de la β -intégrine. La kindline, un coactivateur d'intégrine, se lie au domaine cytoplasmique de l'intégrine β et augmente l'activation de l'intégrine induite par la taline. Le complexe IPP (composé de kinase liée à l'intégrine, PINCH « pour Particularly Interesting New Cysteine-Histidine-rich protein ») et de Parvine) recrute de l' α -actinine et de la paxilline sur le site d'adhésion cellulaire. Dans son état de conformation active, la β -intégrine relie l'actine aux protéines de la matrice extracellulaire, la fibronectine et la laminine, via leurs sites de liaison au RGD.

Les intégrines interagissent également avec diverses protéines membranaires de leurs voisines. Parmi celles-ci les désintégrines qui appartiennent à la famille ADAM (A Disintegrin A Metalloprotease), sont particulièrement intéressantes. L'une d'elles, la fertiline des spermatozoïdes, joue un rôle majeur lors de la fécondation en interagissant avec des intégrines de l'ovocyte. L'interaction directe fertiline-intégrine conduit au déclenchement des signaux intracellulaires conduisant, en résumé, à l'entrée d'un seul spermatozoïde, à la fusion des pronuclei puis au démarrage du premier cycle de division de l'œuf constituant l'étape initiale du développement de l'embryon.

Les intégrines sont des hétérodimères membranaires et les vingtaines d'assortiments connus des sous-unités (18 α et 8 β) dans les hétérodimères confèrent à chacune ses propriétés particulières de liaison. Les intégrines contenant des sous-unités $\beta 2$ sont exprimées à la surface des leucocytes et induisent une liaison cellule-cellule en préparation de l'extravasation. Un exemple est l'intégrine $\alpha 1 \beta 2$ sur des leucocytes non adhérents qui se lient aux ligands sur les surfaces des cellules endothéliales après activation par stimulation extracellulaire, entraînant une extravasation des leucocytes. Comme la constitution de la MEC dépend des cellules présentes dans le tissu, des influences mutuelles des cytosquelettes de chacune d'elles s'exercent via les intégrines. Ceci conduit par exemple à l'organisation baso-latérale ou à des mouvements des cellules. Du côté intracellulaire, les intégrines interagissent avec de nombreuses protéines dont des protéine kinases et indirectement avec le cytosquelette.

2.5. Expression d'antigènes, marqueurs de virulence et de récepteurs cellulaires

2.5.1. Groupe sanguin ABO

2.5.1.1. Historique

La découverte du groupe sanguin ABO, il y a plus de 100 ans. Jusque-là, tout le sang était supposé identique, et les conséquences souvent tragiques des transfusions sanguines n'étaient pas comprises. Au fur et à mesure que notre compréhension du groupe ABO s'est développée, non seulement le monde de la transfusion sanguine est devenu beaucoup plus sûr, mais les scientifiques ont désormais la possibilité d'étudier l'une des premières caractéristiques humaines dont l'héritage ait été prouvé. Le groupe sanguin ABO d'une personne était utilisé par des avocats en procès de paternité, par la police en criminalistique et par des anthropologues pour l'étude de différentes populations.

Au début du 20^{ème} siècle, un scientifique autrichien, Karl Landsteiner, nota que les globules rouges de certains individus ont été agglutinés par le sérum d'autres individus. Il a noté les modèles d'agglutination et a montré que le sang pouvait être divisé en groupes. Ceci a

marqué la découverte du premier système de groupe sanguin, ABO, et a valu à Landsteiner un prix Nobel.

Landsteiner a expliqué que les réactions entre les globules rouges et le sérum étaient liées à la présence de marqueurs (antigènes) sur les globules rouges et d'anticorps dans le sérum. L'agglutination s'est produite lorsque les antigènes de globules rouges ont été liés par les anticorps présents dans le sérum. Il a appelé les antigènes A et B et, en fonction de l'antigène exprimé par les globules rouges, le sang appartenait soit au groupe sanguin A, soit au groupe B. Un troisième groupe sanguin contenait des globules rouges qui réagissaient comme s'ils n'avaient pas les propriétés de A et B. Le groupe a ensuite été appelé "O" du mot allemand "Ohne", qui signifie "sans". L'année suivante, le quatrième groupe sanguin, AB, a été ajouté au système de groupes sanguins ABO. Ces globules rouges exprimaient à la fois les antigènes A et B.

En 1910, des scientifiques ont prouvé que les antigènes des globules rouges étaient hérités et hérités principalement des antigènes A et B. Il existait initialement une certaine confusion quant à la détermination du groupe sanguin d'une personne « modèle allélique ». Les antigènes des groupes sanguins ABO sont codés par un locus génétique, le locus ABO, qui présente trois formes alternatives (alléliques): A, B et O. Un enfant reçoit l'un des trois allèles de chaque parent, donnant ainsi lieu à six génotypes possibles et quatre types de sang possibles (phénotypes), tableau suivant.

Génotypes ABO

| Le génotype ABO en progéniture | | Allèles ABO hérités de la mère | | |
|--------------------------------|---|--------------------------------|----|---|
| | | A | B | O |
| Allèles ABO hérités du père | A | A | AB | A |
| | B | AB | B | B |
| | O | A | B | O |

2.5.1.2. Base biochimique de génotypes des groupes et sous-groupes sanguins

Les quatre phénotypes ABO de base sont O, A, B et AB. Après avoir découvert que les globules rouges du groupe A réagissaient différemment à un anticorps particulier (appelé plus tard anti-A1), le groupe sanguin a été divisé en deux phénotypes, A1 et A2. Les globules rouges avec le phénotype A1 réagissent avec les anti-A1 et représentent environ 80% du groupe sanguin A. Les globules rouges avec le phénotype A2 ne réagissent pas avec les anti-A1 et représentent environ 20% du groupe sanguin A. Les globules rouges de A1 expriment 5 fois

plus d'antigène A que de globules rouges A2, mais les deux types de globules rouges réagissent avec l'anti-A et, en ce qui concerne la transfusion, les groupes sanguins A1 et A2 sont interchangeables.

Il existe de nombreux autres sous-groupes du groupe sanguin A dans lesquels les globules rouges ont tendance à exprimer faiblement l'antigène A, alors que les variants faibles du phénotype du groupe sanguin B sont rares.

Le système immunitaire forme des anticorps contre les antigènes du groupe sanguin ABO qui ne figurent pas sur les globules rouges de l'individu. Ainsi, un individu du groupe A aura des anticorps anti-B et un individu du groupe B aura des anticorps anti-A. Le groupe sanguin O est commun, et les individus avec ce groupe sanguin auront à la fois des anticorps anti-A et anti-B dans leur sérum. Le groupe sanguin AB est le moins commun, et ces individus n'auront ni sérum anti-A ni anti-B.

Les anticorps ABO dans le sérum se forment naturellement. Leur production est stimulée lorsque le système immunitaire rencontre les antigènes « manquants » du groupe sanguin ABO dans les aliments ou dans les micro-organismes. Cela se produit à un âge précoce, car les glucides identiques ou très similaires aux antigènes du groupe sanguin ABO se retrouvent dans toute la nature.

Groupes Sanguins, ses génotypes et ses anticorps

| Groupe sanguin | Antigène(s) présent(s) sur les globules rouges | Anticorps présents dans le sérum | Génotype(s) |
|----------------|--|----------------------------------|-------------|
| A | Antigène A | Anti-B | AA ou AO |
| B | Antigène B | Anti-A | BB ou BO |
| AB | Antigène A et antigène B | Rien | AB |
| O | Rien | Anti-A et Anti-B | OO |

Le locus ABO a trois formes alléliques principales : A, B et O. L'allèle A code pour une glycosyltransférase « α 1,3-N-acetylgalactosaminyltransférase » qui produit l'antigène A (la N-acétylgalactosamine est son sucre immunodominant) et l'allèle B pour une glycosyltransférase « α 1,3-galactosyltransférase » qui crée l'antigène B (le D-galactose est son sucre immunodominant).

L'allèle O code pour une enzyme sans fonction et, par conséquent, ni l'antigène A ou B n'est produit, laissant le précurseur sous-jacent (l'antigène H) inchangé.

2.5.1.3. Expression des antigènes ABO

Bien que les antigènes des groupes sanguins ABO soient considérés comme des antigènes de globules rouges, ils sont en fait exprimés sur une grande variété de tissus humains et sont présents sur la plupart des cellules épithéliales et endothéliales. Chaque globule rouge humain exprime environ 2 millions d'antigènes de groupes sanguins ABO. D'autres cellules sanguines, telles que les cellules T, les cellules B et les plaquettes, ont des antigènes de groupe sanguin ABO qui ont été adsorbés par le plasma. Chez les individus qui sont "sécréteurs", une forme soluble des antigènes du groupe sanguin ABO se trouve dans la salive et dans tous les liquides organiques, à l'exception du liquide céphalo-rachidien. Un certain nombre de maladies peuvent modifier le phénotype ABO d'une personne. Les patients peuvent "acquérir" l'antigène B lors d'une infection nécrosante au cours de laquelle une bactérie libère une enzyme dans la circulation qui convertit l'antigène A1 en un antigène de type B. Pendant ce temps, les patients ne doivent pas recevoir de produits sanguins contenant l'antigène B, car leur sérum contiendra toujours de l'anti-B. Une fois que l'infection sous-jacente est traitée, les groupes sanguins des patients reviennent à la normale. La maladie peut également amener les patients à "perdre" des antigènes du groupe sanguin ABO. De plus, les antigènes des groupes sanguins ABO peuvent être altérés par des cancers hématologiques pouvant modifier les chaînes de sucre portant sur les antigènes des groupes sanguins ABO, ce qui permet d'utiliser les antigènes A et B comme marqueurs tumoraux de la leucémie aiguë, des troubles myéloprolifératifs et de la myélodysplasie.

2.5.1.4. Base moléculaire de génotypes sanguins

Le locus ABO code pour des glycosyltransférases spécifiques qui synthétisent les antigènes A et B sur les globules rouges. Pour que la synthèse de l'antigène A / B ait lieu, un précurseur appelé antigène H doit être présent. Dans les hématies, l'enzyme qui synthétise l'antigène H est codée par le « locus H » (FUT1). Dans la salive et les autres sécrétions corporelles, l'enzyme qui synthétise l'antigène H est codée par le « locus Se » (FUT2).

Le locus ABO est situé sur le chromosome 9 à 9q34.1-q34.2. Il contient 7 exons couvrant plus de 18 kb d'ADN génomique. L'exon 7 est le plus grand et contient la majeure partie de la séquence de codage. L'exon 6 contient la délétion que l'on trouve dans la plupart des allèles O et entraîne une perte d'activité enzymatique.

Les allèles A et B diffèrent l'un de l'autre par sept substitutions de nucléotides, dont quatre se traduisent en différents acides aminés dans le produit du gène (R176G, G235S, L266M, G268A). Les résidus aux positions 266 et 268 déterminent la spécificité A ou B de la glycosyltransférase qu'ils codent.

L'allèle O diffère de l'allèle A par la suppression de la guanine en position 261. La suppression provoque un décalage du cadre et entraîne la traduction d'une protéine presque entièrement différente dépourvue d'activité enzymatique.

Il existe de nombreux allèles variants ABO qui codent un certain nombre de phénotypes variants ABO, mais ils ne codent pas pour des antigènes spécifiques autres que les antigènes A et B. Par exemple, les sous-groupes A faibles, tels que A3, Ax et Ael, expriment l'antigène A, et les sous-groupes B faibles, tels que B3 et Bx, expriment l'antigène B.

Le locus H (FUT1) est situé sur le chromosome 19 à 19q13.3. Il contient trois exons couvrant plus de 5 kb d'ADN génomique et code pour une fucosyltransférase qui produit l'antigène H sur les globules rouges.

Les individus qui sont homozygotes pour les allèles nuls à ce locus (h / h) ne produisent pas l'antigène H, et comme l'antigène H est un précurseur essentiel des antigènes du groupe sanguin ABO, ils ne peuvent pas produire les antigènes A et B. Par conséquent, leur sérum contient des anti-A et des anti-B, ainsi que de puissants anti-H. Ce phénotype rare de globules rouges déficients en H s'appelle le "phénotype de Bombay" (Oh) d'après la ville dans laquelle il a été découvert. Les individus avec le phénotype Bombay sont en bonne santé, mais s'ils avaient besoin d'une transfusion sanguine, les anticorps contenus dans leur sérum les exposeraient à un risque élevé de réaction hémolytique aiguë. Ceci peut être évité en utilisant uniquement des produits sanguins provenant d'un donneur présentant également le phénotype de Bombay (généralement un membre de la famille).

Le locus « Se » est situé sur le chromosome 19 à 19q13.3. Il contient deux exons couvrant environ 25 kb d'ADN génomique.

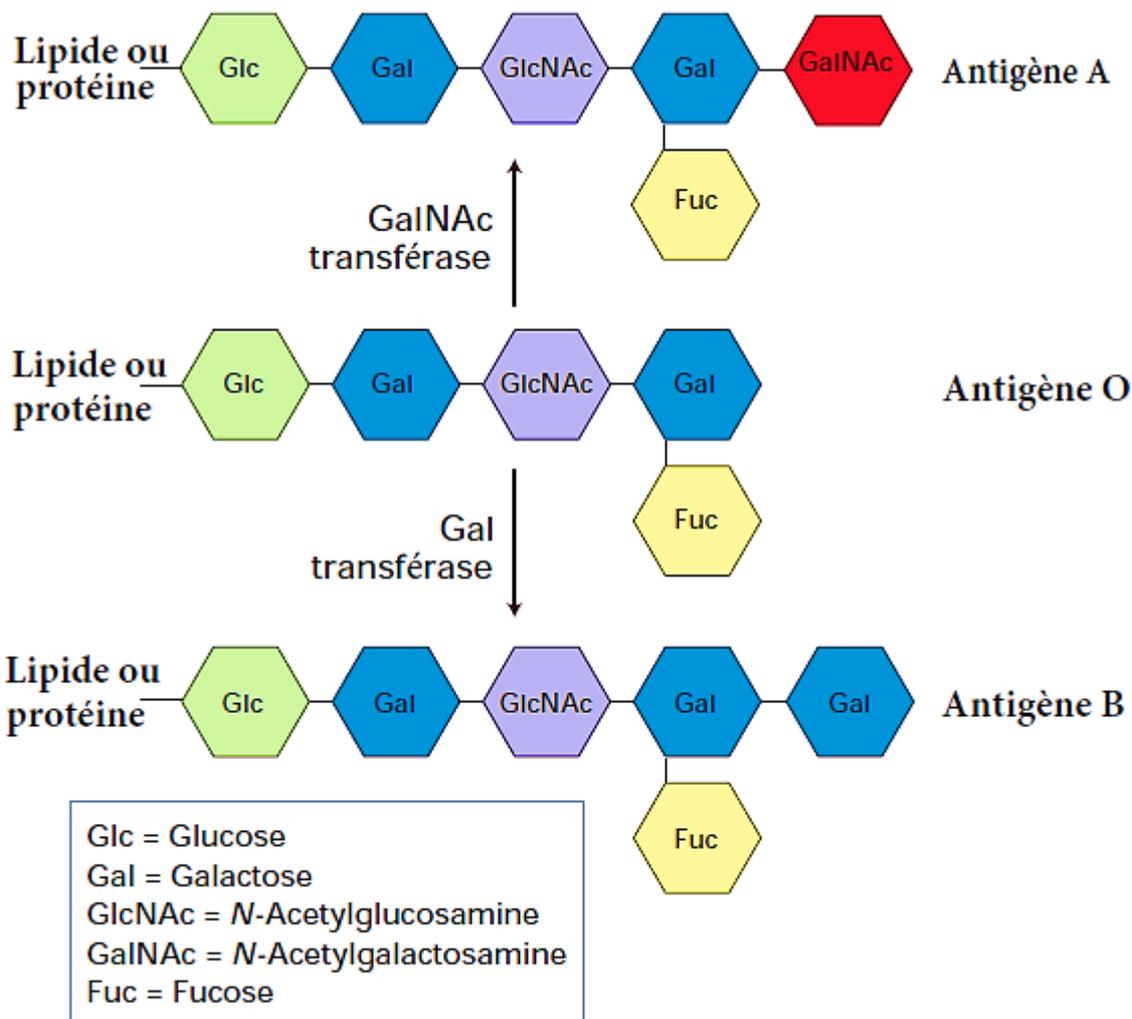
Le locus Se code pour une fucosyltransférase spécifique qui est exprimée dans les épithéliums des tissus sécréteurs, tels que les glandes salivaires, le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires. L'enzyme à laquelle il code catalyse la production d'antigène H dans les sécrétions corporelles.

Les "sécréteurs" ont au moins une copie du gène Se qui code pour une enzyme fonctionnelle, leur génotype est Se / Se ou Se / se. Ils sécrètent l'antigène H qui, en fonction de leur génotype ABO, est ensuite transformé en antigènes A et / ou B. Les non-sécréteurs sont homozygotes pour les allèles nuls à ce locus (se / se). Ils sont incapables de produire une forme soluble d'antigène H et ne produisent donc pas d'antigènes A et B.

2.5.1.5. Réactions transfusionnelles

La pratique courante de la détermination du groupe sanguin et de la compatibilité des produits sanguins devrait permettre d'éviter les réactions transfusionnelles indésirables causées

par les anticorps ABO. Cependant, une erreur d'écriture peut entraîner la transfusion d'un "mauvais sang" à un patient, erreur pouvant entraîner la mort du patient. Si un destinataire du groupe sanguin O reçoit une transfusion de globules rouges n'appartenant pas au groupe O, les anticorps anti-A et anti-B naturellement présents dans le sérum du receveur se lient aux antigènes correspondants sur les globules rouges transfusés. Ces anticorps fixent le complément et provoquent une hémolyse intravasculaire rapide, déclenchant une réaction transfusionnelle hémolytique aiguë pouvant entraîner une coagulation intravasculaire disséminée, un choc, une insuffisance rénale aiguë et la mort. Anti-A1 est une cause moins importante de réactions transfusionnelles et ne semble pas fixer le complément.



Antigènes du groupe sanguin ABO humain.

Ces antigènes sont des chaînes oligosaccharidiques liées de manière covalente à des glycolipides ou des glycoprotéines de la membrane plasmique. Les sucres oligosaccharidiques terminaux distinguent les trois antigènes. La présence ou l'absence de glycosyltransférases qui ajoutent du galactose (Gal) ou de la N-acétylgalactosamine (GalNAc) à l'antigène O déterminent le groupe sanguin d'une personne.

2.5.1.6. Maladie hémolytique du nouveau-né

La plupart des cas de maladie hémolytique du nouveau-né (HDN) résultant d'une incompatibilité ABO ne nécessitent aucun traitement. Les cas d'hémolyse sévère nécessitant des transfusions d'échange sont moins fréquents et l'hydrops foetal est rare. Les HDN provoqués par les anticorps ABO se produisent presque exclusivement chez les nourrissons des groupes sanguins A ou B nés de mères du groupe O. En effet, les anti-A et les anti-B formés chez les individus du groupe O ont tendance à être du type IgG (et peuvent donc traverser le placenta), alors que les anti-A et anti-B présents dans le sérum des individus de groupes B et A, respectivement, ont tendance à être du type IgM. L'HDN a tendance à être de nature relativement douce principalement parce que les globules rouges fœtaux n'expriment pas les niveaux adultes des antigènes A et B. Cependant, la force des antigènes des groupes sanguins ABO fœtaux peut varier et, par conséquent, le degré d'hémolyse et, partant, la gravité de l'HDN peuvent être imprévisibles.

2.5.2. Antigènes tumoraux

On sait maintenant que les protéines endogènes, qu'elles soient le produit d'expression de gènes de cellules normales ou tumorales ou encore de gènes viraux, sont présentées sous forme de peptides associés aux molécules HLA de classe I, codées par les gènes du CMH. Cette présentation permet aux lymphocytes T cytotoxique (CTL), par l'intermédiaire de leur récepteur (TCR), de percevoir la présence d'un antigène tumoral, même si la protéine correspondante n'est jamais exprimée à la surface cellulaire. Les CTL reconnaissent ces antigènes et peuvent être capables de détruire les cellules tumorales avant qu'elles ne se prolifèrent ou ne métastasent.

Les antigènes tumoraux peuvent également se trouver à la surface de la tumeur sous la forme, par exemple, d'un récepteur muté, auquel, ils seront reconnus par les cellules B.

La compréhension des bases moléculaires de l'interaction peptide/CMH/TCR a facilité l'identification de nombreux antigènes spécifiques des tumeurs, cibles des effecteurs cellulaires de l'immunité antitumorale. Pour que l'association de ces peptides, appelés épitopes, avec les molécules de classe I puisse se faire, les protéines intracellulaires doivent être clivées ou « apprêtées » en fragments peptidiques qui vont être transportés dans le réticulum endoplasmique.

Le système protéolytique, récemment identifié, est un complexe composé de plusieurs sous-unités dont la composition modifie son activité peptidase. Le protéasome, exprimé dans le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes, est un complexe multicatalytique formé de 14 sous-unités alpha et 14 sous-unités beta dont trois, beta1, beta2 et beta5, possèdent des activités protéolytiques. Le rôle majeur du protéasome est la dégradation, ou apprêtement, des

protéines intracellulaires dont les produits correspondent à la source majeure des peptides présentés par les molécules de classe I du CMH. Sous l'action de l'INF-gamma, les trois sous-unités beta1, beta2 et beta5 sont remplacées par leurs homologues, inductibles par l'INF-gamma, LMP2 (*low molecular weight proteins* ; beta1i) MECL1 (beta2i) et LMP7 (beta5i) correspondant aux sous-unités actives de l'immunoprotéasome. Il a été décrit que l'immunoprotéasome est plus efficace que le protéasome classique en terme d'apprêtement de peptides antigéniques. Néanmoins des travaux récents, réalisés dans un modèle de carcinome rénal, ont clairement montré que seul le protéasome standard, et non l'immunoprotéasome, est capable d'apprêter certains antigènes ce qui résulte en leur faible présentation par les cellules dendritiques qui expriment essentiellement, comme toutes les cellules du système immunitaire, un immunoprotéasome.

2.5.2.1. Antigènes tumoraux reconnus par les cellules T

L'étude de modèles animaux a clairement démontré que le système immunitaire avait la capacité de rejeter les cellules tumorales et que les lymphocytes T jouent un rôle déterminant dans ce rejet. En particulier, le rôle essentiel des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) a été mis en évidence par des études de transfert adoptif et par l'analyse de variantes de tumeurs échappant au rejet, qui se sont avérés avoir perdu leurs épitopes de CTL. Un certain nombre de tumeurs de souris se sont avérées exprimer un ou plusieurs antigènes reconnus par des CTL dérivés de lymphocytes de souris ayant rejeté ces tumeurs. Chez l'homme, des CTL antitumoraux ont été obtenus *in vitro* à partir des lymphocytes de patients cancéreux et un certain nombre de clones de CTL d'antimélanome ont été analysés en détail. L'étude de variantes de mélanome résistants à certains mais pas à tous ces clones de CTL a révélé que les cellules de mélanome expriment plusieurs antigènes distincts. La définition moléculaire de ces antigènes a permis de mieux comprendre la spécificité de ces antigènes tumoraux et le mécanisme de leur expression par les cellules tumorales.

Comme observé pour les épitopes de CTL viraux, la plupart des antigènes tumoraux identifiés à ce jour correspondent bien à des peptides dérivés de protéines intracellulaires et présentés à la surface de la cellule par des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Selon leur profil d'expression dans les tumeurs et les tissus sains et en fonction de la nature des épitopes issus de ces antigènes. Différents mécanismes aboutissent à la génération de peptides épitopiques reconnus par les lymphocytes T spécifiques de cellules tumorales, les antigènes (épitopes) peuvent être classés en quatre groupes principaux : antigènes communs spécifiques de la tumeur, antigènes de différenciation, antigènes résultant de mutations et antigènes viraux.

A. Antigènes communs spécifiques aux tumeurs

Ces antigènes sont codés par des gènes qui sont complètement silencieux dans la plupart des tissus normaux, mais activés dans un certain nombre de tumeurs de divers types histologiques. Les antigènes prototypes de ce groupe sont codés par le gène P1A dans la souris et par les gènes MAGE chez l'homme, une famille d'au moins douze gènes très homologues situés sur le chromosome X humain. Parmi ces douze gènes, sept sont exprimés dans un certain nombre de tumeurs. Des gènes humains supplémentaires présentant un profil d'expression similaire ont été identifiés par la suite et sont répertoriés dans le tableau ci-après. Des peptides antigéniques dérivés des protéines codées par ces gènes ont été définis et se sont révélés être présentés aux CTL par des molécules spécifiques du CMH de classe I tableau suivant. À l'exception de RAGE, les seules cellules normales où une expression significative de ces gènes a été détectée sont les cellules germinales testiculaires et les trophoblastes placentaires. Comme ces cellules n'expriment pas les molécules du CMH de classe I, elles ne présentent pas le peptide à leur surface.

Par conséquent, ces antigènes peuvent être considérés comme strictement spécifiques à la tumeur. L'activation des gènes résulte généralement d'une déméthylation de leur promoteur qui correspond à une déméthylation non spécifique à l'échelle du génome.

Certains CTL dirigés contre les carcinomes mammaires, ovariens et pancréatiques reconnaissent un épitope de mucine, une protéine de surface composée de plusieurs répétitions en tandem de 20 acides aminés. Alors que dans les cellules normales, la mucine est fortement glycosylée, dans ces tumeurs, les répétitions de peptides sont non masquées par sous glycosylation, ce qui entraîne la reconnaissance des CTL. Remarquablement, cette reconnaissance, qui dépend de la présence de répétitions multiples, se produit en l'absence de restriction HLA. La sous-glycosylation de la mucine se produit également dans les cellules épithéliales des canaux mammaires pendant la lactation, mais uniquement à la surface apicale extracellulaire qui n'est normalement pas accessible aux cellules T. Ces antigènes de la mucine semblent donc être très spécifiques aux cellules tumorales et l'absence de restriction HLA devrait faciliter les essais de vaccination thérapeutique.

B. Antigènes de différenciation

Un grand nombre de CTL issus de lymphocytes de patients atteints de mélanome reconnaissent divers mélanomes allogéniques mais également des mélanocytes normaux. Il a été montré que ces CTL reconnaissent des antigènes de différenciation des mélanocytes. Ces antigènes de différenciation sont des auto-antigènes spécifiques des cellules productrices de

pigment, comme les mélanocytes normaux et certaines cellules de la rétine, et sont également exprimés dans les mélanomes.

| Antigènes spécifiques des tumeurs | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------|-----------|-------------------------|
| Antigène | Élément de restriction | Épitope peptidique | Position | Référence |
| MAGE-A1 | A1/B35 | EADPTGHSY | 161-169 | Traversari C. 1992 |
| | A24 | NYKHCPEI | 135-143 | Fujie T. 1999 |
| | A28 | EYDGREHSA | 222-231 | Chaux P. 1999 |
| | A3 | SLFRAVITK | 96-104 | Chaux P. 1999 |
| | B53 | DPARYEFLW | 258-266 | Chaux P. 1999 |
| | B7 | RVRFFPSL | 289-297 | Luiten R.M. 2000 |
| | Cw2 | SAFPTINF | 62-70 | Chaux P. 1999 |
| | Cw16/Cw3 | SAYGEPRKL | 230-238 | Chaux P. 1999 |
| MAGE-A2 | A2 | YLQLVFGIEV | 157-166 | Kawashima I. 1998 |
| MAGE-A3 | A1 | EVDPIGHLY | 168-176 | Gaugler B. 1994 |
| | A2 | FLWGPALV | 271-279 | Van Der Bruggen P. 1994 |
| | A2 | KVAELVHFL | 112-120 | Kawashima I. 1998 |
| | A24 | IMPKAGLU | 195-203 | Tanaka F. 1997 |
| | B44 | MEVDPIGHLY | 167-176 | Herman J. 1996 |
| | DR11 | TSYVKVLHMHVKISG | 281-295 | Manici S. 1999 |
| | DR13 | AELVHFLLKYRAR | 114-127 | Chaux P. 1999 |
| | DR13 | LLKYRAREPVTKAE | 121-134 | Chaux P. 1999 |
| | DP4 | TQH FVQENYLEY | 247-258 | Schultz E.S. 2000 |
| | MAGE-A4 | A2 | GVDGREHTV | 230-239 |
| MAGE-A6 | A34 | MVKISGGPR | 290-298 | Zorn E. 1999 |
| MAGE-A10 | A2 | GLYDGMHL | 254-262 | Huang L.Q. 1999 |
| MAGE-A12 | A2 | FLWGPALV | 271-279 | Van Der Bruggen P. 1994 |
| | Cw7 | VRIGHLYL | 170-178 | Heidecker L. 2000 |
| BAGE | Cw16 | AARAVFLAL | 2-10 | Boël P. 1995 |
| GAGE-1, 2, 8 | Cw6 | YRPRRRY | 9-16 | Van Den Eynde B. 1995 |
| GAGE-3 à 7 | A29 | YYWPRRRY | 10-18 | De Backer O. 1999 |
| RAGE-1 | B7 | SPSSNRIRNT | 11-20 | Gaugler B. 1996 |
| GnTV | A2 | VLPDVFIRC | 38-64 | Guilloux Y. 1996 |
| TRP2-INT2 | A68011/A3301 | EVISCKLIKR | Intron 2 | Lupetti R. 1998 |
| NY-ESO-1 | A2 | QLSLMWITQC | 155-165 | Jäger E. 1998 |
| | A2 | SLLMWITQCFL | 157-167 | Fleischhauer K. 1998 |
| | A2 | SLLMWITQC | 157-165 | Fleischhauer K. 1998 |
| | A31 | ASGPGGGAPR | 53-62 | Wang R.F. 1998 |
| | A31 | LAAGERRVPR | Alt ORF | Wang R.F. 1998 |
| | DRB4*0101-0103 | PLPVPVLLKFTVSGNI | 115-132 | Jäger E. 2000 |
| | DRB4*0101-0103 | VLLKFTVSGNILTIRT | 121-138 | Jäger E. 2000 |
| | DRB4*0101-0103 | AADHRQLQLSISCLQQL | 139-156 | Jäger E. 2000 |
| SART-1 | A2601 | KLQCVDLHV | 146-154 | Schichijo S. 1998 |
| | A2601 | KDLEEALK | 749-757 | Schichijo S. 1998 |
| | A2601 | VLSGSGKSM | 785-793 | Schichijo S. 1998 |
| SART-2 | A24 | DYSARWNEI | 93-101 | Nakao M. 2000 |
| | A24 | AYDFLYNYL | 161-169 | Nakao M. 2000 |
| | A24 | SYTRLFJLL | 899-907 | Nakao M. 2000 |
| SART-3 | A24 | VYDYNCHVDL | 109-118 | Yang D. 1999 |
| | A24 | AYIDFEMKI | 315-323 | Yang D. 1999 |

Ce groupe compte au moins six antigènes : Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, TRP1/gp75, TRP2 et MC1R, qui sont souvent impliqués dans la synthèse de la mélanine (tableau suivant).

La tyrosinase fut le premier antigène de différenciation identifié. Elle est impliquée dans la synthèse de la mélanine en convertissant la tyrosine en dihydroxyphénylalanine qui est le précurseur de la mélanine. Elle est reconnue par des CTL dans plusieurs contextes HLA de classe I différents : HLA-A1, HLA-A2 HLA-A24, HLA-B44 et HLA-B35 et par des lymphocytes T CD4⁺ dans le contexte HLA-DR4. L'épitope antigénique de la tyrosinase restreint par les molécules HLA-A*0201 (368-376) est particulier car ce peptide, naturellement présenté par les cellules tumorales, subit une modification post-traductionnelle d'un résidu asparagine en acide aspartique.

L'antigène Melan-A/MART-1 est une protéine transmembranaire de 118 acides aminés dont la fonction n'est pas connue. Les peptides identifiés issus de cet antigène immunodominant sont reconnus par des CTL dans le contexte HLA-A*0201. Un de ces peptides peut également être reconnu dans le contexte HLA-B*4501. Les peptides Melan-A/MART-1 (26-35) et (27-35) sont les peptides les plus souvent reconnus par les CTL spécifiques de Melan-A/MART-1 dans le contexte HLA-A*0201.

L'antigène gp100 est une glycoprotéine transmembranaire de 661 acides aminés, localisée dans la membrane des mélanosomes et participant à la synthèse de la mélanine. Dix peptides issus de cet antigène sont reconnus par des CTL dans le contexte HLA-A*0201, huit dans le contexte HLA-A*0301, et d'autres dans les contextes HLA-A11 et HLA-Cw8. Un peptide est également reconnu par des lymphocytes T CD4⁺ dans le contexte HLA-DRb1*0401.

D'autres antigènes de différenciation, TRP1/gp75 et TRP2, partageant environ 40 % d'homologie avec la protéine tyrosinase, sont reconnus par des CTL dans plusieurs contextes de classe I différents : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A68 et HLA-Cw8. Des antigènes de différenciation induisant une réponse CTL ont été caractérisés dans d'autres tumeurs telles que les cancers de la prostate, de la vessie ainsi que les lymphomes B et les leucémies chroniques. En effet, des CTL spécifiques sont capables de reconnaître des segments idiotypiques de régions variables des immunoglobulines à la surface des cellules malignes de type B.

Bien qu'exprimés par des cellules normales, les antigènes de différenciation mélanocytaires sont immunogéniques et des CTL spécifiques peuvent être obtenus non seulement à partir des lymphocytes du sang de patients atteints de mélanome, mais aussi à partir des lymphocytes du sang de personnes saines. La fréquence des précurseurs CTL reconnaissant ces antigènes est nettement supérieure à celle des précurseurs reconnaissant d'autres antigènes associés au mélanome. L'apparition d'une dépigmentation partielle de la peau, appelée vitiligo, chez les patients atteints de mélanomes, est par ailleurs corrélée avec une survie prolongée et

une régression tumorale. Ceci indique un rôle potentiel de ces antigènes dans les réponses immunitaires naturelles au cours de l'évolution des mélanomes.

| Antigènes de différenciation | | | | |
|------------------------------|------------------------|--------------------|----------------|---------------------|
| Antigène | Élément de restriction | Épitope peptidique | Position | Référence |
| Tyrosinase | A1 | DAEKCDKTDEY | 240-250 | Kittlesen D.J. 1998 |
| | A1 | SSDYVPIGTY | 146-156 | Kawakami Y. 1998 |
| | A2 | MLLAVLYCL | 1-9 | Wölfel T. 1995 |
| | A2 | YMNGTMSQV | 369-377 | Wölfel T. 1995 |
| | A2 | YMDGTMSQV* | | Skipper J.C. 1996 |
| | A24 | AFLPWHRLF | 206-214 | Kang X. 1995 |
| | B35 | LPSSADVEF | 312-320 | Morel S. 1999 |
| | B44 | SEIWRDIDF | 192-200 | Brichard V. 1996 |
| | DR4 | QNILLSNAPLPGQFP | 56-70 | Topalian S.L. 1996 |
| | DR4 | SYLQSDSPDSFGD | 450-462 | Topalian S.L. 1996 |
| Pmel17/gp100 | A2 | KTWGGQYWQV | 154-162 | Kawakami Y. 1995 |
| | A2 | AMLGHTIMEV | 177-186 | Tsai V. 1997 |
| | A2 | MLGHTIMEV | 178-186 | Tsai V. 1997 |
| | A2 | ITDQVPFSV | 209-217 | Kawakami Y. 1995 |
| | A2 | YLEPGPVTA | 280-288 | Cox A.L. 1994 |
| | A2 | LLDGTATLRL | 457-466 | Kawakami Y. 1994 |
| | A2 | VLYRYGSFSV | 476-485 | Kawakami Y. 1995 |
| | A2 | SLADTNSLAV | 570-579 | Tsai V. 1997 |
| | A2 | RUMKQDFSV | 619-627 | Kawakami Y. 1998 |
| | A2 | RUPRIFCSC | 639-647 | Kawakami Y. 1998 |
| | A3 | ALLAVGATK | 17-25 | Skipper J.C. 1996 |
| | A3 | LIYRRRIMK | 614-622 | Kawakami Y. 1998 |
| | A3/A1 (I) | ALNFPGSQK | 87-95 | Kawashima I. 1998 |
| | A24 | YYFFLPDHL | | Robbins P.F. 1997 |
| | Cw8 | (KV)SNDGPTLI | 71-78 | Castelli C. 1999 |
| DR4 | NRQLYPEWTEAQRLD | 44-59 | Halder T. 1997 | |
| Melan-A/MART-1 | A2 | (E)AAGIGILTV | 26(27)-35 | Kawakami Y. 1994 |
| | A2 | ILTIVILGVL | 32-40 | Castelli C. 1995 |
| | B45.1 | AEEAAGIGIL(T) | 24-34(33) | Schneider J. 1998 |
| TRP-1 (gp75) | A31 | MSLQRQFLR | alt ORF | Wang R.F. 1996 |
| TRP-2 | A31/A33 | LLGPRPYR | 197-205 | Wang R.F. 1996 |
| | Cw8 | ANDPIFVVL | 387-395 | Castelli C. 1999 |
| | A2 | SVYDFVWL | 180-188 | Parthurst M.R. 1998 |
| | A*6801 | EVISCKLIKR | | Lu petti R. 1998 |
| CEA | A2 | YLSGANLNL | 571-579 | Tsang K.Y. 1995 |
| PSA | A2 | FLTPKLLQCV | 141-150 | Correale P. 1997 |
| | A2 | VISNDVCAQV | 154-163 | Correale P. 1997 |
| | A2 | KLQCVDLHV | 146-154 | Correale P. 1997 |

C. Antigènes résultant de mutations

Les antigènes de la troisième catégorie correspondent à des peptides dérivés de régions de protéines omniprésentes mutées dans des cellules tumorales (tableau suivant). La mutation de la molécule génère un nouvel épitope dans le peptide ou permet sa liaison à la molécule du CMH. Dans la plupart des cas, la mutation est unique à une tumeur individuelle et l'antigène n'est donc pas partagé. D'autres mutations se produisent dans plusieurs tumeurs qui peuvent alors partager l'antigène. Les mutations peuvent affecter des gènes impliqués dans la régulation cellulaire, tels que p53 et CDK4, et jouer ainsi un rôle dans la carcinogénèse. La grande majorité des antigènes tumoraux de souris identifiés à ce jour résultent de mutations. Cela peut être dû au fait que de nombreuses tumeurs chez la souris ont été induites par des agents cancérigènes

ou des radiations. Cependant, des antigènes de cette catégorie ont également été trouvés sur des tumeurs spontanées de souris et sur des tumeurs humaines. Bien que leur spécificité tumorale soit optimale, le fait que ces antigènes soient souvent uniquement individuels empêche leur utilisation en tant que composants de vaccins anticancéreux.

Antigènes tumoraux résultant de mutations

| | Gène/protéine | Tumeur | CMH | Peptide ^a | Position |
|---------------|--------------------------------|--|----------------------|---------------------------------------|----------|
| Souris | Connexine 37 | Cancer du poumon de Lewis 3LL (spontané) | H-2 K ^b | FEQNTAQP | 52-60 |
| | Protéine ribosomale L9 | Tumeur cutanée 6132A (induite par les rayons UV) | H-2 I-E ^k | LRRDFNHINVELS <i>HL</i> GKKKKRLRVD | 34-58 |
| | Gag IAP ^b | Leucémie LEC (spontanée) | H-2 D ^k | RRKGKYTGL | 88-96 |
| | Gp70 env MuLV ^c | Cancer du côlon CT26 (induit par un cancérogène) | H-2 L ^d | SPSYVYHQF | 423-431 |
| | p35 | Sarcome Meth (induit par un carcinogène) | H-2 K ^d | KYICNSSCM | 232-240 |
| | ras ^d | - | H-2 K ^b | <i>L</i> EEYSAM | 61-67 |
| | ras ^d | - | H-2 K ^b | <i>G</i> KEEYSAM | 60-67 |
| Homme | ras ^d | - | H-2 I-A ^d | KLVVVGVAVGVGKS | 5-17 |
| | MUM-1 | Mélanome | HLA-B44 | EEKLIVVLF | 30-38 |
| | CDK4 | Mélanome | HLA-A2 | ACDPHSGHFV | 23-32 |
| | β-caténine | Mélanome | HLA-A24 | SYLDSGIHF | 29-37 |
| | HLA-A2 ^e | Carcinome à cellules rénales | - | - | - |
| Bcr-abl(b3a2) | La leucémie myéloïde chronique | HLA-DR4 | ATGFKQSSKALQRPVAS | - | |

a : Le résidu modifié par la mutation est en italique.

b : Le gène gag d'une particule A intracisternelle (IAP) est activé par transposition de l'IAP.

c : Le peptide dérive du produit du gène env du MuLV qui semble être transcrit dans plusieurs tumeurs.

d : Peptide sélectionné dans la séquence ras et utilisé pour stimuler les CTL in vitro.

e : La mutation affecte le gène HLA-A2 lui-même.

D. Antigènes viraux

Les antigènes dérivés de virus oncogènes constituent une autre catégorie d'antigènes tumoraux potentiellement utiles. Un certain nombre d'antigènes viraux ont été étudiés en détail

sur les tumeurs de souris induites par le virus et se sont avérés pertinents pour le rejet de la tumeur. Chez l'homme, le meilleur exemple est l'oncoprotéine E7 du virus du papillome humain 16 (HPV-16), présent dans la plupart des carcinomes du col utérin. Des peptides dérivés de cette protéine et sélectionnés pour leur forte affinité de liaison à HLA-A2 ont été utilisés pour stimuler les lymphocytes CD8 d'individus normaux. Les clones CTL obtenus contre trois de ces peptides se sont avérés reconnaître non seulement les cellules à impulsions peptidiques, mais également une lignée de carcinome du col utérin exprimant HLA-A2 et HPV-16 E7, démontrant que ces peptides correspondent bien à de véritables antigènes du carcinome cervical.

2.5.2.2. Antigènes tumoraux reconnus par des anticorps monoclonaux

Des progrès considérables ont été réalisés dans l'identification d'antigènes définis associés à la tumeur, reconnus par les anticorps monoclonaux (AcM). Le processus d'identification et de caractérisation des antigènes tumoraux reconnus par les AcM implique une analyse sérologique minutieuse et un criblage immunohistochimique rigoureux des tissus normaux et des tumeurs. Ces méthodes diffèrent de l'approche génétique utilisée pour identifier les antigènes reconnus par les CTL, et la nature moléculaire de nombre de ces antigènes est donc moins bien définie.

L'expression d'antigènes reconnus par les AcM dans les tumeurs est souvent hétérogène et une perte d'expression peut être observée lors de la transformation anaplastique et à la suite d'une fuite immunitaire. La classification des antigènes tumoraux reconnus par les AcM est généralement effectuée sur la base de la structure de l'antigène et du composant anatomique qui exprime l'antigène dans la tumeur.

A. Antigènes de différenciation dans les hémopathies malignes

Les leucémies et les lymphomes sont caractérisés par des cellules malignes qui expriment des immunophénotypes qui se trouvent à des stades choisis de la différenciation hématopoïétique. Ces antigènes sont généralement associés à des groupements CD, ont une structure glycoprotéique, mais ne sont pas toujours strictement spécifiques à la tumeur ou à la lignée. La cible antigène idéale pour l'AcM dirigé contre les leucémies ou les lymphomes a une expression élevée dans les cellules thermoplastiques, mais pas sur les cellules normales ni les progéniteurs de la moelle osseuse. Les antigènes les plus ciblés par les AcM dans les essais cliniques sur la leucémie et le lymphome sont détaillés dans le tableau suivant. L'accessibilité des cellules de leucémie et de lymphome aux AcM circulants offre des avantages distincts en termes de ciblage antigénique par rapport aux tumeurs solides.

Antigènes associés aux tumeurs reconnus par des anticorps monoclonaux

| Catégories | Exemples des antigènes | Types de tumeurs exprimant couramment les antigènes | |
|---------------------------------------|--|--|--|
| Antigènes de différenciation | CD5 | Leucémie / lymphome à cellules T | |
| | CD19, CD20, CD21, CD25, CD37 | Lymphome à cellules B | |
| | CD30 | Lymphome de Hodgkin | |
| | CD33, CD45 | Leucémie myéloïde aiguë | |
| | CAMPATH-1 (CDw52) | Tumeurs malignes lymphoïdes (cellules T et B) | |
| | HLA-DR | Lymphome à cellules B | |
| | Glycoprotéines | CEA, TAG-72, Ep-CAM, MUC1 | Tumeurs épithéliales (sein, côlon, poumon) |
| | | Protéine liant le folate | Tumeurs de l'ovaire |
| | | A33 | Carcinome colorectal |
| | | G250 | Carcinome rénal |
| | | PSMA | Carcinome de la prostate |
| | Glycolipides | Gangliosides (par exemple, GD2, GD3, GM2) | Tumeurs neuroectodermiques |
| | | Glucides | Le ^y |
| | CA-125 | | Carcinome ovarien |
| | antigènes intracellulaires | PSA | Carcinome de la prostate |
| Récepteurs du facteur de croissance | Ferritine | Maladie de Hodgkin, hépatome | |
| | EGFR | Tumeurs des poumons, du sein, de la tête et du cou | |
| | p185 ^{HER2} | Tumeurs du sein et des ovaires | |
| Produits de gènes mutés | Récepteur d'IL-2 | Néoplasmes des cellules T et B | |
| | δEGFR | Glioblastome multiforme, cancer du sein et du poumon | |
| Antigènes stromaux / extracellulaires | FAPα | Cancers épithéliaux (sein, côlon, poumon) | |
| | Ténascine | Glioblastome multiforme | |
| Antigènes endothéliaux / vasculaires | Métalloprotéinases | Tumeurs épithéliales | |
| | Endosialine, VEGF, α _v β ₃ | Vascularisation tumorale | |
| Apoptose | Apo-1 | Tumeurs à cellules B | |

B. Antigènes de surface cellulaire

a. Glycoprotéines

Les antigènes de glycoprotéines exprimés à la surface cellulaire de tumeurs solides sont des cibles communes pour les anticorps monoclonaux. Ces antigènes ont des profils d'expression variables dans les tissus normaux, allant d'une distribution tissulaire étendue à une expression restreinte, et se retrouvent principalement dans les tumeurs d'origine épithéliale (tableau ci-haut). L'antigène carcino-embryonnaire (CEA), l'antigène TAG-72 et le produit du

gène MUC1, le PEM (mucine épithéliale polymorphe "polymorphic epithelial mucin"), ont été les antigènes tumoraux les plus étudiés dans des modèles animaux et les essais cliniques avec des AcM. Tous ces antigènes ont une expression variable dans une large gamme de tumeurs épithéliales, et des formes solubles de ces antigènes peuvent être trouvées dans le sérum de patients atteints de ces tumeurs. Ensemble PEM et Ep-CAM (une glycoprotéine de 40 kDa ciblée par l'AcM 17-1A et impliquée dans l'adhésion cellulaire) sont exprimées dans les tumeurs épithéliales et dans une large gamme de tissus épithéliaux normaux. Dans la plupart des tumeurs exprimant ces antigènes, une régulation négative de l'antigène dans les métastases par rapport aux tumeurs primaires, qui a été rapportée. Les antigènes de glycoprotéines ayant une expression tumorale distincte élevée et une distribution tissulaire normale restreinte incluent A33 et G250. L'antigène A33 est une protéine de 43 kDa qui a une expression limitée dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du gros intestin et qui est exprimée sur plus de 95% des cellules de carcinome colorectal humain. Lorsque l'AcM se fixe à l'antigène A33, le complexe anticorps-antigène est internalisé et séquestré dans des vésicules. Il a été démontré que la structure unique de l'antigène A33 consiste en une glycoprotéine transmembranaire avec une structure de domaine extracellulaire liée au sous-groupe CD2 de la superfamille des immunoglobulines. La fonction de cet antigène n'a pas encore été définie, mais peut être un récepteur de surface cellulaire ou impliqué dans l'adhésion des cellules. Le G250 est un autre antigène glycoprotéique dont l'expression dans les tissus normaux est restreinte. Il est exprimé dans plus de 90% des cancers du rein à cellules claires mais pas dans les reins normaux. Il est également exprimé dans l'épithélium biliaire. La structure précise de cet antigène n'est pas définie, mais on pense qu'elle est liée à l'anhydrase carbonique. Les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes A33 et G250 ont été étudiés dans le cadre d'une étude clinique et ont démontré d'excellentes caractéristiques de ciblage indiquant l'adéquation de ces antigènes à un traitement dirigé contre le cancer.

b. Glycolipides

Les gangliosides sont des glycolipides exprimés dans des cellules animales. Ils consistent en un fragment glucidique lié à une molécule de céramide qui est ancrée dans la bicouche lipidique de la membrane superficielle de la cellule. La transformation maligne des cellules peut être associée à des modifications qualitatives et quantitatives de l'expression des gangliosides à la surface des cellules malignes, qui peuvent être reconnues immunologiquement. La synthèse des gangliosides peut être incomplète et entraîner une accumulation de précurseur, par ex. GD2, GD3, GM2, GM3, trouvés sur des tumeurs d'origine neuroectodermique (mélanome, neuroblastome, astrocytome et carcinome pulmonaire à petites

cellules). Des modifications des portions glucides ou céramides peuvent également être observées. La forte expression de certains gangliosides dans les membranes des cellules tumorales peut également entraîner des modifications conformationnelles des épitopes d'antigènes, qui peuvent contraindre les anticorps monoclonaux à se lier. La fonction des gangliosides n'est pas claire, mais on pense qu'elle implique la croissance et la différenciation des cellules.

c. Glucides

Une gamme de déterminants glucidiques liés à des lipides ou à des protéines a été identifiée par analyse sérologique de cellules cancéreuses humaines avec des AcM de souris. Les antigènes liés aux groupes sanguins (par exemple, Le^h et Le^y) ont fait l'objet de beaucoup d'attention en raison de leur niveau élevé d'expression dans les tumeurs épithéliales, bien que certaines expressions soient également présentes dans les tissus normaux. L'antigène Le^y est exprimé dans plus de 70% des cancers épithéliaux (y compris les cancers du sein, du côlon, des ovaires et du poumon) et constitue une cible attrayante pour une thérapie dirigée par un AcM. Un certain nombre d'AcM de souris contre l'antigène Le^y ont été produits, bien qu'un problème récurrent avec ces AcM soit un élément de réactivité croisée avec les structures Le^x et H-type 2 et d'agglutination des globules rouges humains. Une analyse sérologique minutieuse a été nécessaire pour identifier les AcM anti-Le^y présentant une réactivité croisée minimale ou nulle avec d'autres antigènes liés aux groupes sanguins : un certain nombre ont été étudiés au cours d'essais cliniques et font actuellement l'objet de recherches.

C. Récepteurs du facteur de croissance

Les facteurs de croissance peuvent être surexprimés dans les tumeurs et la croissance ou la survie de certaines tumeurs peut dépendre partiellement de la production autocrine ou paracrine du facteur de croissance épidermique (EGF) ou du facteur de croissance transformant α (TGF α). Ces deux facteurs partagent un récepteur commun, le récepteur de l'EGF, qui est exprimé dans les tissus normaux, en particulier le foie), mais dont l'expression est accrue dans certaines tumeurs (par exemple les poumons et le sein). Des modèles in vivo démontrent que les anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'EGF inhibent la croissance des xénogreffes du cancer du sein, et des essais cliniques menés avec des anticorps monoclonaux anti-EGF ont également démontré un ciblage spécifique. Un récepteur EGF mutant tronqué (δ EGFR) contenant une délétion de 267 acides aminés du domaine extracellulaire et ne se liant pas à EGF a également été identifié dans des gliomes humains. L'expression de δ EGFR confère une tumorigénicité accrue aux cellules de glioblastome et est associée à une prolifération accrue et à une apoptose réduite. Des AcM contre le δ EGFR ont été générés et pourraient représenter

une nouvelle stratégie importante pour le traitement du gliome. Un récepteur supplémentaire important est le récepteur transmembranaire de la glycoprotéine p185 her2 (codé par l'oncogène HER-2 / neu). p185 her2 a une homologie partielle avec le récepteur de l'EGF, est surexprimée dans 25 à 30% des cancers du sein et est associée à un pire pronostic chez les patientes atteintes d'une maladie primaire impliquant des ganglions axillaires. Il a été démontré que les AcM dirigés contre p185 her2 inhibent la croissance des tumeurs chez les modèles animaux et des cellules transformées exprimant des quantités élevées de ce récepteur. Des réponses objectives ont été rapportées chez des patientes atteintes d'un carcinome du sein métastatique surexprimant p185 her2 avec des AcM dirigés contre le domaine extracellulaire, indiquant l'utilisation potentielle d'un traitement ciblé par le facteur de croissance.

D. Antigènes stromaux

La protéine d'activation des fibroblastes humains α ex (FAP α) est un antigène de surface cellulaire exprimé dans les fibroblastes stromaux réactifs d'un certain nombre de cancers épithéliaux, notamment du côlon, du sein et du poumon. La FAP α est absente ou exprimée à des niveaux faibles dans la plupart des tissus adultes, mais elle est observée dans la cicatrisation des plaies et de manière transitoire dans certains tissus mésenchymateux du fœtus. La FAP α a une homologie structurale avec CD26, mais semble être fonctionnellement distincte, et l'expression de la FAP α peut être induite in vitro sur des fibroblastes en culture par divers facteurs de croissance (par exemple, le TGF β). Le ciblage réussi des anticorps monoclonaux contre FAP α exprimé dans le stroma tumoral a été démontrée dans des essais cliniques chez des patients atteints d'un cancer colorectal. La ténascine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire présente dans les tissus en développement au cours de la période fœtale et exprimée dans le stroma de nombreuses tumeurs de l'adulte, en particulier du glioblastome multiforme, est un autre antigène cible du stroma.

E. Angiogenèse et apoptose

Des études sérologiques ont identifié un certain nombre d'antigènes exprimés sélectivement sur l'endothélium néovasculaire de tumeurs, dont l'endosialine, le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR) et l'intégrine α v β 3. En raison de l'expression restreinte de ces antigènes dans le système vasculaire tumoral, l'effet antitumoral potentiel des inhibiteurs de ces antigènes a suscité un vif intérêt en tant que moyen de tuer des cellules tumorales sans nécessiter de ciblage spécifique des cellules tumorales. Le rôle de l'apoptose dans la médiation de la mort cellulaire tumorale est également à l'étude avec des AcM dirigés contre divers antigènes, dont Fas (CD95, Apo-1).

3. Relation structure-fonction de la cellule

3.1. Biosynthèse des lipides, des protéines membranaires et de protéines de sécrétion

Les fonctions des compartiments endomembranaires sont très variées. Elles sont essentielles dans la mesure où elles participent à la fois :

- à l'édification des constituants cellulaires (synthèse de lipides et de protéines des membranes, synthèse des protéines enzymatiques destinées à être intégrées aux membranes) ;
- à la machinerie du métabolisme, par tous les mécanismes de sécrétion, de digestion, de détoxification...

3.1.1. Biosynthèse des lipides et des glycolipides membranaires

La biosynthèse des phospholipides est importante puisque cette synthèse va permettre d'assurer le renouvellement des membranes.

Dans les cellules eucaryotiques, de nouveaux phospholipides sont synthétisés au niveau de la surface cytosolique du réticulum endoplasmique (ER). Les membranes du réticulum possèdent en effet tout l'équipement enzymatique nécessaire pour faire de nombreuses réactions du métabolisme des lipides. La synthèse se fait par élongation et désaturation, en utilisant des acides gras cytosoliques libres comme substrats, les enzymes déposent exclusivement les phospholipides nouvellement synthétisés dans la moitié cytosolique de la bicouche.

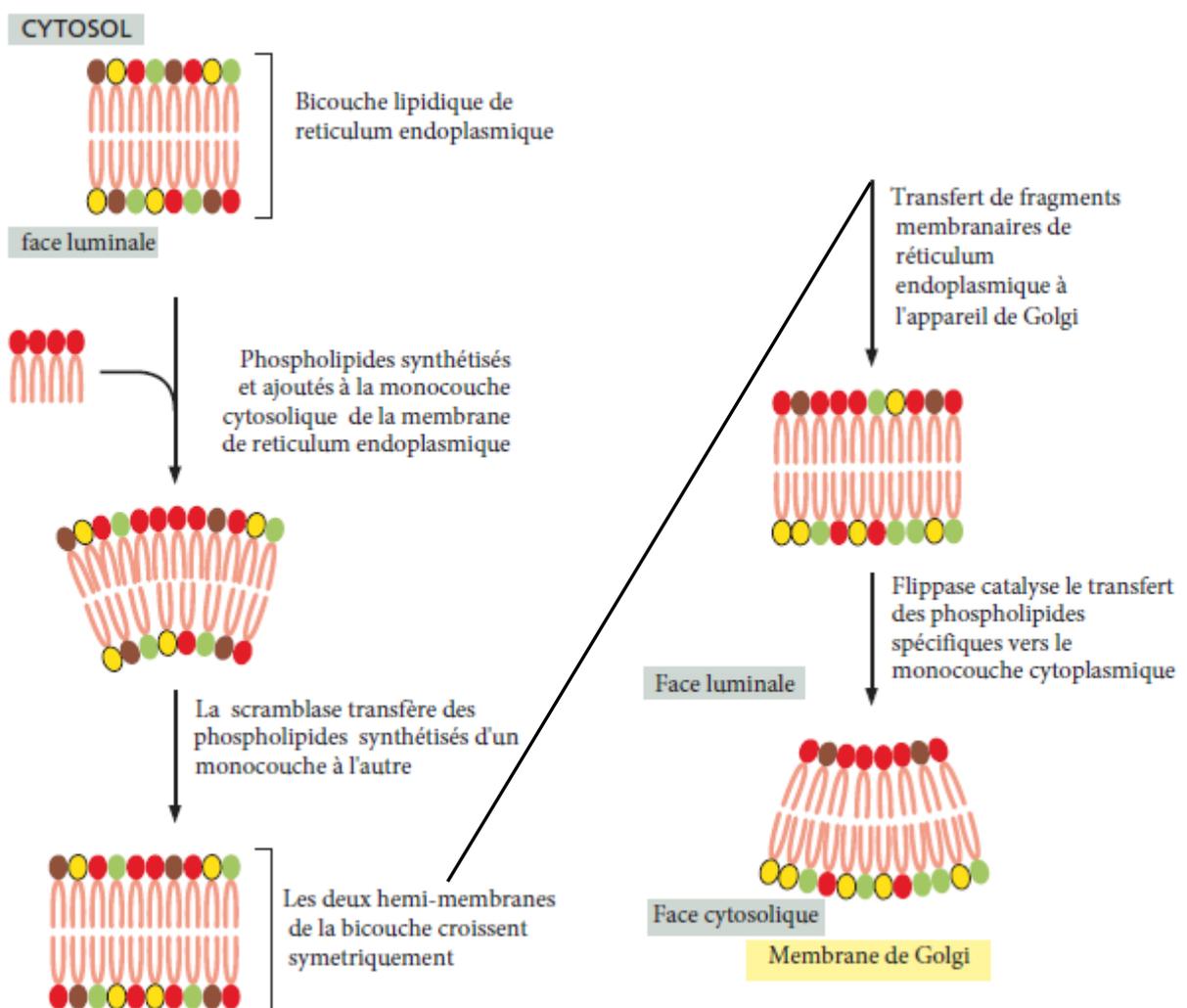
Malgré ceci, les membranes cellulaires réussissent à croître uniformément, malgré que le « flip-flop » des phospholipides (mouvement de bascule spontané des lipides d'une couche à l'autre dans la membrane) ne semble pas exister. Alors, comment les nouveaux phospholipides arrivent-ils à la monocouche opposée ?

Le transfert des phospholipides néosynthétisés d'une monocouche à l'autre au niveau du réticulum est catalysé par des enzymes appelées scramblases, qui déplacent les phospholipides sélectionnés au hasard d'une moitié de la bicouche lipidique et les insèrent dans l'autre. À la suite duquel, les phospholipides nouvellement synthétisés sont redistribués également entre chaque monocouche de la membrane de réticulum endoplasmique.

Les morceaux de membrane réduisent continuellement le réticulum endoplasmique pour former de petites vésicules sphériques qui fusionnent alors avec d'autres membranes, comme celles de l'appareil de Golgi. Des bulles de vésicules supplémentaires provenant du Golgi sont incorporées dans la membrane plasmique.

La plupart des membranes cellulaires sont asymétriques : les deux moitiés de la bicouche comprennent souvent des groupes de phospholipides intégrés différemment. Mais si les membranes émergent de l'ER avec un ensemble de phospholipides uniformément mélangés,

d'où vient cette asymétrie ? Cela commence dans l'appareil de Golgi. La membrane de Golgi contient une autre famille d'enzyme de manipulation des phospholipides appelée flippases. Ces enzymes éliminent les phospholipides spécifiques du côté de la bicouche face à l'espace luminal et les basculent dans la monocouche qui fait face au cytosol. L'action de ces flippases et d'enzymes similaires dans la membrane plasmique initie et maintient l'agencement asymétrique des phospholipides qui est caractéristique des membranes des cellules animales. Cette asymétrie est conservée à mesure que les membranes bourgeonnent de l'appareil de Golgi et se fondent avec une organelle ou avec la membrane plasmique. Cela signifie que tous les membranes cellulaires ont des visages distincts « à l'intérieur » et « à l'extérieurs ».



Les enzymes biosynthétiques liées à la monocouche cytosolique de la membrane de réticulum endoplasmique produisent de nouveaux phospholipides à partir d'acides gras libres et les insèrent dans la monocouche cytosolique. Les enzymes appelées scramblases transfèrent au hasard des molécules de phospholipides d'une monocouche à l'autre, ce qui permet à la membrane de croître en tant que bicouche.

Lorsque les fractions membranaires quittent de réticulum endoplasmique et sont incorporées dans l'appareil de Golgi, elles rencontrent des enzymes appelées flippases, qui éliminent sélectivement la phosphatidylsérine (vert clair) et la phosphatidyléthanolamine (jaune) de la monocouche noncytosolique et les basculent vers le côté cytosolique. Ce transfert laisse la phosphatidylcholine (rouge) et la sphingomyéline (brun) concentrée dans la monocouche noncytosolique.

Cette conservation de l'orientation s'applique non seulement aux phospholipides qui composent la membrane, mais à toutes les protéines qui pourraient être insérées dans la membrane.

Parmi les lipides, ceux qui présentent la répartition la plus spectaculaire dans les membranes cellulaires sont les glycolipides, qui sont principalement situés dans la membrane plasmique, et seulement dans la moitié non-cytosolique de la bicouche. Leurs groupes de sucre font face à l'extérieur de la cellule, où ils font partie d'une couche continue de glucides qui entoure et protège les cellules animales. Les molécules de glycolipides acquièrent leurs groupes de sucre dans l'appareil de Golgi, où les enzymes qui engendrent cette modification chimique sont confinées. Ces enzymes sont orientées de sorte que les sucres sont ajoutés uniquement aux molécules lipidiques dans la moitié non-cytosolique de la bicouche. Une fois qu'une molécule de glycolipide a été créée de cette façon, elle reste piégée dans cette monocouche, car il n'y a pas de flippase qui transfèrent les glycolipides vers le côté cytosolique. Ainsi, lorsqu'une molécule de glycolipide est finalement livrée à la membrane plasmique, elle expose ses sucres à l'extérieur de la cellule.

La biosynthèse des triglycérides est effectuée par le réticulum endoplasmique lisse (REL). Dans les adipocytes par exemple, c'est-à-dire des cellules situées sous la peau et dont la fonction est de stocker des lipides, le (REL) est particulièrement abondant.

La biosynthèse du cholestérol dans les cellules animales, s'effectue surtout dans les hépatocytes où un important (REL) est développé. C'est aussi le réticulum endoplasmique qui est engagé dans la synthèse des hormones.

3.1.2. Biosynthèse, transfert et concentration de (glyco)protéines

A. Ségrégation des protéines

On peut distinguer deux types de protéines : a) les protéines synthétisées sur les polysomes libres qui constituent les protéines cytosoliques ; b) les protéines synthétisées sur les polysomes liés au réticulum endoplasmique qui constituent les protéines de sécrétion (ou d'exportation).

Plusieurs questions se posent : comment se fait le choix entre protéines du cytosol, protéines exportées, protéines de stockage ?

Comment les polypeptides synthétisés à l'extérieur du réticulum endoplasmique rugueux (RER) peuvent-ils gagner la lumière de ce compartiment ? Comment les ribosomes sont-ils dirigés vers le réticulum endoplasmique dans le cas des protéines non cytosoliques ? Où et comment les protéines vont-elles cheminer ? Nous allons tenter de répondre à certaines de ces questions.

Les protéines de sécrétion nouvellement synthétisées sont contenues dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux (RER).

La traversée de la membrane du RER est permise par une séquence signale dans le polypeptide naissant (donc de codons correspondants dans l'ARNm) qui détermine la synthèse sur le RER des protéines destinées à être incorporées dans les cavités du réticulum endoplasmique. Le schéma de la figure ci-dessous résume les mécanismes (encore hypothétiques pour certaines étapes) de la synthèse d'une protéine exportable.

Les ribosomes, libres dans le cytosol, se fixent sur l'ARNm au niveau d'un codon AUG (codon de départ). L'extrémité aminoterminal du polypeptide est d'abord une séquence constituée par 16 à 30 acides aminés : c'est la séquence signale (parfois appelée peptide signal ou séquence-guide). Cette séquence comprend généralement quelques acides aminés chargés positivement à l'extrémité N-terminale puis une douzaine d'acides aminés hydrophobes. La séquence signal est guidée au réticulum endoplasmique par l'intervention de deux systèmes :

- une particule qui reconnaît le peptide signal, appelée particule **SRP** (signal recognition particle). C'est une particule cytosolique faite de 6 polypeptides différents et d'un ARN de 300 nucléotides. La particule SRP s'attache à la fois au ribosome et au peptide signal ; elle fait la navette entre le cytosol et le réticulum endoplasmique ;
- un récepteur de la particule SRP qui est présent sur la face cytosolique du RER et qui permet l'arrimage du ribosome sur le RER.

Le rôle exact de la particule SRP et de son récepteur n'est pas encore parfaitement compris.

Des expériences récentes ont montré que la SRP bloque la chaîne naissante à 70 acides aminés, soit la longueur du peptide-signal plus 30 acides aminés encore enfouis dans la gorge du ribosome. Le récepteur de la SRP lèverait ce blocage et permettrait la liaison du ribosome à la membrane du RER.

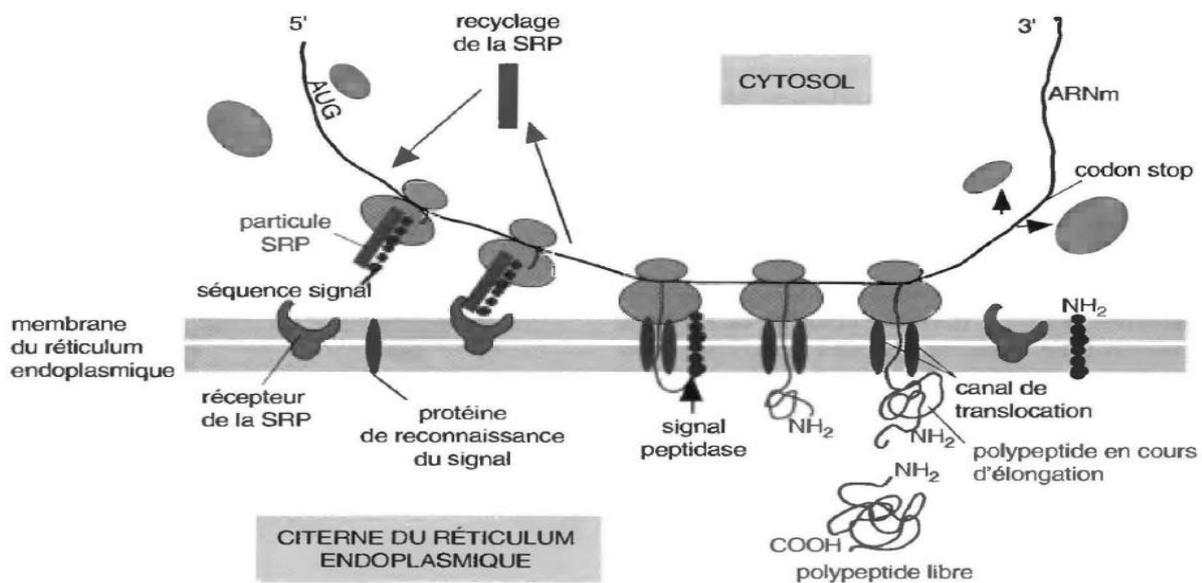
Sans que les mécanismes en soient très clairs, il semble que, lors de la fixation du complexe ribosome + particule SRP sur le récepteur de la SRP, la séquence-guide soit reconnue par un récepteur de la séquence signale, protéine intrinsèque de la membrane du RER. Ceci conduit à l'organisation d'un tunnel transmembranaire, le canal de translocation, grâce à des protéines réceptrices des ribosomes, permettant ainsi le passage du polypeptide en cours de synthèse dans la citerne de RER. Le polypeptide est alors synthétisé dans son entier par lecture du message de l'ARNm.

Dans la cavité du RER la séquence signale est très rapidement reconnue et excisée par l'intervention d'une **signal-peptidase** (ou **clipase**) présente sur la face luminale du RER. A la

fin de l'élongation, c'est-à-dire lors de la lecture du codon stop, le polypeptide (donc dépourvu de son peptide signal) peut être libéré dans la cavité du RER.

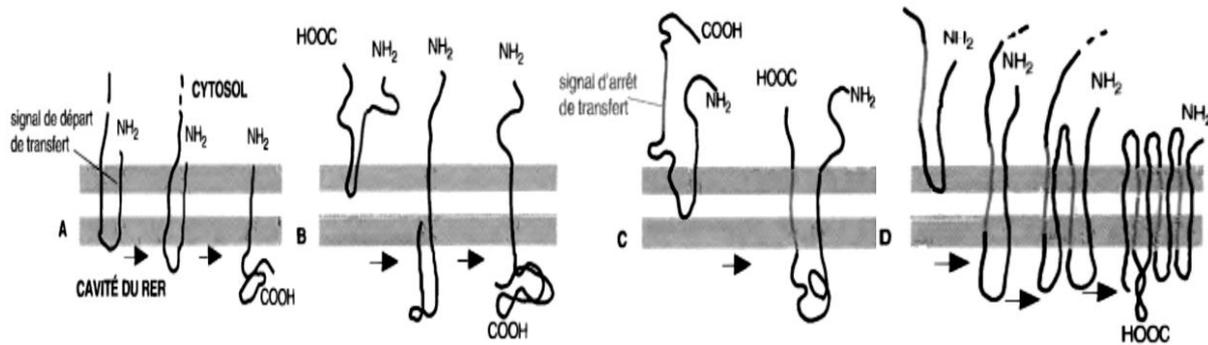
La séquence signal est donc une séquence transitoire. C'est la raison pour laquelle elle n'a été découverte qu'assez tardivement, dans les années 1970, par BLOBEL et son équipe. C'est cette séquence en bases qui détermine si le polysome sera libre ou associé au RER.

Les protéines intrinsèques sont orientées dans la membrane par des séquences topogéniques. Certaines de ces protéines sont au départ synthétisées comme des protéines exportables, mais un signal constitué par exemple par une longue séquence hydrophobe interrompt le transfert. La protéine produite possède son extrémité N-terminale dans la cavité du RER et la C-terminale dans le cytosol.



Biosynthèse d'une protéine exportable. Importance de la séquence signal et des protéines de reconnaissance.

Un exemple de protéine élaborée ainsi est la glycophorine. Il semble qu'il existe dans le polypeptide des « séquences topogéniques » qui permettent l'ancrage de régions polypeptidiques dans la membrane et qui sont de deux types : des séquences signal de départ de transfert et des séquences signal d'arrêt de transfert. Selon le nombre et la place de ces séquences topogéniques dans le polypeptide on aboutira à des intégrations de protéines différentes dans la membrane (figure ci-dessous).



Séquences topogéniques et protéines transmembranaires. Schémas hypothétiques.

A) Signal de départ de transfert au début du polypeptide, à l'extrémité NH₂. La protéine possède un seul domaine tourné vers la cavité du RER.

B) Signal de départ de transfert au milieu du polypeptide. La protéine possède deux domaines : l'un cytoplasmique et l'autre luminal.

C) et D) Alternance de signal de départ de transfert et d'arrêt de transfert conduisant à des protéines transmembranaires traversant la membrane un plus ou moins grand nombre de fois (sous forme d'hélice α).

B. Transport des protéines

Une expérience a permis de montrer les voies que pouvaient suivre les protéines dans la cellule après leur synthèse.

Mise en évidence par autoradiographie

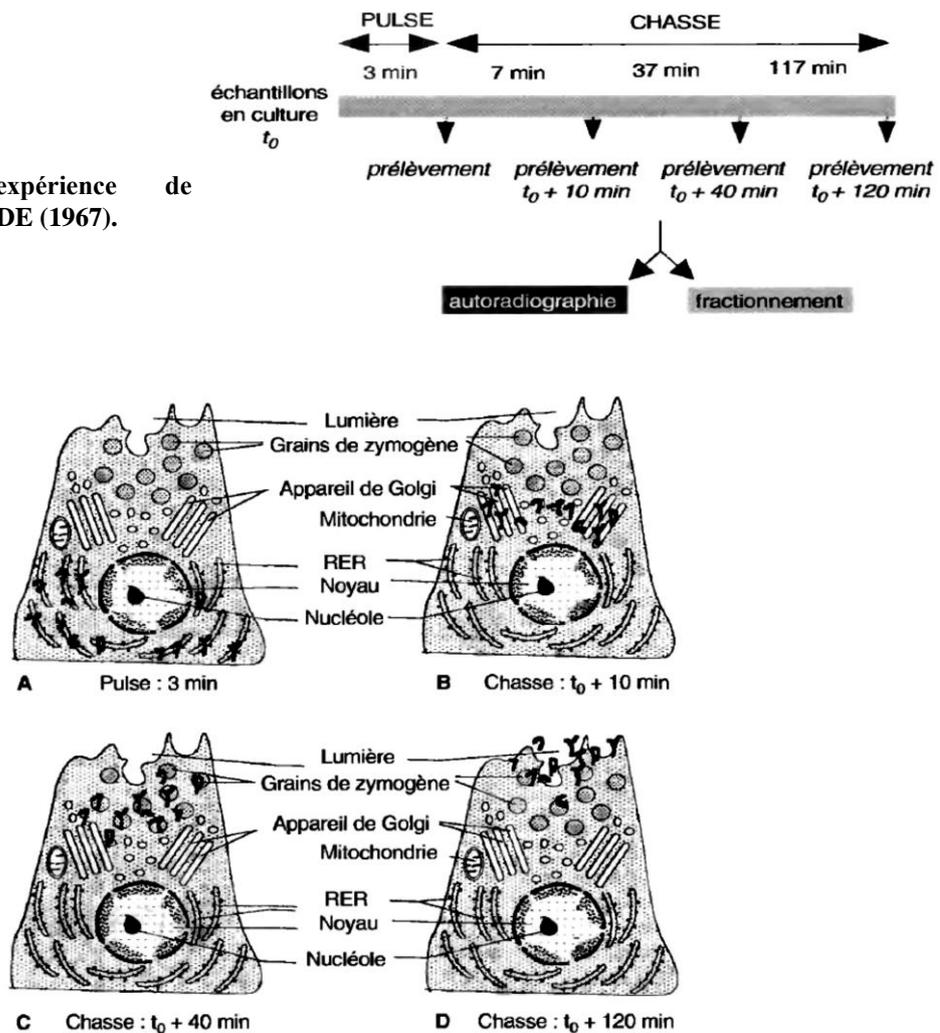
C'est l'expérience effectuée par JAMIESON et PALADE en 1967. Des tranches de pancréas de cobaye sont mises en culture en boîte de Pétri. De la leucine 3H est ajoutée pendant un temps bref (3 minutes) à la culture : c'est un pulse.

Quelques échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une observation en microscopie électronique. Un marquage est observé à la base des cellules, dans la région où des nappes de RER sont très abondantes.

La leucine a été incorporée pendant le pulse dans le réticulum endoplasmique granulaire : la synthèse des protéines a eu lieu dans les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique. Après le pulse, d'autres échantillons sont transférés dans un milieu froid (c'est-à-dire un milieu où la leucine est non radioactive) et maintenus en incubation pendant des périodes de chasse de 7, 37 et 117 minutes. À la fin de chaque période de chasse des échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour la microscopie électronique. Après une chasse de 7 minutes, donc 10 minutes après le début de l'expérience, le marquage est localisé dans la partie médiane de la cellule, riche en dictyosomes. Après 40 minutes, le marquage est localisé sur les vésicules de sécrétion immatures, voisines de l'appareil de Golgi, et appelées grains de zymogène dans ce tissu et dans l'appareil de Golgi. Deux heures après le début de l'expérience, le marquage se retrouve dans les grains de zymogène matures, dans ceux en cours d'exocytose et dans la lumière de l'acinus pancréatique. Cette expérience de chasse indique que les protéines radioactives ont migré après leur synthèse : elles passent dans l'appareil de Golgi où elles

semblent se concentrer (les grains d'argent paraissent nombreux sur une faible surface) ; puis elles sont enfermées dans un grain de sécrétion et libérées à l'extérieur de la cellule deux heures après leur synthèse. Il y a donc eu : **transport, concentration et export des protéines**, apparemment via les compartiments endomembranaires.

Protocole de l'expérience de JAMIESON et PALADE (1967).



Expérience de Jamieson et Palade (1967).

A) Pulse dans la leucine tritiée pendant 3 minutes. B, C et D) Chasse (respectivement 7, 37 et 117 minutes).

C. Maturation des protéines

Le long de ce cheminement les protéines subissent de nombreuses transformations. Elles sont de plusieurs sortes : la formation de liaisons disulfure (les ponts S-S établis entre les résidus cystéine), le pliage des protéines leur permettant d'acquérir une conformation tridimensionnelle, des clivages protéolytiques aboutissant à l'excision de certaines séquences

polypeptidiques, l'addition d'oligosaccharides et la modification éventuelle de ces séquences oligosaccharidiques (glycosylation et élagage).

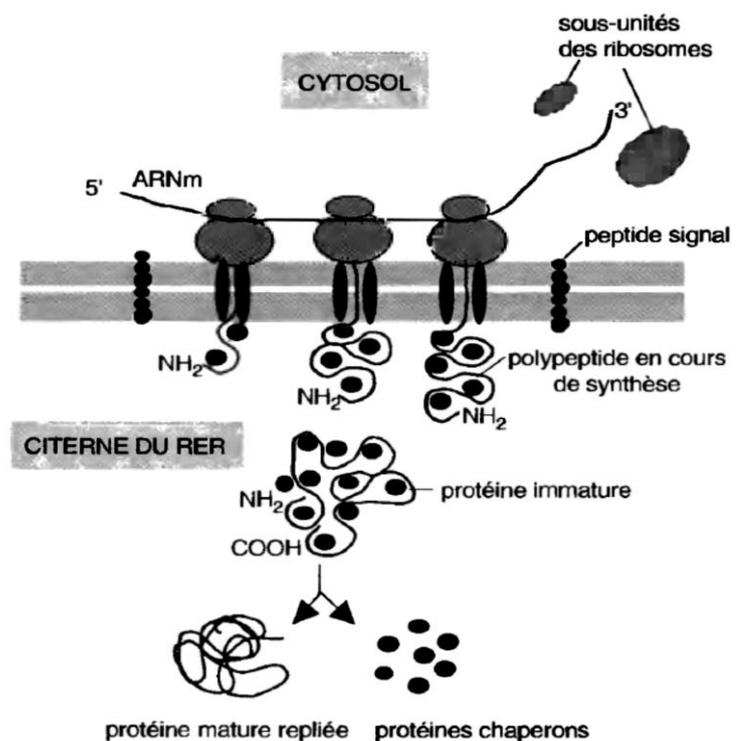
Toutes ces transformations permettent à la protéine d'acquérir son état définitif : c'est la maturation des protéines.

- Repliement des protéines

En ce qui concerne le repliement des protéines, nous savons qu'il est déterminé par la séquence primaire du polypeptide mais sous le contrôle de protéines chaperons. En se fixant sur le polypeptide déplié au fur et à mesure de sa synthèse, aussi bien au niveau des polysomes libres dans le cytosol que des polysomes liés aux membranes du RER, les protéines chaperons recouvrent apparemment les acides aminés hydrophobes, les empêchant d'interagir avec d'autres acides aminés hydrophobes voisins dans la même chaîne ou dans une protéine voisine. Cette protection évite probablement un repliement prématuré de la protéine, minimise les risques de repliement incorrect et empêche l'agrégation entre polypeptides voisins.

Dans ce rôle il semble que plusieurs protéines chaperons agissent en coopération (HSP 70, HSP 40, GroEL...). La liste n'est pas limitative. Le « chaperonnage » est actuellement un domaine de biologie cellulaire dont l'étude est en plein essor.

Rôle possible des protéines chaperons dans le contrôle du repliement des polypeptides en cours de synthèse.



- Clivages protéolytiques

La maturation de l'insuline peut être prise comme exemple d'une transformation impliquant un clivage protéolytique important. L'insuline est une protéine hormonale circulant

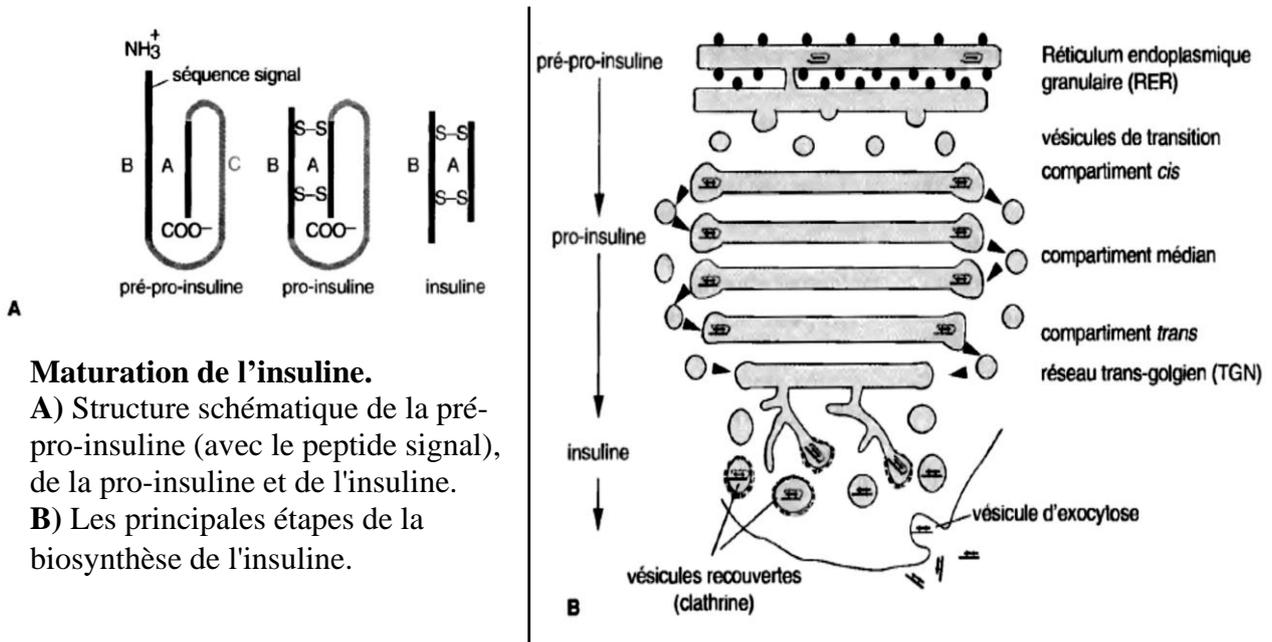
dans le sang et réglant l'entrée de glucose dans les cellules. Elle est synthétisée par les cellules β du pancréas. C'est une protéine de sécrétion qui comporte donc une séquence signal permettant son entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique. L'insuline mature est un polypeptide comprenant deux chaînes (la chaîne A et la chaîne B) réunies par des ponts disulfures. En fait, l'insuline dérive d'un précurseur, la pro-insuline, qui comprend une troisième chaîne, le peptide C.

Une expérience d'immunocytochimie a permis de repérer dans les cellules β la localisation de la pro-insuline et de l'insuline. Des anticorps sont préparés contre les deux molécules : on obtient ainsi des anticorps anti-pro-insuline et des anticorps anti-insuline. Les anticorps sont utilisés comme sondes spécifiques pour rechercher à l'échelle ultrastructurale la localisation de l'antigène correspondant. Avec les anticorps anti-pro-insuline on observe un marquage dans l'extrémité des saccules de l'appareil de Golgi et les vésicules qui en dérivent ainsi que dans des vésicules recouvertes de clathrine (vésicules mantelées) voisines de la face trans du dictyosome. Avec les anticorps anti-insuline on observe un marquage sur les vésicules de sécrétion non mantelées et dans des vésicules en cours d'exocytose. De tels résultats indiquent que le clivage protéolytique a eu lieu au niveau des vésicules recouvertes.

On peut résumer les principales étapes de la maturation de l'insuline. La synthèse a lieu sur les polysomes liés au RER où grâce à une séquence signal (le segment pré) le polypeptide « appelé pré-pro-insuline » est injecté dans la citerne du RER. Le peptide signal est rapidement éliminé, des liaisons S-S se forment conduisant à la formation de la pro-insuline.

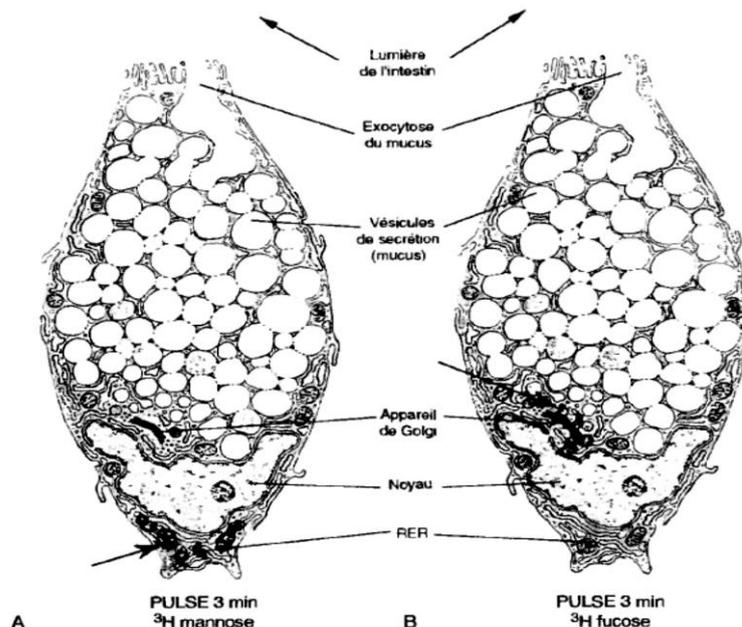
Par des vésicules de transition, la pro-insuline est amenée sur la face cis d'un dictyosome et transite dans les compartiments médians par des sauts de vésicules. Sur la face trans du dictyosome la pro-insuline est concentrée dans des vésicules mantelées, couvertes de clathrine, qui se détachent et migrent vers la surface en perdant rapidement leur manteau. C'est au cours de ce déplacement que, dans les vésicules, un clivage protéolytique de la pro-insuline a lieu : un polypeptide (le peptide C) est éliminé et la molécule qui sera exportée par exocytose est donc l'insuline mature.

Ce mécanisme de clivage protéolytique est fréquent. Beaucoup de protéines de sécrétion et de protéines membranaires sont en effet synthétisées sous une forme trop longue et inactive et doivent être amputées d'un ou de plusieurs secteurs pour devenir matures et actives : c'est le cas de l'albumine, une protéine du sérum, du glucagon, une protéine hormonale, de la protéine HA, une protéine membranaire.



- Glycosylation et élagage

Beaucoup de protéines sécrétées vont être glycosylées : ce sont en fait des glycoprotéines. Une expérience classique d'autoradiographie révèle où a lieu la glycosylation. Elle a été réalisée sur des cellules à mucus qui tapissent la lumière de l'intestin de mammifères, cellules dont la plus grande partie du volume est occupée par des vésicules de sécrétion riches en mucus (glycoprotéines dont la partie glucidique est prépondérante).



Expérience montrant la glycosylation séquentielle des protéines dans les cellules de l'intestin spécialisées dans la sécrétion du mucus.

A) Après un pulse de 3 minutes dans du mannose tritié.

B) Après un pulse de 3 minutes dans du fucose tritié.

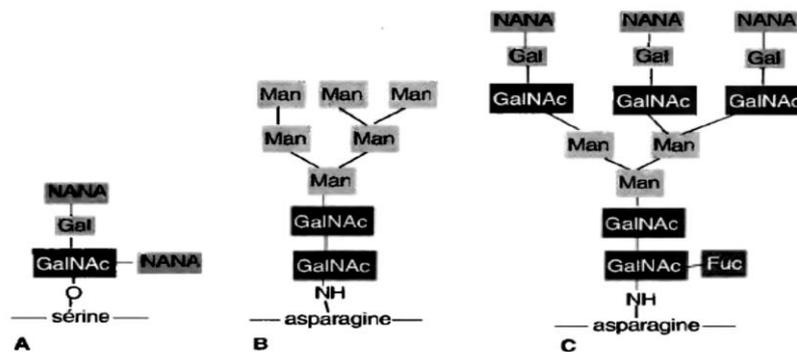
Les flèches indiquent la position des grains d'argent, donc le niveau d'incorporation des précurseurs.

Des cellules sécrétrices de l'intestin de rat (cellules à mucus) sont incubées en milieu de culture. Sur un lot de cellules on effectue un pulse de 3 minutes avec du mannose tritié (3H mannose). Sur un autre lot on effectue un pulse de 3 minutes avec du fucose 3H. Les tissus sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une autoradiographie en microscopie électronique. Le résultat des deux marquages indique que le mannose est incorporé aux protéines dès le réticulum endoplasmique, alors que le fucose est incorporé plus tardivement dans l'appareil de Golgi.

La glycosylation apparaît donc séquentielle. Elle commence dans le RER. Chez les Eucaryotes, les glucides sont fixés à 4 résidus d'acides aminés différents. On distingue :

a) les glucides liés à **O** (groupe glycol de la sérine, de la thréonine ou de l'hydroxylysine) ;

b) les glucides liés à **N** (groupe amide de l'asparagine). La structure de ces glucides est différente.



Structure d'oligosaccharides liés à N et à O.

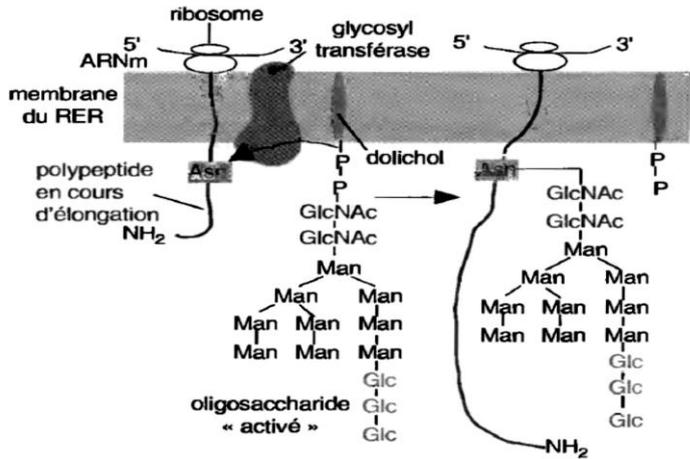
A) Oligosaccharide lié à O (oxygène des groupes hydroxyles de la sérine, ou de la thréonine).

B) Oligosaccharide lié à N (azote amide de l'asparagine), type à mannose prédominant.

C) Oligosaccharide lié à N, type complexe. NANA, acide N-acétylneuraminique ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; Man, mannose ; Fuc, fucose.

Nous prendrons comme exemple l'accrochage des glucides liés à l'asparagine (glucides N-liés). Le précurseur de tous les glucides liés à N est commun pour toutes les cellules : c'est un oligosaccharide comprenant 14 résidus glucidiques dont le mannose est un sucre très majoritaire. Ce précurseur lié à 2 phosphates, donc « activé » et fixé à un élément lipidique de la membrane du RER est transféré en bloc à la chaîne polypeptidique en cours d'élongation.

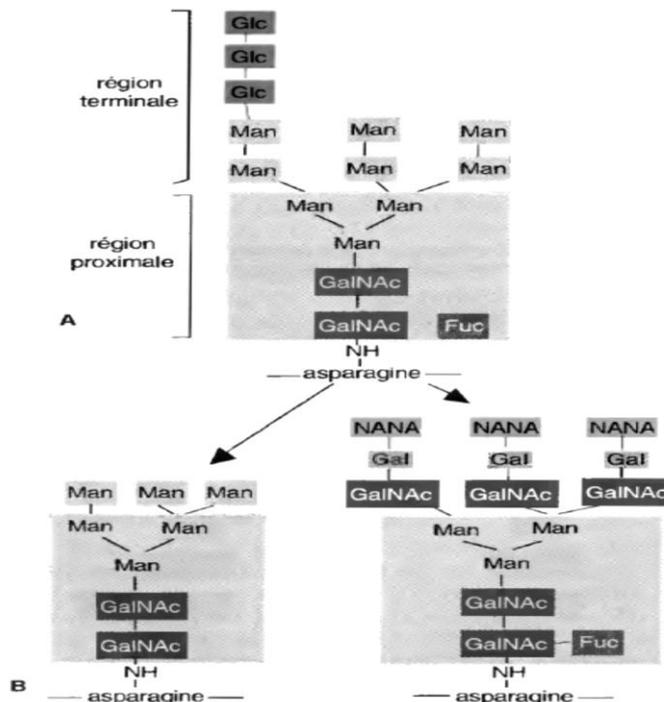
La liaison se fait grâce à une glycosyl-transférase et aux dépens de l'énergie contenue dans les liaisons phosphate.



Glycosylation dans le RER. Transfert catalytique en bloc d'un oligosaccharide activé du dolichol (son transporteur) au résidu asparagine d'un polypeptide en cours de synthèse.

On peut distinguer deux régions dans l'antenne glucidique :

- une région proximale, qui ne sera pas changée ; elle est définitive ;
- une région terminale, riche en mannose et en glucose, qui sera remaniée.



Exemples de modifications des oligosaccharides par élagage et addition de nouveaux sucres.

- A) Motif oligosaccharidique transféré en bloc pendant la synthèse sur le RER ; il comprend une région proximale (en grisé) définitive et une région terminale qui sera remaniée.
 B) Oligosaccharides matures après remaniements dans l'appareil de Golgi.

Dans l'appareil de Golgi les protéines glycosylées subissent des transformations portant sur la structure et la composition de l'oligosaccharide. Par l'action séquentielle de glycosidases qui élaguent (par exemple des mannosidases) et de glycosyl-transférases qui accrochent des sucres (galactose, fucose, NANA), la région terminale est transformée de façon très spécifique et programmée. En effet, cette transformation provient de l'intervention dans un ordre

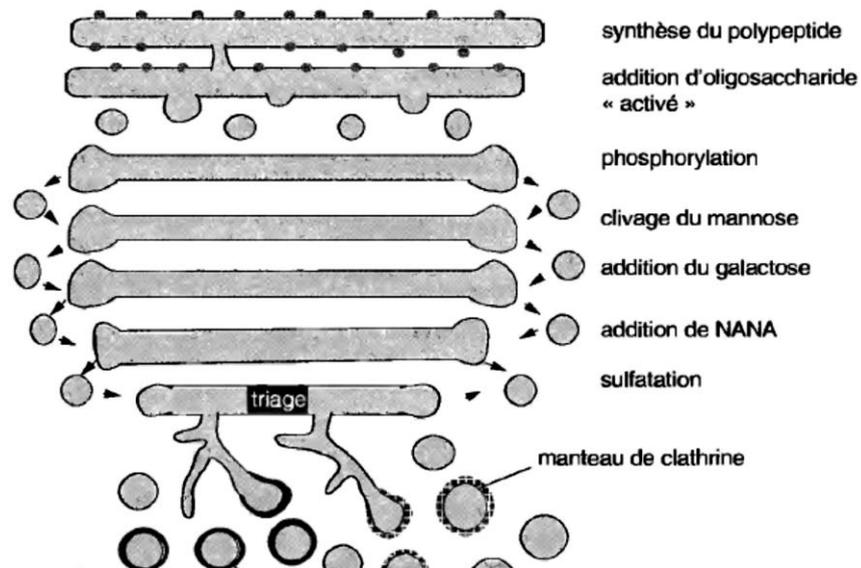
déterminé d'enzymes qui reconnaissent pour substrat le produit de la réaction précédente. C'est donc la spécificité des enzymes insérées dans les membranes (codées par le génome nucléaire) qui définit le type d'oligosaccharide mis en place. Il a été montré que l'élagage intervenait dans la face cis et surtout dans le compartiment médian de l'appareil de Golgi, alors que l'addition de nouveaux sucres (par les galactosyl-transférases, les fucosyl-transférases...) intervenait sur la face trans de l'appareil de Golgi. Contrairement à ce qui a été vu pour les protéines, la séquence oligosaccharidique est donc obtenue non pas à l'aide d'une matrice mais grâce à l'activité séquentielle et coordonnée de plusieurs systèmes enzymatiques fixés sur les membranes des compartiments.

- Sulfatation

Par des expériences d'autoradiographie avec du soufre marqué on peut aussi visualiser les niveaux où des groupements sulfate sont accrochés à des protéines. Ainsi en utilisant l'isotope ^{35}S on peut observer un marquage dans les dictyosomes des cellules à mucus ; quand elle a lieu, la sulfatation des protéines se fait aussi dans l'appareil de Golgi grâce à l'intervention de sulfo-transférases liées à la membrane dans la face trans.

- Accrochage des groupements phosphate

L'accrochage de groupements phosphate sur certaines protéines se fait dès la face cis de l'appareil de Golgi.



Compartimentation dans l'appareil de Golgi.

Quelques étapes de maturation des protéines dans la face cis et trans-golgien.

3.2. Cytosquelette

À la différence des Bactéries, les cellules eucaryotiques présentent un degré d'organisation interne très élevé et une grande diversité de formes, y compris au sein d'un même organisme. De plus, elles sont capables de déplacer leurs organites à l'intérieur du hyaloplasme et, au moins pour certaines d'entre elles, de se mouvoir à l'aide de structures spécialisées ou en modifiant leur forme. Toutes ces propriétés sont liées à l'existence, chez ces cellules, de trois types de réseaux protéiques superposés, formés de fins filaments ou de tubules qui parcourent et emplissent le hyaloplasme et qui constituent le cytosquelette (qui sont : les microtubules, les filaments intermédiaires et microfilaments).

3.2.1. Microtubules

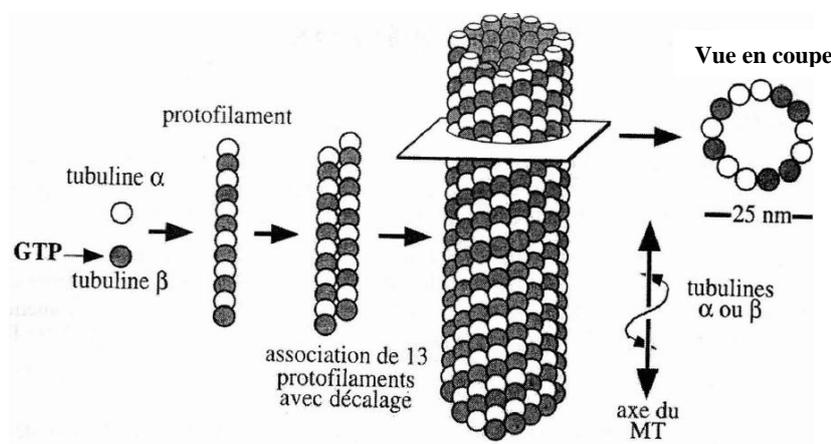
Toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes contiennent des microtubules.

Il existe deux variétés de microtubules : les microtubules labiles (instables) sont isolés les uns des autres et souvent de grande taille comme dans l'axone des neurones. Ils parcourent le hyaloplasme des cellules en interphase et forment un fuseau dans les cellules mitotiques. Les microtubules stables sont organisés en structures complexes (les centrioles et leurs dérivés, les cils et les flagelles).

3.2.1.1. Microtubules labiles

Les microtubules apparaissent comme des cylindres creux mesurant 25nm de diamètre et 5nm d'épaisseur, leur longueur est variable.

La paroi d'un microtubule apparaît formée de 13 protofilaments, chaque protofilament est constitué de la succession de deux types de protéines globulaires : la tubuline α et la tubuline β .



Architecture moléculaire d'un microtubule.

Les tubulines α et β s'associent en dimères, en présence de GTP et d'ions Mg^{+2} . Les dimères s'alignent pour constituer le protofilament. 13 protofilaments s'assemblent latéralement pour former le microtubule.

Les 13 protofilaments sont décalés les uns par rapport aux autres suite à la disposition hélicoïdale des tubulines α et β .

B) Biogenèse

Les micrographies de microscopie électronique montrent que les microtubules prennent naissance au voisinage du centrosome, plus précisément dans le matériel péri centriolaire appelé aussi centre organisateur des microtubules (COMT).

C) Propriétés

Les microtubules constituent un réseau dynamique et polarisé qui irradie du centrosome vers la périphérie des cellules.

Les microtubules se polymérisent (s'allongent) et se dépolymérisent (se raccourcissent) continuellement. Chaque microtubule possède une extrémité (+) à polymérisation rapide et dépolymérisation lente, vers la périphérie cellulaire et une extrémité (-) à polymérisation lente et dépolymérisation rapide, vers le centrosome.

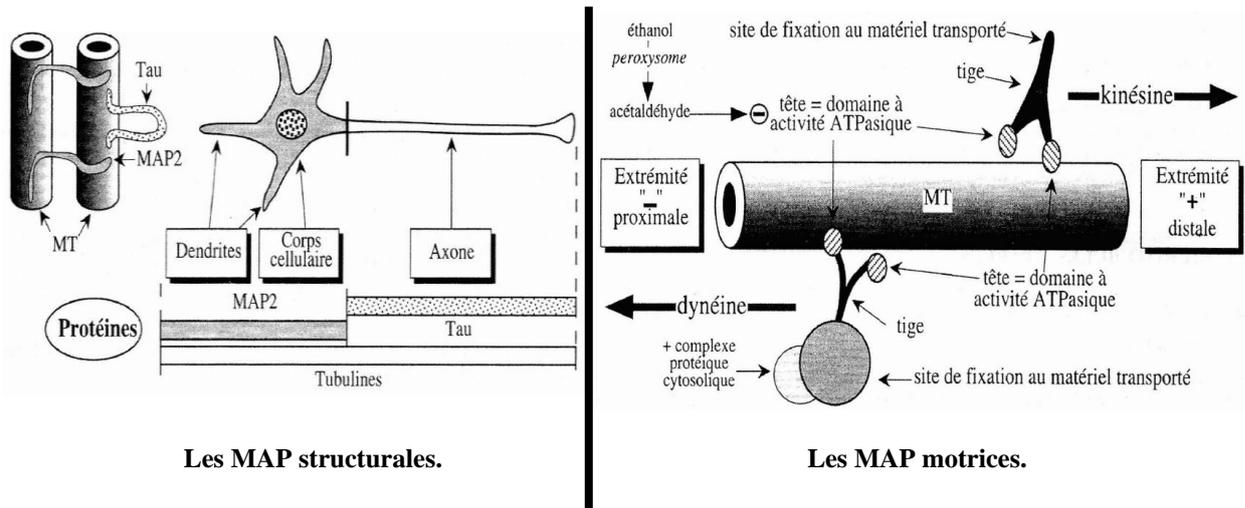
Certaines drogues perturbent la dynamique des microtubules. Ainsi la colchicine et la vinblastine inhibent la polymérisation en s'associant aux dimères de tubuline, il s'en suit le raccourcissement progressif des microtubules. A l'inverse, le taxol stabilise les microtubules polymérisés. En thérapeutique humaine, ces molécules sont utilisées comme médicaments anticancéreux. En effet, la désorganisation des microtubules empêche la migration des chromosomes en métaphase, ce qui empêche la multiplication des cellules cancéreuses.

D) Protéines associées

Il existe des protéines associées aux microtubules, ce sont les MAP (Microtubule Associated Protein). On distingue :

- **Les MAP structurales** stabilisent le réseau des microtubules en reliant les microtubules parallèles entre eux, ex : MAP2. Dans les axones neuronaux, il existe une autre MAP : la protéine Tau dont l'altération est à l'origine de la maladie d'Alzheimer.

- **Les MAP motrices** assurent les mouvements des organites et des vésicules le long des microtubules ; elles présentent trois domaines : un domaine de tête qui se fixe au microtubule, un segment intermédiaire et un domaine (queue) qui se fixe à la membrane des vésicules ou des organites à transporter. Ces protéines assurent un transport orienté : les **Kinésines** transportent vers l'extrémité (+) et les **Dynéines** vers l'extrémité (-).



3.2.1.2. Microtubules stables

Dans les cellules eucaryotes animales, les microtubules s'organisent en structures complexes et stables : les centrioles et leurs dérivés à savoir les cils et les flagelles.

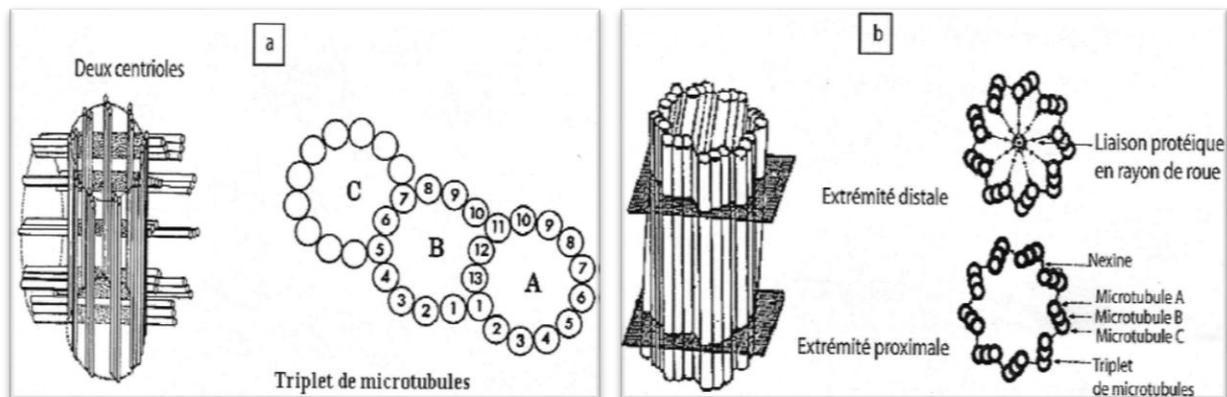
A) Centrioles

Chaque cellule eucaryote renferme, près du noyau, deux centrioles disposés perpendiculairement l'un à l'autre et entourés d'une matrice protéique (matrice de MAPs).

Cet ensemble est appelé centrosome ou centre organisateur des microtubules car il forme aussi bien les microtubules des cils et des flagelles (dérivés centriolaires) que les microtubules labiles.

a) Ultrastructure et protéines associées

Par la technique de coloration positive, chaque centriole apparaît comme un cylindre creux mesurant en moyenne 0,5µm de long et 0,25 µm de diamètre. Sa paroi dense aux électrons, apparaît formée de 9 triplets de microtubules disposés de manière inclinée par rapport à l'axe du centriole. Ces triplets sont désignés de l'intérieur vers l'extérieur par les lettres A, B, C.



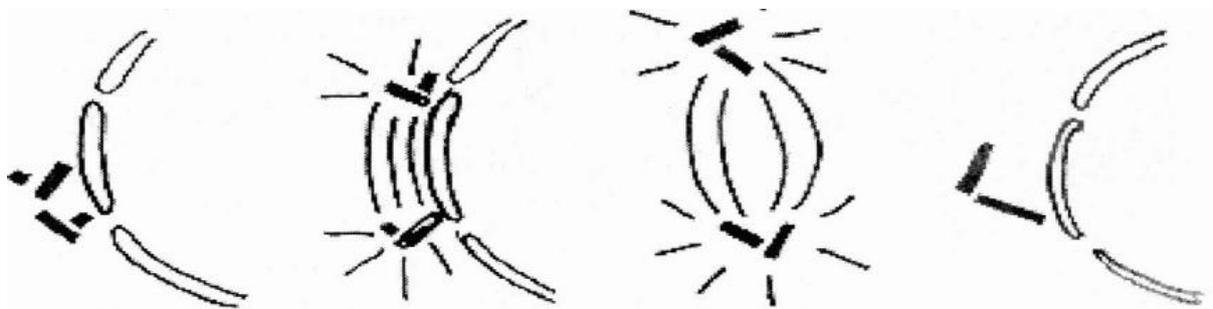
Représentation schématique du diplosome (a) et ultrastructure du centriole (b).

Le microtubule A, à section circulaire, est complet (13 protofilaments) alors que les microtubules B et C sont incomplets (10 protofilaments). Les triplets sont réunis par des liens denses de nexine tendus entre les microtubules A et C de triplets voisins. Le centriole présente à une de ces extrémités une structure complexe dense aux électrons occupant son centre : c'est le dispositif en rayons de roue de charrette.

b) Rôles

Dans les cellules en division, par sa duplication, le centrosome permet la genèse d'un nouveau centrosome. Ceci induit la mise en place du fuseau mitotique dès la fin de la phase G2 du cycle cellulaire.

Dans les cellules différenciées le centrosome permet la production des microtubules libres.



Duplication des centrioles.

B) Cils et les flagelles

Les cils sont des différenciations apicales portées par certaines cellules épithéliales chargées de déplacer leurs produits de sécrétion. Cas des cellules ciliées de l'épithélium bronchique et des cellules des trompes de Fallope.

Les flagelles sont des différenciations uniques ou multiples capables de mouvoir la cellule qui en est porteuse ; comme le flagelle du spermatozoïde.

Il n'existe pas de différence ultrastructurale entre un cil et un flagelle ; seule la longueur diffère : 5 à 10 μm pour un cil et 100 μm ou plus pour un flagelle.

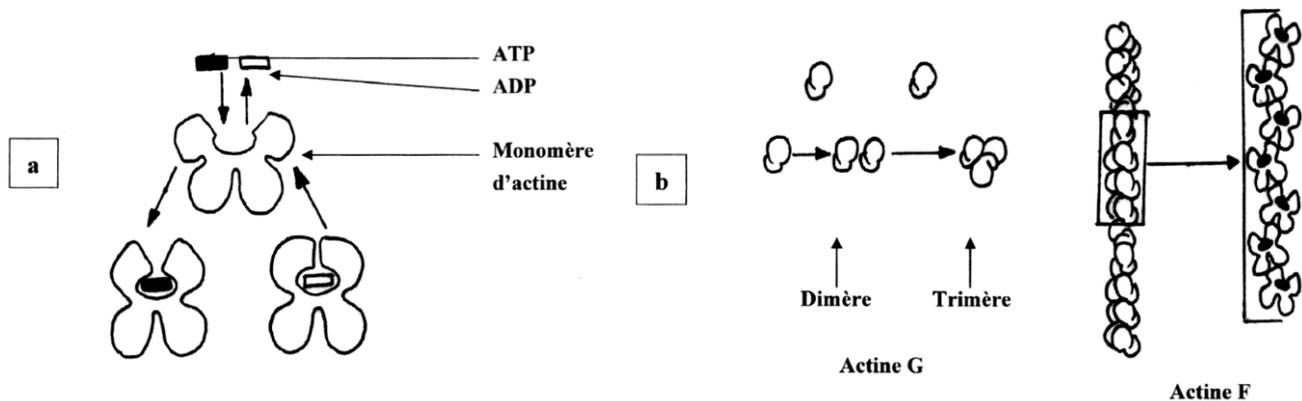
3.2.2. Microfilaments

3.2.2.1. Microfilaments fins d'actine

A) Ultrastructure et architecture moléculaire

Les microfilaments fins apparaissent comme des filaments rectilignes mesurant entre 6 et 8 nm de diamètre. Ils sont formés de l'alignement d'actine G en une hélice monocaténaire.

L'actine G est la protéine cellulaire la plus abondante, c'est un monomère de forme bivalente délimitant une crevasse au centre de laquelle se fixe l'ATP ou l'ADP



Monomère d'actine G (a) et polymérisation de l'actine G en actine F (b).

Chaque monomère d'actine G possède des sites de fixation à d'autres monomères d'actine G d'où sa capacité à former un trimère. Celui-ci sert comme site de nucléation pour la polymérisation en actine F.

B) Propriétés

Les microfilaments d'actine sont polarisés ; ils portent une extrémité positive (+) au niveau de laquelle se fait la polymérisation rapide et une extrémité négative (-) à polymérisation lente.

L'alternance des phases de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine est nécessaire à l'activité des cellules non musculaires ; elle dépend du pool d'actine G, de l'ATP-Mg⁺⁺ et de la force ionique du milieu. En revanche, ces phénomènes ne se produisent pas dans les cellules musculaires.

Le renouvellement des microfilaments d'actine permet de modéliser le tapis roulant. Certaines drogues perturbent ces phénomènes :

- la cytochalasine, poison extrait de champignons microscopiques, se fixe sur l'extrémité (+) des microfilaments et empêche la fixation de nouvelles molécules d'actine G inhibant ainsi la polymérisation.
- la phalloïdine, poison extrait des champignons Amanites, inhibe la dépolymérisation en se fixant sur les côtés des filaments d'actine F et empêche ainsi la libération des monomères.

C) Variétés et distribution

Trois variétés d'actine G sont connues :

- l'actine α , caractéristique des microfilaments qui composent les disques clairs des myofibrilles dans les cellules musculaires striés et ceux des cellules musculaires lisses.

- l'actine β et l'actine γ forment les microfilaments fins des autres types cellulaires. Ces filaments sont particulièrement concentrés dans la région périnucléaire où ils sont disposés en corbeille et sous la membrane plasmique où elles forment avec, les protéines membranaires périphériques internes, le cortex cellulaire.

D) Protéines associées

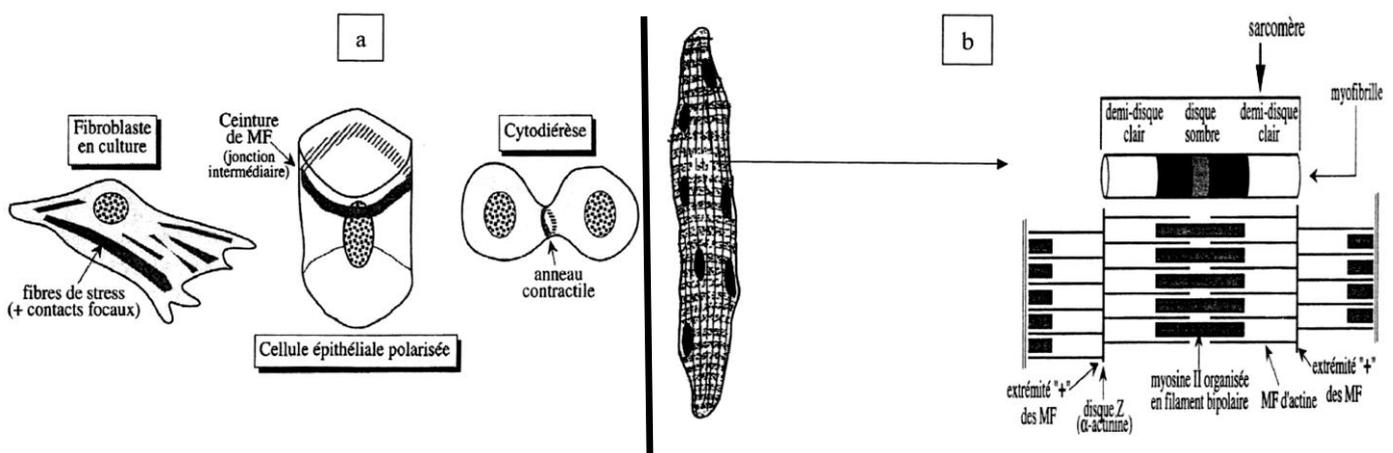
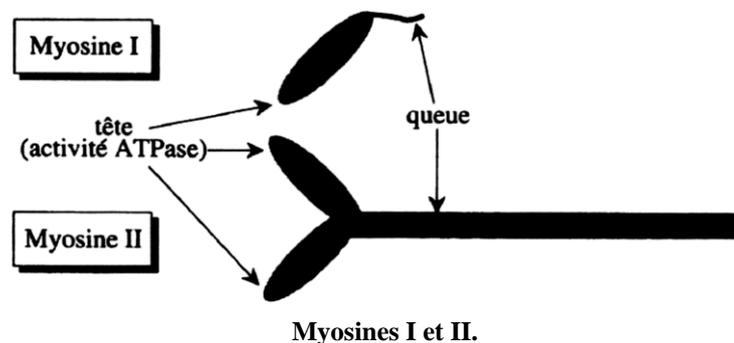
De nombreuses protéines cytosoliques peuvent se lier à l'actine G et contrôler sa polymérisation en actine F ou encore contrôler la croissance des filaments, leur organisation et leur ancrage à la membrane plasmique (tableau suivant).

3.2.2.2. Microfilaments épais de myosine

Ce sont des filaments épais de 10 à 15 nm de diamètre. Ils sont formés d'une protéine contractile en forme de bâtonnet, la Myosine. Il existe deux variétés de myosine :

- **la myosine I** monomérique, est formée d'une tête globulaire qui porte un site de phosphorylation et un site de fixation à l'actine et, d'une queue courte se fixant à la membrane plasmique ou à celle des vésicules à transporter.

- **la myosine II** caractérise les cellules musculaires. Elle est formée de 2 têtes globulaires à activité ATPasique réagissant avec l'actine et, d'une queue longue qui forme les disques A des myofibrilles.



Distribution des microfilaments d'actine dans les cellules non musculaires (a) et dans les cellules musculaires (b).

Protéines associées à l'actine G

| Les protéines associées à l'actine dans les cellules musculaires | | | Les protéines associées à l'actine dans les cellules non musculaires | | |
|--|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|--|
| Fonctions | Protéines | Effet sur les filaments d'actine | Fonctions | Protéines | Effet sur les filaments d'actine |
| Formation des filaments épais entre les microfilaments d'actine du sarcomère | Myosine 2 | Interagit avec l'actine, grâce à son activité ATPasique (têtes), pour assurer le mouvement | Contrôle de la polymérisation | Profiline | Se fixe à l'actine G et stimule l'échange de l'ADP par l'ATP favorisant la polymérisation |
| Pontage des faisceaux d'actine dans le sarcomère | α-actinine | Ancre les filaments d'actine aux stries Z | Faisceaux larges | α-actinine | Se fixe aux microfilaments d'actine et forme des faisceaux contractiles larges |
| Complexe contrôlant la contraction musculaire par le Ca^{++} | Tropomyosine | Occupe les sillons de l'hélice d'actine et masque les sites de fixation de la myosine | Faisceaux serrés | Fimbrine Villine | Se fixe aux microfilaments d'actine et forme des faisceaux serrés occupant l'axe des microvillosités |
| | Troponine | Masque les sites d'interaction actine-myosine et empêche la contraction en absence de Ca^{++} | | | En réseau |
| ////////// | ////////// | ////////// | Fragmentations des microfilaments | Gelsoline | Fragmentation des microfilaments favorisant l'état sol. Fluidification locale du cortex cellulaire lors de l'exocytose. Formation des filaments d'actomyosine lors de l'exocytose. |
| ////////// | ////////// | ////////// | Mouvement | Myosine I | Formation des fibres de stress dans les déplacements cellulaires. |
| ////////// | ////////// | ////////// | Ancrage à la membrane Plasmique | Spectrine | S'associe aux microfilaments d'actine par une extrémité et à des protéines de la membrane plasmique par l'autre. Contrôle de la forme biconcave des globules rouges |

Organisation des microfilaments

3.2.3. Filaments intermédiaires

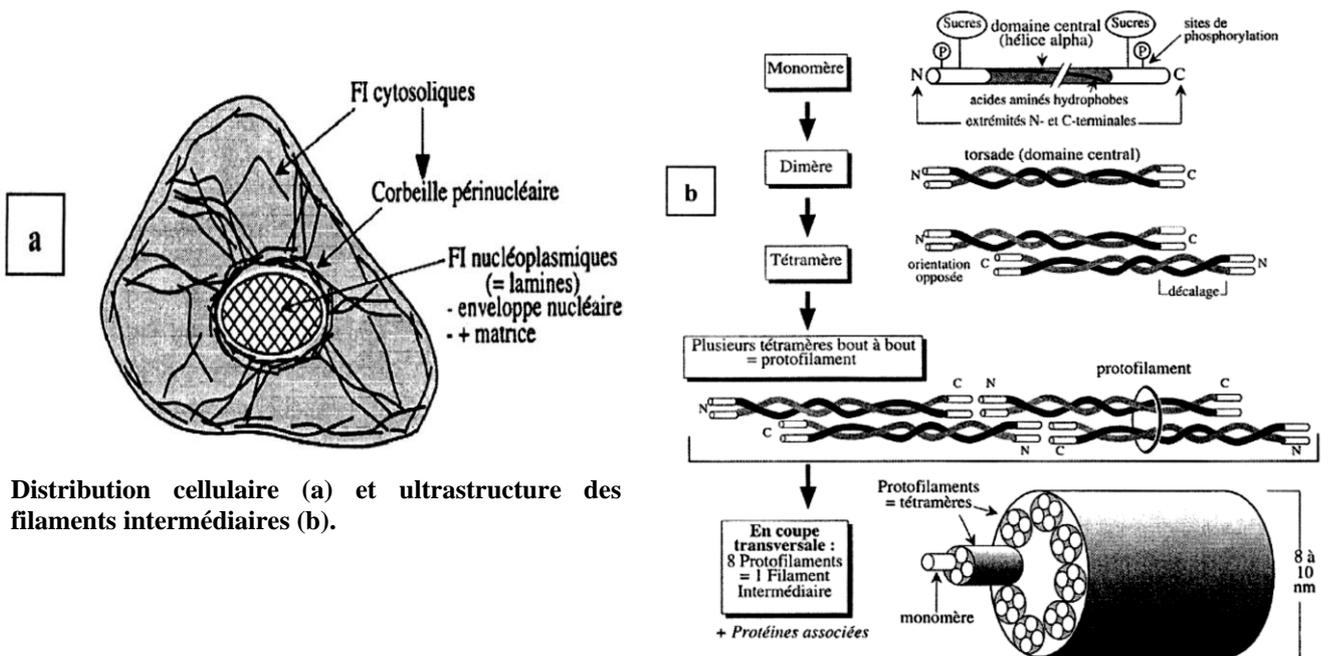
3.2.3.1. Ultrastructure et propriétés

Les filaments intermédiaires mesurent 10 nm de diamètre, diamètre moyen entre celui des microfilaments d'actine et celui des microfilaments de myosine, d'où leur appellation.

Ils sont formés de dimères de protéines fibreuses en forme d'hélices torsadées. Les dimères s'associent de manière antiparallèle pour former des tétramères. Ceux-ci se mettent bout à bout et constituent un protofilament. 8 protofilaments s'associent et forment un filament intermédiaire dont la section est composée de 32 monomères.

Cette structure en câble fait des filaments intermédiaires, des éléments stables, résistants et élastiques.

Ils ne participent pas à la motilité cellulaire mais interviennent dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans la résistance aux stress mécanique et dans le maintien d'une cohésion entre les cellules.



Distribution cellulaire (a) et ultrastructure des filaments intermédiaires (b).

3.2.3.2. Classification

Les protéines qui composent les filaments intermédiaires diffèrent d'un type cellulaire à un autre.

Ces protéines sont classées en quatre familles spécifiques chacune, d'un type de tissu tel que les cytokératines, les neurofilaments, les vimentines, les desmine et en une famille commune à toutes les cellules nucléées les lamines A, B et C.

Distribution des différentes familles de protéines formant les filaments intermédiaires.

| Protéine de filaments intermédiaires | Type cellulaire |
|---|--|
| Neurofilaments | Neurones (dendrites et axones où ils s'y associent aux microtubules). |
| Cytokératines (tonofilaments) | Cellules épithéliales (desmosomes et hémidesmosomes). Dérivés épidermiques (ongles, cheveux, poils...) |
| Desmine | Muscle lisse et strié (relient les myofilaments entre eux et à la membrane plasmique). |
| Vimentine | Dans les tissus qui dérivent du mésenchyme (muscles lisses, muscle cardiaque, vaisseaux sanguins), fibroblastes, cellules endothéliales. |
| Lamines (A, B, C) | Forment le réseau périmoléculaire (lamina). |

Cytosquelette des procaryotes

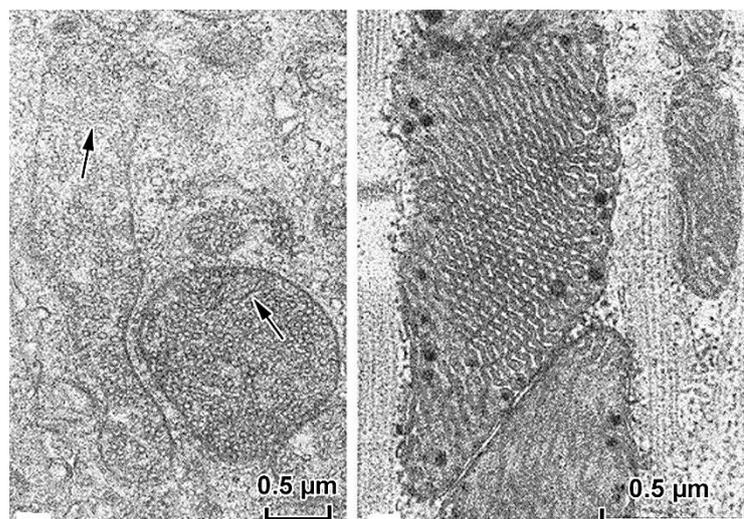
La présence d'un cytosquelette a été mise en évidence chez les procaryotes en 2006, grâce notamment aux travaux de Rut Carballido Lopez et de son équipe. Ceux-ci ont découvert la protéine MreB (en), homologue à la protéine d'actine, et de structure similaire, localisée sous la membrane et semblant jouer un rôle important dans la structure et la forme cellulaire. La protéine FtsZ jouerait également un rôle dans la cytodivision des bactéries.

3.3. Mitochondrie

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la production d'énergie métabolique dans les cellules eucaryotes. Ils sont responsables de la plus grande partie de l'énergie utile dérivée de la décomposition des glucides et des acides gras, qui est convertie en ATP par le processus de phosphorylation oxydative.

Les mitochondries se présentent soit sous forme de bâtonnets aux extrémités arrondies, soit sous forme sphérique. Le diamètre de ces organites varie entre 0,3 et 0,7 μ et leur longueur entre 1 et 4 μ en moyenne. Les mitochondries baignent dans le hyaloplasme en nombre variable selon le type de cellule. Dans une cellule du foie, on peut en dénombrer environ 800, dans les cellules de taille beaucoup plus grande comme les amibes, on estime à environ 50 000 le nombre de mitochondries.

Au microscope électronique, les coupes minces de mitochondries révèlent qu'elles possèdent une ultrastructure caractéristique (figure suivante).



Mitochondrie vue au microscope électronique

Elles sont délimitées par une membrane continue de 75 Å d'épaisseur appelée membrane externe. Sous cette membrane il en existe une seconde, la membrane interne, ayant également 75 Å d'épaisseur et séparée de la membrane externe par un espace de 100 Å environ. La membrane interne s'invagine, formant des plis à l'intérieur de la mitochondrie, plis que l'on nomme crêtes mitochondriales. Ces crêtes sont en général disposées perpendiculairement au grand axe de la mitochondrie. A fort grossissement, membrane externe et membrane interne ont une ultrastructure comparable à celle de la membrane plasmique. En coupe transversale, on constate que chaque membrane est formée de deux feuilletts sombres de 20 Å d'épaisseur,

séparés par un feuillet clair de 35 Å. La membrane interne délimite une région remplie d'une substance qui apparaît amorphe au microscope électronique :

On voit aussi que la membrane interne est, du côté de la matrice, tapissée de particules de 85 Å de diamètre rattachées à la membrane par un petit pédoncule. La membrane externe est dépourvue de telles particules, qui sont appelées « particules élémentaires ».

La matrice mitochondriale est très concentrée et d'aspect finement granuleux, on peut aussi y distinguer des structures figurées de taille importante. Ces inclusions sont les suivantes :

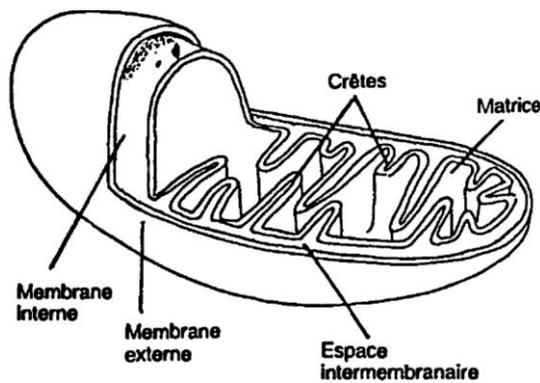
- de nombreux granules opaques aux électrons, de 15 nm de diamètre : les **mitoribosomes**. Ils interviennent dans la synthèse protéique mitochondriale se réalisant à partir du matériel génétique local ;
- des granules de grande taille, qui représentent des **réserves lipoprotéiques**, accumulées par les cellules dans certaines conditions physiologiques ;
- des **cristaux protéiques** de forme géométrique, avec un réseau très régulier, et envahissant parfois complètement la matrice ; ils traduisent l'accumulation d'un nombre limité de protéines ;
- des cristaux de **substances minérales**, généralement des phosphates de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (souvent accumulés dans des conditions pathologiques) ;
- des structures fibreuses d'**ADN**. C'est le génome des mitochondries (**nucléoïde**), qui en fait des organites semi-autonomes du point de vue de leur biogenèse.

La matrice mitochondriale contient également toutes les classes d'acides nucléiques.

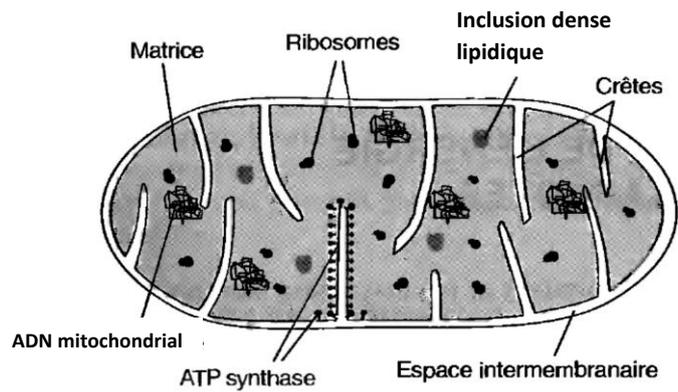
L'ADN mitochondrial (mtADN) est présent sous forme d'une molécule circulaire de petite taille (16 à 19 kb chez les animaux, 150 à 2500 kb chez les végétaux). Il n'est pas associé à des histones. Il existe en général plusieurs copies (5 à 10) de cet ADN par mitochondrie. Le mtADN présente un nombre restreint de gènes ; sa transcription permet l'existence dans la matrice : d'ARNm (mtARNm), d'ARNt (mtARNt) et d'ARNr (mtARNr) « il existe deux mtARNr, qui s'assemblent sous forme de mitoribosomes ». Ces ribosomes sont plus petits (25 nm) que les ribosomes cytoplasmiques (30 nm). La matrice mitochondriale contient donc tous les éléments nécessaires d'une synthèse protéique. Il existe effectivement une traduction mitochondriale des ARNm mitochondriaux.

La matrice mitochondriale est très riche en enzymes. De nombreux processus métaboliques s'y déroulent. On peut citer, parmi les plus importants :

- Littéralement, la β -oxydation des acides gras (hélice de Lynen) ;
- Le cycle de Krebs (cycle de l'acide citrique).



Reconstitution tridimensionnelle d'une mitochondrie



Représentation schématique d'une coupe ultrafine de mitochondrie observée en microscopie électronique.

3.3.1. Chaîne respiratoire

Au niveau des mitochondries certains métabolites sont oxydés, et l'énergie dégagée par l'oxydation sert en partie à régénérer de l'ATP par phosphorylation de l'ADP. L'ensemble des réactions d'oxydation et de phosphorylation constitue la phosphorylation oxydative.

La membrane interne de la mitochondrie est extrêmement riche en protéines transporteurs d'électron et translocateurs de protons. Ces protéines sont regroupées sous forme de gros complexes, indépendants les uns des autres, entre lesquels des petites molécules assurent le relais, au hasard de leur mobilité vis-à-vis de la membrane. On y trouve quatre complexes principaux :

- Le complexe NADH-déshydrogénase (complexe I), capable d'oxyder le NADH, et de prendre en charge les électrons résultants de cette oxydation sous forme d'hydrogène. Ce complexe se comporte également comme une ubiquinone-hydrogénase (ou ubiquinone-réductase...);
- Le complexe succinate-déshydrogénase (complexe II), capable d'oxyder $FADH_2$. Ce complexe se comporte également comme une ubiquinone-réductase.

Pour ces deux complexes, la molécule assurant le relais est donc l'ubiquinone (ou coenzyme Q). Cette molécule comporte un cycle porteur de deux liaisons $-C=O$, maintenu dans la membrane par un ancrage isoprénique : l'ensemble est fortement hydrophobe. L'ubiquinone peut être réduite en ubiquinol par hydrogénation des $-C=O$ en $-C-OH$

- Le complexe ubiquinol-oxydase (complexe III), contenant les cytochromes b et c1. Ce complexe se comporte aussi comme une cytochrome c-réductase. Le relais est donc assuré par le cytochrome c, petite protéine périphérique de la membrane interne.

- Le complexe cytochrome c-oxydase (complexe IV), contenant les cytochromes a et a₃, capable d'oxyder le cytochrome c et de réduire l'accepteur final de cette chaîne de transporteurs : l'oxygène. Il y a alors production d'eau.

La quantification des conséquences du fonctionnement de la chaîne respiratoire s'avère ardue, et le nombre exact de protons transférés par l'ensemble des complexes n'est pas connu avec précision. Il est estimé à 10 protons par molécule de NADH oxydée : 4 au niveau du complexe I, 4 au niveau du complexe III et 2 au niveau du complexe IV. Le complexe II ne semble pas transférer de protons, et l'oxydation du FADH₂ ne déplacerait donc que 6 protons.

Par ailleurs, la circulation des molécules intermédiaires entre les complexes (ubiquinone, cytochrome c) n'est pas mécaniquement orientée. Elle est, par contre, facilitée par les abondances relatives des différents complexes. En effet, pour 1 complexe I (ou 2 complexes II), on trouve 3 complexes III et 9 complexes IV : les chances de rencontre d'un complexe donné augmentent donc dans le sens du parcours de la chaîne respiratoire.

Toutes les réactions d'oxydoréductions au sein de la chaîne des transporteurs se font entre couples redox de potentiels croissants, depuis le couple NADH/NAD⁺ ($E^{\circ} = -0,32 \text{ V}$) et le couple H₂O / 1/2 O₂ ($E^{\circ} = +0,82 \text{ V}$) : elles sont donc spontanées. Il y a donc littéralement une transformation de l'énergie redox en énergie potentielle électrochimique.

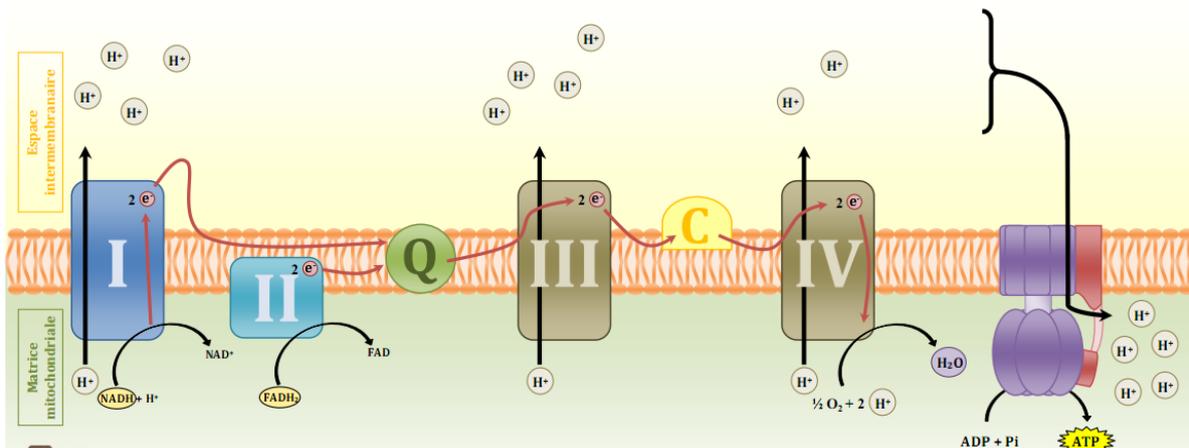
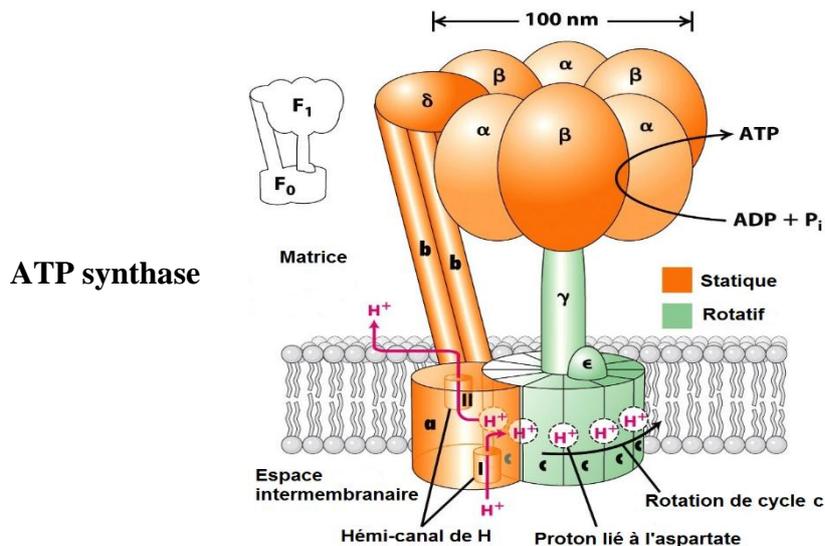
Le gradient électrochimique de protons représente une source d'énergie. La mitochondrie exploite cette énergie sous différentes formes, dont la principale est la production d'ATP. Cette corrélation est à la base de la théorie chimio-osmotique énoncée par Mitchell dans les années 1960 et qui n'a jamais été mise en défaut.

L'utilisation la plus directe du gradient de protons est l'import de métabolites dans la matrice, par des symports métabolites/H⁺ situés dans la membrane interne. C'est ainsi que, par exemple, le pyruvate et les acides gras atteignent la matrice. Indirectement, le transport des groupements phosphate (par un antiport H₂PO₄/OH⁻, activé par la différence de pH) et de l'ADP (par un antiport ATP/ADP, activé par la composante électrique du gradient « Comme l'ADP³⁻ est moins chargé que l'ATP⁴⁻, la différence de charge électrique de part et d'autre de la membrane interne favorisera l'entrée de l'ADP et la sortie de l'ATP ») sont aussi liés à l'existence du gradient de proton.

La synthèse de l'ATP se fait par l'ATP synthase. La base de l'ATP synthase (partie F₀), composée de nombreuses sous-unités, est un canal à proton. Il permet donc le retour spontané des protons vers la matrice, dans le sens du gradient électrochimique créé par la chaîne respiratoire. Le passage des protons par F₀ est à l'origine d'un réarrangement moléculaire de la

partie F1 de l'ATP synthase. Ce réarrangement est associé à la synthèse d'une molécule d'ATP à partir d'ADP et de Pi.

La partie F1 de l'ATP synthase est constituée de 6 sous-unités (3 α et 3 β), associées d'un complexe axial de trois sous-unités différentes (γ , δ , ϵ). Les sous-unités β portent les sites catalytiques. Après la liaison d'ADP et de Pi, elles catalysent la formation d'ATP, qui resterait fermement lié. Le passage de proton(s) au travers de F0 entrainerait une rotation de la sous-unité γ . Au passage de l'extrémité de γ , chaque sous-unité β subirait un changement de conformation permettant la libération de l'ATP : les 3 sous-unités β fonctionneraient alternativement.



Chaîne respiratoire et mécanismes de synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.

- Le **complexe I** récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe II** récupérant les électrons du FADH₂ et permet le transport d'aucun proton.
- Le **complexe III** permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe IV** permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **coenzyme Q** (ou **ubiquinone**) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III.
- Le **cytochrome C** permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène qui sera ainsi à l'origine de la formation de molécule d'eau. Les protons repasseront vers la matrice mitochondriale via une pompe à proton que l'on appelle également l'**ATP-synthétase**, et qui sera à l'origine de la formation d'ATP.

3.4. Ribosome

La reconnaissance d'un codon par l'anticodon sur une molécule d'ARNt dépend du même type d'appariement de bases complémentaires utilisé dans la réplication et la transcription de l'ADN. Cependant, une traduction précise et rapide de l'ARNm en protéine nécessite une machine moléculaire qui peut se déplacer le long de l'ARNm, capturer des molécules d'ARNt complémentaires, maintenir les ARNt en position, puis lier par covalence les acides aminés qu'ils portent pour former une chaîne polypeptidique. Chez les procaryotes et les eucaryotes, la machine qui fait le travail est le ribosome - un grand complexe composé de plusieurs petites protéines (les protéines ribosomales) et de plusieurs molécules d'ARN cruciales appelées ARN ribosomiques (ARNr). Une cellule eucaryote typique contient des millions de ribosomes dans son cytoplasme.

Les ribosomes eucaryotes et procaryotes sont très similaires en termes de structure et de fonction. Les deux sont constitués d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité, qui s'assemblent pour former un ribosome complet d'une masse de plusieurs millions de daltons. La grande sous-unité avec des protéines désignées par le préfixe "L" et la petite sous-unité avec des protéines désignées par "S". Les ribosomes de *E. coli* ont un poids moléculaire d'environ 2,5 MDa. La petite sous-unité ribosomale est constituée d'un seul ARN (ARNr 16S) et de 21 protéines (S1-S21); la grande sous-unité contient deux ARN (ARNr 5S et 23S) et 34 protéines (L1-L34) (Tableau ci-dessous). Les ribosomes eucaryotes sont un peu plus gros ; les ribosomes de mammifères ont un poids moléculaire de plus de 3 MDa. Chez les mammifères, la petite sous-unité est constituée d'un seul ARN (ARNr 18S) et de plus de 30 protéines, tandis que la grande sous-unité possède trois ARN (ARNs 5S, 5.8S et 28S) et plus de 45 protéines (Tableau suivant).

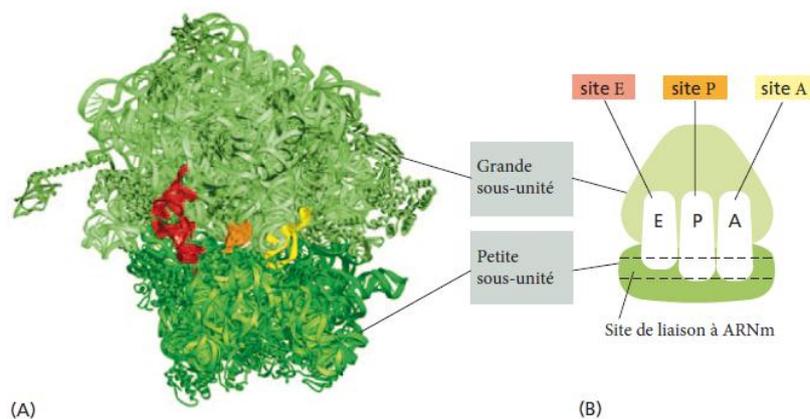
Structure et composition de ribosome

| Ribosomes | ARNr | protéines-r |
|--|---|-------------|
| Bactéries(70S) masse: 2.5 MDa 66% RNA |  50S 23S = 2904 bases 5S = 120 bases | 34 |
| |  30S 16S = 1542 bases | 21 |
| Mammifères (80S) masse: 4.2 MDa 60% RNA |  60S 28S = 4718 bases 5.8S = 160 bases 5S = 120 bases | 49 |
| |  40S 18S = 1874 bases | 33 |

La petite sous-unité ribosomale associe les ARNt aux codons de l'ARNm, tandis que la grande sous-unité catalyse la formation des liaisons peptidiques qui lient de manière covalente

les acides aminés ensemble dans une chaîne polypeptidique. Ces deux sous-unités se rassemblent sur une molécule d'ARNm près de son extrémité 5' pour démarrer la synthèse d'une protéine. L'ARNm est ensuite tiré à travers le ribosome comme un long morceau de ruban. Lorsque l'ARNm avance dans une direction 5' à 3', le ribosome traduit sa séquence nucléotidique en une séquence d'acides aminés, en utilisant les ARNt comme adaptateurs. Chaque acide aminé est ainsi ajouté dans la séquence correcte à la fin de la chaîne polypeptidique en croissance. Lorsque la synthèse de la protéine est terminée, les deux sous-unités du ribosome se séparent. Les ribosomes fonctionnent avec une efficacité remarquable : un ribosome eucaryote ajoute environ 2 acides aminés à une chaîne polypeptidique chaque seconde ; un ribosome bactérien fonctionne encore plus vite, ajoutant environ 20 acides aminés par seconde.

En plus d'un site de liaison pour une molécule d'ARNm, chaque ribosome contient trois sites de liaison pour les molécules d'ARNt, appelés le site A, le site P et le site E (Figure ci-après).



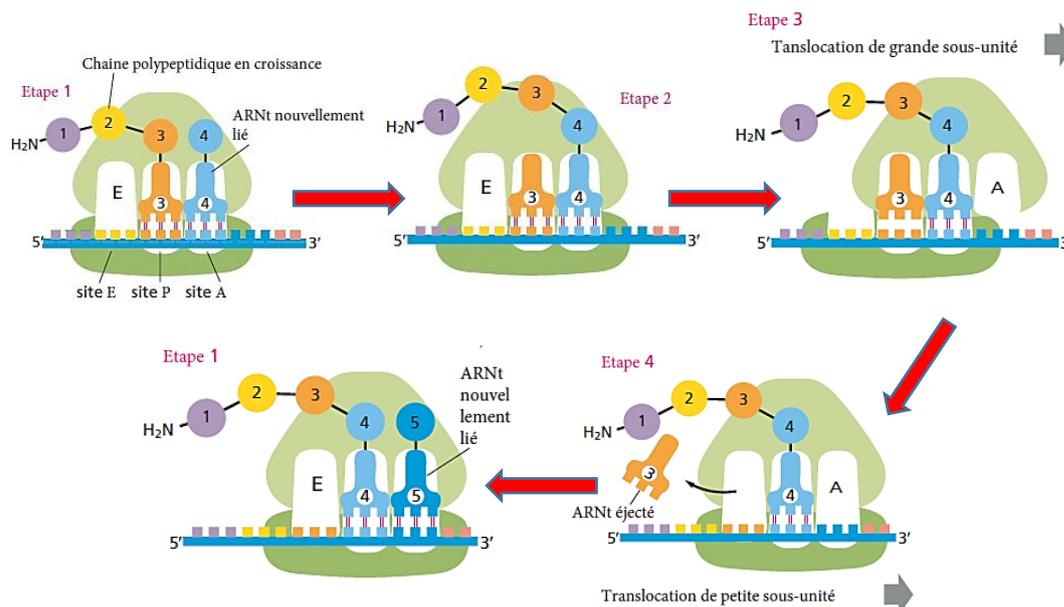
Chaque ribosome a un site de liaison pour l'ARNm et trois sites de liaison pour l'ARNt. Les sites d'ARNt sont désignés par les sites A, P et E (abréviation de Aminoacyl-tRNA, Peptidyl-tRNA, Exit, respectivement).

(A) Structure tridimensionnelle d'un ribosome bactérien, tel que déterminé par cristallographie aux rayons X. Les ARNt sont montrés liés dans le site E (rouge), le site P (orange) et le site A (jaune). Bien que les trois sites d'ARNt soient occupés ici, pendant le processus de synthèse des protéines, seuls deux de ces sites sont occupés à la fois. (B) Représentation schématisique d'un ribosome (dans la même orientation que A).

Pour ajouter un acide aminé à une chaîne peptidique en croissance, l'ARNt chargé approprié entre dans le site A par appariement de bases avec le codon complémentaire sur la molécule d'ARNm. Son acide aminé est ensuite lié à la chaîne peptidique retenue par l'ARNt dans le site P voisin. Ensuite, la grande sous-unité ribosomale se déplace vers l'avant, déplaçant l'ARNt épuisé vers le site E avant de l'éjecter (Figure suivante). Ce cycle de réactions est répété chaque fois qu'un acide aminé est ajouté à la chaîne polypeptidique, la nouvelle protéine se

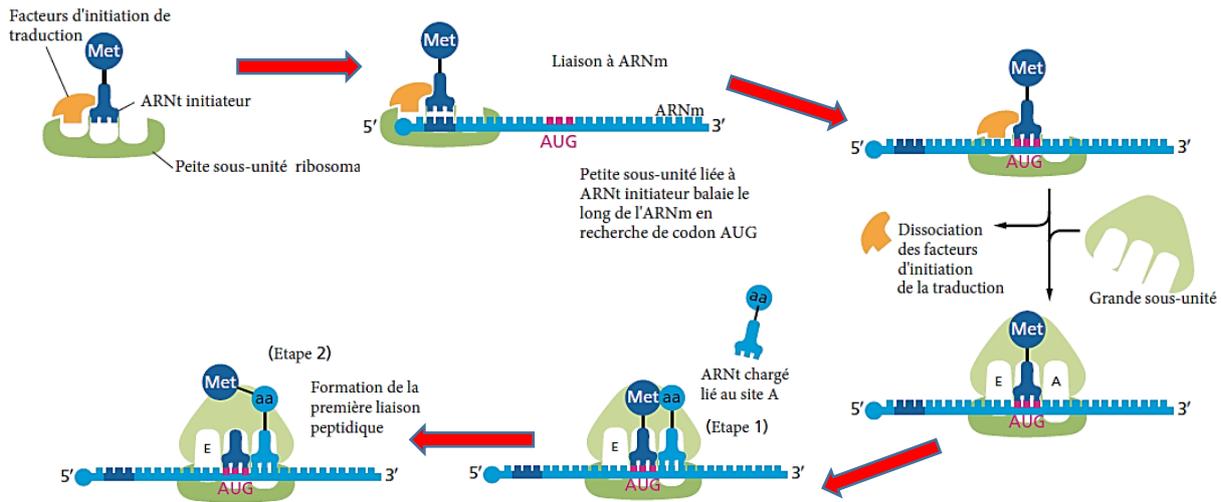
développant de son extrémité amino à son extrémité carboxyle jusqu'à ce qu'un codon stop dans l'ARNm soit rencontré.

La traduction d'un ARNm commence par le codon AUG, et un ARNt chargé spécial est nécessaire pour initier la traduction. Cet ARNt initiateur porte toujours l'acide aminé méthionine (ou une forme modifiée de méthionine, formyl-méthionine, dans les bactéries). Ainsi, les protéines nouvellement synthétisées ont toutes la méthionine comme premier acide aminé à leur extrémité N-terminale, la fin d'une protéine qui est synthétisée en premier. Cette méthionine est habituellement enlevée plus tard par une protéase spécifique.



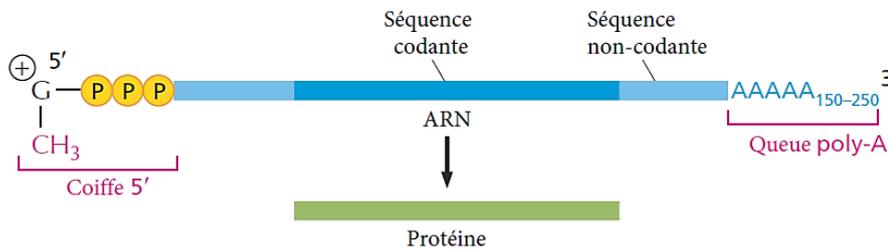
Cycle de traduction en quatre étapes

Chez les eucaryotes, un ARNt initiateur, chargé de méthionine, est d'abord chargé dans le site P de la petite sous-unité ribosomique, avec des protéines supplémentaires appelées facteurs d'initiation de la traduction (figure suivante). L'ARNt initiateur est distinct de l'ARNt qui porte normalement la méthionine. De tous les ARNt dans la cellule, seule une molécule d'ARNt initiateur chargée est capable de se lier étroitement au site P en l'absence de la grande sous-unité ribosomale.



L'initiation de la synthèse protéique chez les eucaryotes nécessite des facteurs d'initiation de la traduction et un ARNt initiateur spécial

Ensuite, la petite sous-unité ribosomale chargée de l'ARNt initiateur se lie à l'extrémité 5' d'une molécule d'ARNm, qui est marquée par la coiffe 5' qui est présente sur tous les ARNm eucaryotes (voir figure suivante).



Molécules pré-ARNm eucaryotes sont modifiées par coiffage et polyadénylation.

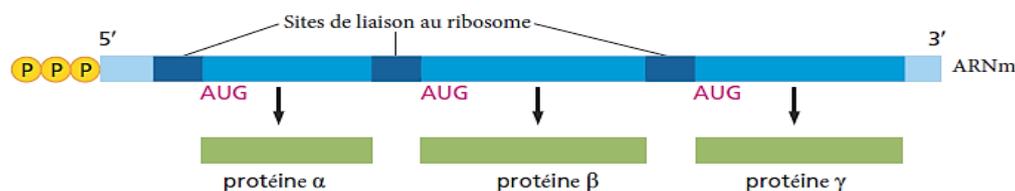
La petite sous-unité ribosomale avance ensuite (5' vers 3') le long de l'ARNm recherchant la première AUG. Lorsque cette AUG est rencontrée et reconnue par l'ARNt initiateur, plusieurs facteurs d'initiation se dissocient de la petite sous-unité ribosomale pour permettre à la grande sous-unité ribosomale de se lier et de terminer l'assemblage ribosomique. Parce que l'ARNt initiateur est lié au site P, la synthèse des protéines est prête à commencer par l'addition de l'ARNt chargé suivant au site A.

Le mécanisme de sélection d'un codon d'initiation est différent chez les bactéries. Les ARNm bactériens n'ont pas de coiffe 5' pour indiquer au ribosome où commencer la recherche du début de la traduction. Au lieu de cela, ils contiennent des séquences de liaison au ribosome

spécifiques, jusqu'à six nucléotides de long, qui sont situés à quelques nucléotides en amont des AUG à partir de laquelle la traduction doit commencer.

Contrairement à un ribosome eucaryote, un ribosome procaryote peut facilement se lier directement à un codon de départ qui se trouve à l'intérieur d'un ARNm, tant qu'un site de liaison du ribosome le précède par plusieurs nucléotides. De telles séquences de liaison au ribosome sont nécessaires chez les bactéries, car les ARNm procaryotes sont souvent polycistroniques, c'est-à-dire qu'ils codent pour plusieurs protéines différentes, dont chacune est traduite à partir de la même molécule d'ARNm (Figure ci-après). En revanche, un ARNm eucaryote porte habituellement l'information pour une seule protéine.

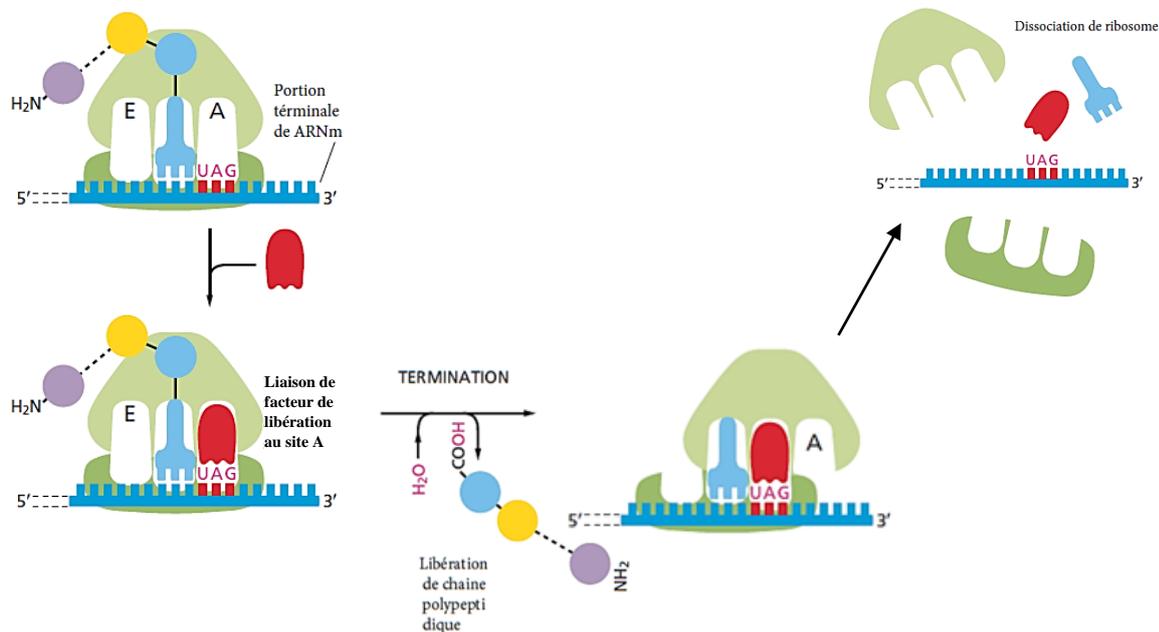
La fin de la traduction chez les procaryotes et les eucaryotes est signalée par la présence de l'un de plusieurs codons, appelés codons d'arrêt, dans l'ARNm. Les codons d'arrêt - UAA, UAG et UGA - ne sont pas reconnus par un ARNt et ne spécifient pas d'acide aminé, mais signalent plutôt au ribosome d'arrêter la traduction.



Une seule molécule d'ARNm procaryote peut coder plusieurs protéines différentes. Chez les procaryotes, les gènes qui dirigent les différentes étapes d'un processus sont souvent organisés en groupes (opérons) qui sont transcrits ensemble en un seul ARNm. Un ARNm procaryote n'a pas le même genre de coiffe en 5' comme ARNm eucaryote, mais a plutôt un triphosphate à son extrémité 5'. Les ribosomes procaryotes initient la traduction au niveau des sites de liaison au ribosome (bleu foncé), qui peuvent être situés à l'intérieur d'une molécule d'ARNm. Cette caractéristique permet aux procaryotes de synthétiser différentes protéines à partir d'une seule molécule d'ARNm, chaque protéine étant produite par un ribosome différent.

Les protéines connues sous le nom de facteurs de libération se lient à tout codon d'arrêt qui atteint le site A sur le ribosome ; cette liaison altère l'activité de la peptidyl transférase dans le ribosome, l'amenant à catalyser l'addition d'une molécule d'eau au lieu d'un acide aminé au peptidyl-ARNt (figure ci-après). Cette réaction libère l'extrémité carboxyle de la chaîne polypeptidique de sa fixation à une molécule d'ARNt ; Parce que c'est la seule fixation qui maintient le polypeptide en croissance au ribosome, la chaîne protéique complète est immédiatement libérée. À ce stade, le ribosome libère également l'ARNm et se dissocie en

deux sous-unités distinctes, qui peuvent ensuite s'assembler sur une autre molécule d'ARNm pour commencer un nouveau cycle de synthèse protéique.



La traduction s'arrête à un codon stop. Dans la phase finale de la synthèse des protéines, la liaison du facteur de libération à un site A portant un codon d'arrêt met fin à la traduction d'une molécule d'ARNm. Le polypeptide terminé est libéré et le ribosome se dissocie en ses deux sous-unités séparées.

3.5. Adressage et tri des protéines

Il est admis que la glycosylation des protéines sert probablement de moyen de protection de celles-ci contre d'éventuelles attaques enzymatiques au cours de leur transit. Mais le rôle le plus important des chaînes latérales glycosylées est sans doute de permettre l'adressage des protéines vers la bonne destination.

L'appareil de Golgi est considéré comme un centre de tri à partir duquel 3 voies principales peuvent être suivies par les protéines dans les cellules animales :

- **l'exportation à l'extérieur de la cellule.** Elle se fait par des vésicules souvent couvertes de clathrine qui bourgeonnent sur la face **trans** des dictyosomes (**TGN**), perdent ensuite leur revêtement de clathrine et peuvent ensuite fusionner avec le plasmalemma pour permettre l'exocytose. C'est le cas de beaucoup d'enzymes digestives. Les séquences oligosaccharidiques servent d'étiquette pour cet adressage ;

- **l'incorporation à la membrane plasmique** pour en permettre le recyclage : c'est ce que l'on appelle la sécrétion constitutive. Pour cette voie très importante (elle permet le renouvellement de la membrane plasmique) le code d'adressage n'est pas parfaitement connu. Il est possible que cette voie corresponde à un adressage par défaut d'étiquette. Les vésicules de transport possèdent généralement un manteau de coatomère ;

- la voie lysosomale, ou voie lytique pour laquelle l'étiquette, on le verra, est un mannose-6-phosphate. Les vésicules de transport de cette voie sont couvertes de clathrine.

3.5.1. Voie d'adressage lysosomiale

Les lysosomes reçoivent du matériel à dégrader (d'origine interne ou externe).

Une question est de savoir comment se fait la biosynthèse à la fois des hydrolases stockées dans les lysosomes et des protéines qui constituent leurs membranes.

On connaît assez bien les mécanismes qui permettent la synthèse, le transport et l'adressage des hydrolases lysosomales dans les cellules animales.

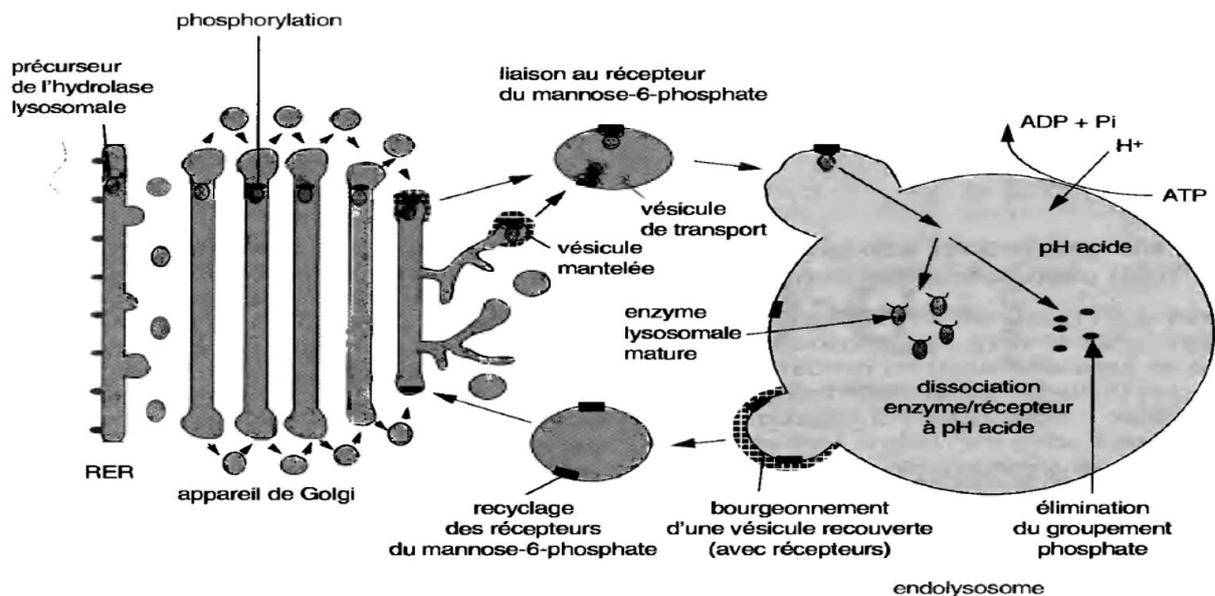
Comme pour les protéines exportables, les hydrolases lysosomales sont synthétisées sur le RER. Grâce à une séquence signal, elles peuvent passer dans la cavité du RER et transiter ensuite par l'appareil de Golgi selon le processus habituel. Les vésicules de transport qui délivrent les protéines vers les lysosomes bourgeonnent du réseau trans-golgien (TGN). Ces vésicules doivent incorporer les protéines lysosomales en excluant les autres. La question est donc de comprendre comment les protéines lysosomales sont reconnues et choisies de façon aussi précise.

Les protéines lysosomales sont triées par un récepteur du mannose-6-phosphate. C'est rattachage d'un marqueur qui donne aux hydrolases lysosomales l'« étiquette » indiquant la bonne adresse à laquelle elles doivent être livrées. Ce marqueur est apparemment le même pour toutes les hydrolases : c'est le mannose-6-phosphate (M6P), c'est-à-dire un résidu mannose terminal sur lequel un groupement phosphate a été lié et qui est attaché aux oligosaccharides de ces protéines. L'accrochage du marqueur se fait relativement tôt, dès le compartiment cis des dictyosomes. Les protéines ainsi marquées sont reconnues par des récepteurs complémentaires localisés dans les membranes des dictyosomes et tournés vers la face luminale. Après s'être chargés des protéines, ces récepteurs se regroupent, se concentrent sur le réseau trans-golgien en vésicules couvertes de clathrine et bourgeonnent en formant des vésicules mantelées spécialisées dans le transport de protéines lysosomales. Au cours de leur transport les vésicules perdent leur manteau et sont dirigées vers les lysosomes avec lesquels elles peuvent fusionner. Cette étape, là encore, fait intervenir d'autres protéines qui permettent une reconnaissance des membranes entre elles et leur fusion.

Après la fusion des vésicules et de la membrane du lysosome, les hydrolases se dissocient des récepteurs membranaires et sont donc libérées dans la cavité du lysosome où elles peuvent éventuellement « attaquer » les substances à hydrolyser. Cette dissociation est permise par le pH qui règne dans le lysosome. Des expériences in vitro montrent en effet que

les récepteurs se lient à l'oligosaccharide spécifique à pH 7 et commencent à se détacher à pH voisin de 6 (rappelons que le pH des lysosomes est voisin de 5).

Une fois libérés, les récepteurs du M6P se regroupent géographiquement dans le lysosome dans un secteur qui se recouvre de clathrine et bourgeonne en formant une vésicule mantelée. Au cours de la migration les vésicules mantelées perdent leur manteau et peuvent à nouveau fusionner avec les membranes golgiennes dans le TGN, assurant ainsi un recyclage des récepteurs.



Biosynthèse des hydrolases lysosomales, adressage aux lysosomes, déchargement et navette les récepteurs.

3.6. Système lysosomal

Grâce aux enzymes qu'ils contiennent, les lysosomes permettent une digestion intracellulaire. Ces digestions sont de deux sortes : les phénomènes d'autophagie ou d'hétérophagie.

A) Phénomènes d'autophagie

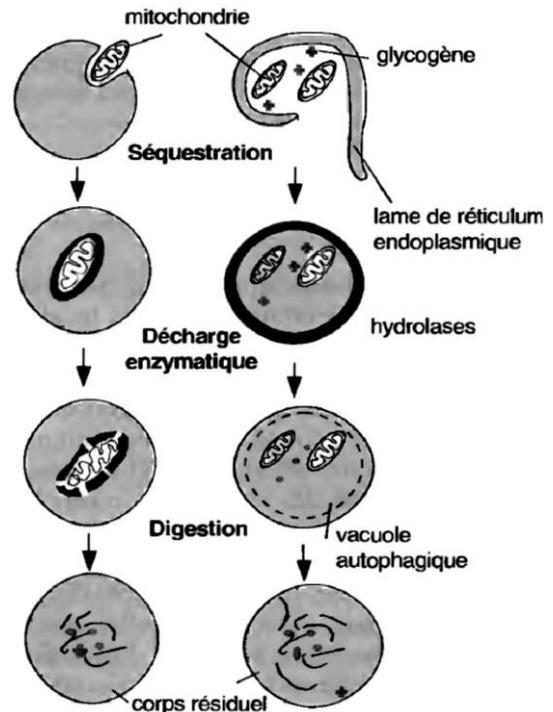
C'est ce qui permet l'autoentretien des constituants cellulaires. La digestion se fait dans les vacuoles autophagiques où sont digérées les propres substances de la cellule. Deux voies sont possibles :

- Invagination de la surface des lysosomes permettant la capture et l'englobement d'un matériel cytoplasmique. C'est un mécanisme fréquemment observé dans les cellules végétales ;
- Encerclement et isolement d'une portion de cytoplasme par une lame de réticulum endoplasmique. Des hydrolases sont déversées et les différents organites du territoire séquestré sont dégradés (mitochondries, plastes, plages de glycogène...).

La vitesse d'autophagie est surprenante. Dans certains organes, surtout le foie et le rein, l'autophagie est un mécanisme régulier. Ainsi une cellule hépatique détruit en moyenne la majeure partie de son contenu en une semaine. Pour 1 gramme de cellules hépatiques, 1 milliard de mitochondries sont détruites par heure, ce qui signifie que les mitochondries sont renouvelées 15 fois pendant la demi-vie d'une cellule hépatique (soit 150 jours).

B) Phénomènes d'hétérophagie

Ce sont les mécanismes de phagocytose et de pinocytose qui permettent de digérer des matériaux d'origine exogène. Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose. Disséminés dans les tissus, en particulier dans les poumons, les macrophages sont spécialisés dans le nettoyage : ce sont les « éboueurs » cellulaires. Après la digestion intralysosomale, la cellule récupère les produits de la digestion (acides aminés, sucres, nucléotides...) qui traversent la membrane du lysosome, probablement grâce à des transporteurs.



Deux voies de formation des vacuoles autophagiques.

Quelques bactéries sont irréductibles : c'est le cas des bactéries de la lèpre qui vivent très bien dans les lysosomes, se trouvant ainsi à l'abri des défenses immunitaires.

De nombreux protozoaires se nourrissent de cette façon. Après digestion intracellulaire des matériaux exogènes, les déchets non utilisés peuvent être expulsés par exocytose ou stockés dans la cellule formant des corps résiduels.

La pinocytose est un mécanisme très général permettant la réabsorption de protéines, leur dégradation et leur réutilisation par les cellules. C'est le mécanisme qui permet aux cellules rénales des tubes contournés de récupérer les molécules protéiques qui ont filtré dans l'espace urinaire au niveau des glomérules ; de même dans le foie les protéines sont retirées du plasma sanguin, dégradées par les lysosomes et récupérées par les cellules.

3.7. Système ubiquitine/protéasome

Les quantités des protéines dans les cellules sont déterminées à la fois par leur taux de synthèse et leur taux de dégradation, leur durée de vie pouvant aller de quelques minutes à

plusieurs jours. Celles ayant une durée de vie très courte, présentes en très faibles quantités, sont en général des molécules à rôle régulateur, telles que les facteurs de transcription qui entraînent souvent une réaction rapide de la cellule, en réponse à des facteurs extérieurs. Certaines protéines sont aussi amenées à être très rapidement détruites, comme c'est le cas pour les cyclines mitotiques (avec une durée de vie de quelques minutes), qui aident à réguler le passage cellulaire à travers la mitose, dont les quantités varient très rapidement au cours du cycle cellulaire. Enfin, on sait que les protéines mal repliées au cours de leur synthèse (environ 1/3 de celles qui sont fabriquées !), ou anormales car résultant d'erreurs de traduction, ou bien endommagées, sont spécifiquement détruites.

La voie mise en œuvre dans cette dégradation, qui a lieu dans le hyaloplasme (et n'a rien à voir avec la voie lysosomale) est celle de l'ubiquitination et des protéasomes.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un système multi-enzymatique extrêmement complexe, qui fonctionne schématiquement en deux étapes distinctes dans la dégradation régulée des protéines intracellulaires.

Dans un premier temps, la protéine substrat est étiquetée par l'addition d'une chaîne formée par la conjugaison successive d'une ou plusieurs molécule(s) d'ubiquitine (Ub) (un polypeptide de 76 résidus), grâce à l'action d'une cascade enzymatique impliquant trois types de facteurs appelés E1 (enzyme d'activation de l'Ub), E2 (enzyme de conjugaison de l'Ub) et E3 (Ub-ligase). La spécificité de la réaction (appelée réaction d'ubiquitylation) est due en grande partie aux E3s, qui sont responsables du recrutement des substrats. Ces E3-ligases existent donc en très grand nombre (plusieurs centaines) dans les cellules. Il existe également de nombreuses enzymes de dé-ubiquitylation (environ une centaine chez l'homme), qui sont capables d'enlever la chaîne d'Ub du substrat, et qui de ce fait participent au contrôle fin de la réaction d'ubiquitylation.

Dans un deuxième temps, la chaîne de poly-ubiquitine est reconnue par une protéase géante appelée le protéasome 26S, qui dégrade la protéine ubiquitylée en peptides inactifs.

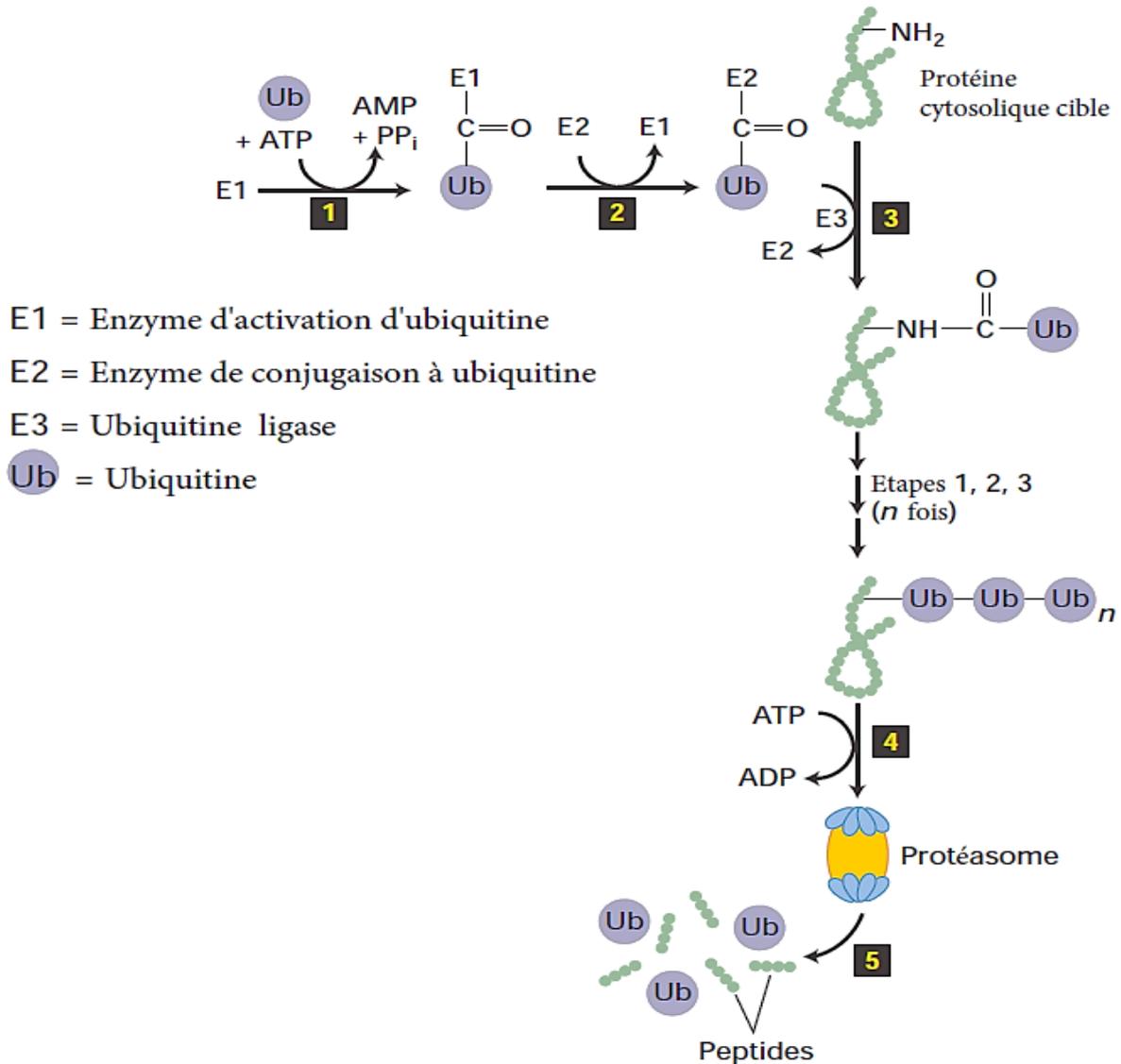
3.6.1. Protéasome

La dégradation par le protéasome 26S des protéines ubiquitylées peut intervenir dans le cytoplasme et le noyau et est dépendante de l'ATP.

Le protéasome 26S est formé par l'association de deux sous-complexes : un cœur protéolytique, le protéasome 20S, et un complexe régulateur appelé complexe 19S.

A) Protéasome 20S

Le protéasome 20S est une particule stable et abondante en forme de cylindre creux, composée de 28 sous-unités apparentées (14 différentes chez les eucaryotes) distribuées en 4 anneaux heptamériques.



Voie protéolytique médiée par l'ubiquitine.

L'enzyme E1 est activée par fixation d'une molécule d'ubiquitine (Ub) (étape 1) puis transfère cette molécule Ub à E2 (étape 2). L'ubiquitine ligase (E3) transfère la molécule Ub liée sur E2 à la chaîne latérale -NH₂ d'un résidu de lysine dans une protéine cible (étape 3). Des molécules Ub supplémentaires sont ajoutées à la protéine cible en répétant les étapes 1 à 3, formant une chaîne de polyubiquitine qui dirige la protéine marquée vers un protéasome (étape 4). Dans ce grand complexe, la protéine est scindée en de nombreux petits fragments peptidiques (étape 5).

Les deux anneaux centraux sont identiques, et sont formés chacun par sept sous-unités différentes (dites de type β) ; ils définissent une cavité interne qui renferme les sites catalytiques.

Les deux anneaux extérieurs sont composés eux aussi de sept sous-unités différentes (dites de type α) ; ils permettent l'association du protéasome 20S à des complexes régulateurs,

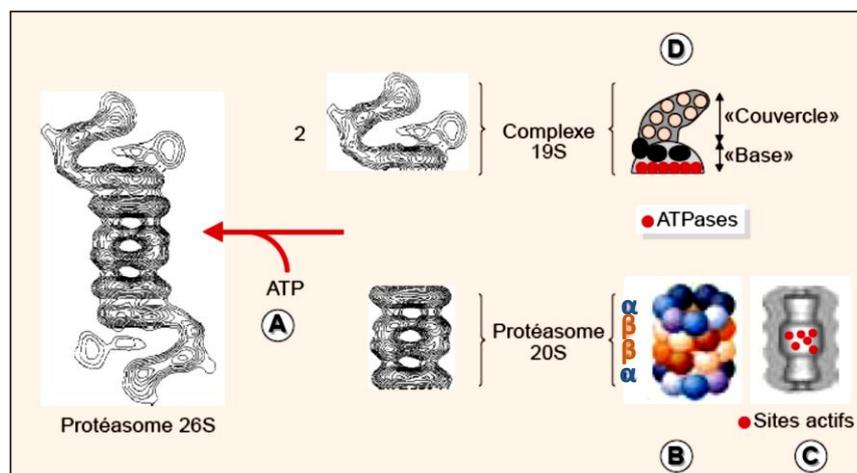
et contrôlent l'entrée des substrats dans la chambre de catalyse. Le protéasome 20S possède au moins 5 activités peptidasiques, dont Trois types sont décrites : une activité de type chymotrypsine (clivage après un résidu hydrophobe), une activité de type trypsine (clivage après un résidu basique), et une activité de type caspase (clivage après un résidu acide).

La plupart des peptides produits par le protéasome sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases cellulaires.

Le protéasome 20S ne fonctionne probablement jamais seul dans les cellules, et interagit avec d'autres facteurs qui contrôlent son ouverture et qui le fournissent en substrats. Parmi ces facteurs, le complexe 19S.

B) Complexe régulateur 19S

Le complexe 19S joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines ubiquitinylées. En se liant aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S, il active celui-ci, probablement en « ouvrant » les orifices des anneaux α , et il apporte des sous-unités qui permettent la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine, la dénaturation des protéines ubiquitinylées et le recyclage de l'Ub. Ce complexe régulateur comprend environ 18 sous-unités différentes, et est formé de deux sous-ensembles : un « couvercle » requis pour la dégradation des protéines ubiquitinylées, et une « base » assurant le lien avec le protéasome 20S et comprenant six ATPases probablement arrangées en anneaux. Il est probable qu'elles hydrolysent l'ATP pour fournir de l'énergie nécessaire à la destruction des substrats, à l'activation du protéasome 20S et, vraisemblablement, à l'injection des substrats dans la chambre catalytique du protéasome 20S. Une activité isopeptidasique (capable d'hydrolyser les chaînes d'Ub) est aussi associée au complexe 19S. Elle assure le recyclage de l'Ub lors de la dégradation des substrats ubiquitinylés, et vraisemblablement aussi une fonction de « contrôle de qualité » permettant le recyclage des protéines mal ubiquitinylées, ou mal dégradées par le protéasome.

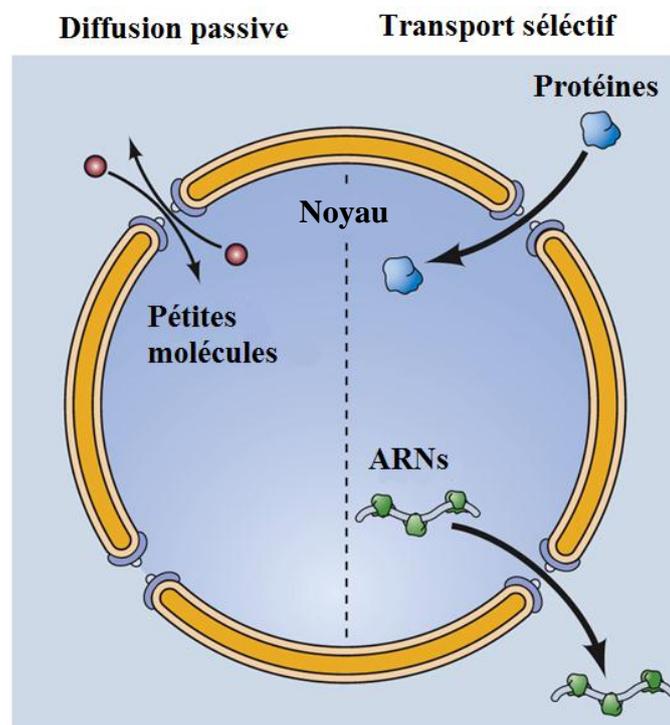


Organisation du protéasome 26S. Le protéasome 26S est formé par l'association du protéasome 20S et du complexe régulateur 19S. Cette association est dépendante de l'énergie (A).

3.7. Noyau et échange avec le cytoplasme

Le trafic bidirectionnel apparaît continu entre le cytosol et le noyau. Les complexes de pores nucléaires sont les seuls canaux par lesquels de petites molécules polaires, des ions et des macromolécules (protéines et ARNs) peuvent voyager entre le noyau et le cytoplasme. Le complexe de pores nucléaires est une très grande structure d'un diamètre d'environ 120 nm et d'une masse moléculaire estimée à environ 125 millions de daltons, soit environ 30 fois la taille d'un ribosome. Chez les vertébrés, le complexe de pores nucléaires est composé de 30 à 50 protéines de pores différentes (appelées nucléoporines), dont la plupart sont présentes sous forme de copies multiples. En contrôlant le trafic de molécules entre le noyau et le cytoplasme, le complexe de pores nucléaires joue un rôle fondamental dans la physiologie de toutes les cellules eucaryotes. Les ARNs synthétisés dans le noyau doivent être efficacement exportés vers le cytoplasme où ils interviennent dans la synthèse des protéines. Inversement, les protéines nécessaires aux fonctions nucléaires (par exemple, les facteurs de transcription) doivent être transportées vers le noyau à partir de leurs sites de synthèse dans le cytoplasme. En outre, de nombreuses protéines font la navette en continu entre le noyau et le cytoplasme.

Selon leur taille, les molécules peuvent traverser le complexe de pores nucléaires par l'un des deux mécanismes différents (figure ci-dessous).

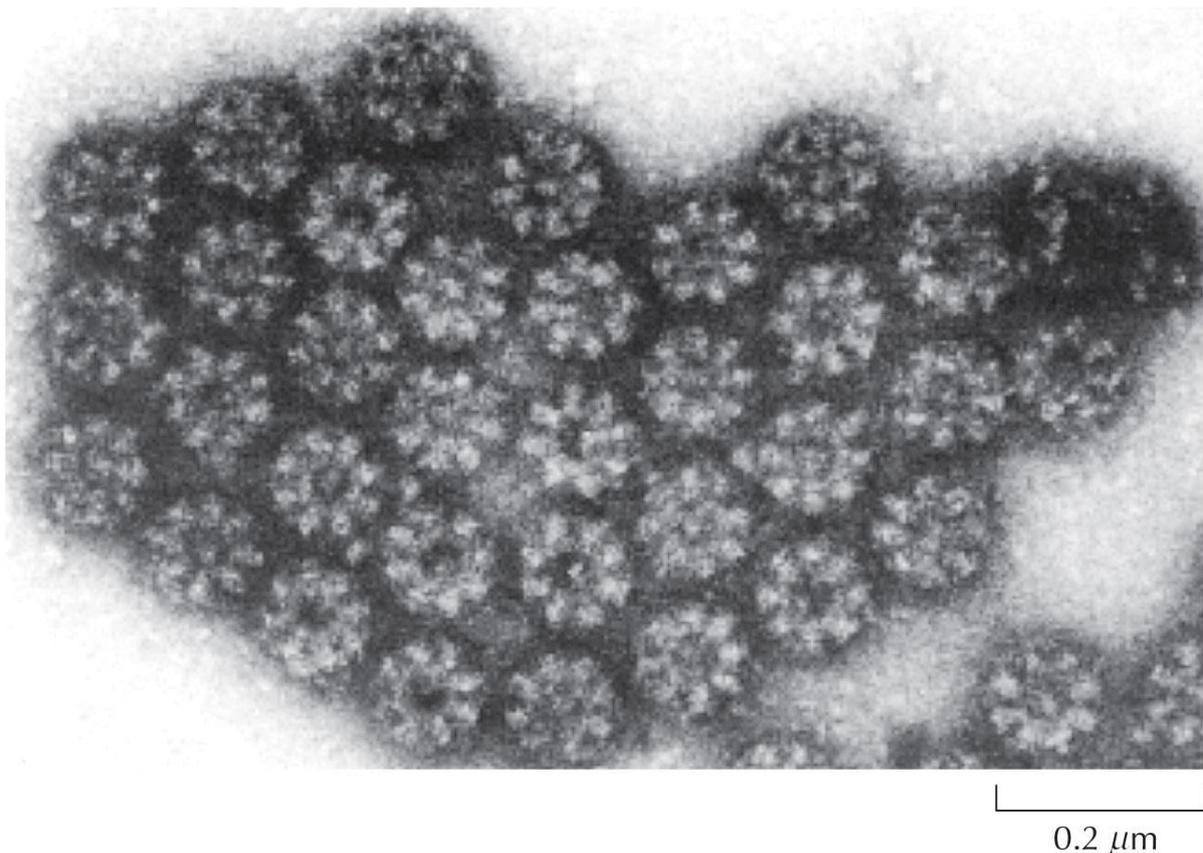


Trafic moléculaire à travers les complexes de pores nucléaires

Les petites molécules sont capables de traverser rapidement les canaux ouverts du complexe des pores nucléaires par diffusion passive. Au contraire, les macromolécules (protéines et ARN) sont transportées par un mécanisme sélectif dépendant de l'énergie.

Les petites molécules et certaines protéines de masse moléculaire inférieure à environ 20-40 kDa traversent librement le pore dans les deux sens : cytoplasme à noyau ou noyau à cytoplasme. Ces molécules diffusent passivement à travers des canaux aqueux ouverts, estimés avoir un diamètre d'environ 9 nm, dans le complexe de pores nucléaires. Cependant, la plupart des protéines et des ARNs sont incapables de passer par ces canaux ouverts. Au lieu de cela, ces macromolécules traversent le complexe de pores nucléaires par un processus actif dans lequel des protéines et des ARNs appropriés sont reconnus et sélectivement transportés dans une direction spécifique (du noyau au cytoplasme ou du cytoplasme au noyau).

La visualisation des complexes des pores nucléaires par microscopie électronique révèle une structure à symétrie octogonale organisée autour d'un grand canal central (figure suivante), qui est la voie par laquelle des protéines et des ARNs traversent l'enveloppe nucléaire.

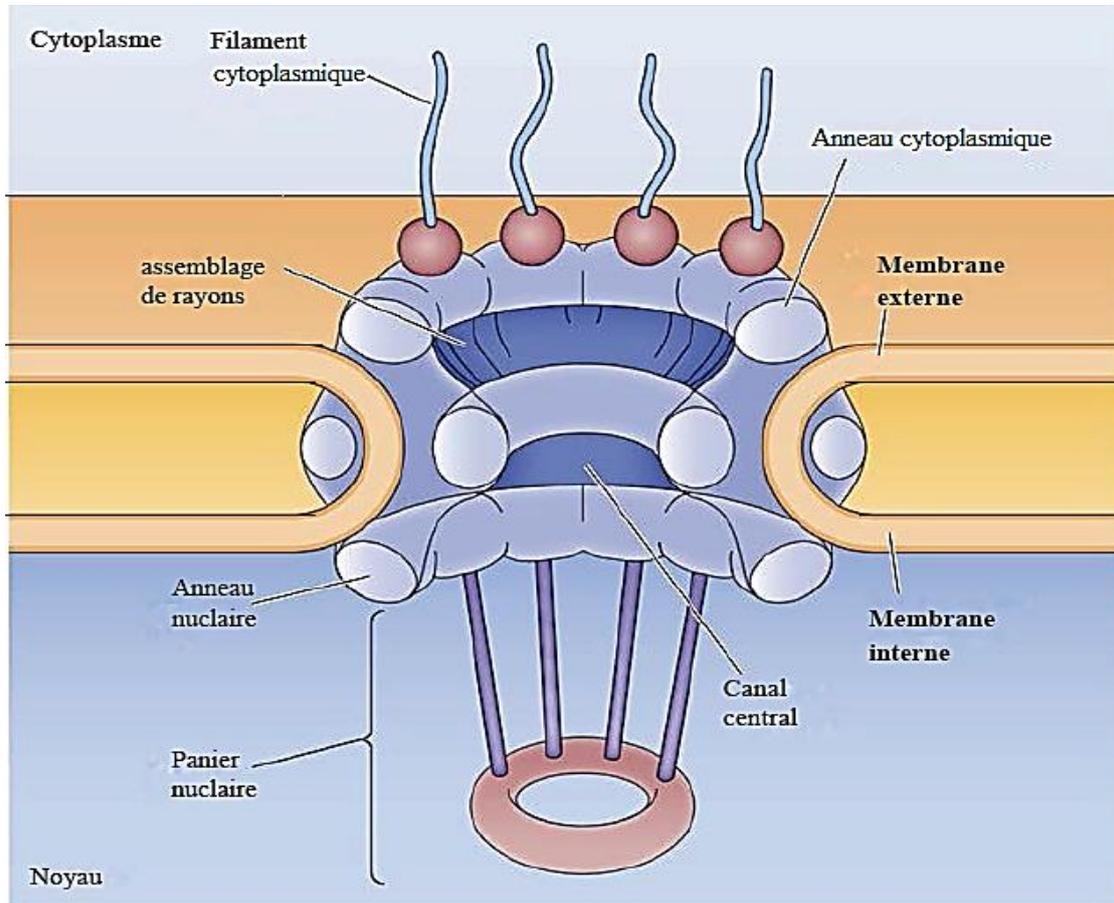


Micrographie électronique de complexes de pores nucléaires

Dans cette vue de face, les complexes de pores nucléaires isolés semblent se composer de huit sous-unités structurelles entourant un canal central.

Des études structurales détaillées, y compris l'analyse d'images sur ordinateur, ont conduit à l'élaboration de modèles tridimensionnels du complexe de pores nucléaires (figure ci-après). Ces études montrent que le complexe de pores nucléaires consiste en un assemblage de huit rayons disposés autour d'un canal central. Les rayons sont reliés à des anneaux situés

aux surfaces nucléaire et cytoplasmique, et l'ensemble anneaux-rayons est ancré dans l'enveloppe nucléaire au niveau des sites de fusion entre les membranes nucléaires interne et externe. Les filaments de protéines s'étendent à la fois des anneaux cytoplasmiques et nucléaires, formant une structure distincte semblable à un panier du côté nucléaire.



Modèle du complexe de pores nucléaires

Le complexe consiste en un assemblage de huit rayons attachés à des anneaux situés sur les côtés cytoplasmique et nucléaire de l'enveloppe nucléaire. L'ensemble anneau-rayons entoure un canal central. Les filaments cytoplasmiques s'étendent de l'anneau cytoplasmique et les filaments formant le panier nucléaire s'étendent de l'anneau nucléaire.

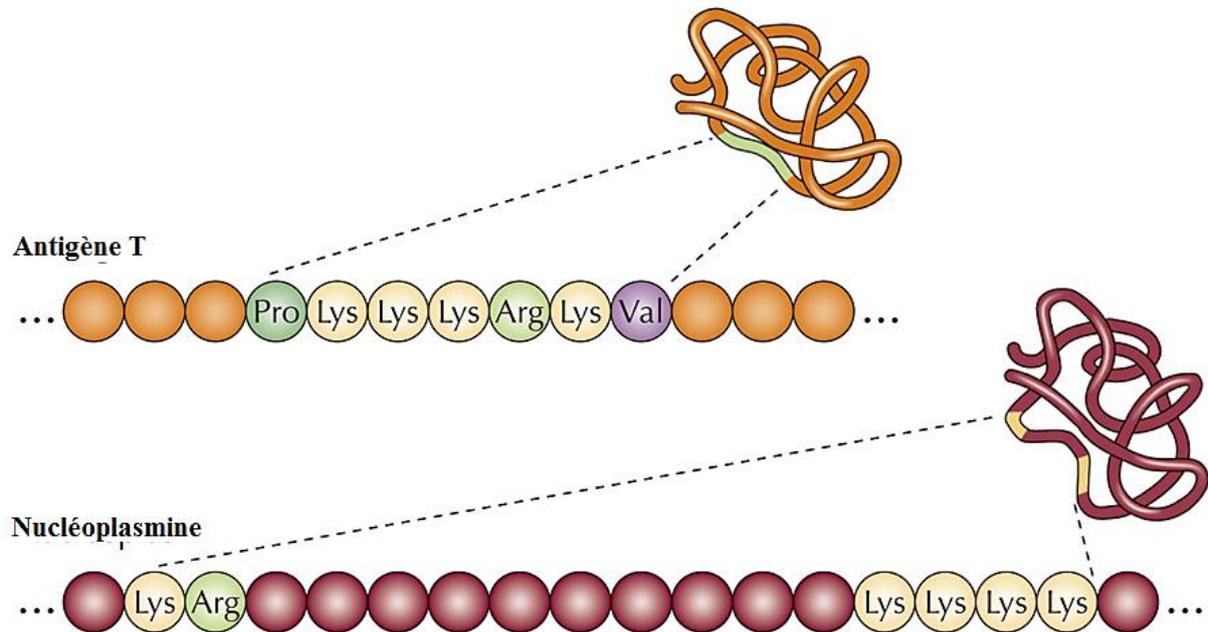
3.7.1. Transport sélectif de protéines vers et depuis le noyau

Plusieurs millions de macromolécules passent sélectivement entre le noyau et le cytoplasme toutes les minutes. Les bases du trafic sélectif à travers l'enveloppe nucléaire sont mieux comprises pour les protéines importées du cytoplasme au noyau. De telles protéines sont responsables de tous les aspects structuraux et fonctionnels du génome ; ils comprennent les histones, les ADN polymérase, les ARN polymérase, les facteurs de transcription, les facteurs d'épissage et bien d'autres. Ces protéines sont dirigées vers le noyau par des séquences d'acides aminés spécifiques, appelées signaux de localisation nucléaire ou NLS (de l'anglais Nuclear

localization signals), qui sont reconnues par les récepteurs de transport et dirigent le transport des protéines à travers le complexe de pores nucléaires.

Alan Smith et ses collègues ont caractérisé le premier signal de localisation nucléaire détaillé en 1984. Ces chercheurs ont étudié l'antigène T du virus simian 40 (SV40), une protéine codée par le virus qui initie la réplication de l'ADN viral dans des cellules infectées. Comme prévu pour une protéine de réplication, l'antigène T est normalement localisé dans le noyau. Le signal responsable de sa localisation nucléaire a d'abord été identifié par la découverte que la mutation d'un seul résidu de lysine empêche l'importation nucléaire, entraînant à la place une accumulation de l'antigène T dans le cytoplasme. Des études ultérieures ont défini le signal de localisation nucléaire de l'antigène T comme étant la séquence de sept aminoacides Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Non seulement cette séquence était-elle nécessaire au transport nucléaire de l'antigène T, mais son addition à d'autres protéines, normalement cytoplasmiques, était suffisante pour diriger leur accumulation dans le noyau.

Les signaux de localisation nucléaire ont depuis été identifiés dans de nombreuses autres protéines. Certaines de ces séquences, comme celle de l'antigène T, sont de courts tronçons riches en résidus d'acides aminés basiques (lysine et arginine). Cependant, souvent, les acides aminés qui forment le signal de localisation nucléaire sont proches les uns des autres mais ne sont pas immédiatement adjacents les uns aux autres. Par exemple, le signal de localisation nucléaire de la nucléoplasmine (une protéine impliquée dans l'assemblage de la chromatine) est constitué de deux parties : un couple Lys-Arg suivi de quatre lysines situées à dix acides aminés plus en aval (figure suivante). Les séquences Lys-Arg et Lys-Lys-Lys-Lys sont nécessaires pour le ciblage nucléaire, mais les dix acides aminés entre ces séquences peuvent être mutés sans affecter la localisation nucléaire. Comme cette séquence de localisation nucléaire est composée de deux éléments séparés, elle est appelée bipartite. Des motifs bipartites similaires semblent fonctionner comme signaux de localisation de nombreuses protéines nucléaires ; ils peuvent donc être plus communs que le signal de localisation nucléaire plus simple de l'antigène T. Alors que de nombreux signaux de localisation nucléaire consistent en ces résidus d'acides aminés basiques, souvent appelés signaux de localisation nucléaire basiques ou "classiques", les séquences d'acides aminés et les structures d'autres signaux de localisation nucléaire varient considérablement. Certains sont très éloignés dans la séquence d'acides aminés et dépendent du repliement normal de la protéine pour leur activité.



Signaux de localisation nucléaire

Le signal de localisation nucléaire de l'antigène T est constitué d'un seul segment d'acides aminés. En revanche, le signal de localisation nucléaire du nucléoplasme en est bipartite, consistant en une séquence Lys-Arg, suivie d'une séquence Lys-Lys-Lys-Lys située dix acides aminés plus en aval.

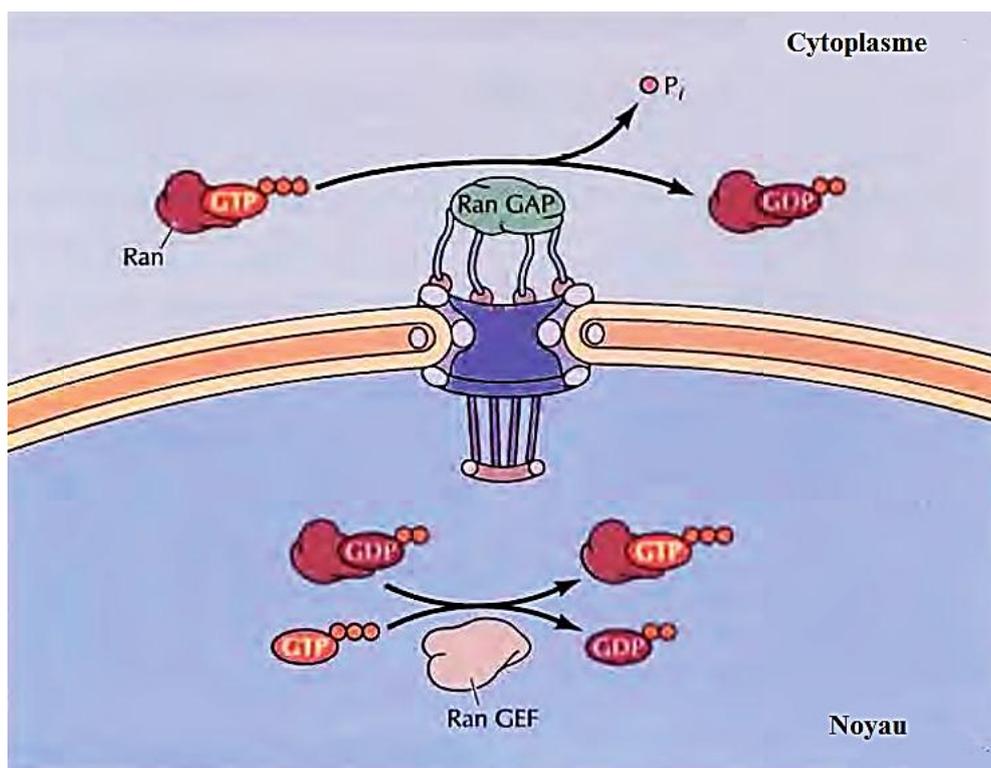
Les signaux de localisation nucléaire sont reconnus par les protéines qui jouent le rôle de récepteurs de transport nucléaire. La plupart sont des membres de la famille des protéines karyophérines et fonctionnent soit comme importines, qui transportent les macromolécules du cytoplasme au noyau, soit comme exportines, qui transportent les macromolécules du noyau au cytoplasme (tableau suivant).

Karyophérines avec des substrats connus

| | Karyopherine | Substrat |
|--------------------|------------------------------------|--|
| Importation | Dimère Kap α /Kap β 1 | Protéines avec NLS basique (ex. nucléoplasmine). |
| | Snurportine/Kap β 1 | snRNPs (U1, U2, U4, U5). |
| | /Kap β 1 seule | Cdk/complexes de cycline |
| | Kap β 2 (transportine) | Protéines de liaison à l'ARNm, protéines ribosomales |
| | Dimère importine7/Kap β 1 | Histone H1, protéines ribosomales |
| Exportation | Crm1 | Protéines à signal d'exportation nucléaire riche en leucine, snurportine |
| | CAS | Kap α |
| | Exportine t | ARNts |
| | Exportine 4 | Facteur d'élongation 5A |

Certaines importines (Kap β 1) agissent avec un adaptateur de karyopherine (Kap α) dans un hétérodimère pour importer des protéines contenant le signal de localisation nucléaire basique, et certaines karyopherines agissent comme importines pour une protéine et exportines pour une autre.

Le mouvement des macromolécules à travers le pore nucléaire est régulé par une protéine appelée Ran. C'est l'un des nombreux types de petites protéines de liaison au GTP dont la conformation et l'activité sont régulées par la liaison au GTP et l'hydrolyse. Pour Ran, les enzymes qui stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP sont localisées du côté cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire, alors que les enzymes qui stimulent l'échange du GDP pour le GTP sont localisées du côté nucléaire (figure suivante). Par conséquent, il existe une distribution inégale de Ran/GTP à travers le pore nucléaire, avec une concentration élevée de Ran/GTP dans le noyau. Cette concentration élevée de Ran/GTP dans le noyau détermine la direction du transport nucléaire des protéines cargos.

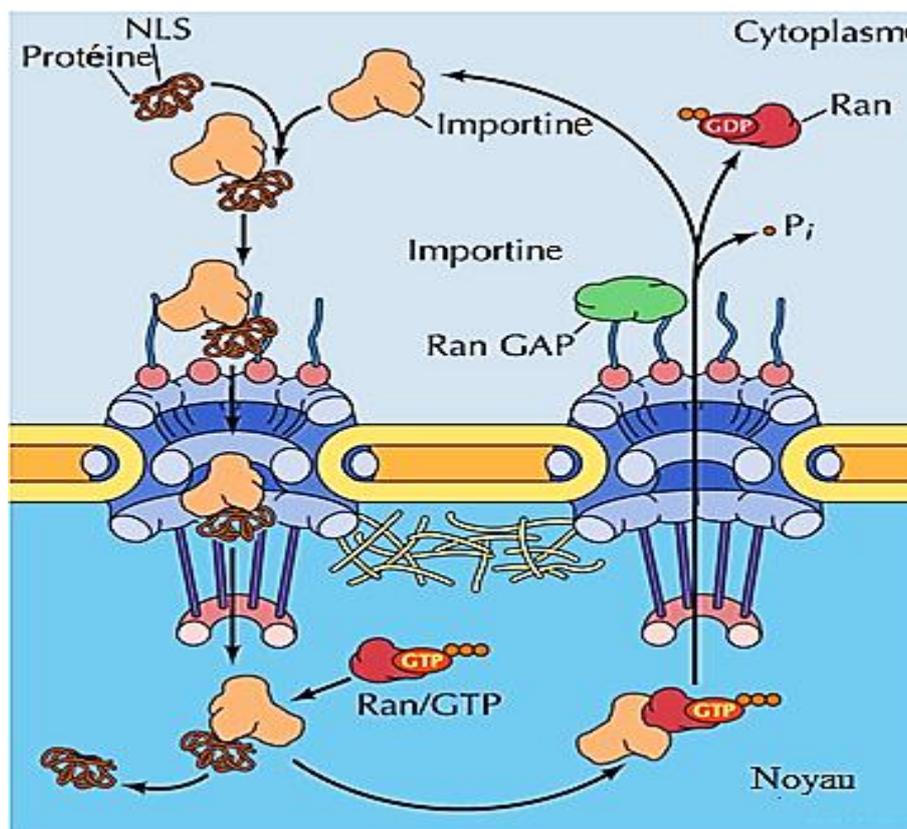


Distribution de Ran / GTP à travers l'enveloppe nucléaire

Une distribution inégale de Ran/GTP à travers l'enveloppe nucléaire est maintenue par la localisation de la protéine GTPase activant Ran (Ran GAP) et dans le cytoplasme le facteur d'échange nucléotidique Ranguanine (RAN GEF) dans le noyau. Dans le cytoplasme, Ran GAP (qui est lié aux filaments cytoplasmiques du complexe de pores nucléaires) stimule l'hydrolyse du GTP lié à Ran, conduisant à la conversion de Ran/GTP en Ran/GDP. Dans le noyau, Ran GEF stimule l'échange de GDP lié à Ran contre GTP, ce qui conduit à la conversion de Ran/GDP en Ran/GTP. Par conséquent, une concentration élevée de Ran/GTP est maintenue dans le noyau.

Ran régule le mouvement à travers le pore nucléaire en contrôlant l'activité des récepteurs de transport nucléaire. L'importation de protéines par le complexe de pores nucléaires commence lorsqu'une importine spécifique se lie au signal de localisation nucléaire d'une protéine de cargaison dans le cytoplasme (figure suivante). Ce complexe importine/cargo se lie ensuite aux protéines des filaments cytoplasmiques du complexe de pores nucléaires et le transport s'effectue par liaison séquentielle à des protéines de pores nucléaires spécifiques situées de plus en plus loin du côté nucléaire du complexe de pores. Du côté nucléaire du complexe de pores, le complexe importine/cargo est perturbé par la liaison au de Ran/GTP.

Cela provoque une modification de la conformation de l'importine, qui déplace la protéine de la cargaison et la libère dans le noyau.



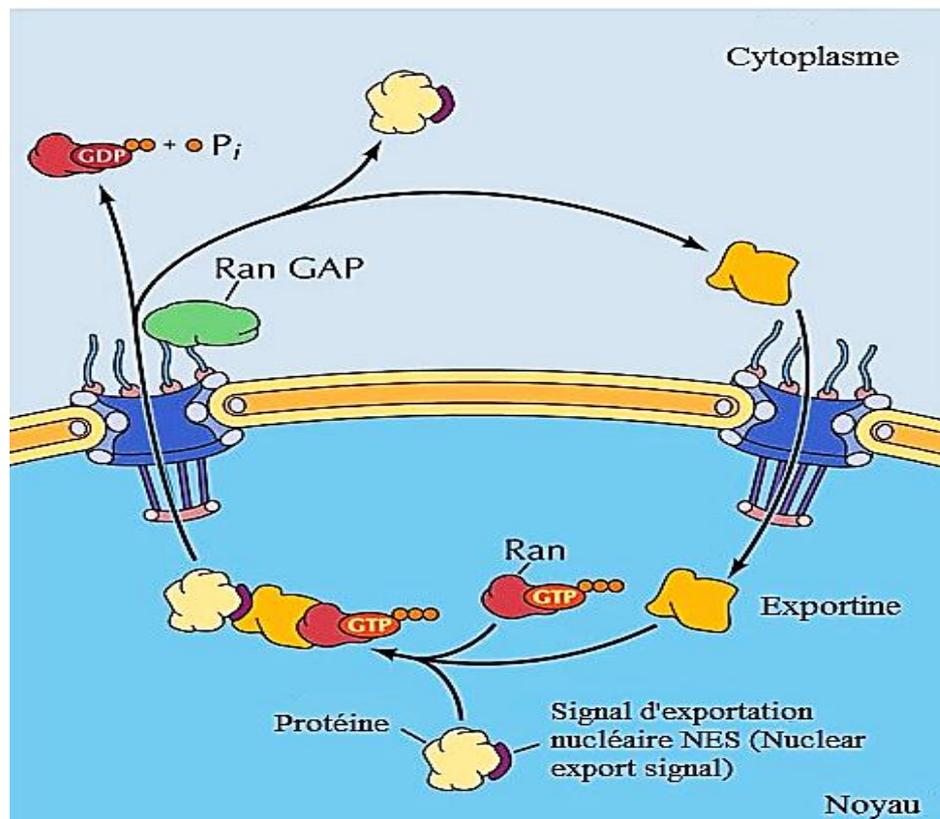
Importation de protéines dans le complexe de pores nucléaires

Le transport d'une protéine à travers le complexe de pores nucléaires commence lorsque sa séquence de localisation nucléaire (NLS) est reconnue par un récepteur importine de transport nucléaire. Le complexe : cargo (protéine avec la séquence de localisation nucléaire) / importine, se lie à des protéines de pores nucléaires spécifiques au niveau des filaments cytoplasmiques. En se liant séquentiellement davantage à des protéines internes de pores nucléaires, le complexe est transloqué à travers le pore nucléaire. Du côté nucléaire du pore, le complexe cargo/importine est perturbé par la liaison de Ran/GTP à l'importine. Le changement de conformation de l'importine déplace la protéine cargo et la libère dans le noyau. Le complexe importine-Ran/GTP est réexporté par le biais du pore nucléaire et le Ran-GAP (GTPase-activating protein) du cytoplasme, hydrolyse le GTP sur le Ran en GDP, libérant ainsi l'importine.

Le complexe importine-Ran / GTP est ensuite exporté via le complexe de pores nucléaires. Dans le cytoplasme, le GTP est hydrolysé en GDP. Cela libère l'importateur afin

qu'il puisse se lier à une nouvelle protéine de la cargaison dans le cytoplasme et participer à un autre cycle de transport. Le Ran/GDP formé dans le cytoplasme est ensuite ramené dans le noyau par son propre récepteur d'importation (une protéine appelée NTF2), où Ran/GTP est régénéré.

Certaines protéines restent dans le noyau après leur importation du cytoplasme, mais beaucoup d'autres font la navette entre le noyau et le cytoplasme. Certaines de ces protéines agissent comme vecteurs dans le transport d'autres molécules, telles que les ARN ; d'autres coordonnent les fonctions nucléaires et cytoplasmiques (par exemple, en régulant les activités des facteurs de transcription). Les protéines sont ciblées pour être exportées du noyau par des séquences spécifiques d'acides aminés, appelées signaux d'exportation nucléaire (NES). À l'instar des signaux de localisation nucléaire, les signaux d'exportation nucléaire sont reconnus par des exportines qui dirigent le transport des protéines à travers le complexe de pores nucléaires vers le cytoplasme. De nombreuses exportines appartiennent également à la famille des protéines karyophérines (voir tableau précédent). Comme les importines, les exportines se lient à Ran, qui est nécessaire à la fois pour l'exportation nucléaire et pour l'importation nucléaire (figure suivante).



Exportation nucléaire

Des complexes des protéines cargo portant des signaux d'exportation nucléaire (NES), exportines et Ran/GTP se forment dans le noyau. Après le transport à travers le complexe de pores nucléaires, Ran GAP stimule l'hydrolyse du GTP lié, entraînant la formation de Ran/GDP et la libération de la protéine cargo et de l'exportine dans le cytoplasme. L'exportine est ensuite ramené dans le noyau.

Cependant, Ran/GTP favorise la formation de complexes stables entre les exportines et leurs protéines de cargaison, alors qu'il dissocie les complexes entre les importines et leurs cargaisons. Cet effet de la liaison Ran/GTP sur les exportines dicte le déplacement des protéines contenant des signaux d'exportation nucléaires du noyau au cytoplasme. Ainsi, les exportines forment des complexes stables avec leurs protéines de cargaison en association avec Ran/GTP dans le noyau. Après le transport du côté cytosolique de l'enveloppe nucléaire, l'hydrolyse du GTP et la libération de Ran/GDP entraînent la dissociation de la protéine cargo, qui est libérée dans le cytoplasme.

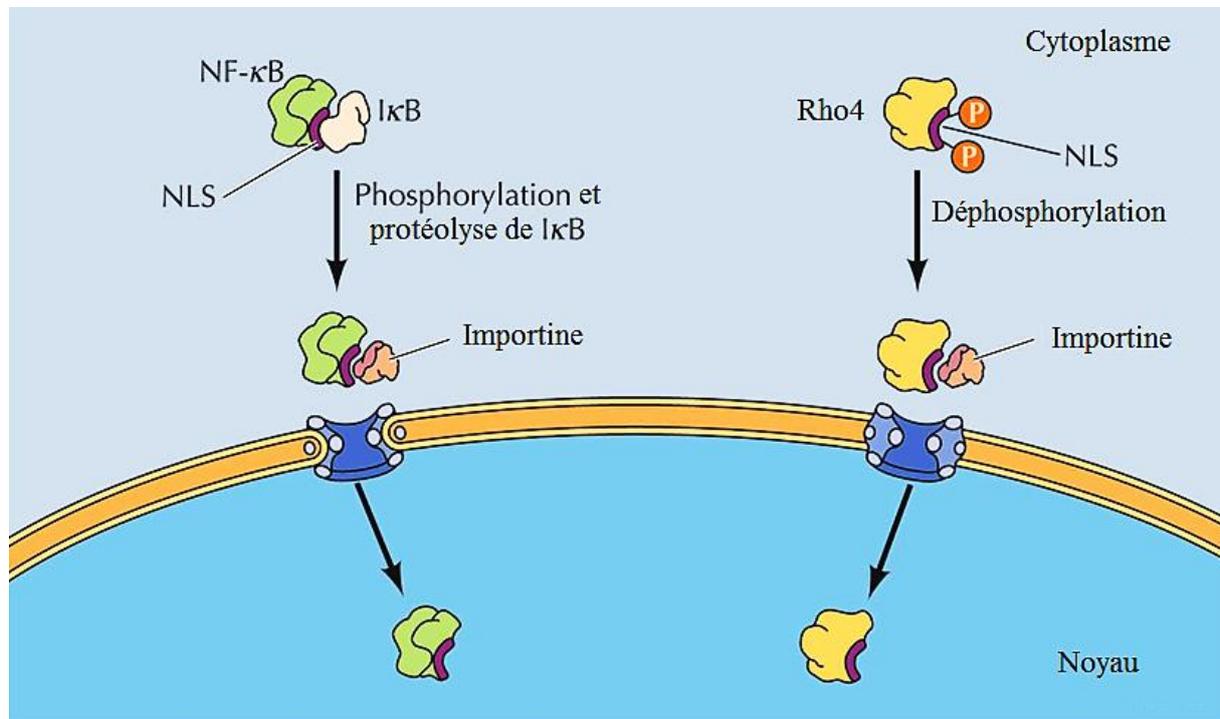
Régulation de l'importation de protéines nucléaires

Le transport des protéines vers le noyau est un autre niveau auquel les activités des protéines nucléaires peuvent être contrôlées. Les facteurs de transcription, par exemple, ne sont fonctionnels que lorsqu'ils sont présents dans le noyau. La réglementation de leur importation et de leur exportation vers le noyau est donc un nouveau moyen de contrôler l'expression des gènes. L'importation nucléaire réglementée de facteurs de transcription et de protéines kinases joue un rôle important dans le contrôle du comportement des cellules en réponse aux changements de l'environnement, car elle fournit un mécanisme par lequel les signaux reçus à la surface des cellules peuvent être transmis au noyau. L'importance de l'importation nucléaire réglementée est démontrée par la découverte que les changements d'affinité pour le récepteur de transport nucléaire de seulement deux protéines du complexe de pores nucléaires ont apparemment contribué à la scission évolutive entre *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans*.

Dans un mécanisme de régulation, des facteurs de transcription (ou d'autres protéines) s'associent à des protéines cytoplasmiques qui masquent leurs signaux de localisation nucléaire ; parce que leurs signaux ne sont plus reconnaissables, ces protéines restent dans le cytoplasme. Un bon exemple est fourni par le facteur de transcription NF- κ B, qui est activé en réponse à une variété de signaux extracellulaires dans des cellules de mammifère (figure suivante). Dans les cellules non stimulées, le NF- κ B se trouve sous forme de complexe inactif avec une protéine inhibitrice (I κ B) dans le cytoplasme. La liaison à I κ B masque le signal de localisation nucléaire NF- κ B, empêchant ainsi le transport de NF- κ B vers le noyau. Dans les cellules stimulées, l'I κ B est phosphorylée et dégradée par protéolyse à médiation par l'ubiquitine, permettant au NF- κ B de pénétrer dans le noyau et d'activer la transcription de ses gènes cibles.

L'importation nucléaire d'autres facteurs de transcription est régulée directement par leur phosphorylation plutôt que par leur association à des protéines inhibitrices (voir la figure ci-après). Par exemple, le facteur de transcription de levure Rho4 est phosphorylé au niveau d'un

résidu de sérine adjacent à son signal de localisation nucléaire. La phosphorylation sur ce site inhibe Pho4 en interférant avec son importation nucléaire. Dans des conditions appropriées, une déphosphorylation régulée de ce site, active Pho4 en permettant sa translocation vers le noyau.



Régulation de l'importation nucléaire de facteurs de transcription

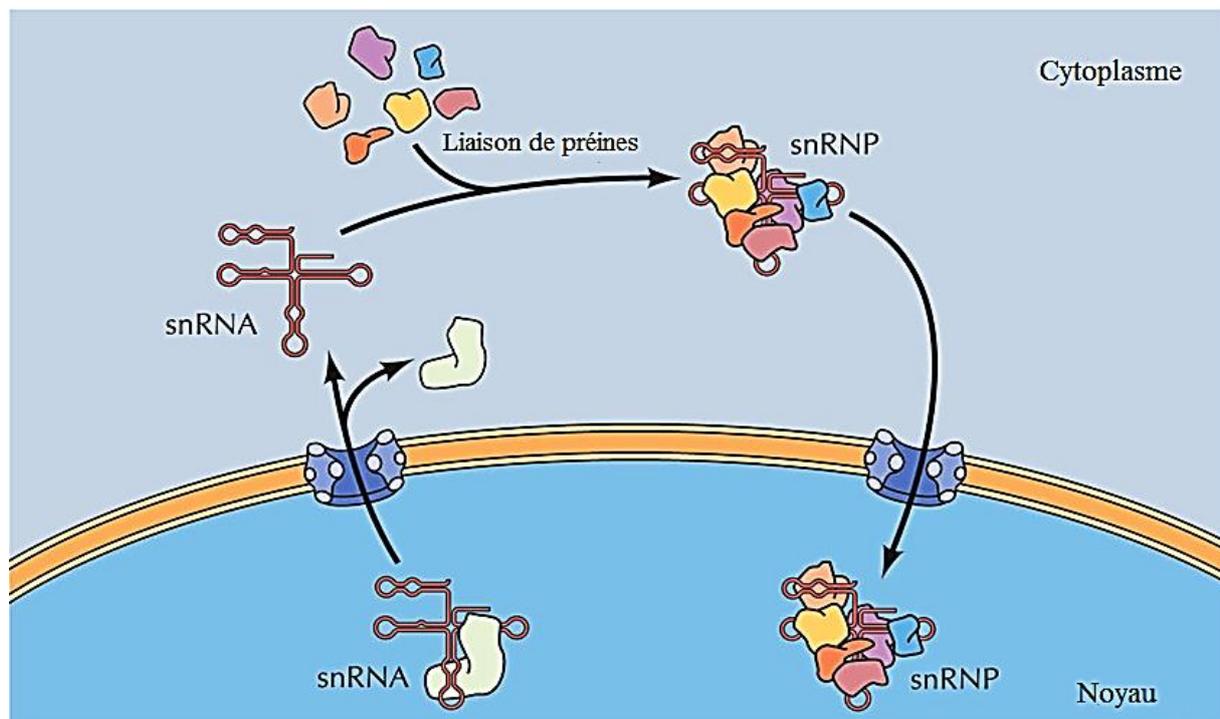
Le facteur de transcription NF- κ B est maintenu sous forme de complexe inactif avec I κ B, qui masque sa séquence de localisation nucléaire (NLS) dans le cytoplasme. En réponse à des signaux extracellulaires appropriés, l'I κ B est phosphorylé et dégradé par protéolyse, ce qui permet d'importer du NF- κ B dans le noyau. Le facteur de transcription de levure Pho4 est maintenu dans le cytoplasme par phosphorylation au voisinage de sa séquence de localisation nucléaire. La déphosphorylation régulée expose la NLS et permet à Pho4 d'être transporté dans le noyau.

Transport des ARNs

Alors que de nombreuses protéines sont sélectivement transportées du cytoplasme au noyau, la plupart des ARN sont exportés du noyau au cytoplasme. Comme les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme, l'exportation d'ARNm, d'ARNr et d'ARNt est une étape cruciale de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Comme pour l'importation de protéines, l'exportation de tous les ARN via le complexe de pores nucléaires est un processus actif dépendant de l'énergie, qui nécessite l'interaction des récepteurs de transport avec le complexe de pores nucléaires. Les importines et les exportines de Karyophérine (voir le tableau précédent) transportent la plupart des ARNt, ARNr et petits ARN nucléaires de manière dépendante de Ran/GTP. Cependant, les ARNm sont exportés par un complexe de deux protéines (l'"exportateur d'ARNm"), dont l'une est liée au transporteur Ran/GDP, NTF2. Ce transport des ARNm semble être indépendant de Ran.

Les ARN sont transportés à travers l'enveloppe nucléaire sous forme de complexes de ribonucléoprotéines (RNPs). Les ARN ribosomiaux sont d'abord associés aux protéines ribosomiales et aux protéines spécifiques de traitement de l'ARN dans le nucléole, puis les sous-unités ribosomiales 60S et 40S naissantes sont ensuite transportées vers le cytoplasme. Leur exportation à partir du noyau est médiée par les signaux d'exportation nucléaires (NES) présents sur les protéines du complexe de sous-unités. Les pré-ARNm et ARNm sont associés à un ensemble d'au moins 20 protéines tout au long de leur traitement dans le noyau et de leur transport éventuel vers le cytoplasme, qui est médié par le complexe exportateur d'ARNm après son recrutement de par l'ARNm traité. Les ARNt sont exportés du noyau par l'exportine-t, qui se lie directement aux ARNt.

Contrairement aux ARNm, ARNt et ARNr, qui fonctionnent dans le cytoplasme, de nombreux petits ARNs (snARNs et snoRNAs) fonctionnent dans le noyau en tant que composants de la machinerie de traitement de l'ARN. De manière peut être surprenante, les snARNs sont initialement transportés du noyau au cytoplasme, où ils s'associent à des protéines pour former des snRNPs fonctionnelles, puis retournent au noyau (figure suivante). Les récepteurs protéiques de transport qui se lient à la coiffe 5' des snRNAs semblent être impliqués dans l'exportation des snRNAs vers le cytoplasme. En revanche, les séquences présentes sur les protéines snRNP sont responsables du transport des snRNPs du cytoplasme au noyau.



Transport des snARN entre le noyau et le cytoplasme

Les petits ARN nucléaires (snARN "Small nuclear RNA") sont initialement exportés du noyau vers le cytoplasme, où ils s'associent avec des protéines pour former des snRNP. Les snRNP assemblés sont ensuite ramenés dans le noyau.