TOUT EN FICHES

Sous la direction de
Daniel Boujard
Professeur à l'université Rennes 1

LE COURS DE

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

4e ÉDITION

LICENCE, SANTÉ, CAPES

Bruno Anselme
Professeur en BCPST 2 au lycée Fénelon (Paris)

Christophe Cullin
Professeur à l'université de Bordeaux

Céline Raguénès-Nicol
Maître de conférence à l'université Rennes 1

DUNOD

Pour aller plus loin et mettre toutes les chances de votre côté, des ressources complémentaires sont disponibles sur le site www.dunod.com.

Connectez-vous à la page de l'ouvrage (grâce aux menus déroulants, ou en saisissant le titre, l'auteur ou l'ISBN dans le champ de recherche de la page d'accueil).
Sur la page de l'ouvrage, sous la couverture, cliquez sur le lien « LES + EN LIGNE ».

© Dunod, 2012, 2015, 2019, 2022
11, rue Paul Bert, 92240 Malakoff
www.dunod.com
ISBN 978-2-10-084711-2

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).
Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Table des matières

Remerciements X

Avant-propos XI

Comment utiliser cet ouvrage ? XII

Partie 1 Introduction

Chapitre 1 Les fondements de la biologie cellulaire

Fiche 1 La théorie cellulaire 2

Fiche 2 Les constituants des êtres vivants 4

Fiche 3 L'origine des cellules 6

Fiche 4 La diversité des cellules 8

Fiche 5 Les virus aux frontières du vivant 10

Fiche 6 Les techniques de la microscopie* 12

Fiche 7 Le fractionnement cellulaire* 14

Focus *Des systèmes très sophistiqués* 16

QCM 17

Chapitre 2 Biochimie et bioénergétique

Fiche 8 La chimie de la vie cellulaire 20

Fiche 9 La thermodynamique de la vie cellulaire 22

Fiche 10 Les aspects mécaniques de la vie cellulaire 24

Fiche 11 L'eau et les molécules organiques 26

Fiche 12 Les petites molécules organiques 28

Fiche 13 Les glucides 30

Fiche 14 Les lipides 32

Fiche 15 Les acides nucléiques 34

Fiche 16 Les macromolécules 36

Fiche 17 La stabilité des macromolécules 38

Fiche 18 Les niveaux structuraux des protéines 40

Fiche 19 Cinétique et thermodynamique de la cellule 42

Fiche 20 L'enthalpie libre et le métabolisme 44

Fiche 21 L'énergie cellulaire 46

Fiche 22 Les conversions énergétiques 48

Fiche 23 Les enzymes « michaeliennes » 50

Fiche 24 Les enzymes allostériques 52

Fiche 25 Les techniques d'étude des protéines* 54

Fiche 26 L'électrophorèse* 56

Focus *Les prions* 58

QCM 59

* : fiches techniques

Partie 2 Du gène à la fonction

Chapitre 3 Structuration de l'ADN

Fiche 27	La structure de l'ADN	62
Fiche 28	L'organisation des génomes	64
Fiche 29	La structure du gène	66
Fiche 30	De l'ADN au chromosome	68
Fiche 31	La réplication de l'ADN	70
Fiche 32	La cohésion des chromosomes	72
Fiche 33	Les mécanismes de mutation	74
Fiche 34	Surveillance et réparation de l'ADN	76
Fiche 35	La recombinaison homologue	78
Fiche 36	La transposition	80
Fiche 37	Télomérase et longévité	82
Fiche 38	Les techniques classiques de séquençage du génome*	84
Fiche 39	Les techniques haut débit de séquençage du génome*	86
Fiche 40	La PCR*	88
Fiche 41	Les technologies de l'ADN recombinant*	90
Fiche 42	L'édition des génomes	92
Focus	*La découverte de la double hélice*	94
QCM		95

Chapitre 4 De l'ADN aux protéines

Fiche 43	La découverte du code génétique	98
Fiche 44	Les différentes classes d'ARN	100
Fiche 45	Les grandes étapes de la transcription chez les procaryotes	102
Fiche 46	Les grandes étapes de la transcription chez les eucaryotes	104
Fiche 47	L'épissage	106
Fiche 48	Modification en 5' et 3' des ARNm	108
Fiche 49	Les ARNt	110
Fiche 50	Les ribosomes	112
Fiche 51	Les grandes étapes de la traduction	114
Fiche 52	Les modifications post-traductionnelles	116
Fiche 53	Les méthodes d'étude du transcriptome*	118
Fiche 54	Les méthodes d'étude du protéome*	120
Focus	*Les protéinopathies*	122
QCM		123

Chapitre 5 Le contrôle de l'expression des gènes

Fiche 55	Le contrôle de la transcription chez les procaryotes	126
Fiche 56	Le contrôle de la transcription chez les eucaryotes	128
Fiche 57	Les régulateurs de la transcription	130
Fiche 58	L'épissage alternatif	132
Fiche 59	Les contrôles post-transcriptionnels	134
Fiche 60	Les facteurs de transcription	136
Fiche 61	L'édition des ARN	138
Fiche 62	La modification épigénétique	140
Fiche 63	L'empreinte génomique	142
Fiche 64	Clonage et reprogrammation nucléaire	144
Fiche 65	La production de protéines recombinantes*	146

Fiche 66 L'immunoprécipitation de la chromatine* 148
Focus *L'inactivation du chromosome X* 150
QCM 151

Partie 3 Organisation de la cellule

Chapitre 6 Les membranes cellulaires

Fiche 67 Unicité et diversité des membranes 154
Fiche 68 La biosynthèse des lipides membranaires 156
Fiche 69 Structure et dynamique des membranes 158
Fiche 70 L'asymétrie des membranes 160
Fiche 71 Les types de protéines membranaires 162
Fiche 72 La diversité des fonctions membranaires 164
Fiche 73 Fonction de compartimentation et perméabilité des membranes 166
Fiche 74 La diffusion facilitée 168
Fiche 75 Le transport actif primaire 170
Fiche 76 Le co-transport 172
Fiche 77 Ions, membranes et potentiel électrique 174
Fiche 78 Le potentiel de membrane 176
Fiche 79 L'influx nerveux 178
Fiche 80 La diversité des potentiels d'action 180
Fiche 81 Les modèles d'études de la membrane 182
Fiche 82 Le suivi de Particule Unique (SPT)* 184
Fiche 83 La fluorescence* 186
Focus *Canalopathie – Blocage de canaux* 188
QCM 189

Chapitre 7 Les compartiments cellulaires et l'adressage des protéines

Fiche 84 La compartimentation de la cellule 192
Fiche 85 Du cytoplasme vers le noyau 194
Fiche 86 Le transport vers les peroxysomes 196
Fiche 87 Le transport vers les mitochondries et les chloroplastes 198
Fiche 88 L'envoi des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE) 200
Fiche 89 La maturation et le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique 202
Fiche 90 La translocation des protéines hors du réticulum : ERAD et UPR 204
Fiche 91 Les protéines chaperonnes 206
Fiche 92 Les protéines intrinsèquement désordonnées et les organelles non membranaires 208
Fiche 93 Le protéasome et l'ubiquitination 210
Fiche 94 Les méthodes d'étude de l'adressage cellulaire* 212
Focus *Les pathologies associées au dysfonctionnement du RE* 214
QCM 215

Chapitre 8 Le transport vésiculaire

Fiche 95 Les mécanismes moléculaires du transport vésiculaire 218
Fiche 96 Du RE vers le Golgi 220
Fiche 97 Les protéines résidentes du RE 222
Fiche 98 Les compartiments golgiens 224
Fiche 99 Du Golgi aux lysosomes 226
Fiche 100 Le transport vésiculaire et l'exocytose 228
Fiche 101 L'endocytose 230
Fiche 102 Les vésicules extracellulaires 232

Fiche 103 L'autophagie et la mitophagie 234
Fiche 104 La levure pour l'étude du transport 236
Focus *Endocytose, exocytose, synapse et botox* 238
QCM 239

Chapitre 9 La bioénergétique cellulaire

Fiche 105 Les oxydations et phosphorylations sur le substrat 242
Fiche 106 La chaîne respiratoire aérobie 244
Fiche 107 Les métabolismes oxydatifs anaérobies 246
Fiche 108 La production d'ATP par les ATPsynthases 248
Fiche 109 Les métabolismes d'autotrophie au carbone 250
Fiche 110 L'exploitation de la lumière dans le chloroplaste 252
Fiche 111 Photosystèmes, pouvoir réducteur et énergie chimique 254
Fiche 112 La production de glucides 256
Fiche 113 La diversification des assimilats 258
Fiche 114 La photorespiration 260
Fiche 115 Le génome des mitochondries et des plastes 262
Fiche 116 Dynamique mitochondriale : entre fusion et fission 264
Focus *Pathologies mitochondriales* 266
QCM 267

Chapitre 10 Le cytosquelette des eucaryotes

Fiche 117 Différents filaments pour structurer la cellule 270
Fiche 118 Les filaments intermédiaires 272
Fiche 119 Les tubulines et l'assemblage dynamique des microtubules 274
Fiche 120 Les structures associées aux microtubules 276
Fiche 121 Les microfilaments d'actine 278
Fiche 122 Moteurs protéiques et mouvements intracellulaires 280
Fiche 123 Le cytosquelette des cellules musculaires squelettiques 282
Fiche 124 Le mécanisme de la contraction des cellules musculaires squelettiques 284
Fiche 125 Cytosquelette et motilité cellulaire 286
Fiche 126 La cryomicroscopie électronique 288
Focus *Les myopathies, des pathologies du cytosquelette* 290
QCM 291

Chapitre 11 La communication cellulaire

Fiche 127 Les récepteurs à protéine G 294
Fiche 128 Les récepteurs à activité kinasique 296
Fiche 129 Les cascades de kinase dans la cellule 298
Fiche 130 Protéolyse et transduction 300
Fiche 131 Des voies très conservées 302
Fiche 132 Cytosquelette et voies de signalisation 304
Fiche 133 Les voies de signalisation chez les plantes 306
Fiche 134 La méthode double hybride* 308
Focus *Les diabètes sucrés* 310
QCM 311

Chapitre 12 Cycle cellulaire et apoptose

Fiche 135 Les modalités de la division cellulaire 314
Fiche 136 Le chromosome mitotique et les phases de la mitose 316

Fiche 137 La mécanique mitotique 318
Fiche 138 Le cycle cellulaire et son contrôle 320
Fiche 139 Les morts cellulaires 322
Fiche 140 Division cellulaire et apoptose 324
Fiche 141 Le modèle *C. elegans* et la découverte de l'apoptose 326
Fiche 142 La culture cellulaire animale* 328
Focus *La découverte du MPF* 330
QCM 331

Partie 4 Les cellules en société

Chapitre 13 Jonctions cellulaires et matrice extracellulaire

Fiche 143 Les matrices extracellulaires animales 334
Fiche 144 Les matrices extracellulaires végétales 336
Fiche 145 L'adhérence des cellules 338
Fiche 146 Jonctions cellulaires – Communications entre cytoplasmes 340
Fiche 147 Jonctions serrées et polarité cellulaire 342
Fiche 148 Les cadhérines 344
Fiche 149 Les intégrines 346
Fiche 150 Les CAM 348
Fiche 151 La culture primaire* 350
Fiche 152 Les synapses 352
Fiche 153 L'intégration nerveuse par les neurones 354
Focus *Pathologie des jonctions cellulaires* 356
QCM 357

Chapitre 14 Vie et mort des organismes multicellulaires

Fiche 154 La méiose et la recombinaison génétique 360
Fiche 155 La détermination du sexe 362
Fiche 156 La fécondation 364
Fiche 157 Organisation des axes embryonnaires 366
Fiche 158 Les gènes homéotiques 368
Fiche 159 Le modèle drosophile 370
Fiche 160 Les mécanismes cellulaires de la gastrulation 372
Fiche 161 Les cellules souches pluripotentes 374
Fiche 162 Les cellules souches pluripotentes induites 376
Fiche 163 Les cellules souches embryonnaires et la transgenèse 378
Fiche 164 Le développement des plantes 380
Fiche 165 La sénescence réplicative 382
Fiche 166 La sénescence métabolique ou chronologique 384
Focus *Dolly* 386
QCM 387

Chapitre 15 Organisation et renouvellement des tissus

Fiche 167 Les grandes catégories de tissus 390
Fiche 168 Les épithéliums 392
Fiche 169 Les tissus conjonctifs 394
Fiche 170 Le renouvellement des tissus 396
Fiche 171 Les cellules souches adultes 398
Fiche 172 Le renouvellement des tissus musculaires 400
Fiche 173 Le renouvellement des cellules sanguines 402

Fiche 174 L'angiogenèse 404
Fiche 175 Les cellules souches neurales 406
Fiche 176 L'ingénierie des cellules souches adultes* 408
Fiche 177 La cytométrie en flux* 410
Focus *Thérapie génique et maladie des « bébés bulles »* 412
QCM 413

Chapitre 16 Le système immunitaire

Fiche 178 Les cellules de l'immunité 416
Fiche 179 Reconnaissance des pathogènes et premières défenses 418
Fiche 180 Le système du complément 420
Fiche 181 La réponse inflammatoire 422
Fiche 182 Les médiateurs de l'inflammation et les anti-inflammatoires 424
Fiche 183 Phagocytose et production de radicaux libres 426
Fiche 184 Interférons et Natural Killer : d'autres réponses innées aux virus 428
Fiche 185 Les lymphocytes ont des récepteurs spécifiques d'antigènes 430
Fiche 186 Origine et diversité des récepteurs B et T 432
Fiche 187 Les protéines du CMH, structure et propriétés 434
Fiche 188 Le développement des lymphocytes et l'apprentissage du soi cellulaire 436
Fiche 189 L'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T 438
Fiche 190 Les cellules présentatrices d'antigènes 440
Fiche 191 Les LT $CD4^+$ effecteurs dirigent les réponses immunes adaptatives 442
Fiche 192 Les cytokines 444
Fiche 193 La réponse immune adaptative à médiation cellulaire 446
Fiche 194 La production des anticorps au cours de la réponse humorale 448
Fiche 195 Le rôle des anticorps dans les mécanismes de défense 450
Fiche 196 Tolérance et points de contrôle immunitaire 452
Fiche 197 La mémoire immunitaire 454
Fiche 198 L'utilisation des anticorps au laboratoire* 456
Focus *L'immunité des muqueuses* 458
QCM 459

Chapitre 17 Les cancers

Fiche 199 Les types de cancers 462
Fiche 200 Propriétés des cellules tumorales 464
Fiche 201 Les bases moléculaires de la cancérisation 466
Fiche 202 Oncogènes et suppresseurs de tumeurs 468
Fiche 203 Les agents transformants externes 470
Fiche 204 Les facteurs intrinsèques favorisant les cancers 472
Fiche 205 Le développement d'une tumeur 474
Fiche 206 Envahissement par les métastases 476
Fiche 207 Principe des traitements classiques anti-tumoraux 478
Fiche 208 Les thérapies ciblées 480
Fiche 209 Immunothérapie des cancers 482
Focus *p53, gardienne du génome* 484
QCM 485

Glossaire 487
Index 492
Crédits iconographiques 498

Table des fiches techniques

Fiche 6	Les techniques de la microscopie	12
Fiche 7	Le fractionnement cellulaire	14
Fiche 25	Les techniques d'étude des protéines	54
Fiche 26	L'électrophorèse	56
Fiche 38	Les techniques classiques de séquençage du génome	84
Fiche 39	Les techniques haut débit de séquençage du génome	86
Fiche 54	Les méthodes d'étude du protéome	120
Fiche 65	La production de protéines recombinantes	146
Fiche 66	L'immunoprécipitation de la chromatine	148
Fiche 82	Le suivi de Particules Unique (SPT)	184
Fiche 83	La fluorescence	186
Fiche 94	Les méthodes d'étude de l'adressage cellulaire	212
Fiche 126	La cryomicroscopie électronique	288
Fiche 134	La méthode double hybride	308
Fiche 142	La culture cellulaire animale	328
Fiche 151	La culture primaire	350
Fiche 176	L'ingénierie des cellules souches adultes	408
Fiche 177	La cytométrie en flux	410
Fiche 198	L'utilisation des anticorps au laboratoire	456

Remerciements

L'ensemble des chapitres de ce manuel a fait l'objet d'une relecture attentive. Les auteurs souhaitent remercier vivement :

- Vincent Leclerc, de l'université de Strasbourg, pour le travail remarquable de relecture qu'il a effectué. Aucune fiche n'a été épargnée par ses critiques, toujours pertinentes, et cet ouvrage lui doit beaucoup.

L'ensemble du manuscrit a été revu, chacun dans sa spécialité, par les membres du comité de lecture.

Un grand merci à :

- Guiseppe Baldacci de l'université Paris Diderot ;
- Nathalie Davoust-Nataf de l'École Normale Supérieure de Lyon ;
- Hélène Vincent-Schneider de l'université Paris-Sud ;
- Laurence Duchesne, Reynald Gillet, Christophe Héligon, Sébastien Huet, Jean-François Hubert, Claire Piquet-Pellorce et Daniel Thomas, l'équipe rennaise de biologie cellulaire qui a été fortement mise à contribution.

Merci également à :

- Alain Fautrel de la plate-forme d'histopathologie de Rennes pour ses nombreuses illustrations ;
- Charlotte Brigand du plateau de culture cellulaires de l'UMR 6026 (université de Rennes 1) ;
- Georges Baffet, chercheur à l'Inserm (université de Rennes 1) pour leur contribution à l'iconographie.

Enfin, merci à Alain Gerfaud pour la réalisation de nombreuses figures de ce manuel et pour sa patience parfois mise à rude épreuve.

Pour la 4e édition, merci de leur relecture à Francis Omilli et Laurence Fontaine.

Avant-propos

Le prix Nobel de Chimie 2014 a été remis à Eric Betzig, Stephen Hell et William Moerner pour le développement récent de technique de microscopie à fluorescence permettant de visualiser le vivant à l'échelle nanoscopique.

Citer un prix Nobel de chimie dans l'avant-propos d'un manuel de Biologie peut paraitre curieux. En fait cela témoigne simplement qu'en ce début de XXI^{e} siècle les frontières de la biologie ont été déplacées.

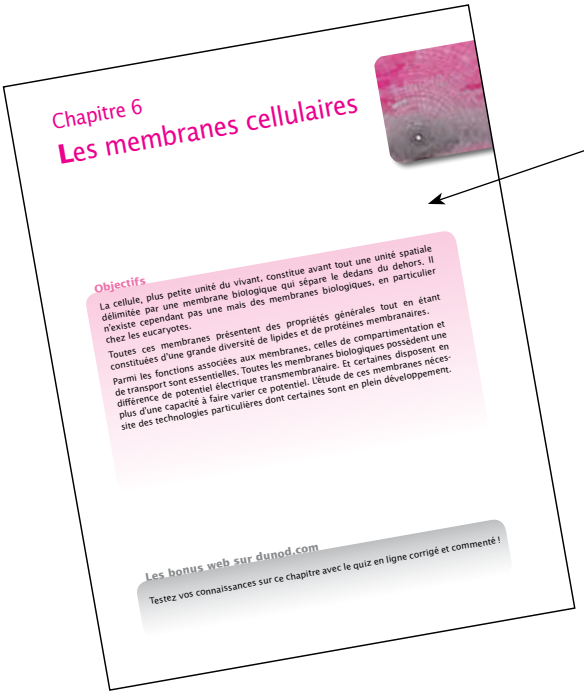
En autorisant l'observation dans des cellules vivantes à des résolutions nanométriques, il devient possible de voir **dans la cellule vivante** le déplacement ou le changement de formes des molécules qui la constituent.

La frontière entre la biochimie et la biologie cellulaire s'efface. Le décryptage des mécanismes de fonctionnement de la cellule de l'échelle moléculaire à l'organisme sans discontinuité ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre le vivant.

L'enseignement de la biologie cellulaire doit tenir compte de ces ruptures. Ce « cours en fiche » a pour vocation de donner aux étudiants des connaissances actualisées sur l'organisation à l'échelle moléculaire de la cellule puis d'aborder comment ces ensembles moléculaires contribuent au fonctionnement de la cellule. Mais les cellules sont multiples et se spécialisent dans les organismes pluricellulaires. C'est cette « cellule en société » qui sera étudiée dans les derniers chapitres.

Cet ouvrage est destiné aux étudiants de licence et à ceux qui préparent les concours de l'enseignement. Il s'adresse donc à un public varié aux connaissances diverses. L'avantage de la formule « en fiches » est qu'elle permet une lecture différenciée. Nous espérons ainsi que ce livre pourra accompagner le lecteur sur plusieurs années.

Comment utiliser


Chapitre 6

Les membranes cellulaires

Objectifs

La cellule, plus petite unité du vivant, constitue avant tout une unité spatiale délimitée par une membrane biologique qui sépare le dedans du dehors. Il n'existe cependant pas une mais des membranes biologiques, en particulier chez les eucaryotes.

Toutes ces membranes présentent des propriétés générales tout en étant constituées d'une grande diversité de lipides et de protéines membranaires.

Parmi les fonctions associées aux membranes, celles de compartimentation et de transport sont essentielles. Toutes les membranes biologiques possèdent une différence de potentiel électrique transmembranaire. Et certaines disposent en plus d'une capacité à faire varier ce potentiel. L'étude de ces membranes nécessite des technologies particulières dont certaines sont en plein développement.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

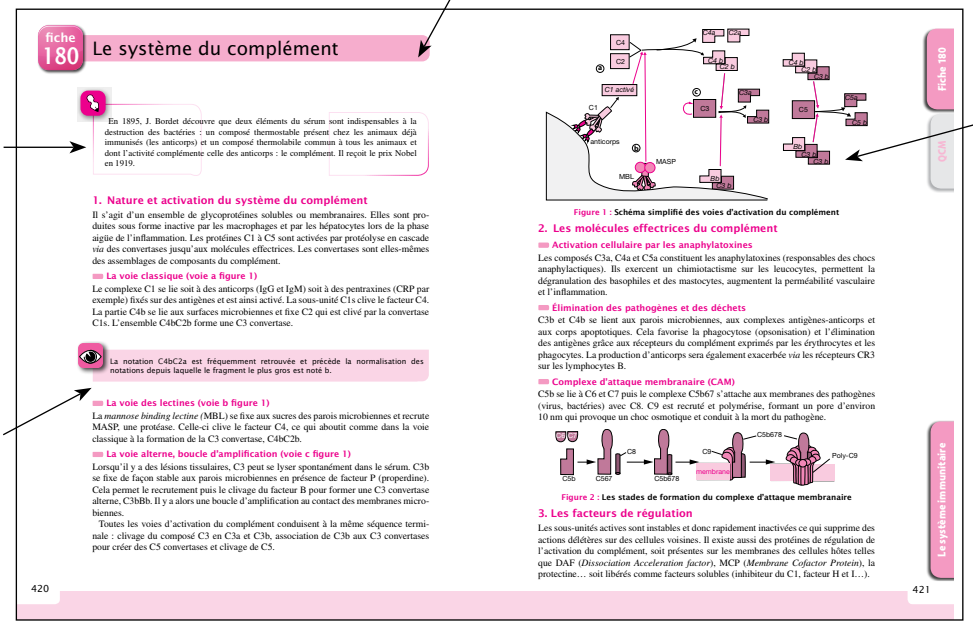
17 chapitres
auquels sont associés
des bonus web à retrouver
sur dunod.com

209 fiches de cours en double-page
Les notions essentielles avec des renvois
pour naviguer d'une fiche à l'autre

« Autour du cours » :
des conseils méthodologiques ou des anecdotes historiques

Les points clés à retenir

De très nombreux schémas


fiche 180 Le système du complément

En 1895, J. Bordet découvre que deux éléments du sérum sont indispensables à la destruction des bactéries : un composé thermostable présent chez les animaux déjà immunisés (les anticorps) et un composé thermolabile commun à tous les animaux et dont l'activité complémente celle des anticorps : le complément. Il reçoit le prix Nobel en 1919.

1. Nature et activation du système du complément

Il s'agit d'un ensemble de glycoprotéines solubles ou membranaires. Elles sont produites sous forme inactive par les macrophages et par les hépatocytes lors de la phase aigüe de l'inflammation. Les protéines C1 à C5 sont activées par protéolyse en cascade *via* des convertases jusqu'aux molécules effectrices. Les convertases sont elles-mêmes des assemblages de composants du complément.

La voie classique (voie a figure 1)

Le complexe C1 se lie soit à des anticorps (IgG et IgM) soit à des pentraxines (CRP par exemple) fixés sur des antigènes et est ainsi activé. La sous-unité C1s clive le facteur C4. La partie C4b se lie aux surfaces microbiennes et fixe C2 qui est clivé par la convertase C1s. L'ensemble C4bC2b forme une C3 convertase.

La notation C4bC2a est fréquemment retrouvée et précède la normalisation des notations depuis laquelle le fragment le plus gros est noté b.

La voie des lectines (voie b figure 1)

La *mannose binding lectine* (MBL) se fixe aux sucres des parois microbiennes et recrute MASP, une protéase. Celle-ci clive le facteur C4, ce qui aboutit comme dans la voie classique à la formation de la C3 convertase, C4bC2b.

La voie alterne, boucle d'amplification (voie c figure 1)

Lorsqu'il y a des lésions tissulaires, C3 peut se lyser spontanément dans le sérum. C3b se fixe de façon stable aux parois microbiennes en présence de facteur P (properdine). Cela permet le recrutement puis le clivage du facteur B pour former une C3 convertase alterne, C3bBb. Il y a alors une boucle d'amplification au contact des membranes microbiennes.

Toutes les voies d'activation du complément conduisent à la même séquence terminale : clivage du composé C3 en C3a et C3b, association de C3b aux C3 convertases pour créer des C5 convertases et clivage de C5.

420

Figure 1 : Schéma simplifié des voies d'activation du complément

2. Les molécules effectrices du complément

Activation cellulaire par les anaphylatoxines

Les composés C3a, C4a et C5a constituent les anaphylatoxines (responsables des chocs anaphylactiques). Ils exercent un chimiotactisme sur les leucocytes, permettent la dégranulation des basophiles et des mastocytes, augmentent la perméabilité vasculaire et l'inflammation.

Élimination des pathogènes et des déchets

C3b et C4b se lient aux parois microbiennes, aux complexes antigènes-anticorps et aux corps apoptotiques. Cela favorise la phagocytose (opsonisation) et l'élimination des antigènes grâce aux récepteurs du complément exprimés par les érythrocytes et les phagocytes. La production d'anticorps sera également exacerbée *via* les récepteurs CR3 sur les lymphocytes B.

Complexe d'attaque membranaire (CAM)

C5b se lie à C6 et C7 puis le complexe C5b67 s'attache aux membranes des pathogènes (virus, bactéries) avec C8. C9 est recruté et polymérise, formant un pore d'environ 10 nm qui provoque un choc osmotique et conduit à la mort du pathogène.

Figure 2 : Les stades de formation du complexe d'attaque membranaire

3. Les facteurs de régulation

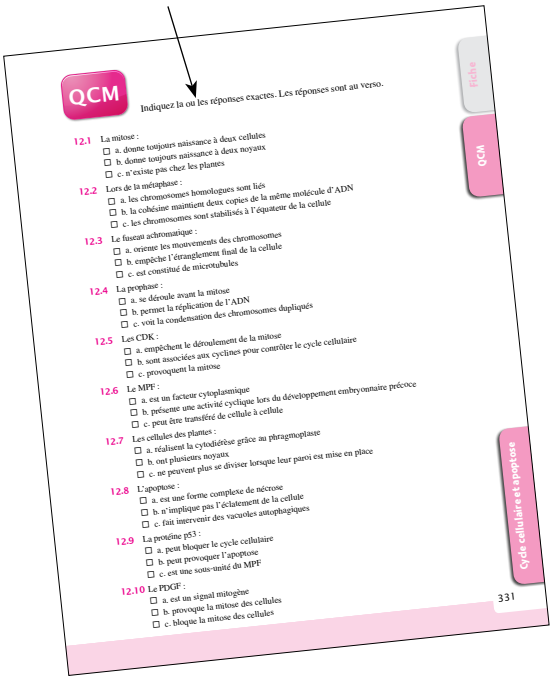
Les sous-unités actives sont instables et donc rapidement inactivées ce qui supprime des actions délétères sur des cellules voisines. Il existe aussi des protéines de régulation de l'activation du complément, soit présentes sur les membranes des cellules hôtes telles que DAF (*Dissociation Acceleration factor*), MCP (*Membrane Cofactor Protein*), la protectine… soit libérés comme facteurs solubles (inhibiteur du C1, facteur H et I…).

421

Fiche 180 | QCM | Le système immunitaire

cet ouvrage ?

Des QCM
en fin de chapitre
pour s'auto-évaluer



QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

Fiche

QCM

Cycle cellulaire et apoptose

12.1 La mitose :
- ☐ a. donne toujours naissance à deux cellules
- ☐ b. donne toujours naissance à deux noyaux
- ☐ c. n'existe pas chez les plantes

12.2 Lors de la métaphase :
- ☐ a. les chromosomes homologues sont liés
- ☐ b. la cohésine maintient deux copies de la même molécule d'ADN
- ☐ c. les chromosomes sont stabilisés à l'équateur de la cellule

12.3 Le fuseau achromatique :
- ☐ a. oriente les mouvements des chromosomes
- ☐ b. empêche l'étranglement final de la cellule
- ☐ c. est constitué de microtubules

12.4 La prophase :
- ☐ a. se déroule avant la mitose
- ☐ b. permet la réplication de l'ADN
- ☐ c. voit la condensation des chromosomes dupliqués

12.5 Les CDK :
- ☐ a. empêchent le déroulement de la mitose
- ☐ b. sont associées aux cyclines pour contrôler le cycle cellulaire
- ☐ c. provoquent la mitose

12.6 Le MPF :
- ☐ a. est un facteur cytoplasmique
- ☐ b. présente une activité cyclique lors du développement embryonnaire précoce
- ☐ c. peut être transféré de cellule à cellule

12.7 Les cellules des plantes :
- ☐ a. réalisent la cytodiérèse grâce au phragmoplaste
- ☐ b. ont plusieurs noyaux
- ☐ c. ne peuvent plus se diviser lorsque leur paroi est mise en place

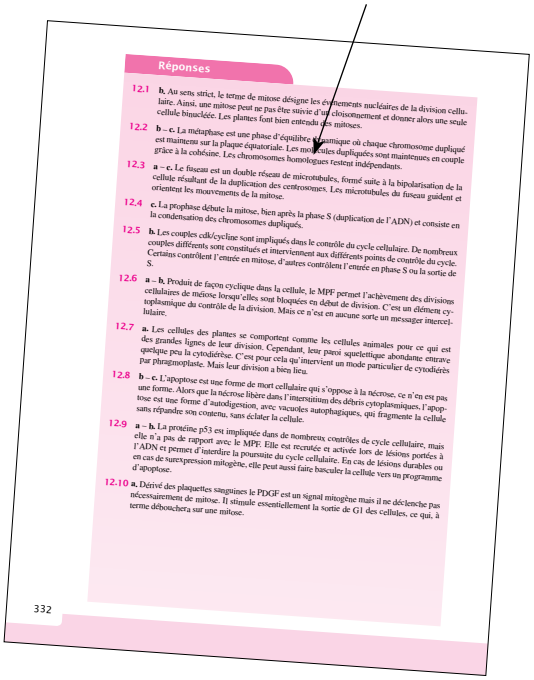
12.8 L'apoptose :
- ☐ a. est une forme complexe de nécrose
- ☐ b. n'implique pas l'éclatement de la cellule
- ☐ c. fait intervenir des vacuoles autophagiques

12.9 La protéine p53 :
- ☐ a. peut bloquer le cycle cellulaire
- ☐ b. peut provoquer l'apoptose
- ☐ c. est une sous-unité du MPF

12.10 Le PDGF :
- ☐ a. est un signal mitogène
- ☐ b. provoque la mitose des cellules
- ☐ c. bloque la mitose des cellules

331

Les réponses
commentées au verso



Réponses

12.1 **b.** Au sens strict, le terme de mitose désigne les événements nucléaires de la division cellulaire. Ainsi, une mitose peut ne pas être suivie d'un cloisonnement et donner alors une seule cellule binucléée. Les plantes font bien entendu des mitoses.

12.2 **b – c.** La métaphase est une phase d'équilibre dynamique où chaque chromosome dupliqué est maintenu sur la plaque équatoriale. Les molécules dupliquées sont maintenues en couple grâce à la cohésine. Les chromosomes homologues restent indépendants.

12.3 **a – c.** Le fuseau est un double réseau de microtubules, formé suite à la bipolarisation de la cellule résultant de la duplication des centrosomes. Les microtubules du fuseau guident et orientent les mouvements de la mitose.

12.4 **c.** La prophase débute la mitose, bien après la phase S (duplication de l'ADN) et consiste en la condensation des chromosomes dupliqués.

12.5 **b.** Les couples cdk/cycline sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. De nombreux couples différents sont constitués et interviennent aux différents points de contrôle du cycle. Certains contrôlent l'entrée en mitose, d'autres contrôlent l'entrée en phase S ou la sortie de S.

12.6 **a – b.** Produit de façon cyclique dans la cellule, le MPF permet l'achèvement des divisions cellulaires de méiose lorsqu'elles sont bloquées en début de division. C'est un élément cytoplasmique du contrôle de la division. Mais ce n'est en aucune sorte un messager intercellulaire.

12.7 **a.** Les cellules des plantes se comportent comme les cellules animales pour ce qui est des grandes lignes de leur division. Cependant, leur paroi squelettique abondante entrave quelque peu la cytodiérèse. C'est pour cela qu'intervient un mode particulier de cytodiérèse par phragmoplaste. Mais leur division a bien lieu.

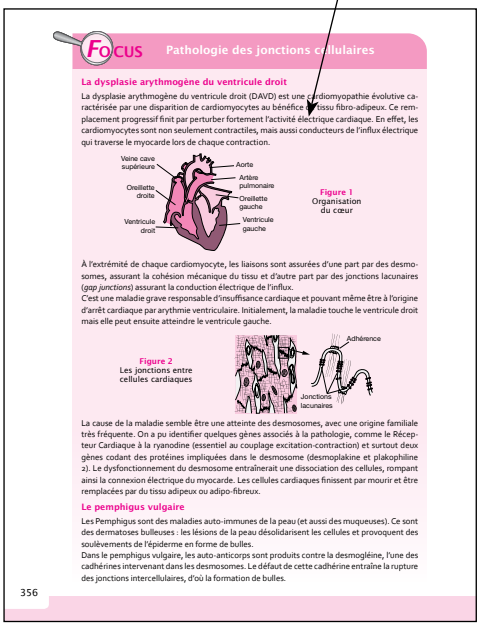
12.8 **b – c.** L'apoptose est une forme de mort cellulaire qui s'oppose à la nécrose, ce n'en est pas une forme. Alors que la nécrose libère dans l'interstitium des débris cytoplasmiques, l'apoptose est une forme d'autodigestion, avec vacuoles autophagiques, qui fragmente la cellule sans répandre son contenu, sans éclater la cellule.

12.9 **a – b.** La protéine p53 est impliquée dans de nombreux contrôles de cycle cellulaire, mais elle n'a pas de rapport avec le MPF. Elle est recrutée et activée lors de lésions portées à l'ADN et permet d'interdire la poursuite du cycle cellulaire. En cas de lésions durables ou en cas de surexpression mitogène, elle peut aussi faire basculer la cellule vers un programme d'apoptose.

12.10 **a.** Dérivé des plaquettes sanguines le PDGF est un signal mitogène mais il ne déclenche pas nécessairement de mitose. Il stimule essentiellement la sortie de G1 des cellules, ce qui, à terme débouchera sur une mitose.

332

Des focus biomédicaux ou historiques
sur une page à la fin de chaque chapitre



FOCUS Pathologie des jonctions cellulaires

La dysplasie arythmogène du ventricule droit

La dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) est une cardiomyopathie évolutive caractérisée par une disparition de cardiomyocytes au bénéfice d'un tissu fibro-adipeux. Ce remplacement progressif finit par perturber fortement l'activité électrique cardiaque. En effet, les cardiomyocytes sont non seulement contractiles, mais aussi conducteurs de l'influx électrique qui traverse le myocarde lors de chaque contraction.

Figure 1
Organisation du cœur

À l'extrémité de chaque cardiomyocyte, les liaisons sont assurées d'une part par des desmosomes, assurant la cohésion mécanique du tissu et d'autre part par des jonctions lacunaires (*gap junctions*) assurant la conduction électrique de l'influx.
C'est une maladie grave responsable d'insuffisance cardiaque et pouvant même être à l'origine d'arrêt cardiaque par arythmie ventriculaire. Initialement, la maladie touche le ventricule droit mais elle peut ensuite atteindre le ventricule gauche.

Figure 2
Les jonctions entre cellules cardiaques

La cause de la maladie semble être une atteinte des desmosomes, avec une origine familiale très fréquente. On a pu identifier quelques gènes associés à la pathologie, comme le Récepteur Cardiaque à la ryanodine (essentiel au couplage excitation-contraction) et surtout deux gènes codant des protéines impliquées dans le desmosome (desmoplakine et plakophiline 2). Le dysfonctionnement du desmosome entraînerait une dissociation des cellules, rompant ainsi la connexion électrique du myocarde. Les cellules cardiaques finissent par mourir et être remplacées par du tissu adipeux ou adipo-fibreux.

Le pemphigus vulgaire

Les Pemphigus sont des maladies auto-immunes de la peau (et aussi des muqueuses). Ce sont des dermatoses bulleuses : les lésions de la peau désolidarisent les cellules et provoquent des soulèvements de l'épiderme en forme de bulles.
Dans le pemphigus vulgaire, les auto-anticorps sont produits contre la desmogléine, l'une des cadhérines intervenant dans les desmosomes. Le défaut de cette cadhérine entraîne la rupture des jonctions intercellulaires, d'où la formation de bulles.

356

Retrouvez sur www.dunod.com :

- **Des QCM corrigés et commentés**
- **Une sélection de sites web de référence**
- **Un lexique et des figures de référence**

Chapitre 1

Les fondements de la biologie cellulaire

Objectifs

La vie est affaire de cellules. Tous les êtres vivants sont constitués d'au moins une cellule et toute cellule est issue d'une autre cellule. Un organisme humain est constitué d'environ cent mille milliards de cellules.

Une cellule présente toutes les caractéristiques fondamentales du vivant : elle transfère différentes formes d'énergie de manière à effectuer un travail ; elle exprime une information génétique contenue dans des acides nucléiques ; elle échange avec son milieu de vie ; elle peut se reproduire, et enfin, elle meurt.

La vie des organismes pluricellulaires impose l'existence d'une communication entre les cellules, moyen essentiel de leur coordination.

Même si les cellules semblent être de très petite taille, elles présentent une très grande complexité mettant en jeu des centaines de milliers d'interactions de tous ordres, entre gènes, protéines, petites molécules, cytosquelette.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 1

La théorie cellulaire

L'idée selon laquelle les êtres vivants sont constitués d'une ou plusieurs cellules, fonctionnant toutes peu ou prou sur le même principe, est une idée maintenant assez ancienne qui s'est peu à peu imposée avec l'histoire de la microscopie.

1. L'histoire du mot cellule – les observations de Hooke

L'anglais R. Hooke (1635-1703) a réalisé des observations de tissus végétaux à l'aide d'un instrument assez rudimentaire. Le liège (figure 1) lui est apparu comme une juxtaposition de boîtes auxquelles il donna le nom de cellule.

Par la suite, le hollandais A. van Leeuwenhoeck (1632-1723) mit au point le premier microscope. Il s'agissait d'un système de loupe simple et léger que l'on plaçait avec l'objet observé devant l'œil, comme pour une visée. Leeuwenhoek a pu atteindre des grossissements de l'ordre de 200 fois. Il fit de nombreuses observations et descriptions d'organismes unicellulaires, protozoaires et bactéries.

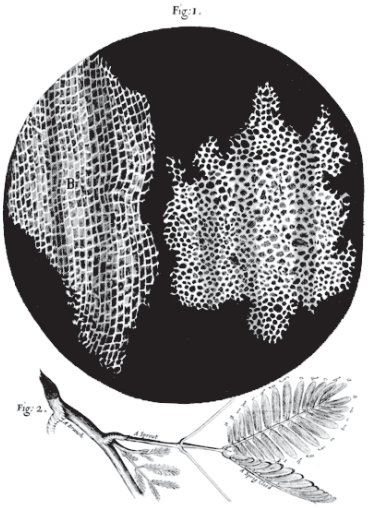


Figure 1 : Observation de liège par R. Hooke
La structure du liège est manifestement cloisonnée, le tissu semblant formé de petites « boîtes », les cellules.

2. Schwann et la théorie cellulaire

La théorie cellulaire est née bien plus tard avec T. Schwann (1810-1882) et M. Schleiden (1804-1881). Ce zoologiste et ce botaniste affirment que tous les êtres vivants, même les plus complexes sont constitués de cellules ainsi que des produits de ces cellules.

R. Virchow (1821-1902) complète cette théorie en 1855 par une seconde affirmation : *omni cellula e cellula* : « Toute cellule provient d'une cellule ».

Une cellule, entourée d'une membrane lipidique qui sépare son cytoplasme de l'extérieur, est ainsi la plus petite unité vivante d'un organisme. À l'échelle subcellulaire, on connaît maintenant de nombreux systèmes complexes, objets des chapitres de ce

livre, mais aucun système subcellulaire ne réunit à lui seul l'ensemble des propriétés du vivant.

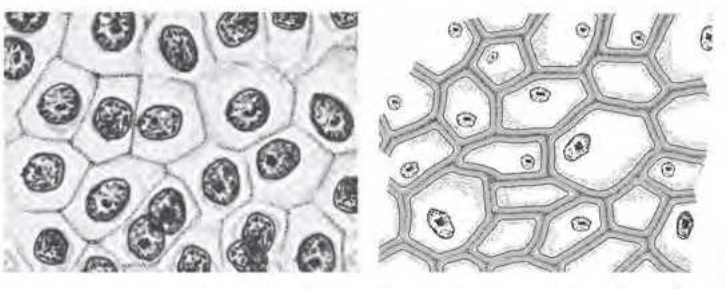


Figure 2 : Tissu animal et tissu végétal

L'observation d'un tissu complexe montre clairement l'organisation cellulaire. Cette constatation est particulièrement aisée pour un tissu végétal où les séparations entre cellules sont soulignées par la paroi squelettique. Dans un tissu animal, on peut deviner les limites entre cellules, mais seul le microscope électronique permet d'identifier les membranes.

3. Les liens entre cellules sont très divers

Fiche 166

Si la cellule est l'unité de base des organismes pluricellulaires, les relations entre les cellules d'un tel organisme sont complexes.

Ainsi dans un tissu, c'est-à-dire un assemblage coordonné de cellules, on peut trouver des cellules jointives liées entre elles par des jonctions complexes ou séparées par des constituants extracellulaires qui forment des matrices.

Fiches 140, 141, 143

Ces matrices peuvent être très abondantes (paroi squelettique des cellules végétales) et même prédominantes en volume et très rigides (tissu osseux). Dans le cas du sang, l'environnement des cellules n'est plus une matrice mais un liquide. Cependant, dans tous les cas, les contacts entre cellules sont assurés.

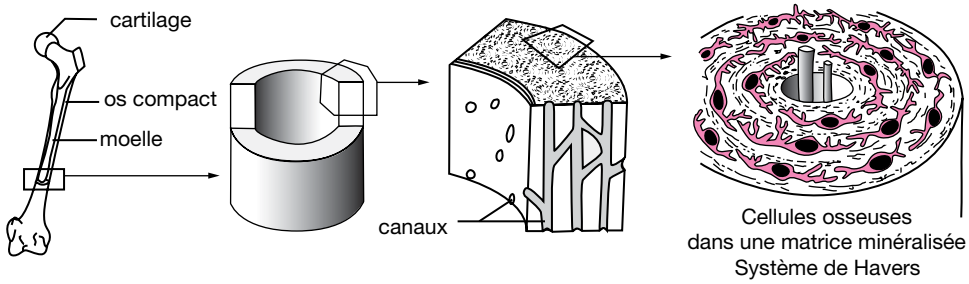


Figure 3 : Organisation du tissu osseux

L'os est un tissu vivant et est à ce titre constitué de nombreuses cellules en contact les unes avec les autres : les ostéocytes. Cependant, les propriétés mécaniques de l'os sont dues à une matrice extracellulaire très rigide et surtout très abondante. Cela n'empêche cependant pas les contacts entre cellules.

fiche 2

Les constituants des êtres vivants

La chimie du vivant est suffisamment originale pour être à l'origine d'une vaste branche de la chimie, la chimie organique. Cependant, la chimie organique ne fait pas tout le vivant : l'organisation logique des cellules, nous le verrons, est tout à fait essentielle. Néanmoins, une analyse rapide de la chimie des êtres vivants nous renseigne sur quelques grands principes de la vie.

1. L'eau, milieu de vie, milieu intérieur, constituant majeur

La chimie du vivant ne s'imagine pas sans eau. La vie est apparue sur la Terre dans l'eau liquide et cette eau liquide constitue l'essentiel du milieu de vie de toute cellule, tout comme l'essentiel de la composition des cellules.

Fiche 11

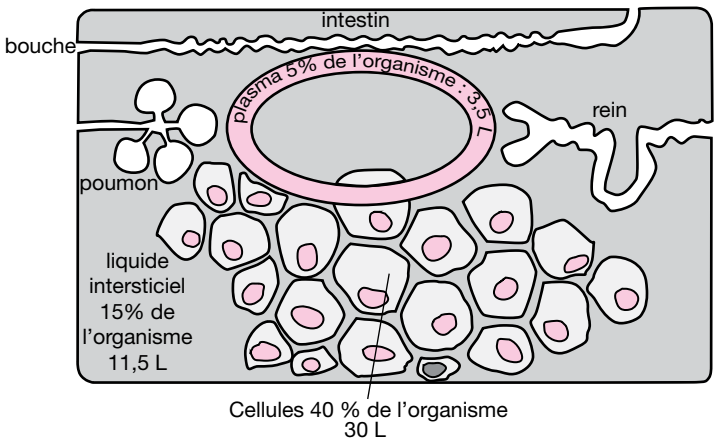


Figure 1 : Les compartiments liquidiens d'un organisme humain

Les chiffres indiqués correspondent à la quantité d'eau présente chez un homme de 75 kg. Les cellules sont remplies de solution aqueuse constituant le liquide cellulaire. Elles sont entourées de liquide interstitiel piégé dans les matrices et d'un milieu circulant, également liquide, le sang et la lymphe.

L'une des étapes de l'évolution des êtres vivants a été la conquête du milieu aérien, avec un affranchissement plus ou moins poussé vis-à-vis des contraintes hydriques du milieu. Il y a ainsi une assez grande diversité des teneurs en eau d'un organisme à l'autre.

Tableau 1 : Teneur en eau de différents êtres vivants

Homme	60 à 65 %
Méduse	98 %
Insecte	De 50 à 80 %
Graine	Environ 10 %
Feuille de laitue	97 %
Pomme de terre	79 %

2. Les principaux éléments

Les cellules sont constituées de molécules organiques, c'est-à-dire de molécules construites autour d'un schéma de squelette carboné de deux à quinze carbones environ. Des atomes d'hydrogène, d'oxygène et d'azote viennent diversifier ces molécules.

Tableau 2 : Les éléments rencontrés dans le vivant

Éléments majeurs	Carbone	C	19,3 %
	Hydrogène	H	9,3 %
	Azote	N	5,1 %
	Oxygène	O	62,8 %
	Phosphore	P	0,6 %
	Soufre	S	0,6 %
Principaux ions minéraux	Calcium	Ca	1,4 %
	Sodium	Na	0,3 %
	Potassium	K	0,2 %
	Magnésium	Mg	0,04 %
	Chlore	Cl	0,2 %
Oligo-éléments	Fer	Fe	0,005 %
	Silicium	Si	0,004 %
	Zinc	Zn	0,0025 %
	Cuivre	Cu	0,0004 %

En complément on trouve quelques éléments moins prépondérants mais pourtant essentiel, comme le phosphore et le soufre.

Enfin, quelques éléments, minoritaires mais tout aussi essentiels, forment les oligo-éléments.

Exobiologie

Il est possible d'opérer une recherche de vie extraterrestre en partant d'une analyse chimique. Tout cela n'ayant de sens que pour détecter des formes de vie comparables à celle que nous connaissons.

L'eau est le premier axe de recherche ; la vie n'est concevable qu'en présence d'eau. Ainsi, la recherche de vie reposera en premier lieu sur la recherche d'eau liquide, présente en grande quantité et sur une durée assez longue.

Ensuite, on pourra faire une recherche d'éléments ou de molécules spécifiques du vivant. Une signature intéressante des êtres vivants concerne les isotopes du carbone. En effet, le monde vivant (par l'intermédiaire de la photosynthèse) fixe préférentiellement l'isotope 12 du carbone. Cela produit une matière organique appauvrie en carbone 13 par rapport au monde minéral. Des molécules appauvries en carbone 13 seraient donc la marque d'une activité biologique. C'est de cette manière que l'on recherche l'histoire du vivant dans les couches géologiques. La découverte extraterrestre d'un déséquilibre entre les deux isotopes pourrait alors être un indice d'une photosynthèse comparable à celle que nous connaissons.

fiche 3

L'origine des cellules

Si l'on s'en tient simplement au précepte de R. Virchow, *omni cellula e cellula*, et que l'on y associe l'évolution des êtres vivants, l'idée d'une « première cellule » émerge assez rapidement. S'il est illusoire d'espérer connaître vraiment une telle première cellule, on peut imaginer les propriétés de la « dernière » cellule ayant engendré l'ensemble des êtres vivants actuellement connus.

1. Les êtres vivants sont en permanente évolution

Compte tenu du fait que l'évolution est réalisée sur la base de la reproduction avec variation, deux groupes apparentés d'êtres vivants ont toujours un ancêtre commun. La grande unité chimique et organisationnelle (sur le plan de la génétique, en particulier) impose d'envisager que tous les êtres vivants sont apparentés et que toutes les cellules descendent donc d'une cellule ancestrale.

2. Un ancêtre commun – l'arbre du vivant

L'apparentement entre deux êtres vivants peut être évalué de nombreuses manières, mais en particulier par la similitude entre les séquences d'ADN des cellules. Cette méthode a permis de construire l'arbre phylogénétique de l'ensemble des êtres vivants. Cet arbre n'a pas de racine, car il n'y a pas actuellement consensus sur la nature du groupe qui serait à l'origine des deux autres. C'est ainsi que l'on distingue :

- les eubactéries caractérisées par une paroi cellulaire à peptido-glycanes ;
- les archées qui présentent des lipides particuliers dans leur membrane ;
- les eucaryotes dont l'ADN est contenu dans un noyau.

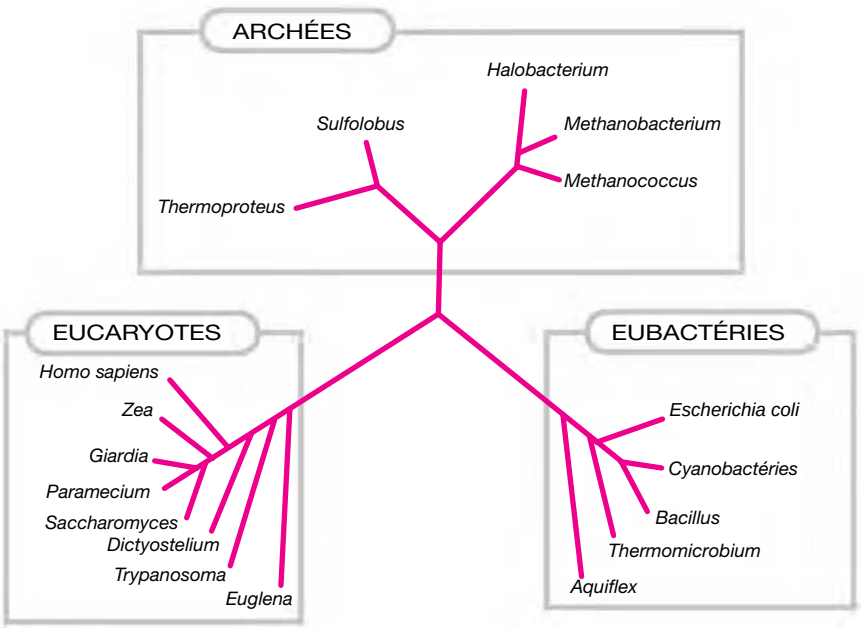


Figure 1 : L'arbre du vivant

3. LUCA n'est pas le premier être vivant

L'apparentement de toutes les formes de vie actuelles impose d'envisager un ancêtre commun à qui on donne le nom de LUCA (*Last Unique Common Ancestor*). Cependant, LUCA n'est vraisemblablement pas le premier être vivant. Il a certainement coexisté avec d'autres êtres vivants faisant partie de groupes aujourd'hui éteints.

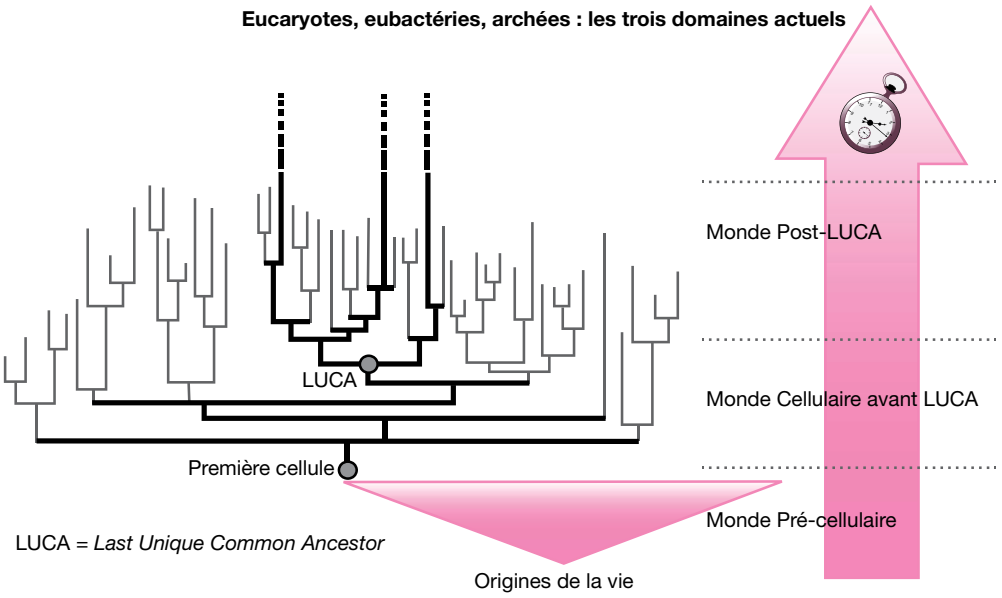


Figure 2 : La place de LUCA dans l'évolution du vivant

4. Mitochondries et chloroplastes : endosymbiose

Des arguments génétiques et phylogénétiques sur la parenté entre les ADN des chloroplastes et des mitochondries et ceux de bactéries ont permis d'établir l'origine de ces organites comme résultant d'une symbiose entre des ancêtres eucaryotes et des eubactéries capables pour les unes d'oxyder la matière organique avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons et, pour les autres, de réaliser la photosynthèse.

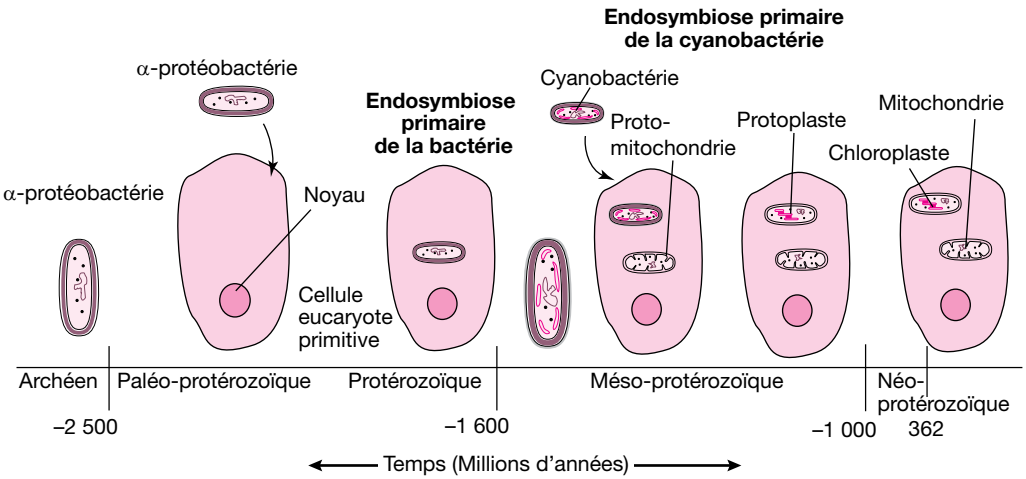


Figure 3 : L'origine endosymbiotique des mitochondries et chloroplastes

fiche 4

La diversité des cellules

Organismes unicellulaires ou pluricellulaires sont formés de cellules ayant un métabolisme de base similaire. La spécialisation cellulaire s'accompagne de variations sur la cellule type ce qui donne une diversité de forme des cellules et des voies métaboliques spécifiques. Modes et milieux de vie sont ainsi extrêmement divers.

1. Des modalités métaboliques distinctes

Les êtres vivants ont des façons très diverses de se procurer l'énergie nécessaire à leur métabolisme cellulaire. On retrouve cependant des schémas récurrents essentiellement sous forme de chaînes membranaires de transfert d'électrons.

Diversité des métabolismes archées et eubactéries

Les eubactéries et les archées présentent une très grande diversité de mode d'approvisionnement en énergie. Certains exploitent l'énergie lumineuse et du sulfure d'hydrogène, d'autres de l'énergie lumineuse et de l'eau. D'autres oxydent grâce, par exemple, à l'oxygène des substrats minéraux comme le fer réduit ou l'ammoniaque. On trouve des bactéries dans pratiquement tous les milieux imaginables, sous la glace, proches des sources chaudes, avec ou sans oxygène, avec ou sans lumière. Ce monde non eucaryote semble marqué par une « inventivité métabolique » sans fin. Ce sont par ailleurs le plus souvent de très petites cellules avec une activité métabolique très intense et très rapide.

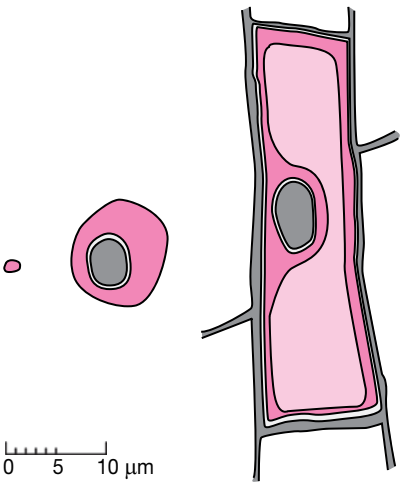


Figure 1 : Tailles caractéristiques des grands types de cellules

Une bactérie, une cellule animale, une cellule végétale : le rapport de taille est environ de 10 de l'une à l'autre de ces cellules.

Conformisme du métabolisme eucaryote

Les eucaryotes, inversement, sont étonnamment homogènes et ont tous adopté le même schéma :

- oxydation de matière organique pour les cellules hétérotrophes (respiration mitochondriale ou fermentation) ;

- photosynthèse (par le chloroplaste) et respiration pour les cellules autotrophes au carbone.

De plus, les modalités chimiques de ces processus ont été remarquablement bien conservées par l'évolution.

2. Des organismes unicellulaires : les cellules multifonctionnelles

Le caractère pluricellulaire ne se rencontre guère que chez les eucaryotes, même si nombre d'entre eux sont unicellulaires. Les archées et les eubactéries sont des êtres vivants unicellulaires à quelques exceptions près. Cette unicellularité suppose l'existence de cellules « totipotentes », réalisant toutes les fonctions biologiques.

3. Des types cellulaires variés : les cellules différenciées

L'état pluricellulaire correspond à l'invention du partage du travail à l'échelle de l'organisme. Cela va de pair avec l'apparition de cellules parfois extrêmement différenciées qui se sont spécialisées. Les spécialisations peuvent être très spectaculaires comme dans le cas d'une cellule musculaire au cytosquelette quasi cristallin ou d'un globule rouge semblant réduit à une simple membrane et n'ayant plus aucun matériel génétique.

Fiche 123

Fiche 81

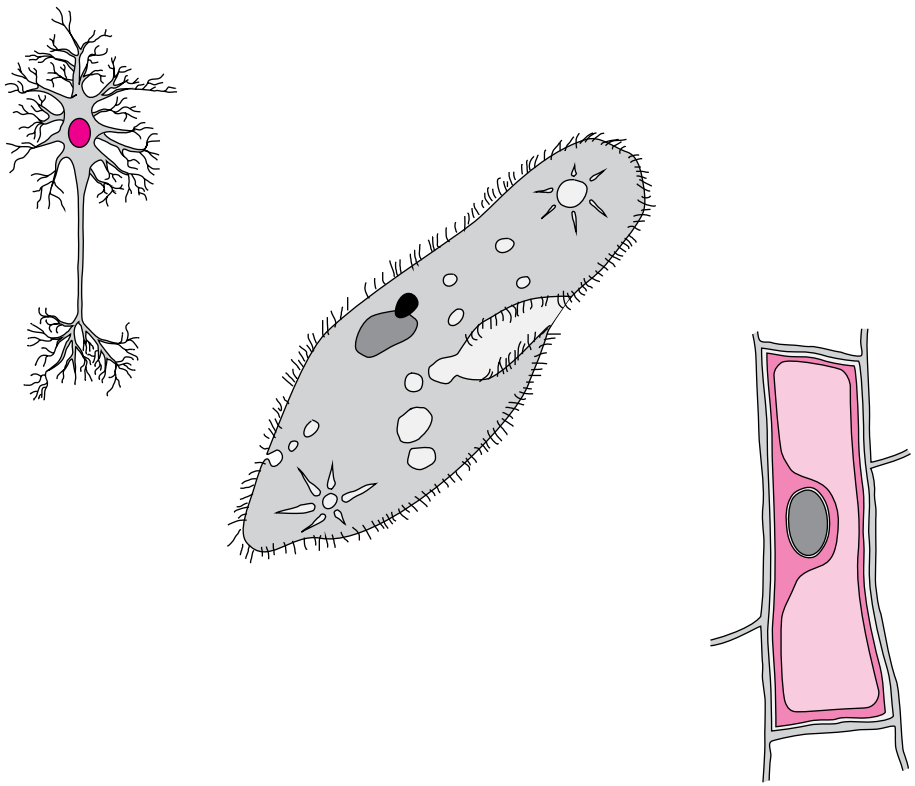


Figure 2 : Quelques types cellulaires

À gauche, un neurone, dont le corps cellulaire peut représenter une dizaine de micromètres, mais dont l'axone peut être extrêmement long (plusieurs dizaines de centimètres parfois). Au centre, une paramécie, organisme unicellulaire cilié. À droite, une cellule végétale de type parenchyme, dont la paroi squelettique épaisse de un à quelques micromètres est visible au microscope optique.

fiche 5

Les virus aux frontières du vivant

Focus chap. 2

Historiquement, on connaît les virus pour leurs effets avant de connaître leur nature et leur structure. Ces agents infectieux sont des parasites moléculaires qui dépendent obligatoirement d'une cellule hôte pour fournir l'énergie et la machinerie nécessaire à leur réplication. Leur inclusion dans le monde vivant est discutée puisque leur forme libre, le virion, est inerte. Composés au minimum de matériel génétique et d'une capside protéique, il existe des agents infectieux encore plus simples comme les viroïdes ou les prions.

Un virus est en quelque sorte une information génétique mobile équipée du matériel protéique facilitant l'infection de cellules hôtes.

1. Un parasitisme cellulaire détournant l'expression génétique des hôtes

L'exemple des bactériophages est tout à fait révélateur de la nature des virus. Les bactériophages sont des agents infectieux qui détruisent des colonies bactériennes sous forme de plages de lyse dans des boîtes de culture. Ces agents infectieux se multiplient : ils prolifèrent en détruisant les bactéries. On a d'abord pu les analyser chimiquement (ADN et protéines) et montrer qu'ils dirigent l'expression génétique des cellules bactériennes au profit de leur prolifération. Cela se fait en injectant à la cellule une information génétique virale qui commande et contrôle sa propre réplication et la synthèse de nouveaux virions. C'est ainsi que l'on a pu construire le cycle lytique d'un virus bactériophage.

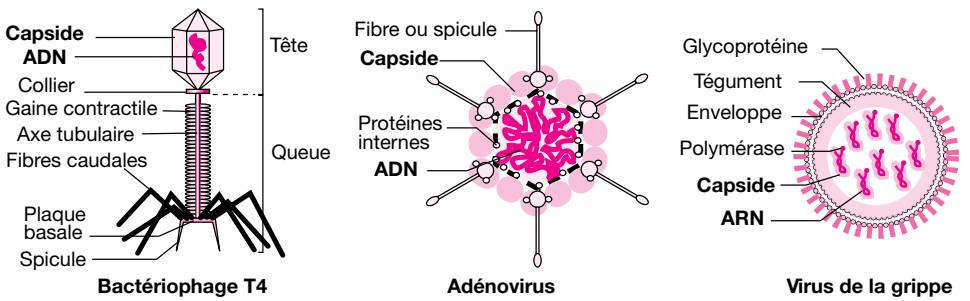


Figure 1 : Exemples de structures de virus

2. Une organisation simplifiée à l'extrême

Au-delà de la seule analyse chimique, la microscopie électronique à transmission a permis d'identifier la structure des virus.

Capside protéique et matériel génétique

Un virus présente donc un matériel génétique, ADN ou ARN, double brin ou simple brin, entouré d'une capside protéique qui protège ce matériel, parfois entourée d'une bicouche lipidique avec des glycoprotéines appelée enveloppe. Les capsides adoptent souvent une structure quasi-cristalline, très régulière et répétitive, elles sont formées d'un petit nombre de protéines. Capside et enveloppe lipidique permettent l'introduction du matériel génétique viral dans le cytoplasme d'une cellule hôte. Par exemple les glyco-

protéines de surface, dits parfois anti-récepteurs viraux, reconnaissent des récepteurs d'entrée dans la cellule cible.

Auto-assemblage des capsides

L'assemblage de nouvelles capsides se fait spontanément à partir de ses constituants. Ainsi, dès lors que les protéines virales sont produites par le métabolisme de l'hôte, l'auto-assemblage de ces protéines en capside peut s'opérer.

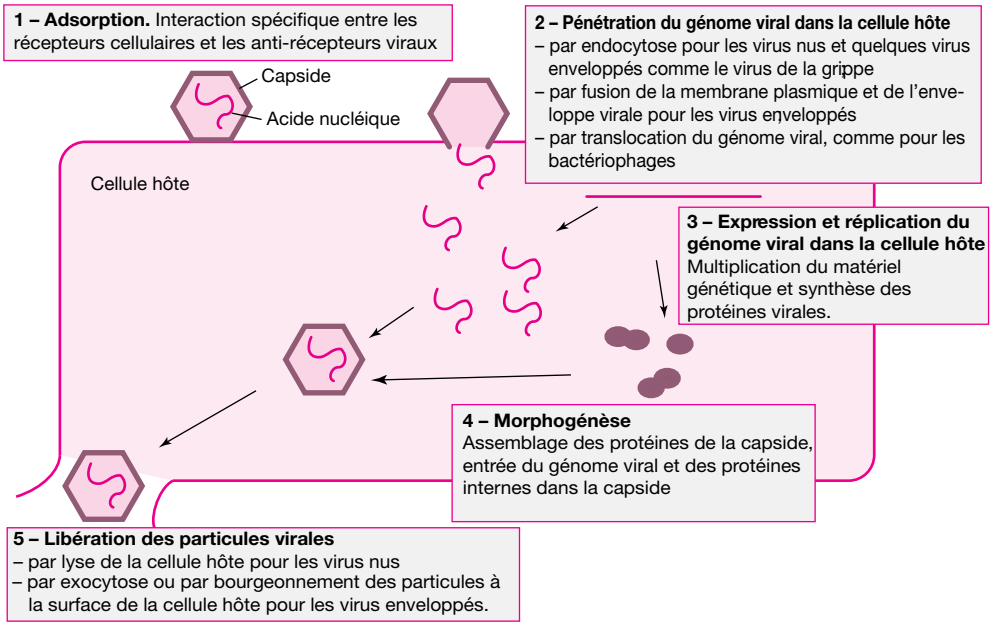


Figure 2 : Cycle lytique d'un virus nu

3. Diversité des virus

On classe les virus selon la nature de leur matériel génétique, la symétrie de leur capside, la présence d'une enveloppe lipidique et selon les modalités de réplication dans leur cellule hôte. Le diamètre de leurs virions vont de 20 nm (parvovirus) à plus de 750 nm (mimivirus). Les familles de ces derniers virus géants remettent à nouveau en question la place des virus dans le vivant.

Tableau 1 : Classification de certains virus

	Virus à ADN				Virus à ARN					
	Double brin			Simple brin	Double brin	Simple brin				
						Polarité positive				Polarité négative
Activité de rétro-transcription	Oui	-		-	-	-			Oui	-
Classe selon Baltimore	Classe VII	Classe I		Classe II	Classe III	Classe IV			Classe VI	Classe V
Enveloppé ou non	Enveloppé	Enveloppé	Nu	Nu	Nu	Enveloppé	Nu		Enveloppé	Enveloppé
Symétrie de la capside	Icosaèdre	Icosaèdre		Icosaèdre	Icosaèdre	Icosaèdre	Icosaèdre	Hélice	Icosaèdre	Hélice
Exemple	Virus de l'hépatite B	Virus herpes simplex (HSV)	Adéno-virus	Parvovirus	Rotavirus	Virus de la rubéole	Entéro-virus, poliovirus	Virus de la mosaïque du tabac	Rétrovirus (VIH)	Virus de la grippe, virus de la rage

fiche 6

Les techniques de la microscopie

Les progrès de la biologie cellulaire sont directement liés à l'évolution des techniques d'observation du monde microscopique. Le terme « cellule » résulte directement des premières observations de R. Hooke. La connaissance de l'échelle subcellulaire date du XX^{e} siècle, avec l'invention de la microscopie électronique.

1. Le microscope optique : observation de tissus

La technique

Le principe du microscope optique est double : constitution, grâce à un objectif, d'une image de l'objet observé, puis observation de cette image grâce à un oculaire qui l'agrandit et la place à l'infini, permettant une observation confortable. L'ensemble permet d'agrandir l'image et d'augmenter sa résolution. Il existe une limite au pouvoir de résolution du microscope, qui est de quelques dixièmes de micromètre et lié à la longueur d'onde de la lumière visible.

L'objet observé est une coupe suffisamment plane pour être nette et suffisamment fine pour être traversée par la lumière qui permet d'observer l'objet. Cela n'interdit cependant pas d'observer plusieurs épaisseurs de cellules, et surtout d'observer des tissus vivants.

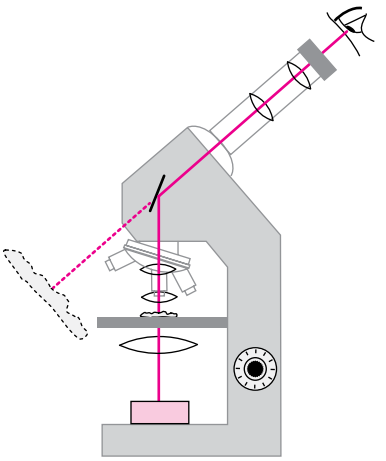


Figure 1
Technique du microscope optique

Les techniques complémentaires

L'observation de cellules peut être améliorée de multiples manières par des techniques de coloration, de révélation (autoradiographie, fluorescence…). Quelques techniques microscopiques permettent d'améliorer dans certains cas le contraste ou la profondeur de champ, comme le contraste de phase ou la microscopie confocale.

Fiche 83

2. Le microscope électronique à transmission : les ultrastructures

Un principe semblable à la microscopie optique

Si l'on considère un faisceau d'électrons de la même manière qu'un faisceau de lumière, le microscope à transmission n'est pas très différent d'un microscope optique. Les lentilles de verre y sont remplacées par des lentilles magnétiques qui dévient les électrons selon le même principe. Les différences sont cependant grandes : un vide poussé doit être pratiqué dans l'enceinte du microscope, les coupes doivent être très fines ; ces deux contraintes interdisent l'observation de tissus vivants. En revanche, le pouvoir de résolution est très fortement amélioré : on peut observer des détails de l'ordre de quelques nanomètres. Récemment la cryomicroscopie électronique a révolutionné cette technique en permettant l'observation d'échantillons dans l'eau vitrifié.

Fiche 126

La technique d'ombrage

L'ombrage métallique est un moyen d'observer des surfaces complexes et surtout de très petits objets (molécule d'ADN, par exemple) en projetant de façon oblique une fine couche métallique sur une surface. À l'image d'une lumière incidente rasante, cette projection provoque des dépôts de métal irréguliers (et opaques aux électrons), formant ainsi des ombres. On obtient donc une illusion de relief (à ne pas confondre avec les images obtenues avec un microscope à balayage).

3. Le microscope électronique à balayage : observation des surfaces

On peut poursuivre l'analogie entre les techniques électroniques et optiques avec le microscope électronique à balayage. Cet instrument est l'équivalent électronique de la loupe binoculaire : la surface de l'objet est « éclairée » par un faisceau d'électron (le balayage) et les faisceaux réfléchis par cette surface sont analysés. On obtient des images fines de surfaces, avec un effet de relief caractéristique, mais il est nécessaire soit de métalliser la surface, ce qui diminue la résolution, soit d'utiliser de faibles énergies, ce qui diminue aussi la résolution.

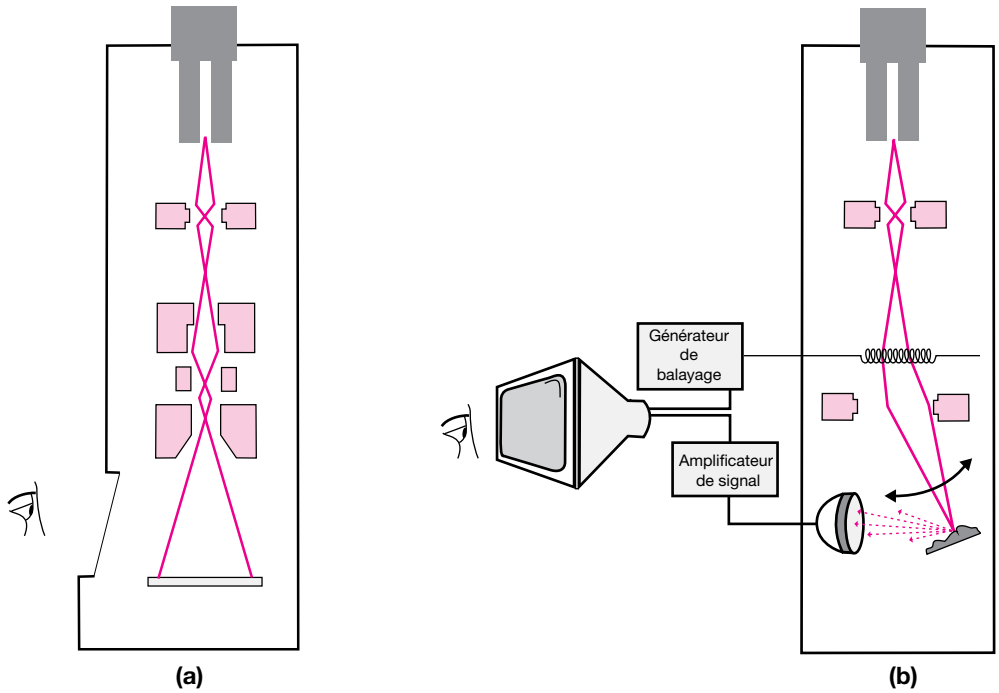


Figure 2 : Technique du microscope électronique (a) à transmission ; (b) à balayage.

fiche 7

Le fractionnement cellulaire

La purification des différents organites cellulaires nécessite la fragmentation des cellules. Leurs composants sont ensuite triés sur la base de leur taille, de leur densité ou de l'expression de marqueurs spécifiques.

1. L'homogénéisation des cellules

Les cellules isolées ou dissociées des tissus sont placées en suspension dans des solutions de pH et de pression osmotique appropriés, puis la membrane cellulaire est rompue. Pour les bactéries, levures et cellules végétales entourées d'une paroi, des enzymes adéquates sont ajoutées. Les principales techniques d'homogénéisation utilisent :

- des broyeurs mécaniques (type Ultraturax®) qui fonctionnent comme des mixeurs et servent surtout à dissocier les tissus ;
- des homogénéisateurs à piston (type Dounce®) qui écrasent les cellules entre le piston et la paroi interne du tube. En fonction de leur diamètre, ils dissocient les tissus ou cassent les cellules ;
- des ultrasons qui induisent des compressions/décompressions et déstructurent très efficacement les cellules. Ce procédé de cavitation ultrasonore est souvent appelé « sonication » ;
- des homogénéisateurs sous pression (type bombe à azote ou presse de French), des cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide ou des détergents doux qui solubilisent la membrane.

2. La séparation par centrifugation

Le développement de centrifugeuses à haute vitesse, ou ultracentrifugeuses, imposant des accélérations supérieures à 20 000 fois la pesanteur terrestre (20 000 g) a permis le fractionnement subcellulaire. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, elle est quantifiée par le coefficient de sédimentation donné en unités Svedberg (S).

La centrifugation différentielle (figure 1)

Les particules sédimentent à une vitesse donnée, en fonction de leur taille et de leur densité, dans le tampon d'homogénéisation. Le procédé de purification des composants cellulaires peut être réalisé en plusieurs étapes, le surnageant étant chaque fois centrifugé plus vite et plus longtemps.

La centrifugation sur gradient de densité (figure 2)

L'échantillon est déposé sur un gradient de densité puis centrifugé à une vitesse adaptée à la séparation des particules d'intérêt. Les molécules utilisées pour former les gradients peuvent être des sucres (saccharose), des sels métalliques (chlorure de césium CsCl), des colloïdes (Percoll). Il faut distinguer la centrifugation zonale de la centrifugation à l'équilibre.

- Lors d'une centrifugation zonale, la densité maximale du gradient est inférieure à la densité maximale des particules. Il y a donc une séparation basée sur la vitesse de sédimentation. La durée est contrôlée pour que les particules ne sédimentent pas jusqu'au fond du tube.

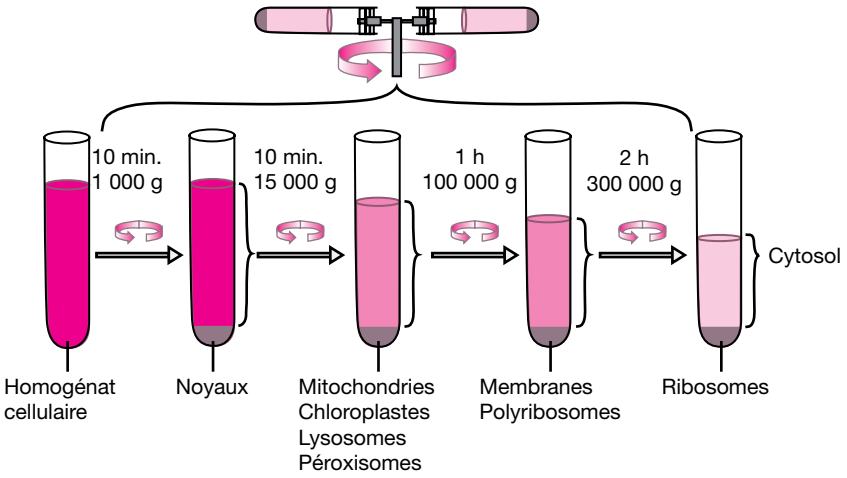


Figure 1 : Les principales étapes de la centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire

- Lors d'une centrifugation à l'équilibre (isopycnique), la densité maximale à la base du gradient est supérieure à la densité maximale des particules. La séparation est basée sur la densité. La durée de centrifugation peut être très longue jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Dans ces procédures, le gradient peut être continu ou discontinu, on parle alors de centrifugation « sur coussin ». Avec le chlorure de césium utilisé pour séparer différentes formes d'acides nucléiques (ADN génomique, plasmidique, ARN), le gradient n'est pas préformé. L'échantillon est mélangé à une solution concentrée de CsCl puis, au cours de la centrifugation, un gradient de CsCl se forme ce qui entraîne la séparation des acides nucléiques.

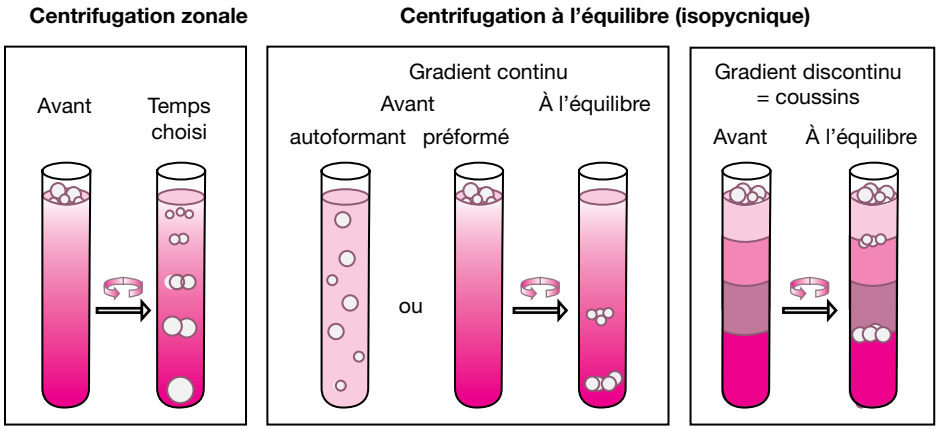


Figure 2 : Les différents types de centrifugation sur gradient

3. La séparation par immunoadsorption

La purification par centrifugation des composants subcellulaires a permis une très bonne caractérisation de nombreuses vésicules dans la cellule. S'il existe des marqueurs de surface caractéristiques (protéines transmembranaires), des anticorps monoclonaux peuvent être produits et utilisés pour une séparation par immunoadsorption sur support solide. Les anticorps sont greffés sur des billes de résine ou sur des billes magnétiques qui permettent la séparation physique des vésicules d'intérêt.

Fiche 198

FOCUS Des systèmes très sophistiqués

Schématiquement, on peut retenir que la dimension caractéristique d'une bactérie est le micromètre, celle d'une cellule animale est la dizaine de micromètres, celle d'une cellule végétale est la centaine de micromètres.

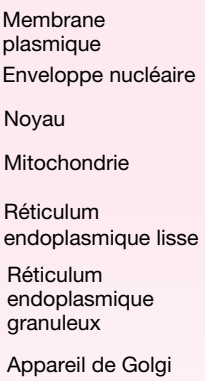
La taille réduite des cellules ne doit pas faire oublier qu'elles sont déjà largement assez grandes pour héberger des systèmes très nombreux et très complexes. La raison en est que le travail de base des cellules est un travail chimique qui s'effectue sur des molécules de quelques nanomètres, avec des outils (des protéines) d'un diamètre d'une à quelques dizaines de nanomètres.

Une comparaison simple peut être faite : les objets courants manipulés par une cellule sont des petites molécules (quelques nanomètres), les outils sont des protéines (dizaine de nanomètres) effectuant leur travail dans des sous-systèmes de la cellule mesurant de 100 nanomètres à un micromètre, le tout dans des cellules d'une dizaine de micromètres. De façon comparable, dans une société, des hommes (de taille 1 m) manipulent des objets de 10 cm (livres, outils, téléphone…) dans des sous-systèmes (maison, bureau, train…) d'une taille caractéristique de 10 à 100 m, le tout dans des villes de dimension kilométrique. Dans cette comparaison, le niveau de complexité de la cellule est celui d'une ville.

Le monde chimique est tellement microscopique, qu'il faut nous habituer à considérer une cellule comme un objet de très grande taille.

Les membranes biologiques forment des obstacles à la diffusion de la plupart des molécules organiques. Ce frein à la diffusion permet de séparer des milieux différents, de concentrer de confiner des molécules et donc des activités, de créer des gradients… Ce sont des édifices lipidiques d'environ 7,5 nanomètres d'épaisseur. Ces membranes délimitent des compartiments dont la longueur caractéristique est de l'ordre du micromètre.

On distinguera ainsi classiquement une membrane plasmique qui délimite la cellule. On trouve à l'intérieur de la cellule un noyau et divers organites délimités eux aussi par des systèmes membranaires. On distinguera le noyau, délimité par une enveloppe nucléaire (deux membranes), le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (réseaux de citernes et de vésicules, une membrane) et des organites énergétiques, les mitochondries (deux membranes). Dans le cas des cellules végétales chlorophylliennes, il faut ajouter un autre organite énergétique : le chloroplaste (deux membranes).



Ultrastructure schématique d'une cellule animale

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

1.1 Les cellules :
- ☐ a. ne peuvent pas vivre sans d'autres cellules
- ☐ b. sont des organismes eucaryotes
- ☐ c. sont entourées d'une membrane lipidique

1.2 Les molécules hydrophiles :
- ☐ a. ont tendance à se regrouper en phase aqueuse
- ☐ b. traversent difficilement les membranes biologiques
- ☐ c. sont de petite taille

1.3 Le carbone :
- ☐ a. constitue les squelettes des molécules organiques
- ☐ b. est peu abondant dans les êtres vivants
- ☐ c. est enrichi en isotope ^{12}C chez les êtres vivants

1.4 LUCA :
- ☐ a. est la première cellule apparue sur terre
- ☐ b. est une bactérie
- ☐ c. est un ancêtre commun à tous les êtres vivants actuels

1.5 Une cellule différenciée :
- ☐ a. est spécialisée au sein d'un organisme pluricellulaire
- ☐ b. est totipotente
- ☐ c. n'a plus de noyau

1.6 Les eubactéries :
- ☐ a. sont des cellules véritables
- ☐ b. ne respirent pas mais fermentent car elles vivent sans oxygène
- ☐ c. réalisent la photosynthèse

1.7 Les chloroplastes :
- ☐ a. sont des bactéries
- ☐ b. sont aussi gros que le noyau de la cellule
- ☐ c. sont des mitochondries modifiées au cours de l'évolution

1.8 Le microscope électronique à transmission :
- ☐ a. ne permet pas d'observer de cellules vivantes
- ☐ b. ne donne que des images en noir et blanc
- ☐ c. donne des images moins précises que le microscope à balayage

1.9 Un virus bactériophage :
- ☐ a. tire son énergie de la fermentation
- ☐ b. est un parasite intracellulaire
- ☐ c. est fait d'ADN bactérien

1.10 Une cellule eucaryote :
- ☐ a. possède un noyau entouré d'une enveloppe
- ☐ b. n'est pas compartimentée
- ☐ c. n'est pas visible au microscope optique

Réponses

1.1 **c**. Toutes les cellules tirent leur individualité de la possession d'une membrane de composition essentiellement lipidique qui sépare efficacement toutes les molécules biologiques hydrophiles. Le terme de cellule n'est pas réservé aux eucaryotes, et de très nombreux êtres vivants sont constitués d'une seule cellule.

1.2 **b**. Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule n'a rien à voir avec sa taille, mais avec l'abondance de fonctions polarisées. Ce sont les molécules hydrophobes qui se regroupent en phase aqueuse. Les membranes sont des barrières efficaces aux molécules hydrophiles.

1.3 **a** et **c**. Les molécules organiques sont des molécules construites autour d'atomes de carbone et de squelettes d'atomes de carbone. La photosynthèse qui fixe le carbone atmosphérique privilégie le carbone 12.

1.4 **c**. L'acronyme LUCA désigne le dernier des ancêtres communs à tous les êtres vivants actuels. On ne sait pas du tout si LUCA était un eucaryote, une eubactérie ou une archée. LUCA était certainement une cellule, mais pas la première. Il y a certainement eu bien d'autres êtres vivants avant LUCA.

1.5 **a**. Chez un pluricellulaire, le partage du travail a mené à la mise en place de cellules différenciées, qui sont rendues différentes des autres, en cela qu'elles assurent une partie seulement du travail de l'organisme. Ces cellules ont donc perdu la totipotence qu'ont les unicellulaires. Si les globules rouges n'ont pas de noyau, la plupart des cellules, même différenciées sont pourvues d'un noyau.

1.6 **a**. Les eubactéries sont des organismes principalement unicellulaires. Ces cellules sont d'organisation simple, sans noyau et sans compartiment. Ce sont pourtant bien des cellules. Leur métabolisme est extrêmement divers et certaines bactéries respirent avec ou sans oxygène, d'autres fermentent… Seules certaines d'entre elles réalisent la photosynthèse.

1.7 **b**. Les chloroplastes sont des organites de grande taille, de l'ordre de 10 µm. Comme les mitochondries, ils proviennent de l'assimilation par les cellules de bactéries symbiotiques, mais ils ne dérivent pas des mitochondries. De même, les chloroplastes dérivent de bactéries mais ne sont pas des bactéries.

1.8 **a** et **b**. Les microscopes électroniques exigent la constitution d'un vide poussé dans leur enceinte. Il n'est donc pas question d'y observer des cellules vivantes. L'image obtenue est une image binaire (un électron détecté ou pas d'électron détecté). L'image est donc fondamentalement en noir et blanc. Enfin, le microscope à transmission est beaucoup plus précis que le microscope à balayage.

1.9 **b**. Les virus sont à la marge du monde vivant. En particulier, ils n'ont pas de métabolisme ; ils ne mobilisent pas d'énergie. À ce titre ils ne font ni respiration, ni fermentation. Les bactériophages sont des parasites intracellulaires des bactéries, auxquelles ils injectent leur matériel génétique, ADN ou ARN, mais ce matériel n'est pas bactérien. Les virus sont aussi constitués d'une capside protéique, ils ne sont donc pas faits que d'ADN ou ARN.

1.10 **a**. La présence d'un noyau délimité par une enveloppe est la marque même des eucaryotes. Ce sont également des cellules largement compartimentées. Ces cellules ont des dimensions de plusieurs µm et peuvent, à ce titre, tout à fait être observées en microscopie optique.

Chapitre 2

Biochimie et bioénergétique

Objectifs

Au premier ordre, on peut considérer les cellules comme de grands laboratoires de chimie plus ou moins autosuffisants. Il s'y produit d'innombrables réactions chimiques entre petites molécules, pourvoyant le système en matériaux de base et en énergie. Il s'y élabore les outils complexes de la vie cellulaire, les acides nucléiques et les protéines, édifices moléculaires de très grandes tailles, construits sur une logique modulaire par polymérisation de petites molécules. Ces macromolécules sont les outils du vivant, les enzymes en étant l'illustration la plus évidente.

Toute cette activité chimique produit une vaste dissipation d'énergie dont l'origine est à chercher dans les nutriments qu'une cellule hétérotrophe (animale, par exemple) importe ou qu'une cellule autotrophe (chlorophyllienne, par exemple) élabore.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 8

La chimie de la vie cellulaire

Une cellule peut être considérée comme une usine chimique réalisant de très nombreuses réactions de façon séquentielle mais aussi de façon parallèle, partageant le travail dans le temps et dans l'espace au moyen d'une compartimentation souvent complexe.

1. Un travail chimique permanent en solution aqueuse

Toute la vie cellulaire constitue un travail chimique d'assemblages (anabolisme) et de dégradations (catabolisme) définissant ainsi un métabolisme. Les cellules sont des systèmes chimiques élaborés qui exploitent des nutriments, les transforment de façon à se construire, s'entretenir, au prix d'une importante dépense énergétique. La matière première des cellules est essentiellement constituée de petites molécules solubles dans l'eau (hydrophiles) : pour une large part des petits glucides et des acides aminés, mais aussi de nombreux intermédiaires.

Ce travail chimique très ordonné suppose, à l'image d'une activité chimique humaine, un outillage approprié permettant de manipuler des produits, de guider et provoquer des réactions et bien entendu de les contrôler.

2. Des récipients

Fiche 67

Comme dans tout laboratoire de chimie, la cellule dispose de récipients permettant de contenir, de confiner, de séparer des produits (figure 1). Ce rôle dans la cellule est assuré en grande partie par les membranes. Ces édifices lipidiques contribuent donc à séparer efficacement des compartiments dont le contenu est essentiellement hydrophile. Cela permet de :

- confiner et concentrer des molécules ;
- séparer des molécules et partager le travail ;
- entretenir des contrastes et des déséquilibres.

Cette compartimentation membranaire est complétée par la capacité, pour certains composés, à former des coarcevats qui sont des micro-goutelettes se formant dans le milieu liquide de la cellule.

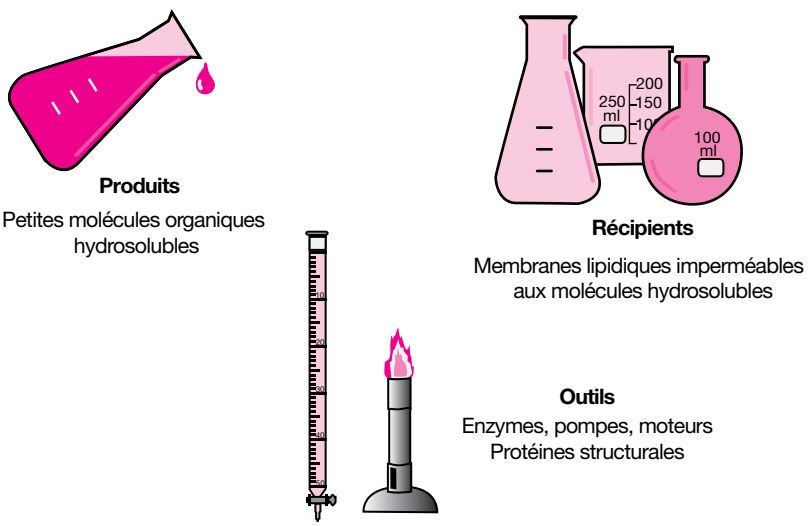
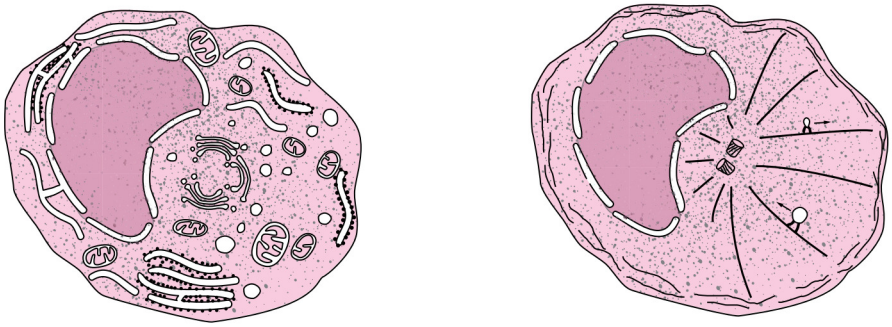


Figure 1 : Logique chimique d'une cellule

3. Des outils spécifiques de transvasement

Dès lors que l'on dispose de récipients étanches se pose le problème du transvasement. Si certaines petites molécules traversent librement les membranes lipidiques, la plupart exigent des protéines de transfert. On y reconnaîtra des canaux, adaptés à la diffusion d'ions minéraux, des perméases plus adaptées au transfert de solutés organiques et des pompes qui, elles, permettent, au prix d'une dépense énergétique, de transporter des substances à rebours de leur tendance spontanée. Il est important de souligner la spécificité de ces outils. Chaque canal, chaque perméase, chaque pompe est spécifique d'un soluté bien particulier et gère le transfert de ce soluté et d'aucun autre.

Fiche 73



Membrane et compartimentation
Confinement
Concentration
Partage

Cytosquelette et moteur
Architecture
Mouvements
Transports

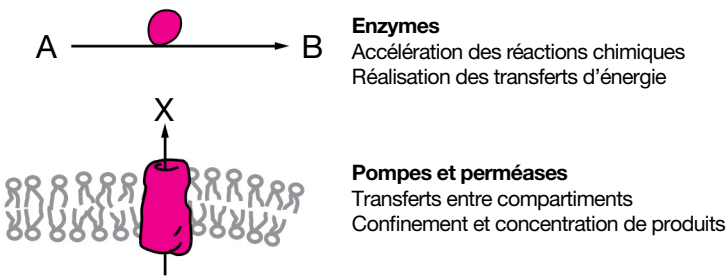
Figure 2 : Les grands types d'outils « logistiques » de la cellule

4. Des catalyseurs

Le deuxième impératif chimique, pour la cellule, après le confinement, est le contrôle cinétique des réactions. Ce rôle est dévolu aux enzymes, protéines dont le rôle est de catalyser les réactions. Il s'agit ici d'un point fondamental. Le contraste est énorme entre les réactions biochimiques non catalysées et les réactions enzymatiques. Une enzyme peut multiplier une vitesse de réaction par un facteur 10^6. Considérons ici que 10^6 secondes font 11 jours ; cela signifie qu'une enzyme peut réaliser en une seconde une réaction qui, autrement, prendrait plusieurs jours ou plusieurs semaines.

Fiche 22

Ici aussi, la spécificité d'action est le maître mot. Chaque enzyme est spécifique d'une réaction ou d'une classe de réaction.



Enzymes
Accélération des réactions chimiques
Réalisation des transferts d'énergie

Pompes et perméases
Transferts entre compartiments
Confinement et concentration de produits

Figure 3 : Les grands types d'outils « cinétiques » de la cellule

fiche 9

La thermodynamique de la vie cellulaire

Les systèmes vivants n'échappent pas aux lois de la thermodynamique. Ce sont des systèmes ouverts qui réalisent de nombreux travaux au prix d'une importante dépense énergétique.

1. Des systèmes thermodynamiques ouverts

Les cellules sont des systèmes ouverts : leur membrane, bien que très sélective, autorise les flux de très nombreux solutés, de façon plus ou moins contrôlée. De la même manière, les systèmes mécaniques de la cellule lui permettent d'exercer un travail sur son milieu : travail de déplacement par exemple. Les cellules subissent également des déformations de la part du milieu et, enfin, elles importent et exportent de la chaleur… De très nombreux échanges ont donc lieu entre une cellule et son environnement (production de travail, production de chaleur, importation et exportation de matière) : c'est ce qui définit un système thermodynamique ouvert.

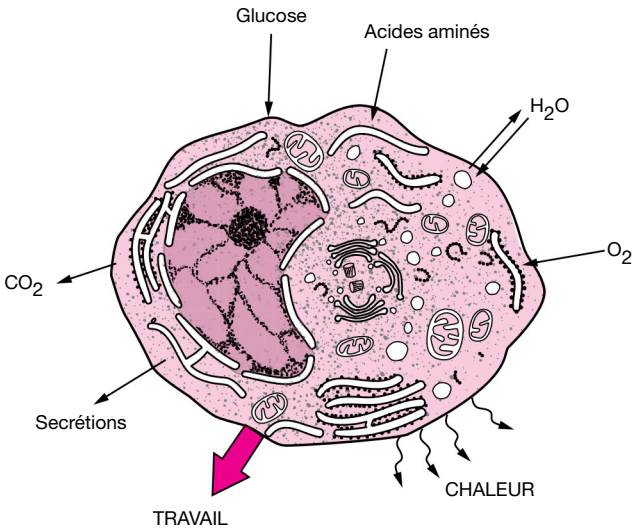


Figure 1 : Un système thermodynamique ouvert

2. Des systèmes très ordonnés

Les cellules sont des systèmes qui entretiennent un haut niveau d'organisation par rapport à leur environnement. Thermodynamiquement, cela signifie que les cellules entretiennent une entropie faible ou, du moins, luttent contre l'augmentation d'entropie. On peut en effet raisonnablement considérer l'entropie comme une mesure de la désorganisation d'un système. En raison du second principe de la thermodynamique, cette lutte se fait au prix d'une importation d'énergie, sous forme de nutriments pour la plupart des cellules ou sous forme de lumière pour les cellules chlorophylliennes. Cette énergie importée puis dépensée par la cellule permet de maintenir son entropie à un niveau faible.

3. Les transferts d'énergie par couplage

Les travaux cellulaires sont coûteux en énergie. Leur réalisation suppose donc la possibilité pour la cellule de transférer de l'énergie depuis les processus de dégradation de matière, par exemple, vers les processus consommateurs d'énergie.

Les couplages sont le moyen par lequel les cellules transfèrent de l'énergie d'un processus à un autre. Un processus spontané peut, par couplage, permettre la réalisation d'un processus qui, s'il était pris isolément, serait impossible. Il est important de comprendre qu'un couplage nécessite l'indissociabilité des deux processus que l'on couple.

4. La diversité des types de couplage

Fiche 21

Hormis l'énergie nucléaire, on peut rencontrer toutes les formes d'énergie dans une cellule. Et hormis la récupération d'énergie à partir d'une source chaude et d'une source froide (principe des machines thermiques), on rencontre tous les types de couplage. On pourra ainsi nommer :

- Les couplages chimio-chimiques, où une réaction chimique spontanée permet la réalisation d'une autre réaction chimique.
- Les couplages chimio-osmotiques, où une réaction chimique pompe un soluté à travers une membrane contre son gradient.
- Les couplages osmo-chimiques, où la dissipation spontanée d'un gradient permet la réalisation d'un travail chimique.
- Les couplages osmo-osmotiques où la dissipation d'un gradient d'un soluté permet de pomper un autre soluté contre son gradient.
- Les couplages chimio-mécaniques, où une réaction chimique spontanée permet la réalisation d'un travail mécanique par fonctionnement d'un moteur.
- Les couplages osmo-mécaniques, où la dissipation d'un gradient permet le fonctionnement d'un moteur.

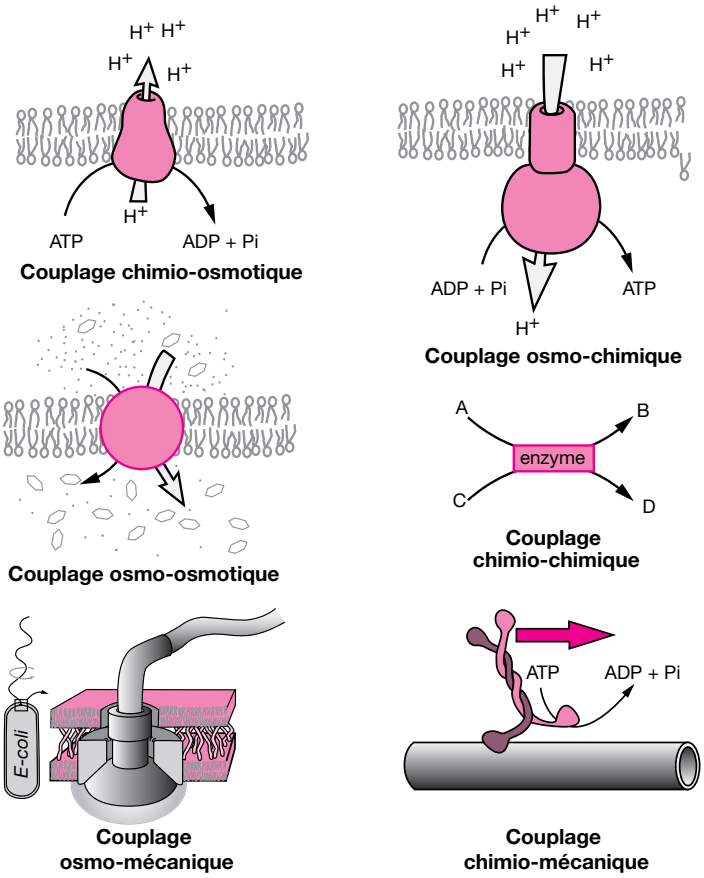


Figure 2 : Principaux types de couplages

fiche 10 Les aspects mécaniques de la vie cellulaire

À l'échelle de la chimie, les cellules sont des systèmes de très grande taille et la vie implique à de nombreux niveaux des mouvements : mouvements de transfert à l'intérieur des cellules, mouvement de déformation des cellules et enfin mouvement des cellules elles-mêmes dans leur environnement.

1. Un cytosquelette à trois niveaux et une matrice extracellulaire

Fiche 117

L'architecture de la cellule est sous-tendue par un réseau protéique fibrillaire très élaboré. Ce réseau définit un enchevêtrement de poutres, de câbles et de haubans qui définissent les formes mais aussi et surtout les propriétés mécaniques des cellules, en termes de fluidité, de rigidité, de souplesse, de plasticité…

On distingue classiquement trois grands types de filaments protéiques : les microtubules (les plus épais : environ 25 nm de diamètre), les filaments d'actine (les plus fins : 7 nm de diamètre) et les filaments intermédiaires (8 à 12 nm). L'organisation de ce réseau permet de structurer le cytoplasme et gouverne en particulier la polarité des cellules.

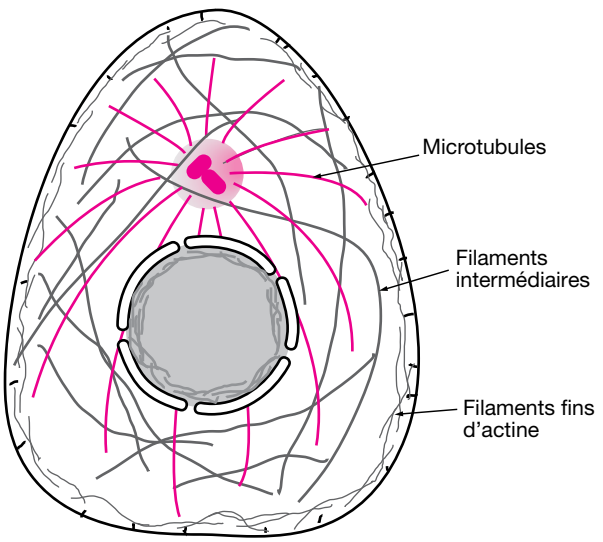


Figure 1 : Organisation schématique du cytosquelette

Dans un tissu, l'espace intercellulaire est structuré par des macromolécules, réseau de câbles enchevêtrés déterminant les propriétés mécaniques du tissu. Ce réseau constitue la matrice extracellulaire. Dans les tissus végétaux, il s'agit d'un réseau essentiellement glucidique dont la pièce maîtresse est la cellulose, polymère de ß-glucose. Dans les tissus animaux, la matrice est surtout protéique, organisée le plus souvent autour de molécules de collagène.

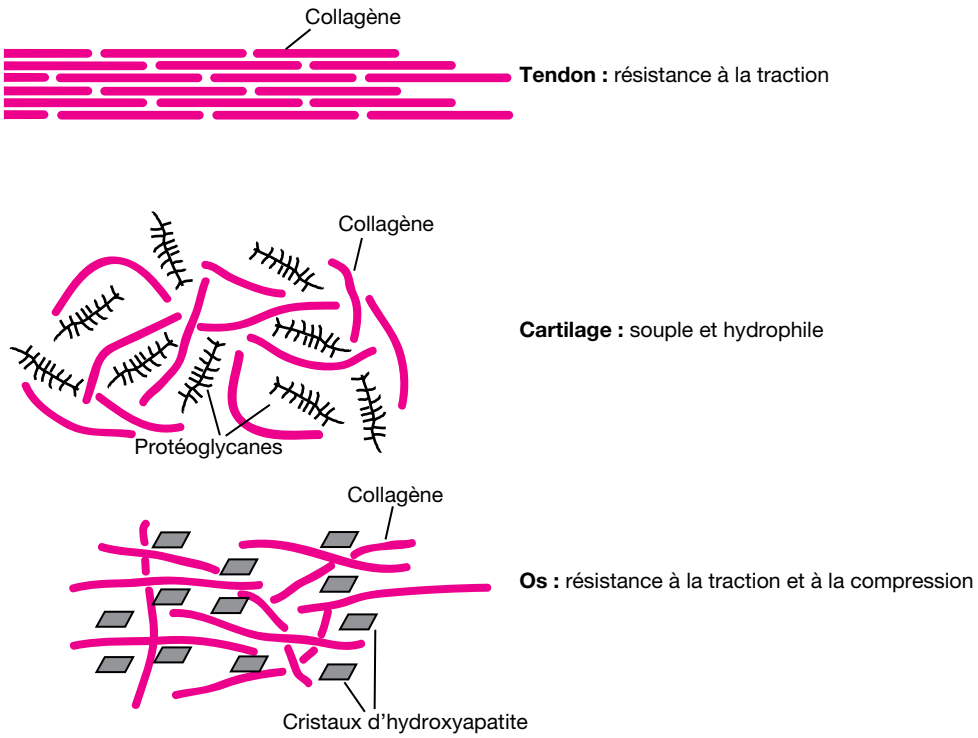


Figure 2 : Propriétés mécaniques des matrices extracellulaires

2. La fluidité et la viscosité des milieux cellulaires

Le degré de cohésion entre les macromolécules structurales, que ce soit dans la cellule ou en dehors de la cellule, définit la consistance des milieux. Un réseau dense de filaments dans l'eau forme un gel, et l'abondance et la stabilité des liens entre les filaments détermine la viscosité de ce gel. C'est ainsi que la périphérie d'une cellule, riche en réseaux denses d'actine forme une sorte de coque gélifiée (le cytogel formant l'ectoplasme) autour d'un cytoplasme central plus fluide (le cytosol). De la même manière, les liens ioniques et covalents établis dans les pectines des ciments pectiques entre cellules végétales déterminent la cohésion entre les cellules.

3. Un trafic d'organites à travers la cellule

Fiche 122

Une grande variété de mouvements est réalisée à l'intérieur des cellules, parmi lesquels des mouvements orientés de vésicules. Associés aux mécanismes de fusion membranaire, ces mouvements permettent de gérer le trafic de substances entre les différents compartiments de la cellule. La réalisation en est assurée par l'intervention de moteurs protéiques liant d'une part ces vésicules et d'autre part les microtubules. En convertissant une énergie chimique en énergie mécanique, ces moteurs parviennent à assurer le déplacement des vésicules.

4. Un squelette dynamique animé par des moteurs protéiques

Fiche 125

Outre les mouvements internes des organites de la cellule, existent aussi des mouvements de déformation de la cellule elle-même. Le principe en est le même : des moteurs protéiques interagissent avec le cytosquelette. Dans le cas des déformations de la cellule, il s'agira principalement de moteurs de myosine travaillant sur des filaments d'actine. Un exemple particulièrement différencié est fourni par les cellules musculaires.

fiche 11

L'eau et les molécules organiques

L'essentiel de l'activité chimique de la cellule correspond à une chimie en solution aqueuse. Le comportement des molécules organiques vis-à-vis de l'eau est donc tout à fait crucial. Ces comportements très contrastés permettent de structurer les premiers niveaux de l'organisation du vivant.

1. L'eau est un solvant polaire

La polarité de la molécule d'eau

Dans la molécule d'eau, il y a un contraste net d'électronégativité entre l'atome d'oxygène (très électronégatif) et les atomes d'hydrogène. Il en résulte une répartition non homogène des charges dans cette molécule : l'atome d'oxygène est légèrement chargé négativement et chaque atome d'hydrogène est légèrement chargé positivement. Ces charges partielles sont notées δ^+ et δ^-. On exprime cela en disant que la molécule est polarisée : chaque atome d'oxygène forme un pôle négatif et chaque atome d'hydrogène forme un pôle positif. La molécule d'eau forme donc un dipôle (deux charges électriques égales et de signes opposés).

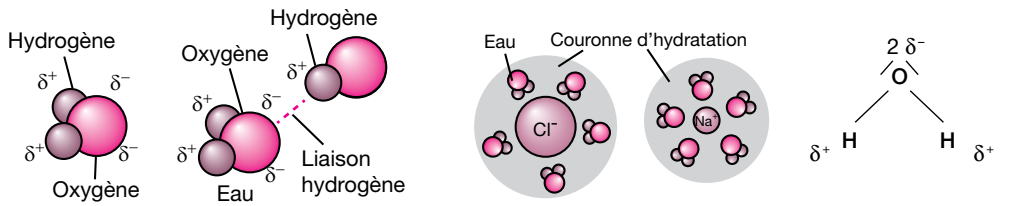


Figure 1 : La molécule d'eau et sa polarité

L'organisation de l'eau liquide

Il s'établit alors des forces électriques faibles (que l'on nomme des liaisons hydrogènes) entre les molécules d'eau (figure 1), constituant ainsi un réseau de liaisons, en perpétuel changement et remaniement. Une image instantanée de la population de molécules d'eau montrerait de telles liaisons ; à une date différente, l'image serait comparable mais les molécules auraient toutes changé de place et le schéma des liaisons serait tout autre.

2. Le comportement des molécules organiques dans l'eau

Lorsqu'une molécule est dépourvue de tout groupement polarisé (donc à l'inverse de la molécule d'eau), elle ne peut établir aucune liaison avec les molécules d'eau. Au contraire, une molécule présentant des radicaux polaires (avec des charges électriques partielles) établit en permanence des liens (électrostatiques) transitoires et changeants avec le réseau de molécules d'eau.

Les molécules polaires

Les molécules polaires s'intègrent totalement dans le réseau et s'y dispersent sans difficulté ; on dit que ces molécules sont solubles dans l'eau (hydrosolubles) et on les qualifie également d'hydrophiles (qui aiment l'eau).

Molécules polaires = molécules hydrophiles = molécules hydrosolubles

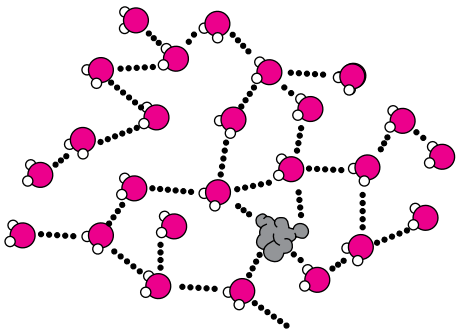


Figure 2 : Comportement dans l'eau des molécules hydrosolubles

Les molécules apolaires

Dans le cas des molécules non polaires, en revanche, il ne s'établit aucune liaison et la mobilité des molécules d'eau associées à ce réseau « mouvant » de liaisons hydrogène repousse et rejette les molécules non polaires. Cela aboutit à la situation la plus stable énergétiquement : le regroupement des molécules non polaires en amas isolés du réseau. On parle alors de regroupement apolaire. Les molécules sont non solubles dans l'eau et on les qualifie d'hydrophobes (qui n'aiment pas l'eau) ou encore de lipophiles (qui aiment les graisses).

Molécules apolaires = molécules hydrophobes = molécules liposolubles

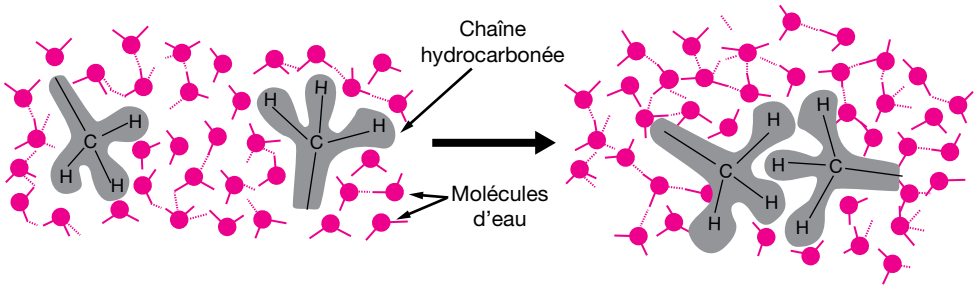


Figure 3 : Comportement dans l'eau des molécules hydrophobes

3. Les ions

Les ions, par définition, sont chargés et peuvent à ce titre établir des liaisons faibles avec les molécules d'eau. Ils sont généralement entourés d'une couronne de molécules d'eau plus ou moins abondantes (figure 1). L'édifice est alors parfaitement intégré au réseau : on dit que l'ion est solvaté. Les ions sont donc hydrosolubles.

fiche 12

Les petites molécules organiques

La chimie d'une cellule tourne autour de la manipulation de petits squelettes carbonés comprenant de trois à une quinzaine d'atomes de carbone. Le métabolisme transforme ces molécules à des fins de diversification, de polymérisation ou encore d'extraction d'énergie.

1. Des molécules hydrophiles

Les oses : des polyalcools avec un groupe carbonyl (C = 0)

Les oses sont parmi les plus simples des molécules organiques. Ils sont constitués de carbone, oxygène et hydrogène. Tous leurs carbones portent des fonctions alcool, à l'exception d'un carbone porteur d'une fonction aldéhyde ou cétone. Ce sont des petites molécules de 3 à 7 carbones. Le glucose est un ose essentiel ; c'est un aldéhyde (un aldose) à 6 carbones, de formule $C_6H_{12}O_6$.

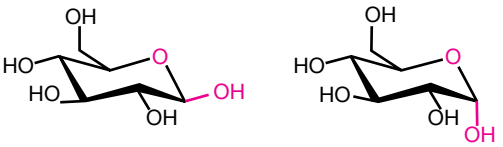


Figure 1 : La molécule de glucose (isomère β à gauche ; isomère α à droite)

Les acides aminés : des molécules azotées

Les acides alpha-aminés, comme leur nom l'indique, portent un groupement amine primaire (–NH_2) et un groupe carboxyle (–COOH). Il en existe vingt différents, que l'on distingue par la nature de leur radical (CH_3 dans le cas de l'alanine, figure 2).

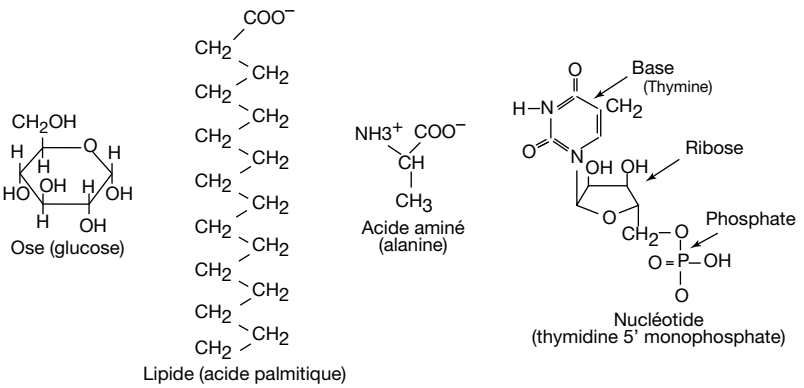


Figure 2 : Les quatre grands types de petites molécules

Les nucléotides : des molécules mixtes

Fiche 15

Ce sont des molécules complexes formées par l'association d'un ose à 5 carbones, le ribose ou le désoxy-ribose, d'une base azotée, et de un à trois groupements phosphates. On distinguera ainsi des nucléotides mono-phosphate, di-phosphates ou tri-phosphates.

2. Les lipides

Fiche 14, 67

Ce sont des molécules hydrophobes ou en partie hydrophobes (amphiphiles). On y trouve les stérols (comme le cholestérol) et les acides gras et leurs dérivés. Les acides gras sont formés de longues chaînes carbonées hydrophobes présentant un groupe acide carboxylique (hydrophile, donc) à une extrémité. Ce sont des molécules amphiphiles : une extrémité est hydrophile, le reste est hydrophobe (figure 3).

Les diglycérides et triglycérides sont formés par l'estérification d'un glycérol (tri-alcool $C_3H_8O_3$) par deux ou trois acides gras.

Les phospholipides sont formés par un di-glycéride estérifié par un phosphate, lui-même lié à une petite molécule hydrophile (choline, inositol…).

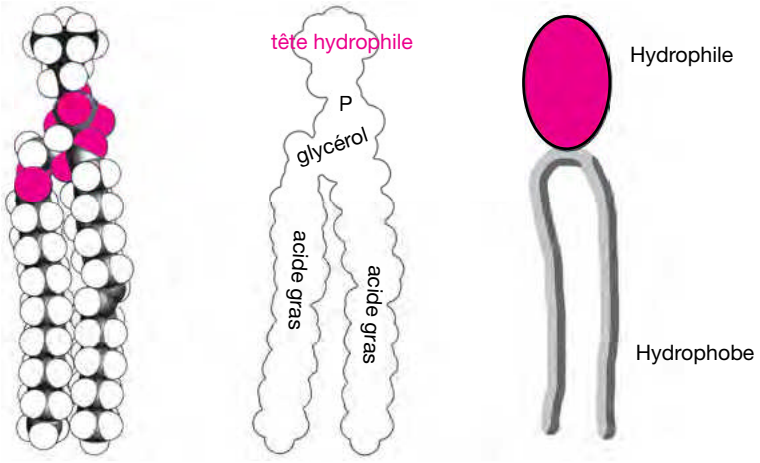


Figure 3 : Organisation d'un lipide membranaire

3. Les passerelles entre molécules

De nombreux intermédiaires du métabolisme permettent de produire des molécules d'un groupe à partir d'un autre groupe. Ainsi, entre les oses et les acides aminés, les intermédiaires sont les acides alpha-cétoniques. Ils sont produits par les voies de dégradation des oses et des acides aminés. La désamination d'un acide aminé produit un acide alpha-cétonique, qui peut ensuite être converti en ose. La dégradation des oses produit des acides alpha-cétoniques qui peuvent être aminés en acides aminés.

fiche 13

Les glucides

Les glucides sont, dans la cellule, le principal substrat énergétique. Ce ne sont pourtant pas les nutriments les plus énergétiques. À masse égale, les acides aminés fournissent autant d'énergie et les lipides beaucoup plus. En revanche, les glucides présentent deux avantages essentiels : à la différence des acides aminés, leur dégradation ne libère aucun autre déchet que H_2O et CO_2 ; et à la différence des lipides, ils sont hydrosolubles, c'est-à-dire très facilement mobilisables dans le cytosol.

1. L'oxydation des oses libère de l'énergie

C'est par oxydation que la cellule récupère de l'énergie sur les oses. Réalisée à l'aide de molécules oxydantes (des coenzymes redox), cette oxydation est particulièrement aisée sur les groupements aldéhyde.

Ainsi, l'une des étapes clés de la glycolyse est l'oxydation du glycéraldéhyde en acide glycérique.

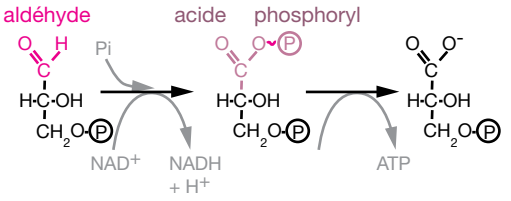


Figure 1 : Le glycéraldéhyde-phosphate et son oxydation

À ce titre, les aldoses sont moins stables que les cétoses, car les groupements aldéhydes sont de meilleurs réducteurs (sont donc plus facilement oxydables) que les groupements cétones.

2. La cyclisation des oses masque leur groupe réducteur

Les oses simples les plus fréquents sont des pentoses et des hexoses. Ces molécules s'avèrent être moins réductrices que le laissent penser la présence de leurs fonctions aldéhyde ou cétone. Ceci est lié à leur structure cyclique qui masque efficacement le groupe carbonyle. Ainsi, sous forme cyclisée, ces molécules sont légèrement stabilisées.

Il est intéressant de noter que le glycéraldéhyde, molécule à trois carbones, ne peut pas se cycliser.

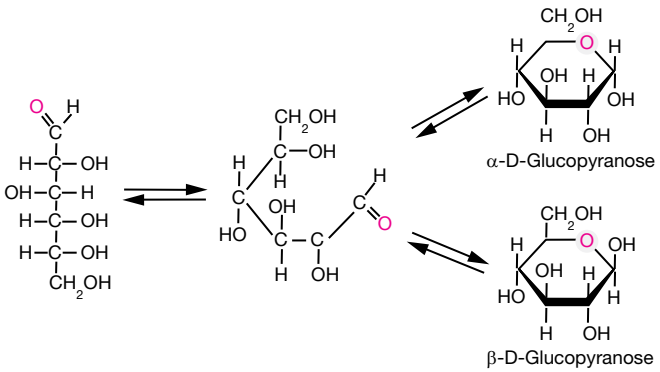


Figure 2 : La cyclisation des hexoses

3. La constitution de réserves par polymérisation du glucose

La mise en réserve de substrats énergétique est un enjeu capital pour des cellules dont l'approvisionnement n'est ni permanent ni constant. Cette mise en réserve, sous forme d'amidon par exemple, répond à trois impératifs :

- permettre la fourniture d'oses utilisables ; l'amidon est facilement hydrolysable en glucose ;
- constituer un stock qui ne soit pas pénalisant d'un point de vue osmotique ; comme c'est la concentration molaire qui définit l'activité osmotique, là où des milliers de molécules de glucose ont un fort impact osmotique, une seule molécule d'amidon aura peu d'influence ;
- être chimiquement stable. Cela est réalisé par la polymérisation de glucose α sous forme d'amidon (cellules végétales) ou de glycogène (cellules animales). Ces polymères sont osmotiquement avantageux (d'un point de vue osmotique, le polymère compte pour une seule molécule au lieu de plusieurs centaines si le glucose était libre), la polymérisation bloque les monomères en conformation cyclique non-réductrice et enfin, l'hydrolyse de l'amidon libère des molécules de glucose utilisables par la cellule.

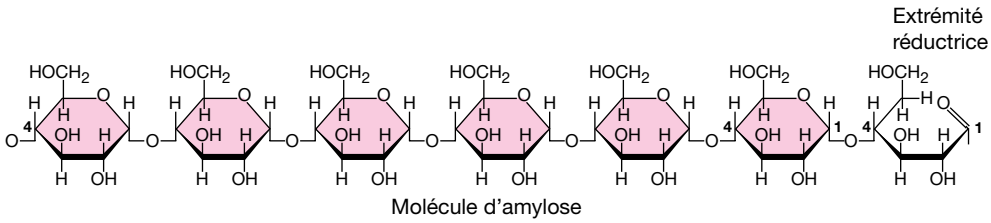


Figure 3 : La stabilisation de l'amidon par polymérisation

fiche 14

Les lipides

Les molécules lipidiques occupent une place tout à fait à part parmi les biomolécules : elles sont hydrophobes. C'est *a priori* peu banal dans un monde dominé par la présence d'eau. Cette propriété est cependant essentielle à la compartimentation des systèmes vivants par des membranes lipidiques. Ce sont par ailleurs des molécules faisant office de réserves d'énergie.

1. Les acides gras sont des molécules réduites et hydrophobes

Fiche 68

L'étude d'un acide gras simple comme l'acide palmitique montre une structure en longue chaîne (15 carbones) de type alcane : CH_3-$C_{14}H_{28}$– à laquelle est adjointe une fonction acide carboxylique –COOH. La chaîne carbonée est très hydrophobe car les liaisons C–C et les liaisons C–H ne sont pas polarisées. De la même manière, ces groupes alkyles sont les formes les plus réduites des atomes de carbone (à part peut-être le diamant…). Ces deux propriétés gouvernent l'essentiel des rôles des lipides.

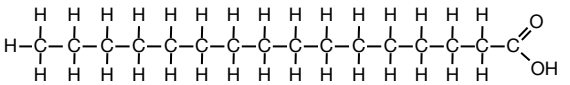


Figure 1 : Des molécules organiques très réduites (exemple de l'acide palmitique)

2. L'auto-assemblage dans l'eau des bicouches lipidiques

Placées dans l'eau, les molécules amphiphiles s'assemblent spontanément en structures complexes qui minimisent les interactions des zones hydrophobes avec l'eau. Ces zones hydrophobes se rassemblent et se protègent de l'eau. Deux structures spontanées peuvent se former selon la densité des molécules et selon leur organisation géométrique (figure 2) :

- les micelles : sphères regroupant en leur centre les zones hydrophobes ;
- les bicouches qui forment des membranes stables, hydrophiles sur chacune de leurs faces qui prennent en sandwich un « feuillet » central hydrophobe. Lorsqu'elles se referment en une sphère, les bicouches forment une vésicule délimitant ainsi deux milieux et créent une barrière à de nombreux solutés. Tous les solutés ionisés et polaires traversent très mal ces bicouches. Elles sont la base de l'architecture des membranes biologiques.

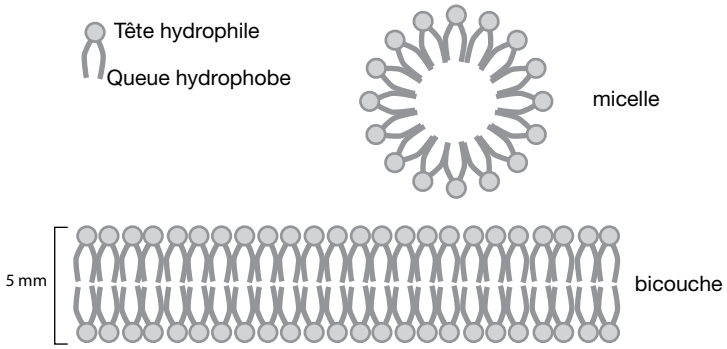


Figure 2 : Assemblage en micelles et bicouches

3. Une forme de réserve d'énergie

En dépit de leur mauvaise solubilité (qui les rend peu mobilisables), les lipides constituent, sous forme de triglycérides, des réserves énergétiques appréciables. Leur avantage est d'être très énergétique. En effet, ce sont les formes du carbone les plus réduites de la cellule ; leur oxydation complète en CO_2 libère une quantité appréciable d'énergie. Le principe de base de cette oxydation est la β-oxydation des acides gras, qui attaque en trois étapes l'atome de carbone en position β du groupe acide. Le résultat de cette attaque en position β est qu'il y a libération à chaque fois d'un fragment à deux carbones : de l'acide acétique. Comme l'extrémité acide de ces molécules est liée à un coenzyme A lors de ce processus, c'est à chaque fois un acétyl-coA qui est libéré.

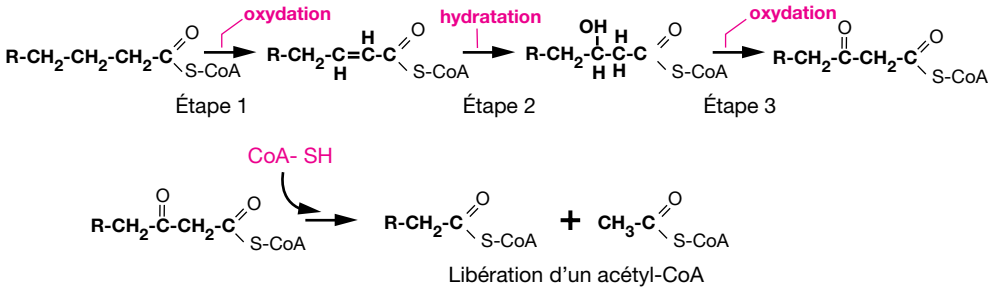


Figure 3 : La β-oxydation et la libération d'énergie

4. Des stéroïdes comme messagers intercellulaires

Les stéroïdes (formés autour du schéma du noyau stérol) ne sont pas des esters d'acide gras. Mais ce sont des molécules amphiphiles et on les classe comme proche des lipides. De nombreuses hormones sont des stéroïdes : les hormones sexuelles mâles et femelles des vertébrés, l'ecdysone des crustacés et des hexapodes. L'originalité du mode d'action de ces hormones est qu'elles pénètrent dans les cellules et y atteignent des récepteurs intracellulaires. De même que le cholestérol peut s'insérer dans les membranes, les hormones stéroïdes peuvent aisément les franchir.

fiche 15

Les acides nucléiques

Fiche 44

Les acides nucléiques sont des macromolécules clés dans l'organisation de la cellule. Ces polymères stockent l'information génétique sous forme d'ADN, le véhiculent sous forme d'ARN messager (ARNm) qui est lui-même maturé grâce aux petits ARN (ARNn). Enfin, ils aident à la traduction de cette information sous forme protéique par l'action d'ARN de transfert (ARNt) et d'ARN ribosomaux (ARNr).

1. Des molécules riches en phosphate

Les acides nucléiques sont initialement décrits comme une substance riche en phosphate appelée « nucléine » (F. Miescher, 1869) car isolée à partir de noyaux cellulaires. L'ARN et l'ADN sont formés par la polymérisation de ribonucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP ou UTP) ou de désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP ou dTTP) respectivement.

Les nucléotides qui forment l'unité de base de ces acides nucléiques sont eux-mêmes constitués par une base azotée, un sucre formé de cinq atomes de carbone (pentose) et un groupe phosphate.

Le sucre est un ribose (pour l'ARN) ou un désoxyribose (pour l'ADN) et sa liaison à la base azotée forment le nucléoside. La différence entre le ribose et le désoxyribose provient de la présence éventuelle d'un groupement hydroxyle sur le carbone C2 du sucre (figure 1). Il y a donc quatre nucléosides impliqués dans la formation de l'ARN et quatre nucléosides impliqués dans la formation de l'ADN.

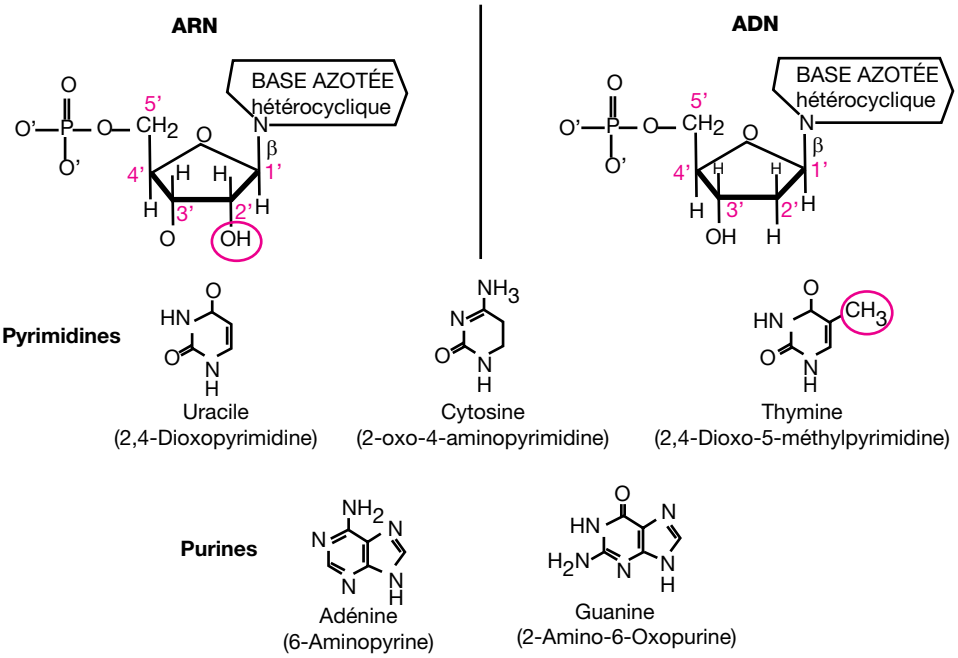


Figure 1 : Composition et importance des acides nucléiques

2. Des polymères orientés

La polymérisation des nucléotides s'effectue lors de la réplication (pour l'ADN) et de la transcription (pour l'ARN). Dans les deux cas, cette polymérisation s'accompagne de la libération d'une molécule de pyrophosphate inorganique (PPi) lors de la formation de la liaison phosphodiester entre le groupement OH porté par le carbone 3' du sucre et le phosphate alpha du nucléotide qui est incorporé à la chaîne d'acide nucléique (figure 2). Ce mécanisme aboutit donc à former une molécule polymérique non ramifiée avec un groupement phosphate libre sur le carbone en 5' (on parle de l'extrémité 5'-phosphate) et un groupe hydroxyle à l'autre extrémité sur le carbone 3' (on parle de l'extrémité 3' OH).

Par convention, les acides nucléiques s'écrivent de 5' vers 3'.

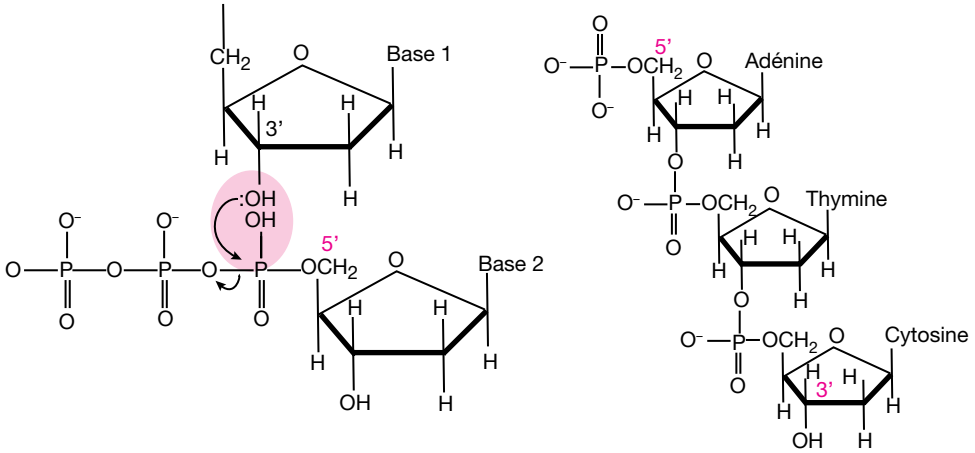


Figure 2 : Polymérisation d'acides nucléiques

3. Des molécules hautement structurées

Les propriétés biologiques des acides nucléiques résultent de leur structuration spatiale. L'acquisition de cette structure est liée à la capacité des bases azotées purines et pyrimidines à s'associer deux à deux grâce à des liaisons hydrogène. Ces appariements sont baptisés « Watson et Crick ». Ce sont ces associations qui définissent des complémentarités entre des séquences nucléiques. Un ARN pourra ainsi se replier sur lui-même (l'exemple le plus classique est celui des ARN de transfert qui forment un « trèfle »), mais pourra aussi s'apparier à un autre acide nucléique. Enfin, c'est grâce à cette structuration que certains acides nucléiques, de concert avec des protéines, forment des complexes hautement structurés comme les ribosomes.

Fiches 26, 45 et 49

fiche 16

Les macromolécules

L'activité métabolique consiste en une gestion des flux et des transformations de petites molécules. Les outils qui permettent la réalisation de ces travaux sont des macromolécules. Ces édifices macromoléculaires ont des masses molaires supérieures à 10 000 g · mol^{-1}, et des dimensions d'une à plusieurs dizaines de fois supérieures aux petites molécules les plus classiques.

1. Des polymères globalement homogènes de petites molécules

L'amidon et la cellulose sont des polymères de glucose, les protéines sont des polymères d'acides aminés, les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides. Finalement très peu de macromolécules sont hétérogènes (on pourra toutefois citer les protéoglycanes, assemblage mixte de polymères protéiques et glucidiques). L'agencement des molécules du polymère se fait par des liaisons spécifiques pour chaque macromolécule (figure 1).

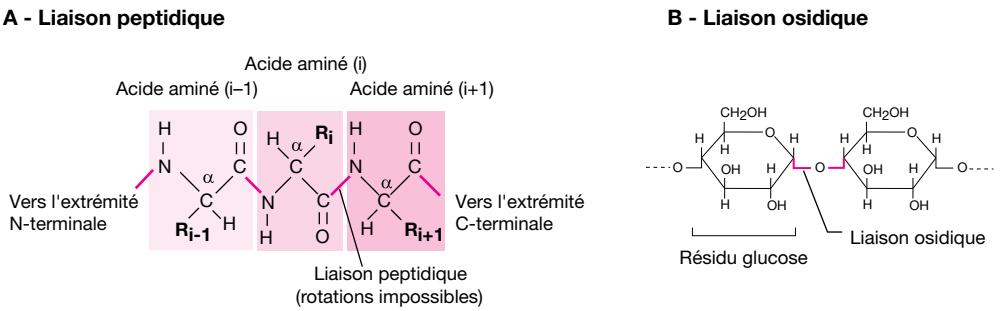


Figure 1 : Liaison peptidique et liaison osidique

2. Des polymères séquencés ou monotones pour une structure toujours précise

Chimiquement, deux cas sont à considérer : certaines macromolécules sont formées par la répétition monotone d'un même motif. De ce fait, la description complète de la molécule n'exige pas une quantité excessive d'information. C'est le cas des polymères glucidiques (amidon ou cellulose, par exemple). D'autres sont formés de la répétition d'un même motif, mais sous des déclinaisons diverses : les protéines sont des polymères d'acides aminés choisis parmi vingt acides aminés ; les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides choisis parmi quatre. Ces macromolécules (les protéines et les acides nucléiques) sont ainsi qualifiées de macromolécules séquencées.

Dans tous les cas de figure, ces édifices sont très structurés en une organisation 3D précise qui fait intervenir de nombreuses liaisons faibles entre les monomères.

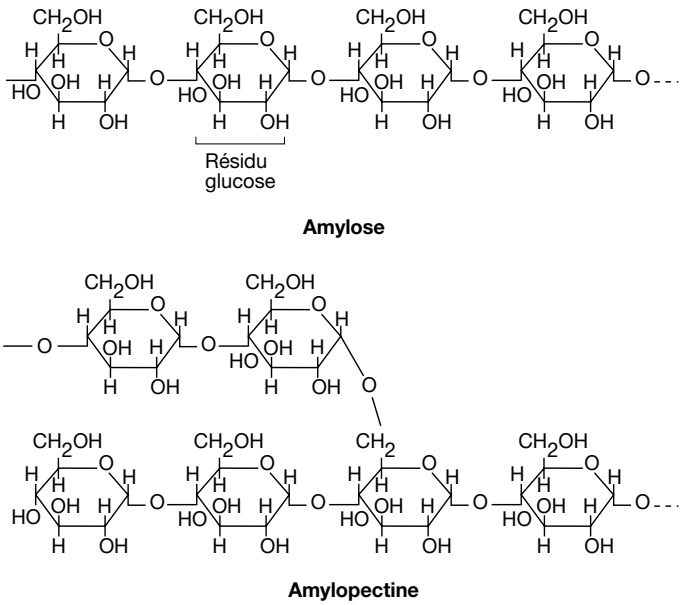


Figure 2 : Chaînes d'amylose et d'amylopectine

3. Des polymérisations coûteuses en énergie

La polymérisation, quelle qu'elle soit se fait toujours à partir de monomères préalablement activés. Les ADN et ARN sont formés à partir de nucléotides triphosphates ; amidon, glycogène et cellulose sont polymérisés à partir d'ADP-glucose ou UDP-glucose ; les protéines sont polymérisées à partir d'aminoacyl-ARNt. Toutes ces formes recèlent une forte énergie potentielle ; énergie qui est exploitée lors de la polymérisation.

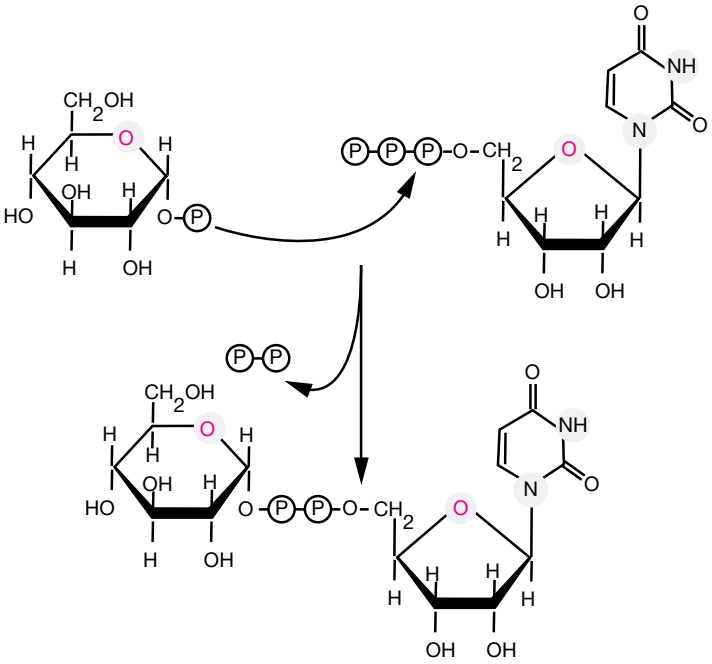


Figure 3 : Activation des monomères avant polymérisation : cas de l'ADP-glucose

fiche 17

La stabilité des macromolécules

L'efficacité biochimique des systèmes vivants repose donc sur des macromolécules remarquablement stables catalysant la transformation de petites molécules. L'assemblage et la stabilité de ces macromolécules reposent sur différentes forces d'interaction.

1. Les liaisons intramoléculaires stables

Fiche 13

Ces liaisons stables, covalentes sont des liaisons fortes. L'énergie nécessaire pour les rompre est trop élevée pour être atteinte par des températures compatibles avec le monde vivant. La formation de ces liaisons covalentes entre monomères va jouer différents rôles. Dans les macromolécules de réserve comme l'amidon ou le glycogène, la polymérisation du glucose implique le carbone n° 1 de ce glucose et le bloque en une configuration qui masque le caractère aldéhyde réducteur de ce monomère. Cela stabilise les réserves. Dans le cas des polymères séquencés (acides nucléiques, protéines) cela permet de stocker l'information ou d'obtenir un objet dont la forme dans l'espace permettra la fonction biologique.

2. La structure des polymères repose sur des forces faibles

Les polymères biologiques ne vont pas rester sous forme linéaire. Les centaines d'atomes les constituant vont être soumis à des contraintes physicochimiques qui peuvent être regroupées sous le terme de « forces faibles ». On retrouve ainsi les forces de Van der Waals (schématiquement liées à la capacité à former un dipôle), les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques. L'ensemble de ces forces permet au polymère d'adopter une structure dont la stabilité sera conditionnée par l'environnement physicochimique (présence de sels, variation du pH, etc.). Dans la molécule d'ADN, la structure en double hélice illustre parfaitement le rôle de ces forces faibles et plus particulièrement celui des liaisons hydrogènes. Les deux brins sont antiparallèles et complémentaires. Cette complémentarité des bases azotées repose sur les liaisons hydrogènes entre les bases azotées. Ces deux brins peuvent être séparés en augmentant la température (dénaturation) sans rompre les liaisons covalentes (Figure 1)

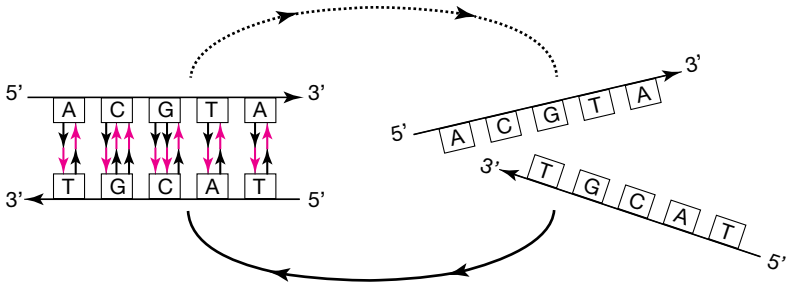


Figure 1 : Dénaturation (pointillé) et renaturation (trait plein) d'une molécule d'ADN

L'ADN double brin est stabilisé par les liaisons hydrogènes (en rouge, un groupement accepteur et en noir un groupe donneur)

3. La multiplicité des interactions faibles contraint fortement les polymères

Dans une protéine, de très nombreuses liaisons faibles sont observées. Ces liaisons sont de natures très multiples et engagent de très nombreux monomères. On pourrait ainsi croire qu'une protéine puisse adopter de très nombreuses configurations. Il n'en est rien : la plupart des protéines adoptent une configuration unique, la plus stable, qui correspond au niveau d'énergie le plus bas de toutes ces interactions. La somme de ces liaisons faibles contrebalance alors l'entropie conformationnelle qui tend à déstabiliser l'ensemble. On retrouve des phénomènes analogues dans un polyose comme la cellulose (Figure 2).

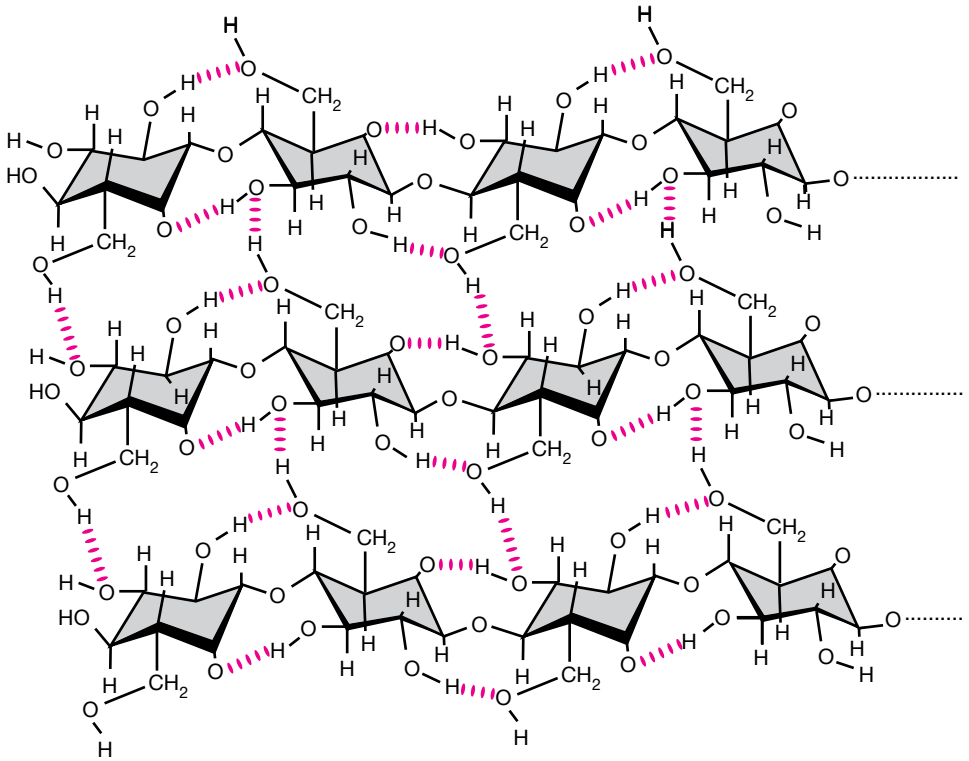


Figure 2 : La cellulose et ses propriétés mécaniques

Les trois chaînes parallèles de glucose sont stabilisées par des liaisons hydrogène intrachaînes et interchaînes.

4. La précision nanométrique des sites actifs

Les outils utilisés par la cellule sont essentiellement des protéines (pompes, enzymes, moteurs…). Du fait de leur grande taille (de 10 à 100 nanomètres), ces molécules sont stabilisées par un très grand nombre de liaisons faibles et la position de leurs atomes est réglée avec une grande précision, à la fraction de nanomètre près. C'est ce qui permet à ces outils de manipuler des petites molécules à l'atome près, ce qui est essentiel, par exemple dans le cas de la catalyse enzymatique.

fiche 18

Les niveaux structuraux des protéines

Fiche 16

Les protéines sont chimiquement définies comme des macromolécules résultant de l'enchaînement d'acides aminés. Il existe une vingtaine d'acides aminés qui ont en commun la présence d'une fonction acide carboxylique et une fonction amine. La condensation de ces deux fonctions permet la formation de la liaison peptidique.

1. La structure primaire

Au moment de la traduction ou après une étape de dépliement liée à un transport dans une organelle ou à une dénaturation, les protéines correspondent à des chaînes polypeptidiques. Cette chaîne est orientée avec une extrémité NH_2 et une extrémité COOH (par convention, on écrit la chaîne de l'extrémité N– vers l'extrémité C–terminale). Un tel polymère n'est pas stable en solution. La chaîne principale du polypeptide (formée par la répétition du motif [–NH–CH(R)–CO–]) va alors se replier et former des éléments structuraux de taille variable. La formation de ces éléments représente le passage de la structure primaire (séquence d'acides aminés) à la structure secondaire (motifs formés par les acides aminés).

2. La structure secondaire

C'est essentiellement la nature des acides aminés qui va conditionner ce repliement. Celui-ci va s'ajuster grâce à des rotations des liaisons C–N et C–C du carbone portant l'acide aminé (la liaison peptidique qui est plane ne pouvant « tourner »). Ces deux angles de torsion sont appelés respectivement les angles φ et ψ. Ces deux angles faisant référence à la rotation de deux unités peptidiques rigides autour du même atome C alpha, la plupart des combinaisons conduisent à un encombrement stérique.

On doit au physicien G. N. Ramachandran d'avoir réalisé en 1963 une étude des combinaisons possibles de ces deux angles et l'établissement d'une carte : le diagramme de Ramachandran. Au sein de ce diagramme il existe trois zones « autorisées ». Ces trois zones correspondent à la formation de structure secondaire hélice droite, feuillets bêta et hélice gauche respectivement.

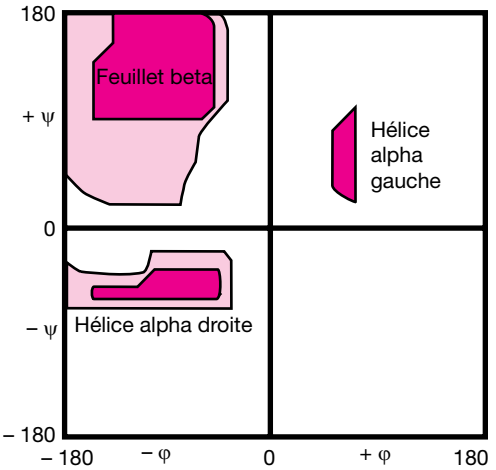


Figure 1 : Diagramme de Ramachandran (ψ et φ représentent les angles diédraux)

L'hélice alpha

Décrite en premier par L. Pauling en 1951, cette hélice possède 3,6 résidus par tour. La chaîne principale est stabilisée par la formation d'une liaison hydrogène entre le C=O du résidu n et le NH du résidu n + 4. Les chaînes latérales (la partie (R) de chaque acide aminé) sont tournées vers l'extérieur de l'hélice. La longueur moyenne d'une hélice est de dix résidus.

Le feuillet bêta

Cette structure implique la formation de plusieurs brins ß. Ces brins s'associent latéralement dans la même orientation (feuillets parallèles) ou tête bêche (feuillets antiparallèles).

Le coude

C'est un élément de jonction entre deux éléments de structure secondaire structurée. Le coude n'a pas à proprement parler de structure périodique régulière. En fonction de la longueur du coude (2, 3, 4, 5 ou 6 résidus), on parle de coude delta, gamma, bêta, alpha ou pi. Une boucle plus longue est généralement trouvée sous forme de pelote statistique.

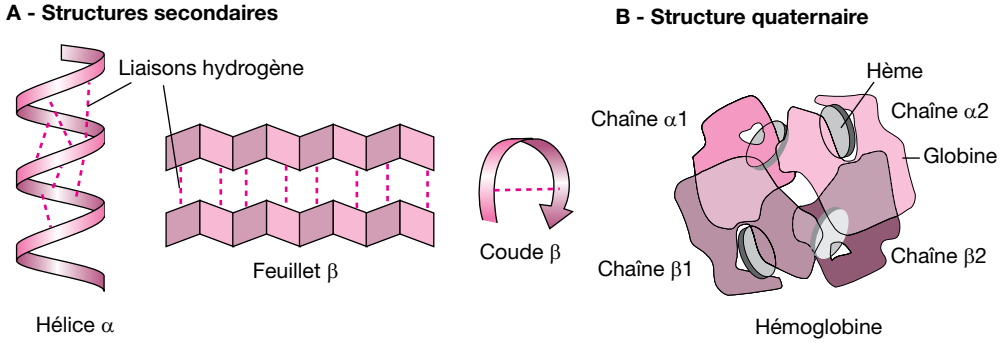


Figure 2 : Structures secondaires et quaternaire

3. La structure tertiaire

Les éléments de structure secondaire s'associent entre eux à leur tour et permettent l'acquisition de la forme structurale : la structure tertiaire. Cette structure peut être étudiée par des approches physiques comme la diffraction de rayons X ou la résonance magnétique nucléaire.

Fiche 25

4. La structure quaternaire

Une protéine peut être composée de plusieurs chaînes polypeptidiques identiques (homopolymère) ou différentes (hétéropolymère). L'agencement de ces différentes chaînes représente la structure quaternaire (figure 2). Souvent, la fonction biologique n'est possible que lorsque ce niveau de structure est atteint (voir exemple de l'ARN polymérase).

Fiche 46

fiche 19

Cinétique et thermodynamique de la cellule

Comme pour toute transformation physico-chimique, il est essentiel, lors de la description d'un processus de distinguer clairement ce qui relève de la cinétique et ce qui relève de la thermodynamique. Il s'agit en fait pour le biologiste de répondre à la question (ou son inverse) : « pourquoi ce processus se produit-il ? ». Cette question est toujours double, recouvrant l'aspect thermodynamique et l'aspect cinétique.

1. Les raisons de la non-réalisation d'un processus

Deux raisons très différentes peuvent faire qu'une transformation ne se produit pas.

La spontanéité

La réaction peut être impossible, antispontanée. Cela signifie qu'elle est thermodynamiquement défavorisée et que c'est précisément le processus inverse qui est spontané. La meilleure image est celle de la chute de l'eau dans une cascade. La chute est spontanée, mais la remontée de l'eau ne l'est pas.

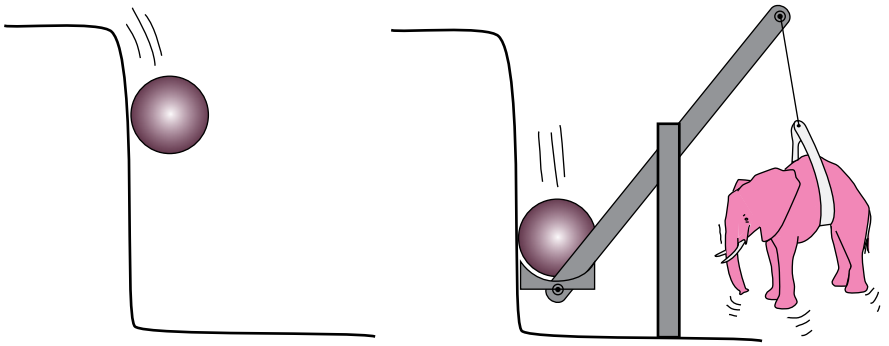


Figure 1 : Spontanéité et antispontanéité

Si un processus est spontané, on peut en tirer du travail. Si un processus est antispontané, sa réalisation exige un travail fourni par un autre processus.

La vitesse

Mais une réaction peut aussi sembler empêchée pour des raisons de vitesse. La transformation est spontanée et doit se produire, tôt ou tard, mais sa vitesse est si lente que ce n'est pas détectable, ou bien une barrière d'activation empêche momentanément sa réalisation.

On peut faire une analogie avec la combustion de l'essence. De l'essence en présence d'oxygène réagit de façon explosive en produisant de l'eau et du dioxyde de carbone. Cette réaction est inéluctable et certaine… si l'on attend suffisamment longtemps. En l'absence d'une étincelle, ou d'une autre forme d'activation, l'explosion n'a pas lieu ; elle est bloquée cinétiquement. On parlera alors de métastabilité de l'essence. Il en va exactement de même de la molécule d'ATP : thermodynamiquement instable, elle n'est pourtant dégradée que si une enzyme permet d'accélérer cette réaction.

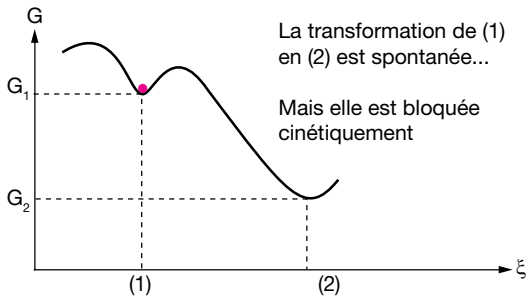


Figure 2 : Blocage cinétique et métastabilité

2. Les aspects énergétiques

La chute d'enthalpie libre

La spontanéité d'un processus est mesurée par la variation d'enthalpie libre ΔG qui lui est associée. Plus le ΔG est négatif, plus le processus est spontané. Si le ΔG est positif, le processus est impossible et c'est le processus inverse qui est spontané.

La barrière d'activation

En revanche, la vitesse d'une réaction dépend de la barrière énergétique d'activation qui caractérise cette réaction. La vitesse de la réaction est donnée par la proportion des molécules de réactifs dont l'énergie cinétique individuelle est supérieure à l'énergie d'activation. Si cette barrière est haute, la vitesse est faible, si la barrière est basse la vitesse est grande. C'est sur ce point que les catalyseurs jouent leur rôle : ils abaissent l'énergie d'activation et augmentent ainsi la vitesse d'une réaction.

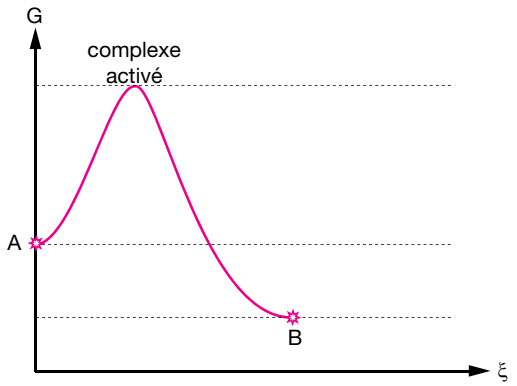


Figure 3 : Barrière d'activation et vitesse de réaction

Toute réaction spontanée passe par un état intermédiaire instable qui constitue une barrière énergétique.

fiche 20

L'enthalpie libre et le métabolisme

L'enthalpie libre est la fonction d'état thermodynamique adaptée à la description des processus biologiques (car adaptée aux transformations réalisées à pression constante). Toutefois, pour les réactions chimiques, il sera plus commode d'avoir recours à l'enthalpie libre de réaction.

1. Les principes de la thermodynamique

L'énergie interne

Le premier principe peut s'énoncer simplement de la façon suivante :

$$\Delta U = Q + w$$

[où ΔU est la variation d'énergie interne du système lors d'une transformation, et où Q et w sont la quantité de chaleur et le travail mécanique reçus par le système au cours de cette transformation]

L'enthalpie

On peut, à partir de l'énergie interne U, définir la fonction enthalpie H par :

$$H = U + PV$$

[où P et V sont la pression et le volume du système]

Lors des transformations à pression constante, la variation d'enthalpie est alors égale à la quantité de chaleur échangée.

En biologie, les variations de H décrivent les échanges de chaleur et permettent de définir les transformations endothermiques (absorbant de la chaleur) et exothermiques (produisant de la chaleur).

L'enthalpie libre

Le second principe de la thermodynamique énonce :

$$\Delta G = \Delta H + T\Delta S$$

[où G désigne l'enthalpie libre du système et S son entropie, T étant la température absolue]

L'enthalpie libre G représente la part d'enthalpie disponible pour la réalisation d'un travail, et l'entropie S représente l'énergie dégradée, non disponible. Autrement dit, ΔG représente la quantité maximale de travail que l'on peut obtenir de la transformation. Le reste, la part égale à $T\Delta S$ est inutilisable.

2. Enthalpie libre et spontanéité

La variation d'enthalpie libre associée à une transformation désigne donc la quantité de travail récupérable sur cette transformation. Si un processus est spontané, par exemple la chute d'une masse, il est possible d'exploiter cette spontanéité pour en récupérer du travail. Or, par définition de l'enthalpie libre, si un travail est récupérable, c'est que le système libère de l'enthalpie libre. Ainsi, il est équivalent de dire qu'un processus est spontané ou de dire qu'il se fait à ΔG négatif.

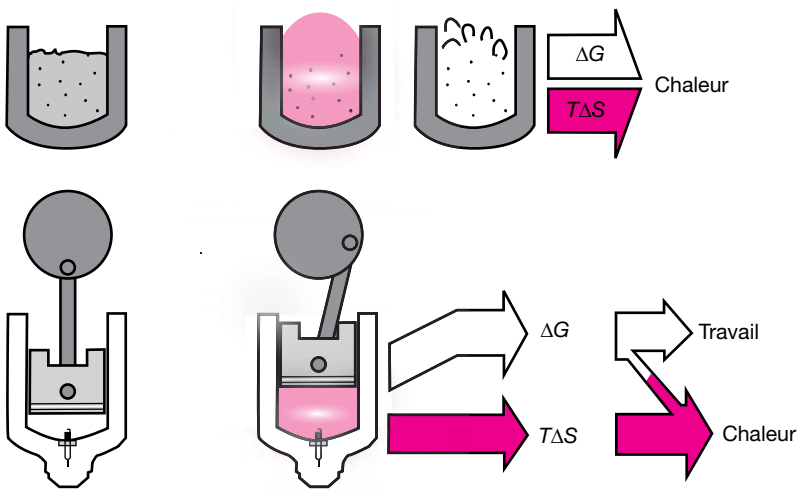


Figure 1 : Enthalpie libre, entropie et travail

Nous pouvons ainsi énoncer les équivalences suivantes :

$\Delta G < 0$

Il est possible de retirer du travail du système, la transformation est spontanée et est dite exergonique.

$\Delta G = 0$

Le système est à l'équilibre ; il ne fournit pas de travail et ne consomme pas d'énergie.

$\Delta G > 0$

Le système ne fournit pas de travail, la transformation est impossible, à moins qu'une énergie extérieure au système ne lui soit fournie et elle est dite endergonique.

Cette vision des choses nous permet alors de comprendre comment certaines transformations sont à la fois endothermiques et spontanées : le chlorure de sodium a une entropie supérieure à l'état dissous qu'à l'état cristallisé, et sa dissolution se fait à ΔG négatif (spontanément) mais avec un terme $T\Delta S$ suffisamment grand pour que le système absorbe de la chaleur (ΔH positif).

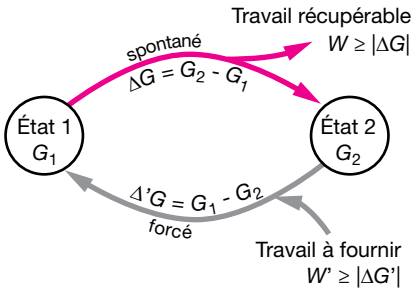


Figure 2 : Équilibre, travail et spontanéité

Il y a équilibre lorsque $G_1 = G_2$.

fiche 21

L'énergie cellulaire

Les cellules réalisent des travaux de multiples natures : des travaux chimiques (synthèses, polymérisations…) des travaux mécaniques (mouvement), des travaux osmotiques (transferts de solutés, concentration, création de gradients). Tous ces travaux sont des formes d'énergie que la cellule sait mettre en jeu et nous les envisagerons avec les concepts de la thermodynamique.

1. Les réactions chimiques

Le cas général

La variation d'enthalpie libre d'une réaction chimique n'est pas directement accessible. On se contentera de « l'enthalpie libre de réaction » (notée $\Delta_r G$), notion différente qui nous permet d'approcher la spontanéité de la réaction.
Le $\Delta_r G$ s'exprime à partir d'une valeur standard $\Delta_r G°'$ et à l'aide des concentrations des réactants.
Ainsi, pour une réaction A + B = C + D :

$$\Delta_r G = \Delta_r G°' + RT\ln(Q)$$

[où Q est le quotient de réaction (le rapport des concentrations des produits et des réactifs]

En nous rappelant que l'équilibre est défini par la relation $\Delta_r G = 0$, il vient aisément :

$$\Delta_r G°' = -RT\ln(K_{éq})$$

qui exprime que le quotient de la réaction est, à l'équilibre, une constante ($K_{éq}$), une caractéristique de la réaction.
On retrouve ici la loi d'action de masse.

Loi d'action de masse : si les concentrations s'éloignent des valeurs de l'équilibre, les rapports de ces concentrations définissent le sens dans lequel la transformation évolue spontanément.

Les réactions d'oxydo-réduction

Dans ce cas particulier, on peut également considérer l'aspect électrique de la transformation ; cela permet de définir l'égalité suivante :

$$\Delta_r G = -nFE$$

[où F est la constante de Faraday et E la différence de potentiel redox entre les deux couples considérés]

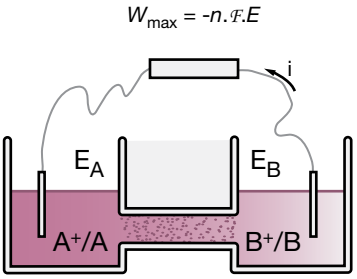


Figure 1 : Potentiel redox et travail

2. Les flux transmembranaires : les gradients

Le cas des espèces non chargées

La traversée d'une membrane par une espèce chimique X non chargée s'accompagne d'une variation d'enthalpie libre de transfert qui est donnée par :

$$\Delta_{tr}G = RT\ln([X]_2/[X]_1)$$

On retrouve ici l'importance des concentrations : le flux est spontané de (1) vers (2) lorsque ΔtrG est négatif, c'est-à-dire lorsque la concentration en (2) est plus faible que la concentration en (1).

Les flux d'ions

Si l'espèce chimique est chargée, l'influence de la concentration vue ci-dessus reste valable mais il faut y ajouter un terme électrique qui rend compte de la sensibilité de l'ion à la différence de potentiel électrique entre les deux compartiments. Cette différence de potentiel, dans le cas des membranes biologiques, n'est en général jamais nulle ; pour une membrane plasmique, elle est de l'ordre de – 60 mV pour les cellules animales et de – 150 mV pour les cellules végétales. Ces valeurs négatives traduisent une face interne de la membrane légèrement négative et une face externe positive.

$$\Delta_{tr}G = RT\ln([X]_2/[X]_1) + zFE$$

[où z est la valence de l'ion et E le potentiel de membrane (c'est-à-dire la différence de potentiel transmembranaire)]

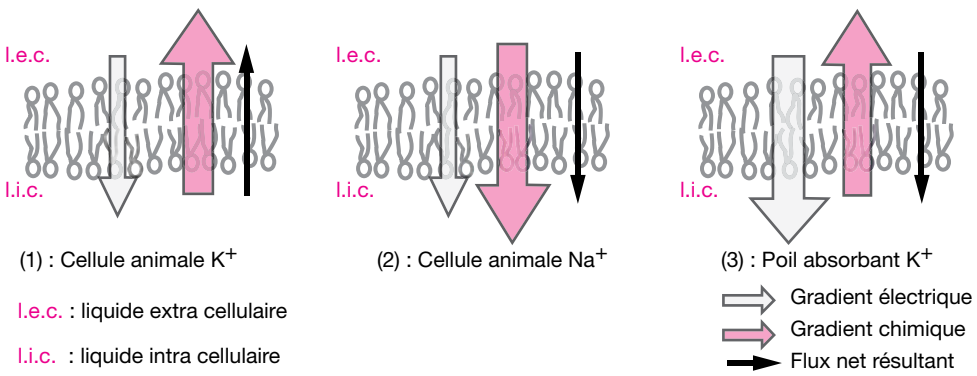


Figure 2 : Les flux transmembranaires

fiche 22

Les conversions énergétiques

Il y a conversion énergétique lorsqu'un travail est réalisé (transfert ordonné d'énergie) en utilisant la dissipation d'énergie d'un processus spontané. On nomme couplage le mécanisme par lequel un processus spontané force un autre processus.

1. Possible et impossible

Une transformation n'est possible que si le ΔG qui lui est associé est négatif. Toute transformation à ΔG positif est impossible et n'existe pas. Il semble pourtant que de nombreux processus biologiques se fassent à ΔG positif (mouvements, pompes, synthèses…) ; il n'en est bien sûr rien. Ces processus sont une partie d'un processus global plus large qui englobe une transformation à ΔG très négatif, de telle sorte que le processus global est bien spontané.

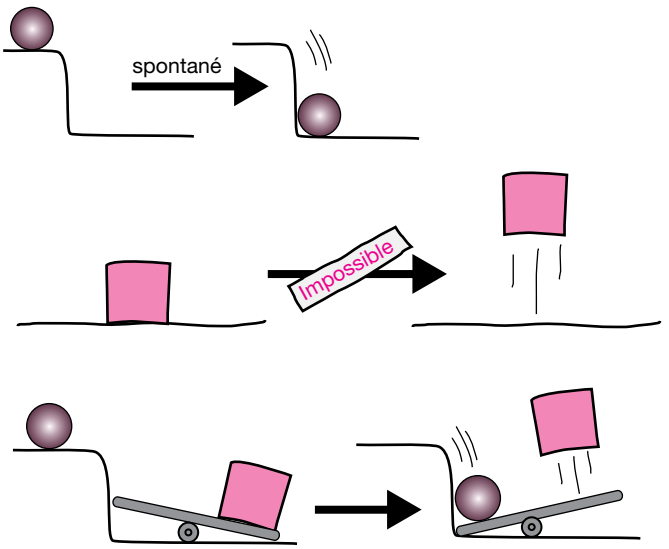


Figure 1 : Le principe d'un couplage

2. Les conditions des couplages

La notion de couplage résulte d'une sorte d'expérience de pensée, où l'on imagine un phénomène biologique comme deux sous-processus séparés, l'un à ΔG négatif, spontané donc, et l'autre à ΔG positif qui « consomme » l'énergie du premier. Cette façon de voir est très commode et est bien adaptée aux systèmes biologiques. Cependant il est essentiel de garder à l'esprit que cette séparation n'est que théorique et que, bien au contraire, un couplage exige l'indissociabilité des deux sous-processus. C'est bien parce qu'ils sont indissociables et non juxtaposés que la réalisation de l'un « entraîne » inéluctablement l'autre.

Ainsi, il ne suffit pas de juxtaposer deux processus, l'un spontané, l'autre anti-spontané pour réaliser un couplage : une ampoule électrique dans une chute d'eau (figure 2)

ne s'allume pas ! Bien au contraire, la réalisation du couplage exige un appareillage rendant indissociables les deux processus : écoulement de l'eau dans une turbine et production d'électricité par une dynamo.

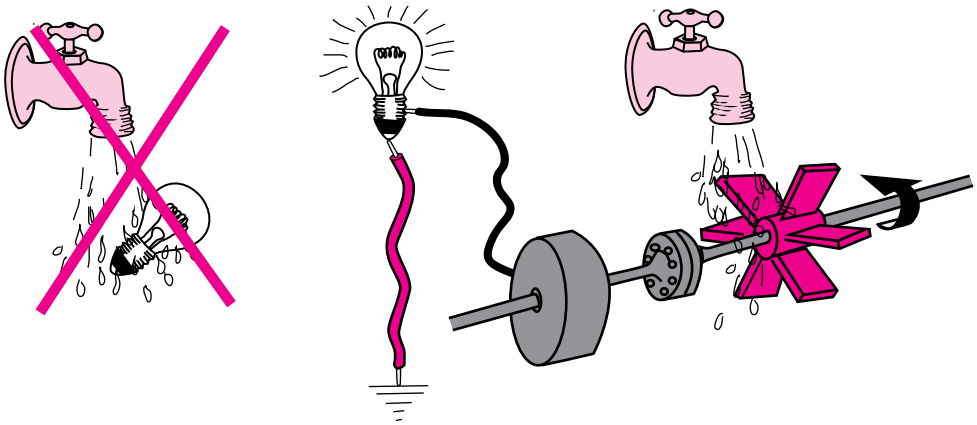


Figure 2 : Couplage et indissociabilité

L'indissociabilité entre les deux processus est marquée par les boulons qui lient la rotation de la turbine à la rotation de la dynamo. Sans ces boulons, le couplage n'est pas possible.

3. Enzymes et couplages

Ainsi, lorsque l'on considère le couplage effectué entre la phosphorylation du glucose et l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, il est évident que l'ion phosphate est l'élément de couplage. Mais l'enzyme qui catalyse cette réaction est également essentielle, car elle rend les deux transformations impossibles l'une sans l'autre.

Glucose + Pi	=	Glucose–phosphate
ATP	=	ADP + Pi
Glucose + ATP	=	Glucose–phosphate + ADP

Mais pour d'autres situations, comme la production de GTP lors du cycle de Krebs, il n'apparaît pas clairement d'élément commun aux deux réactions. Cependant, le couplage devient compréhensible si l'on reconnaît que les enzymes participent bien aux réactions, même si elles n'apparaissent pas dans les bilans de ces réactions.

Fiche 105

fiche 23

Les enzymes « michaeliennes »

Les enzymes sont les catalyseurs biologiques. Ce sont essentiellement des protéines dont la fonction est d'accélérer les réactions chimiques du vivant de façon spécifique, en stabilisant les états de transition de ces réactions. Certains acides nucléiques comme les ARNs sont capables de telles activités.

1. Des catalyseurs spécifiques

Chaque enzyme catalyse (accélère) une réaction bien précise ou un ensemble de réaction bien précis. Les enzymes sont donc spécialisées et c'est la spécificité de leurs étroites interactions avec les réactants qui explique la spécificité de catalyse.

2. Le modèle michaellien

Dans de nombreux cas, l'approche expérimentale de la catalyse enzymatique présente une allure caractéristique hyperbolique, bien expliquée par le modèle de Leonor Michaellis et Maud Menten. Il s'agit de modéliser les variations de la valeur de la vitesse initiale de la réaction lorsque l'on fait varier les quantités de substrat. Considérons l'équation générale d'une transformation d'un substrat S en un produit P :

$$E + S \underset{k^{-1}}{\overset{k^{1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k^{-2}}{\overset{k^{2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Les constantes cinétiques k sont propres à chaque transformation. En début de réaction (vitesse initiale), il y a peu de produit formé et donc $v_i = k^2(ES)$. En augmentant la concentration de S, l'enzyme va être progressivement saturée pour atteindre le maximum qui correspond à la v_{max} : la vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée d'enzyme. En supposant un état quasi stationnaire, la concentration en complexe ES est donc constante. Si la concentration en substrat est grande par rapport à celle de l'enzyme, on peut considérer que la concentration en substrat libre (disponible pour la réaction) équivaut à la concentration de substrat ajouté (celle que l'on connaît). En utilisant toutes ces approximations, on peut alors démontrer que : $v_i = v_{max}(S)/(Km + (S))$. Les constantes Km et v max peuvent être déduites des études cinétiques en reportant les valeurs mesurées des vi en fonction de S. On peut alors définir le K_m comme la valeur de la concentration en substrat pour laquelle la moitié de V_{max} est atteinte.

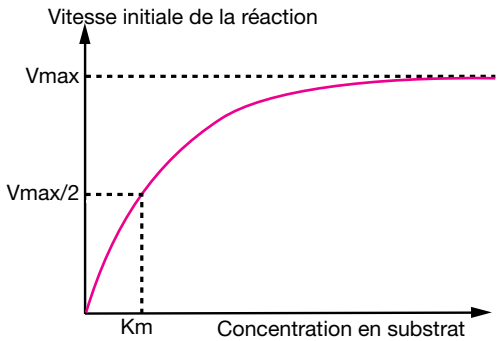


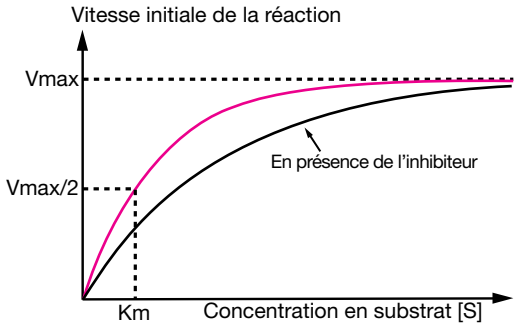
Figure 1
Courbe de Michaellis et Menten

3. Les inhibiteurs compétitifs et non compétitifs

Des inhibiteurs qui ne modifient pas V_{max}

L'utilisation de tels inhibiteurs aboutit à une diminution de la vitesse, mais sans modification de V_{max} qui reste atteignable ; si l'on augmente la quantité de substrat, la vitesse re-augmente et l'on peut atteindre V_{max}, si l'on augmente la quantité d'inhibiteur, la vitesse re-diminue, si l'on augmente [S], la vitesse re-augmente, si l'on augmente encore [I], etc. Il y a compétition entre S et I : on dit que I est un inhibiteur compétitif. Cette compétition concerne en fait le site de fixation du substrat sur l'enzyme.

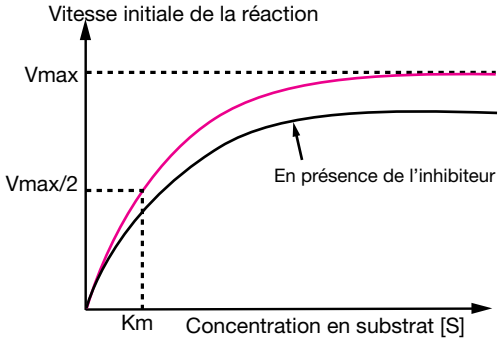
Figure 2 : Inhibition compétitive



Des inhibiteurs qui abaissent V_{max}

Dans ce cas, tout se passe comme si de l'enzyme avait été supprimée. On aura beau augmenter [S], la vitesse maximale sera diminuée. Il n'y a pas compétition entre [S] et [I]. L'inhibiteur se fixe sur un autre site de l'enzyme que le substrat.

Figure 3 : Inhibition non compétitive



4. Toutes les enzymes ne sont pas « michaeliennes »

Le modèle michaelien a permis d'obtenir de nombreuses données à une époque pendant laquelle l'informatique et les données structurales faisaient défaut. Il a ainsi permis de décrire et modéliser le fonctionnement de beaucoup d'enzymes. Néanmoins, la compréhension et le mode d'action des enzymes ont été bouleversés dans les années 1960 avec la découverte de l'allostérie.

fiche 24

Les enzymes allostériques

Nous comprendrons ici le terme d'allostérie comme faisant référence à une cinétique avec liaison coopérative, marquée par une allure sigmoïde. Ces enzymes offrent des possibilités de contrôle de réaction plus fins et plus radicaux que les enzymes michaeliennes. Leur intérêt est patent lorsqu'elles interviennent, comme c'est souvent le cas, aux étapes d'engagement des voies métaboliques.

1. Une cinétique sigmoïde : la liaison coopérative

La cinétique sigmoïde de certaines réactions catalysées échappe totalement à la description michaelienne de la catalyse. Le point d'inflexion suggère une évolutivité de la catalyse selon l'abondance du substrat. L'enzyme, pour de faibles concentrations en substrat est médiocre (pente faible), tandis qu'elle devient très efficace autour du point d'inflexion (pente forte).

Cela s'explique par la coopérativité : la fixation du substrat favorise la fixation du substrat. L'intérêt biologique est ici de disposer d'une enzyme beaucoup plus réactive à la concentration en substrat ; à proximité du point d'inflexion, la pente de la courbe cinétique est en effet plus forte que pour une enzyme michaelienne.

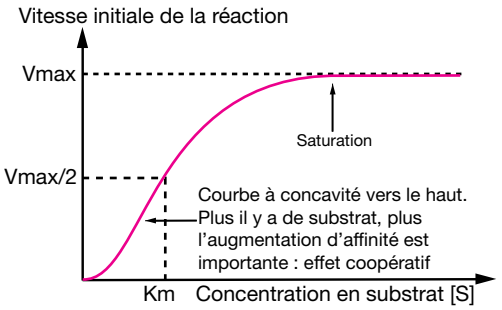


Figure 1
Cinétique sigmoïde et coopérativité

2. Des effecteurs allostériques : les effets hétérotropes

La plupart des enzymes allostériques présentent une autre particularité : la possibilité de voir leur activité modulée par la fixation d'autres ligands que le substrat ; on nomme ces ligands des effecteurs allostériques.

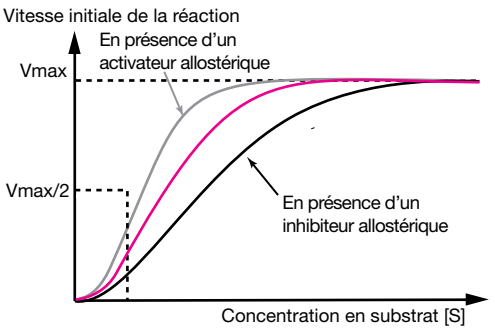


Figure 2
Effecteurs allostériques

3. Modèle d'allostérie

Les enzymes allostériques sont des protéines à structure quaternaire (plusieurs sous-unités) qui oscillent entre deux configurations :

- l'une dite « tendue » notée T ;
- et l'autre dite « relâchée » notée R.

Dans la forme tendue, des liaisons entre les sous-unités contraignent chaque sous-unité et la maintiennent dans une configuration ayant une faible affinité pour le substrat. Dans la forme relâchée, au contraire, la rupture de ces liaisons ramène les sous-unités dans une configuration qui leur donne une affinité plus importante.

Les effets homotropes : la liaison coopérative

Dans un modèle d'allostérie, la fixation du substrat contribue à stabiliser la forme R de la protéine. De ce fait, la fixation du substrat sur une sous-unité favorise la configuration R des autres sous-unités et donc facilite la fixation de substrat supplémentaire.

Les effets hétérotropes

Les effecteurs allostériques sont des molécules qui, en se fixant sur les sous-unités, stabilisent l'une ou l'autre forme, en renforçant ou en empêchant les liaisons contraignantes entre les sous-unités. De ce fait, certains effecteurs allostériques favorisent les formes T et sont des inhibiteurs allostériques, d'autres favorisent les formes R et sont des activateurs allostériques.

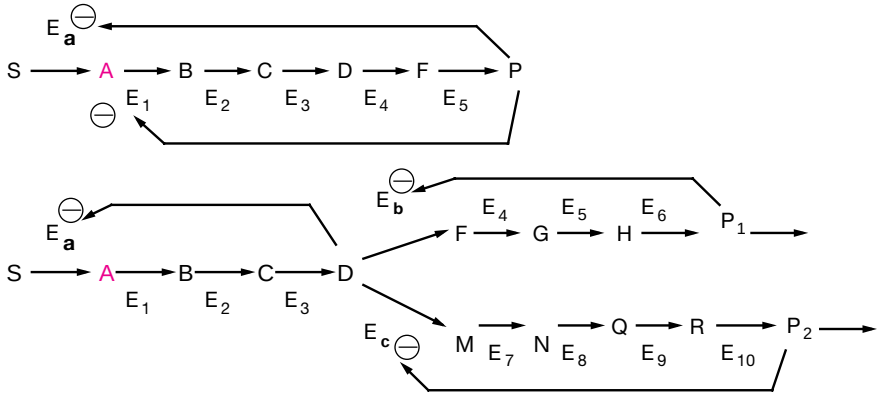


Figure 3 : Rôle de l'allostérie, rétrocontrôle de produits sur des réactions dans une chaîne de biosynthèse

Les enzymes allostériques fonctionnent comme des interrupteurs

Elles sont très sensibles à la concentration en substrat. Elles fonctionnent presque comme des interrupteurs autour de la valeur de leur point d'inflexion. De ce fait, elles sont largement utilisées par les cellules comme points de contrôle des voies métaboliques. À chaque étape essentielle d'engagement dans une voie métabolique, on trouve le plus souvent une enzyme allostérique. Par exemple, l'enzyme PFK1 (phosphofructokinase-1) contrôle l'entrée dans la glycolyse du fructose phosphate.

De plus, la possibilité de modulation de leur activité permet de contrôler finement ces voies métaboliques, particulièrement en permettant des rétrocontrôles. Ainsi, la PFK1 voit son activité diminuée en présence d'un excès d'ATP qui est précisément l'un des produits essentiels de la glycolyse. Il y a ainsi, grâce à de telles enzymes, un ajustement de l'activité de la cellule en fonction de l'abondance des ressources (glucose) et des besoins en produits (ATP).

Fiche 102

fiche 25

Les techniques d'étude des protéines

Voici un aperçu de quelques techniques majeures pour l'étude des protéines *in vivo* ou *in vitro*.

1. Identification et structure primaire

Lorsqu'une protéine d'intérêt est nouvellement mise en évidence, il faut l'identifier, c'est-à-dire connaître sa séquence en acides aminés. Si cette protéine peut être isolée sur gel d'électrophorèse, la bande est découpée sur le gel et analysée en **spectrométrie de masse**. Sa masse totale et la masse de peptides issus de sa digestion par la trypsine peuvent permettre son identification approximative dans des bases de données. À partir d'un fragment de séquence protéique, le gène entier correspondant peut être isolé, cloné et séquencé. La séquence complète en acides aminés est ensuite déduite de la séquence du gène.

Fiches 26, 38 et 41

À partir de la structure primaire, des comparaisons de séquences peuvent être établies par bioinformatique pour rechercher une fonction, une structure, une localisation cellulaire, des sites putatifs de modifications post-traductionnelles, des motifs d'interactions, etc. Ces données *in silico* doivent ensuite être validées expérimentalement. Si des versions normales et pathologiques des protéines sont connues, d'éventuelles mutations seront repérées.

Fiche 52

La construction de vecteurs d'expression, l'obtention de protéines recombinantes puis d'anticorps spécifiques sont des étapes presque indispensables pour la suite.

Fiches 65 et 198

2. Localisation et dynamique

La présence d'une protéine à l'échelle tissulaire ou cellulaire peut être recherchée grâce à des anticorps spécifiques par microscopie sur des coupes, ou par immuno-empreinte sur des extraits, éventuellement après fractionnement subcellulaire. Le système de détection (enzyme, fluorochrome, billes d'or) est adapté à la méthode choisie.

Fiche 6

Une alternative consiste à coupler directement la protéine d'intérêt à un fluorochrome comme la GFP (***Green Fluorescent Protein***). Cela peut être fait en utilisant un vecteur d'expression permettant la synthèse d'une protéine de fusion qui est introduite dans les cellules étudiées. Il est alors possible de suivre de façon dynamique la localisation de la protéine. Cette méthode est adaptée aussi bien à l'échelle subcellulaire qu'à celle d'un organisme entier.

Fiche 83

3. Partenaires fonctionnels

Lorsque les partenaires potentiels d'une protéine sont recherchés *a priori*, il est possible d'immobiliser la protéine d'intérêt et de l'exposer à un extrait susceptible de contenir des partenaires. Si les interactions sont suffisamment fortes et stables, les partenaires sont retenus et devront alors être identifiés. Lorsque la protéine est fixée à une résine, il s'agit de chromatographie d'affinité. La protéine d'intérêt est parfois fusionnée avec un peptide qui permet son accrochage à la résine. Lorsque des anticorps couplés à des billes sont utilisés pour immobiliser la protéine d'intérêt, il s'agit d'immunoprécipitation.

D'autres méthodes permettent de combiner la mise en évidence de l'interaction et l'isolement du gène du partenaire. Elles confrontent un « appât » à une banque de « proies » potentielles. La méthode d'exposition des phages (***phage display***) est appliquée chez *E. coli* alors que la **méthode du double hybride** est réalisée chez la levure.

Fiche 126

Toutes ces techniques nécessitent des contrôles rigoureux pour éviter les « faux positifs » et leurs résultats doivent être confirmés par la démonstration de l'interaction directe entre les partenaires purifiés. Pour cela existent de multiples méthodes. Les biocapteurs comme le BIAcore® utilisent la résonance des plasmons de surface (SPR) pour suivre quantitativement et en temps réel l'interaction entre molécules non marquées. Le détecteur mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface, qui résulte de l'interaction entre une des molécules fixées et les autres circulant sous l'interface.

4. Structure tridimensionnelle

La détermination du repliement d'une protéine et de sa structure 3D n'est possible qu'à partir d'une protéine purifiée.

La diffraction des rayons X par un cristal protéique, appelée **cristallographie aux rayons X**, permet d'obtenir une carte de densité électronique tridimensionnelle. Cette carte est confrontée à la séquence primaire pour déduire la localisation des atomes et donc la structure de la protéine avec une résolution atomique (jusqu'à 0,1 nm). La production des rayons X pour la recherche en biologie se fait dans des accélérateurs de particules de type Synchrotron. Cette technique convient aux protéines solubles qui sont aptes à la formation de cristaux.

Pour les petites biomolécules (< 25 kDa), la spectroscopie par **résonance magnétique nucléaire** (RMN) permet de déterminer non seulement la structure mais aussi la dynamique conformationnelle de la molécule. Placés dans un champ magnétique intense (plus de 250 000 fois le champ magnétique terrestre), les noyaux de certains atomes résonnent en fonction de leur environnement, donc notamment de leurs voisins. Les atomes observables sont ceux qui ont un moment magnétique (spin) non nul : ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N et ^{31}P sont utilisés le plus fréquemment. Une carte de distance entre les noyaux peut donc être établie. Elle doit être ensuite combinée à des modèles bioinformatiques pour déterminer une structure tridimensionnelle.

Alors que la cristallographie aux rayons X donne des informations sur des solides cristallins, la RMN est utilisée en conditions liquides. Pour les très gros complexes ou les protéines membranaires, la **cryomicroscopie électronique** est utilisée.

Fiche 126

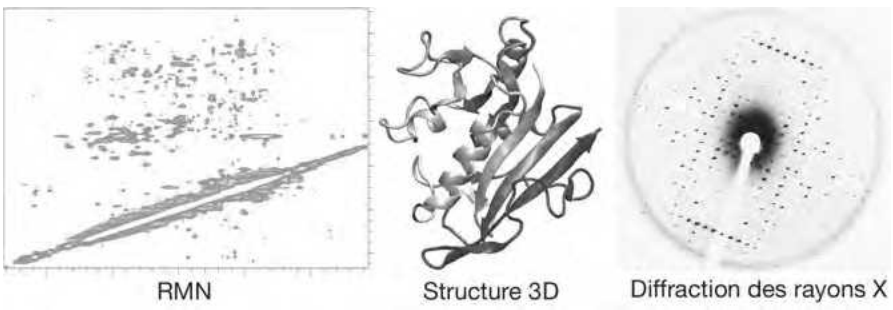


Figure 1 : Détermination expérimentale de la structure de la dihydrofolate réductase (DHFR, Pdb 1 OHJ)

Avec l'aimable autorisation d'A. Bondon, UMR CNRS 6290 Rennes.

fiche 26

L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation des molécules sous l'effet d'un courant électrique dans un support solide et poreux, le plus fréquemment un gel. Inventée par A. Tiselius pour les protéines dans des gels d'amidon (en 1933, prix Nobel 1948) cette technique est utilisée en routine pour l'analyse des protéines et des acides nucléiques.

1. L'électrophorèse d'acides nucléiques

Fiche 38

L'ADN et l'ARN portent une charge négative par nucléotide et sont donc d'autant plus chargés qu'ils sont longs. Ils sont le plus souvent séparés sur des gels de 0,5 à 2 % d'agarose. Des gels de polyacrylamide peuvent aussi être utilisés pour des fragments très petits (< 500 bases) et pour le séquençage.

Pour des molécules très longues (> 20 kb, soit une longueur supérieure à la porosité du gel), le courant électrique n'est plus continu mais à champ pulsé, c'est-à-dire que son orientation est alternée au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel, augmentant ainsi la probabilité qu'elle se déplace à travers les mailles du gel.

Pour être visualisés après séparation, les acides nucléiques doivent être marqués ou colorés. On utilise des nucléotides radioactifs ou plus fréquemment des agents intercalants comme le bromure d'éthidium (BEt).

2. L'électrophorèse de protéines

SDS-PAGE

Fiche 18

L'électrophorèse de routine pour les protéines est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, ou SDS-PAGE, mise au point à la fin des années 1960. Les protéines ont une charge nette dépendant de leur structure primaire mais le SDS est un détergent anionique qui déplie des protéines et leur transfère une charge proportionnelle à leur taille.

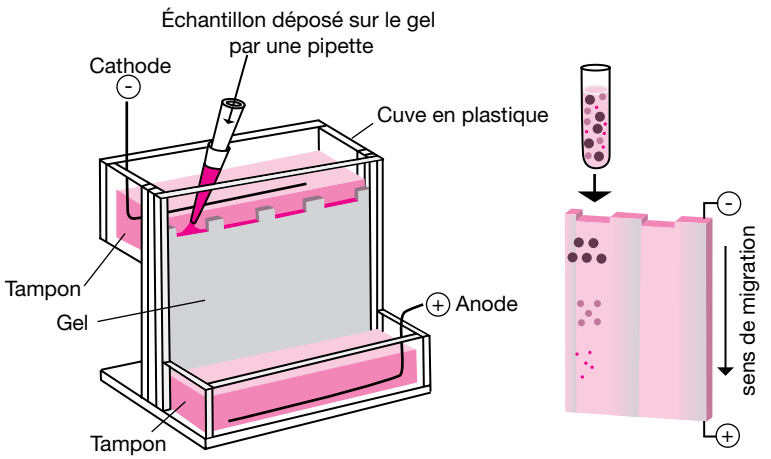


Figure 1 : Montage expérimental pour le SDS-PAGE

Les protéines dénaturées par le SDS migrent donc en fonction de leur taille dans le champ électrique. L'analyse par SDS-PAGE d'un échantillon permet de déterminer le nombre et la masse des polypeptides présents.

L'électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse unidirectionnelle ne peut discriminer qu'un nombre réduit de signaux en regard du nombre très élevé de protéines différentes dans une cellule. Pour l'analyse à haut débit du protéome, deux séparations successives sont réalisées : dans la première étape, les protéines sont séparées en fonction de leur charge par focalisation isoélectrique (IEF). La charge des protéines dépendant du pH, le point isoélectrique (pI) correspond au pH pour lequel la charge globale est nulle. Les protéines sont dénaturées dans l'urée qui ne modifie pas leur charge intrinsèque. Dans un tube de gel de polyacrylamide contenant un gradient de pH, les protéines migrent jusqu'à leur pI. Le tube de gel est alors équilibré dans un bain de SDS et déposé au sommet d'un gel de SDS-PAGE pour une seconde séparation selon la taille.

Fiche 54

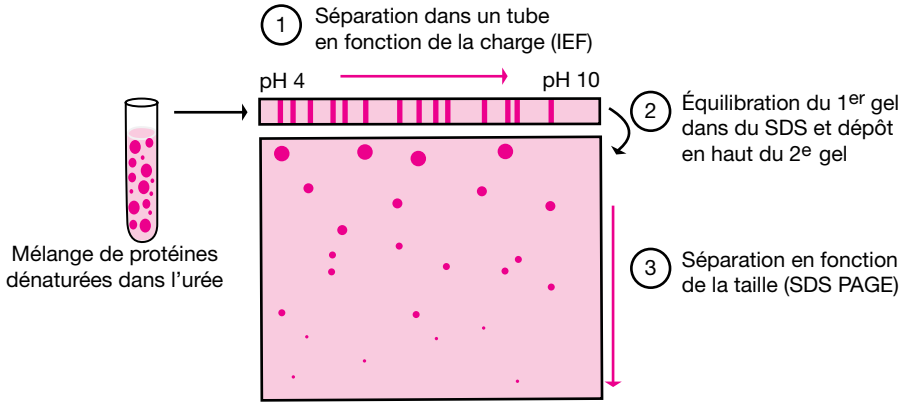


Figure 2 : Électrophorèse bidimensionnelle

La révélation des protéines après l'électrophorèse

Après l'électrophorèse, les protéines ne sont pas visibles. La coloration la plus courante et la plus rapide est celle du bleu de Coomassie mais la coloration au nitrate d'argent est cent fois plus sensible (moins de 1 ng est détectable).

Plutôt que de colorer toutes les protéines, des anticorps peuvent être utilisés pour rechercher des protéines particulières par immuno-empreinte (ou immunoblot ou western blot). Dans ce cas, les protéines, après le SDS-PAGE, sont transférées sur une membrane grâce à un champ électrique. La membrane est hybridée avec l'anticorps spécifique qui est révélé le plus souvent par couplage à une enzyme dont l'activité génère un produit coloré ou un dégagement de lumière.

Fiche 198

FOCUS Les prions

Le concept de protéine infectieuse impliqué dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) humaines et animales a été avancé en 1982 par S. Prusiner (prix Nobel 1997). Le prion *(Proteinaceous Infectious Particles)* est un agent pathogène non conventionnel. Contrairement aux agents infectieux tels que les bactéries, les virus, les champignons et les viroïdes, il est dépourvu d'acides nucléiques et aucune réponse immunitaire n'est déclenchée lors de l'infection.

Le prion est une protéine infectieuse dérivant d'une protéine cellulaire endogène dont elle a gardé la structure primaire, mais qui diffère de la protéine normale par ses structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Ces propriétés structurales confèrent à la forme prion la capacité de convertir la protéine sauvage en protéine prion par un processus auto-catalytique. Cet événement peut avoir lieu spontanément (cas sporadique) ou peut être dû à l'absorption d'un prion (contamination).

Même si la nature amyloïde du prion n'a toujours pas été clairement démontrée *in vivo*, il est de plus en plus évident que la formation de fibres amyloïdes et le caractère infectieux sont intimement liés. L'amyloïde est un terme général qui décrit des agrégats protéiques organisés avec des particularités physico-chimiques communes telles qu'une morphologie fibrillaire avec une prédominance de feuillets β et une biréfringence à la lumière polarisée après coloration au rouge Congo. Le prion n'apporte aucune modification génétique, le gène impliqué doit continuer à exprimer une protéine dont la structure primaire est normale. La forme prion se propage donc par conversion de la forme sauvage en provoquant une polymérisation de type amyloïde. De ce fait, la délétion du gène codant pour la protéine cellulaire empêche toute infection par le prion.

Chez les Mammifères, le prion est à l'origine de plusieurs maladies neurodégénératives. Le cerveau prenant un aspect spongieux, ces pathologies ont été appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Chez l'Homme, différents types d'EST sont connus. Le Kuru (« tremblant de peur » en dialecte Fore) a été observé dans la tribu des Fore en Papouasie-Nouvelle-Guinée (1957) où la consommation du corps des défunts faisait partie des rites funéraires. Ces rites de cannibalisme ont été montrés comme la cause de la transmission de la pathologie. Son étude a conduit à l'obtention du prix Nobel à D. Gajdusek en 1976. Toutes ces maladies provoquent une démence et une perte de coordination motrice. Elles sont transmissibles mais non contagieuses. Les EST ont également été observées chez d'autres mammifères : bovin, félin, caprins… Les plus connues sont la scrapie, ou tremblante du mouton, et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), ou « maladie de la vache folle ». Ces deux maladies provoquent une perte de la coordination motrice chez les animaux atteints. L'hypothèse d'une transmission inter-espèce de l'ESB a été émise pour expliquer l'apparition d'une nouvelle forme d'EST en Grande-Bretagne et en France à la fin des années quatre-vingt-dix.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

2.1 Les membranes biologiques :
- ☐ a. rendent hermétiques les compartiments cellulaires
- ☐ b. laissent passer l'eau
- ☐ c. sont totalement lipidiques

2.2 Un couplage osmo-chimique :
- ☐ a. utilise une énergie chimique pour réaliser un transfert
- ☐ b. utilise la dissipation d'un gradient pour faire une réaction
- ☐ c. n'existe pas

2.3 Les enzymes :
- ☐ a. sont indispensables au déroulement de la réaction
- ☐ b. sont des protéines
- ☐ c. accélèrent les réactions chimiques

2.4 Les macromolécules :
- ☐ a. résultent d'une agglomération d'atomes de carbone
- ☐ b. sont polymérisées par copie de l'information génétique
- ☐ c. sont insolubles

2.5 L'équation de Michaelis-Menten :
- ☐ a. implique une concentration de substrat élevée par rapport à l'enzyme
- ☐ b. s'applique à toutes les enzymes
- ☐ c. permet de mesurer la vitesse initiale

2.6 Un ose cyclisé :
- ☐ a. est moins réducteur que la forme linéaire
- ☐ b. a plus de six carbones
- ☐ c. est instable

2.7 Les lipides :
- ☐ a. sont potentiellement très énergétiques
- ☐ b. ne sont pas solubles dans l'eau
- ☐ c. sont des macromolécules

2.8 La vitesse d'une réaction :
- ☐ a. dépend du ΔG de cette réaction
- ☐ b. est augmentée par les enzymes
- ☐ c. ne dépend que de la concentration en substrat.

2.9 La variation d'enthalpie libre d'un processus :
- ☐ a. renseigne sur la spontanéité d'un processus
- ☐ b. dépend de l'enzyme utilisée
- ☐ c. est toujours positive

2.10 Les transferts transmembranaires :
- ☐ a. ne dépendent pas que du gradient de concentration
- ☐ b. se font à vitesse constante
- ☐ c. sont impossibles pour les molécules chargées

Réponses

2.1 **b**. Les membranes sont formées, à la base, d'une bicouche lipidique, mais on y trouve de nombreuses protéines ainsi que quelques glucides. Elles forment une barrière sélective : elles bloquent certains passages et en autorisent d'autres.

2.2 **b**. Les couplages osmochimiques se rencontrent dans les membranes bactériennes, mitochondriales ou thylakoïdiennes. L'exemple le plus célèbre est l'ATP synthase qui exploite un gradient de protons pour synthétiser l'ATP.

2.3 **b**. Certains ARNs sont capables de réaliser des catalyses. La catalyse permet de diminuer la barrière d'activation, mais ne change pas la variation d'enthalpie libre.

2.4 **Aucune réponse exacte**. Les macromolécules sont formées par polymérisation de petites unités répétitives. La plupart sont solubles dans l'eau, du moins les plus petites. Les macromolécules séquencées exigent, pour leur formation, des mécanismes mettant en jeu l'information génétique, mais les polymères monotones sont produits sans intervention de l'expression génétique.

2.5 **c**. Certaines enzymes sont allostériques. La résolution de l'équation est simplifiée en considérant que $[S]_{totale} = [S]_{libre}$ (donc [ES] négligeable car [E] est très inférieur à [S]). Il faut déterminer les vitesses initiales en fonction de [S] pour en déduire la V_{max} et le K_m.

2.6 **a**. Les oses cyclisés ont plus de cinq carbones. Les principaux ont 5 ou 6 carbones. Ce sont des molécules qui masquent leur groupement aldéhyde ou cétone, ce qui les rend moins réducteurs que la forme linéaire. Cette particularité augmente leur stabilité.

2.7 **a** et **b**. Du fait de leur caractère non-polaire, les acides gras sont parfaitement insolubles dans l'eau. Par conséquent les lipides sont également insolubles dans l'eau. Ces acides gras sont formés d'atomes de carbone très réduits. À ce titre, leur oxydation jusqu'à la formation de CO_2 libère une appréciable quantité d'énergie. Les lipides ont tous une masse molaire inférieure à 1 000 $g \cdot mol^{-1}$, ce qui en fait de petites molécules.

2.8 **b**. La vitesse d'une réaction dépend certes de la concentration en substrat, mais aussi de la concentration en produit, de la température, de la présence ou non d'un catalyseur. Mais elle ne dépend pas du $\Delta_r G$ qui a à voir avec la spontanéité de la réaction, ce qui n'est pas sa vitesse. Les enzymes accélèrent les réactions.

2.9 **a**. La variation d'enthalpie libre d'un processus peut être négative ou positive, étant entendu cependant que les processus à ΔG positifs sont impossibles. Un ΔG négatif marque la spontanéité du processus. Sa valeur dépend des concentrations des réactants mais absolument pas de l'enzyme. L'enzyme est affaire de vitesse, le ΔG est affaire d'énergie.

2.10 **a**. Lorsqu'un soluté est chargé, le transfert dépend du $\Delta_{tr} G$ dans l'expression duquel intervient certes le gradient de concentration, mais aussi le gradient électrique. La vitesse d'un transfert dépend du degré d'hydrophilie du soluté ou bien de l'intervention d'un transporteur protéique. Des molécules chargées peuvent traverser une membrane, mais en empruntant un transporteur spécifique.

Chapitre 3

Structuration de l'ADN

Objectifs

L'ADN qui s'organise d'abord en forme de double hélice, s'associe à des complexes protéiques pour former des chromosomes comportant chacun une seule molécule d'ADN. L'enchaînement des nucléotides définit une séquence et le génome représente l'ensemble de ce matériel génétique propre à chaque espèce. Son organisation entre séquence codante et séquence non codante est complexe.

Cette molécule est capable de se dupliquer. Au cours de cette duplication des erreurs peuvent survenir mais des systèmes de surveillance et de réparation existent pour limiter l'impact de ses modifications.

Depuis la découverte de l'ADN, de nombreuses technologies ont été développées pour manipuler cet ADN, soit dans un but exhaustif (séquençage...), soit pour étudier un endroit précis du chromosome (PCR...)

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 27

La structure de l'ADN

La molécule d'ADN est un polynucléotide résultant de la liaison de dATP, dCTP, dGTP et dTTP.

1. Une structure en double hélice

La découverte de cette forme en double hélice en 1953 par F. Crick et J. Watson est une avancée considérable en biologie. Cette structure consiste en l'enroulement de deux brins. Chaque brin possède une orientation de l'extrémité 5'phosphate vers l'extrémité 3'OH. Les deux brins s'assemblent en créant des liaisons hydrogène impliquant soit la paire adénine-thymine (deux liaisons hydrogène) ou guanine-cytosine (trois liaisons hydrogène). Ces appariements se font entre groupe donneur de liaison hydrogène (typiquement un groupement amine) et un accepteur de liaison hydrogène (typiquement l'azote ou l'oxygène) comme le montre la figure 1. Seul l'appariement d'une purine (A ou G) avec une pyrimidine (C ou T) permet de maintenir une distance constante entre les deux brins (deux purines formeraient une paire trop grande pour rentrer dans l'hélice et deux pyrimidines une paire trop petite). Cet appariement implique que les deux brins soient orientés de manière antiparallèle. Outre les liaisons hydrogène entre les bases, l'empilement des bases les unes sur les autres permet une stabilisation par interaction hydrophobe (il n'y a pas de molécule d'eau dans le cœur de l'ADN). La formation de la double hélice engendre la formation d'un grand et d'un petit sillon (figure 1).

Focus 94

Fiche 15

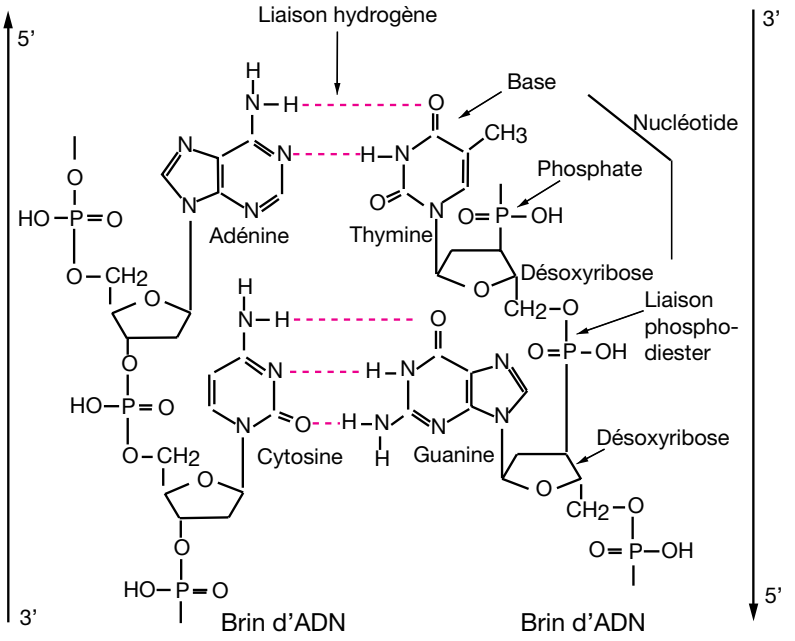


Figure 1 : Structure de la molécule d'ADN

Organisation en hélice bicaténaire et formation du petit et du grand sillon.

L'appariement des deux brins implique donc que la connaissance de l'enchaînement des bases sur un brin est suffisante pour connaître la séquence complète de la double hélice. Au sein de la cellule, une molécule d'ADN pourra être circulaire (c'est le cas des plasmides) ou linéaire (cas des chromosomes eucaryotiques). Localement, la double hélice pourra s'ouvrir (pour la réplication ou la transcription), mais cette ouverture est toujours transitoire.

2. Une molécule polymorphe

La situation la plus commune correspondant à la forme initialement décrite est la forme B. Elle a des caractéristiques qui sont indiquées dans la figure 2. La flexibilité de chaque base au sein de la double hélice permet à celle-ci de s'adapter à des contraintes de torsion et d'hydratation. Cette adaptation conduit l'ADN à adopter deux autres structures qui sont la forme A et Z (figure 2).

La forme A (trouvée dans des conditions de déshydratation et potentiellement dans des hybrides ADN/ARN) est une double hélice droite dans laquelle les paires de base sont plus inclinées que ce qui est trouvé pour la forme B. Il s'ensuit une déformation du grand sillon qui devient plus profond, le petit sillon ne formant qu'une légère dépression sur l'extérieur de la double hélice.

La forme Z (dont l'existence pourrait faciliter la transcription et la recombinaison) est radicalement différente. Sa structure est une hélice gauche et elle ne présente pratiquement qu'un seul sillon. Son apparition aux dépens de la forme B est favorisée dans des séquences alternant purines et pyrimidines comme la séquence (CG).

Ces variations structurales permettent à une même séquence d'être reconnue ou non par des facteurs protéiques ou nucléiques selon la structure adoptée et peuvent donc être importantes pour la régulation de l'expression génique.

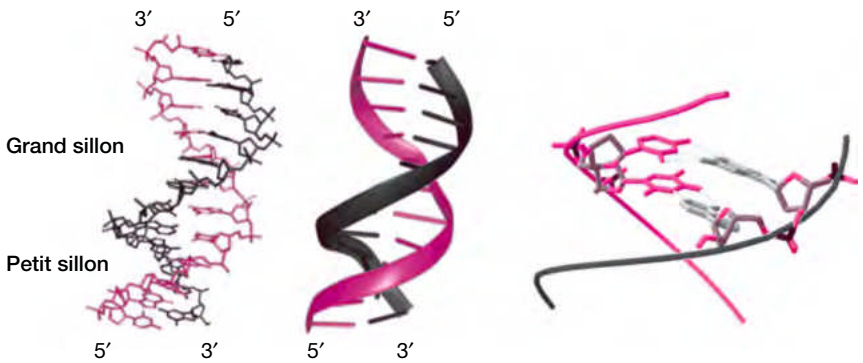


Figure 2 : ADN A, B et Z

fiche 28

L'organisation des génomes

Les génomes peuvent être caractérisés par leurs séquences et leurs propriétés « structurales » qui seront abordées plus loin.

Fiches 25 et 62

La taille des génomes dépend de l'organisme considéré (allant de quelques kilo-bases chez les phages et virus, jusqu'à des centaines de giga-bases chez certaines plantes). L'intérêt de la connaissance de ces génomes provient de leur capacité supposée à contenir toute l'information permettant de définir un individu et permettant donc de le modifier à des fins de santé publique ou d'intérêt économique. Chez les eucaryotes, outre le génome nucléaire, il existe un génome mitochondrial et chloroplastique.

Fiche 115

1. Le génome humain

En 2003, la séquence complète du génome humain a été obtenue. Cette séquence comprend 3,2 milliards de nucléotides qui contiennent moins de 30 000 gènes (dont moins de la moitié correspond à des fonctions connues) montrant ainsi que ni la taille du génome ni le nombre de gènes n'est corrélé avec le statut évolutif. Les gènes « occupent » seulement 2 % de la séquence nucléotidique et la moitié d'entre eux ont un équivalent chez la drosophile ou le vers *C. elegans*. La taille moyenne d'un gène est de 3 000 nucléotides avec d'énormes variations (le gène le plus long qui est celui de la dystrophine représente 2,4 millions de paires de bases, soit la moitié du génome de la bactérie *E. coli*). Les gènes ne sont pas répartis au hasard sur les chromosomes mais sont regroupés dans des zones particulières. Ces zones sont séparées les unes des autres par de longues séquences d'ADN non-codant plus riches en résidus A et T. À la frontière entre ces ilots d'ADN « informatif » et d'ADN longtemps et à tort décrits comme « poubelle », on trouve des répétitions de bases CG qui peuvent atteindre plusieurs dizaines de milliers de nucléotides. La répartition des gènes par chromosome suit grossièrement la taille des chromosomes (le chromosome 1, le plus long, possédant le plus de gènes (3 168) ; le chromosome le plus court (Y) en contenant 344).

La vaste majorité du génome (98 %) ne contient donc pas de séquences codantes. Près de la moitié du génome est constitué de séquences répétées. Les séquences répétées en tandem (tableau 1) et les séquences répétées et dispersées sont, comme leur nom l'indique, des copies de l'élément répété adjacentes ou dispersées.

Le reste du génome est constitué par des séquences uniques. Ce dernier type d'ADN souvent décrit il y a quelques années comme de l'ADN poubelle a en fait une fonction encore énigmatique. Il permet en particulier la transcription d'ARN qui ne sont pas codants.

Tableau 1 : Les différents types de séquences répétées en tandem

	Longueur	Motif (pb)	Localisation
Satellites	100 kb-1 Mb	> 100	Centromères
Minisatellites	1-30 kb	10-100	Régions non codantes, Télomères
Microsatellites	< 150 pb	1-10	

Fiche 44

Variation de séquences génomiques entre individus

D'une personne à une autre, la séquence nucléotidique est identique à plus de 99,9 %. Les scientifiques ont identifié environ 3 millions de sites où une seule base varie d'un humain à un autre. Ces variations (SNP pour polymorphisme d'un nucléotide simple) sont à l'heure actuelle très utilisées dans les recherches de gènes impliqués dans des pathologies et dans l'étude des mouvements migratoires humains.

2. Les génomes des autres organismes

Il est remarquable de constater qu'il n'y a pas de relation directe entre la taille des génomes et le nombre de gènes qu'il recèle (tableau 2).

Tableau 2 : Taille de génomes et contenu en gènes

Organisme	Taille du génome (Mégabases)	Nombre de gènes estimé
Escherichia coli	0,46	4 400
Saccharomyces cerevisiae	12	6 400
Plante *(A. thaliana)*	115	25 500
Caenorhabditis elegans	97	18 000
Drosophila melanogaster	140	13 500
Mus musculus	2 700	22 000
Homo sapiens	3 300	30 000

Eucaryotes

Le premier génome eucaryotique à avoir été complètement séquencé est celui de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae.* C'est un des plus petits génomes eucaryotes (12 millions de paires de bases). Il est compact (contient près de 6 000 gènes qui représentent 72 % de la séquence totale) et ne contient que peu de gènes possédant des introns. Il possède un faible pourcentage de séquences répétées. Ceci montre donc que l'organisation du génome n'est pas absolue et dépend de l'organisme considéré.

Fiche 47

Procaryotes

Les génomes des procaryotes sont très différents de ceux des eucaryotes. Ils sont contenus dans une seule molécule d'ADN qui, dans la plupart des cas, est circulaire. Cette situation est différente chez les eucaryotes où l'on trouve plusieurs chromosomes. Certains gènes peuvent être trouvés sur des structures indépendantes du chromosome : les plasmides. La taille du génome est généralement petite (*E. coli* possède un génome de 0,46 million de paires de bases) et présente moins de gènes (4 397 pour cette bactérie). La compacité du génome est encore plus importante que ce qui est trouvé chez les eucaryotes unicellulaires comme la levure.

fiche 29

La structure du gène

Nous utiliserons ici le terme gène pour désigner une unité transcriptionelle, c'est-à-dire une séquence d'ADN qui sera reconnue par une ARN polymérase quelle qu'elle soit. L'ARN produit à partir de ce gène pourra être, soit un ARN messager permettant après traduction de donner naissance à une protéine, soit un ARN non-codant. Nous allons comparer la structure « type » d'un gène chez le procaryote et chez l'eucaryote.

Fiche 44

1. La structure du gène procaryotique

La compacité du génome se retrouve dans la structure du gène. On distingue néanmoins les mêmes éléments structuraux dans tout le règne vivant (promoteur, séquence transcrite, terminateur). Une caractéristique de ces gènes est le regroupement sous forme d'opérons. Différentes protéines participant à un même mécanisme (par exemple la biosynthèse d'un acide aminé) seront traduites à partir du même ARN messager, permettant ainsi leur expression de manière simultanée et coordonnée. Cette coordination sera réalisée au moment de la traduction de l'ARN messager par les ribosomes. Le promoteur, qui permet le recrutement de l'ARN polymérase, se caractérise par la présence de séquences consensus (retrouvés quasi systématiquement dans tous les promoteurs). Ces séquences sont la « boîte Pribnow » (séquence TATAAT) située 10 nucléotides avant le site d'initiation de la transcription, et une boîte « TTGACAT » située en -35. Le site d'initiation de la transcription est souvent une purine (A ou G). Le terminateur est constitué de trois éléments : deux séquences complémentaires et une séquence de décrochage. Ces éléments sont représentés dans la figure 1.

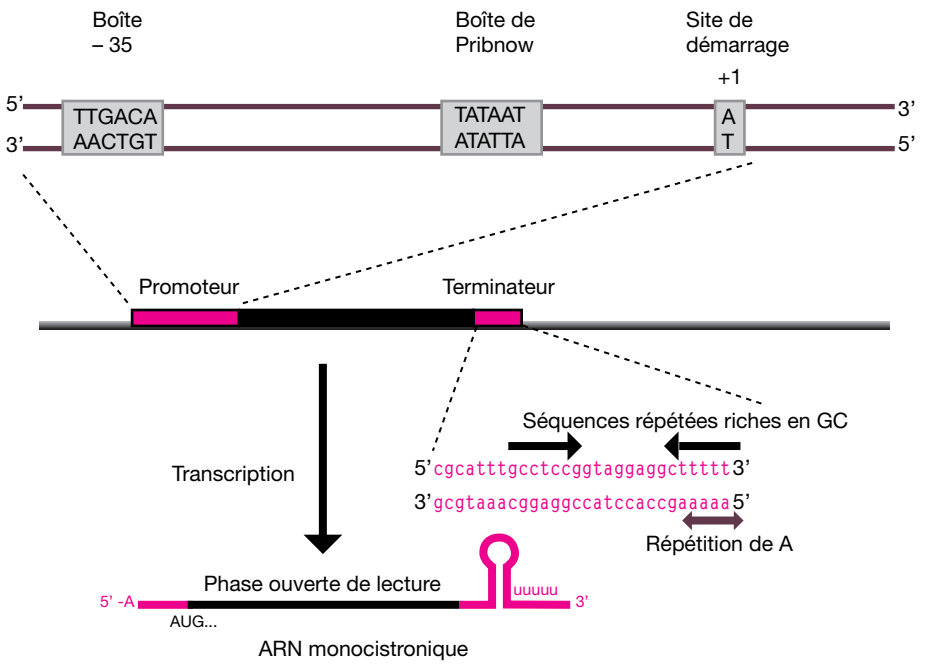


Figure 1 : Structure d'un gène procaryotique

Il existe d'autres niveaux d'organisation fonctionnelle comme les régulons (ensemble d'opérons impliqués dans les mêmes fonctions). Un exemple est donné dans la figure 2. Dans ce cas, une même protéine régulatrice (R dans le schéma) va contrôler la transcription de plusieurs gènes, en se fixant sur les régions opératrices (O) bloquant ainsi simultanément la transcription de A, B, C, D, E et F.

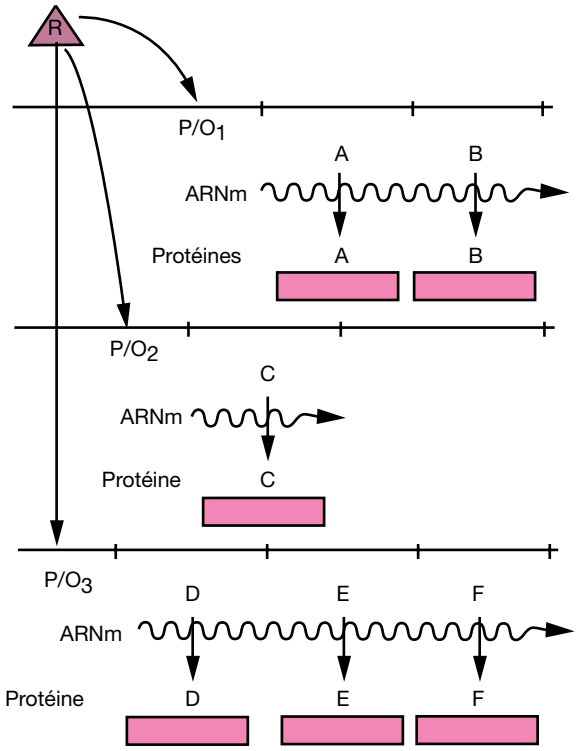


Figure 2 : Exemple d'un régulon

2. La structure du gène eucaryotique

Il existe des différences importantes dans la structure typique d'un gène eucaryotique. Pour autant, celui-ci comprendra trois éléments permettant l'initiation (le promoteur), l'élongation (la séquence transcrite) et la terminaison. Le promoteur est plus étendu que chez les procaryotes et comprend plusieurs centaines de nucléotides. Il peut inclure des séquences de régulation distants de plusieurs milliers de nucléotides du site d'initiation de la transcription ! Sa séquence typique est plus difficile à déterminer que celle des promoteurs procaryotiques. On retrouve dans 20 % des cas une séquence TATA (boîte TATA) aux alentours de la position -40. Outre ces zones de régulation et d'initiation de la transcription, les gènes de structure de protéines possèdent une phase de lecture morcelée. La séquence contient des séquences introniques qui seront retirées (épissées) de l'ARN messager mature.

Fiche 46

Fiche 47

Le gène ne se termine pas par un terminateur, c'est-à-dire une séquence qui provoque le décrochage de l'ARN polymérase. On retrouve en aval du codon stop une séquence de clivage/polyadénylation. Cette séquence une fois transcrite sera l'objet d'une maturation aboutissant à une coupure et en l'ajout d'une queue poly-adénosine. Cette maturation provoque le décrochage de l'ARN polymérase de l'ADN et la séquence correspondante limite donc le gène sur son versant 3'.

Fiche 48

fiche 30

De l'ADN au chromosome

Si le génome peut être compris comme un enchaînement de nucléotides, celui-ci va s'organiser. Cette organisation repose sur des entités physiques distinctes : les chromosomes. Chez les eucaryotes, les chromosomes sont des entités linéaires. Il y a donc deux extrémités (les télomères) et une zone d'accrochage des chromosomes au réseau de microtubules permettant la ségrégation de ces entités lors de la mitose et de la méiose.

L'ADN formant ce chromosome n'est pas nu. Il se structure dans l'espace en s'associant à des protéines particulières : les histones. La double hélice d'ADN présentant à son pourtour des groupes phosphates chargés négativement, les histones sont chargées positivement (ce sont des protéines basiques).

1. Le nucléosome : premier niveau d'organisation

L'enroulement de l'ADN autour des histones correspond à la formation d'un nucléosome. Cet enroulement est régulier et inclut un octamère d'histones (les histones H2A, H2B, H3 et H4). L'enroulement de l'ADN implique 146 paires de bases qui permettent à la double hélice de s'enrouler sur environ 1,7 tour. L'ADN non impliqué dans la formation d'un nucléosome forme une région internucléosomale. Cette région de 60 paires de bases en moyenne n'est pas pour autant « nue » puisque d'autres protéines et en particulier l'histone H1 peuvent s'y fixer, permettant ainsi de stabiliser le nucléosome. Ce niveau d'organisation peut être vu comme la formation d'un « fil » (le nucléofilament) comportant une région internucléosomale qui relie des perles (le cœur des nucléosomes). Le nucléofilament permet de compacter l'ADN selon un facteur 7. Un nucléosome a un diamètre de 100 nm et correspond à une séquence de 146 + 60, soit 206 paires de bases qui sous forme étendue correspondent environ à 700 nm d'ADN (206 × 3,4 nm).

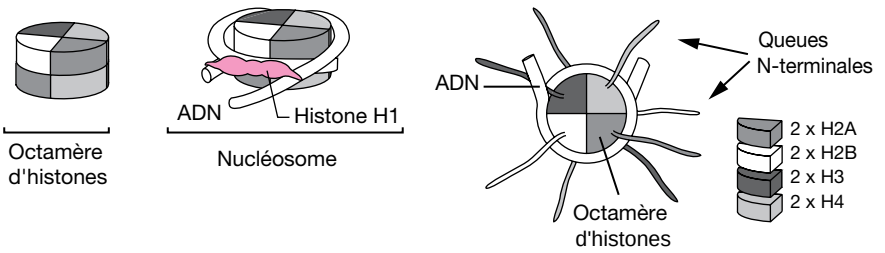


Figure 1 : Organisation de l'ADN au sein des nucléosomes

2. La formation d'un solénoïde et de boucles

Le nucléofilament n'est pas une structure étendue, mais au contraire, elle va se structurer en s'enroulant sur elle-même. Cet enroulement hélicoïdal possède une certaine régularité. Chaque « tour » comprend 6 nucléosomes et l'ensemble de ces tours aboutit à la formation d'une hélice plus épaisse d'un diamètre de 30 nm qui donne une structure en solénoïde (figure 2). Ces fibres compactées s'organisent ensuite en boucle de 300 nm

qui s'ancrent dans une matrice protéique. Cette organisation très compacte permet ainsi au noyau d'une cellule humaine qui a un diamètre de l'ordre de 6 µm de contenir les 2 mètres linéaires d'ADN qui constitue son génome !

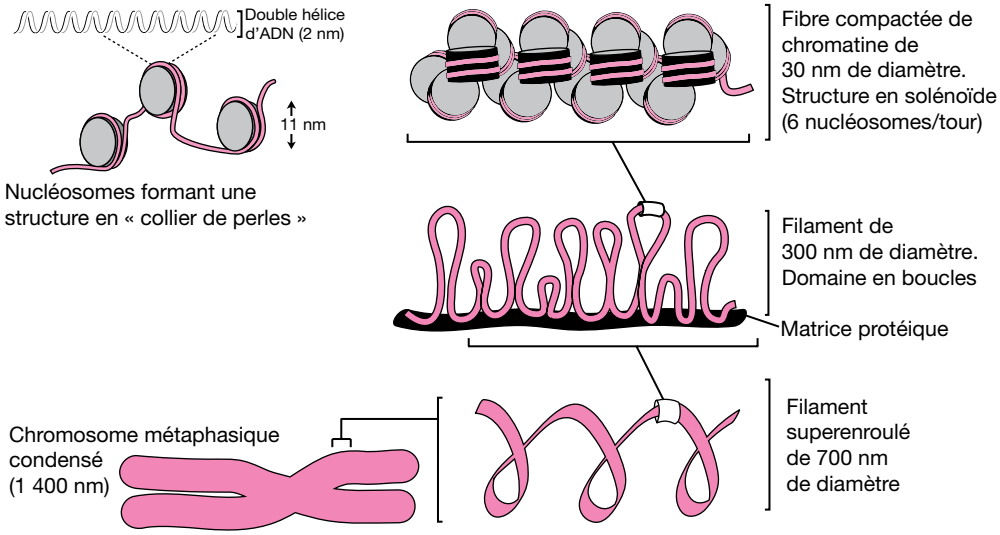


Figure 2 : Les différents niveaux d'organisation du nucléofilament

3. Une chromatine hétérogène

Des observations cytologiques anciennes ont montré que des segments de chromosome apparaissent très condensés et très colorés dans le noyau interphasique. Ces segments correspondent à l'hétérochromatine qui est une zone inactive sur le plan transcriptionel. Si une séquence d'ADN contenant des gènes se trouve placée physiquement dans une partie du chromosome qui est de l'hétérochromatine, alors les gènes ne seront pas actifs. Cette hétérochromatine a les propriétés suivantes : les histones y sont hypo-acétylées et l'ADN est méthylé sur les cytosines. À l'inverse, il existe des zones des chromosomes qui sont peu condensées. L'euchromatine qui s'y trouve se distingue par l'hyper-acétylation et l'hypométhylation des histones. Cette partie de l'ADN correspond à une chromatine peu condensée « active » qui contient les gènes transcrits. Ainsi il existe un code indépendant de la séquence de l'ADN qui va, en jouant sur la méthylation des histones, permettre la régulation de l'expression génique. Ce code est quelquefois appelé « code des histones ».

Fiche 62

fiche 31

La réplication de l'ADN

La réplication va avoir un rôle prépondérant puisque c'est le mécanisme de « copie » d'un génome et donc des chromosomes. Elle va permettre le maintien de l'information au cours des mitoses, mais tolère un certain niveau d'erreur et joue ainsi un rôle prépondérant dans l'évolution des espèces. Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, les événements sont similaires sur le plan moléculaire. La réplication est initiée en des endroits (*loci*) particuliers baptisés « origine de réplication ». Chez le procaryote *E. coli*, il y a une seule origine de réplication pour le chromosome circulaire de cet organisme. Chez les eucaryotes, il y a plusieurs origines de réplication par chromosome.

1. Initiation de la réplication

La réplication de l'ADN implique l'ouverture de la double hélice. Cette ouverture est réalisée par la protéine DnaA chez les bactéries et le complexe ORC (*Origin Replication Complex*) chez les eucaryotes. Ces initiateurs reconnaissent des séquences spécifiques et permettent d'y « charger » des hélicases dont le rôle va être de séparer les deux brins d'ADN pour faire fondre la double hélice. L'initiation est contrôlée au cours du cycle cellulaire pour être un évènement unique par cycle au moment de la phase S. Une fois réalisée, il y a formation locale d'une « bulle » et donc de deux fourches de réplication. Pour que la réplication puisse se faire, il faut une amorce d'ARN complémentaire d'un brin d'ADN. Cette amorce de 10 nucléotides est synthétisée par la primase. À l'initiation de la réplication, la situation est celle indiquée par la figure 1.

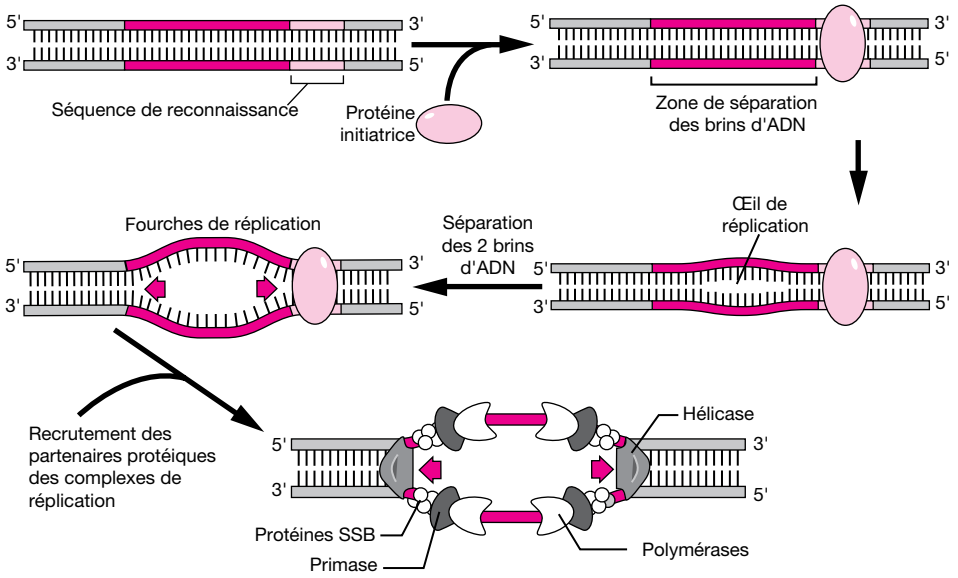


Figure 1 : Initiation de la réplication

2. La réplication est bidirectionnelle

Les deux fourches vont se déplacer en sens opposés comme deux vagues en dénaturant les deux brins au fur et à mesure. L'élongation de la chaîne synthétisée va toujours de 5'P vers 3'OH. Les deux brins étant antiparallèles, le système doit résoudre un paradoxe

puisque les deux brins néo-synthétisés « pointent » dans des directions opposées. La copie du brin « 3'→ 5' » est simple puisque la copie se fait dans le sens 5'→ 3' (il est antiparallèle par rapport au brin matrice). Ce brin est dit précoce. Il implique un seul événement d'initiation par la primase lors de l'initiation. L'autre brin, dit brin retardé est synthétisé de manière discontinue (figure 2). Les fragments synthétisés sont dits fragments d'Okasaki et ont une longueur de 1 500 nucléotides chez les procaryotes et de 200 nucléotides chez les procaryotes.

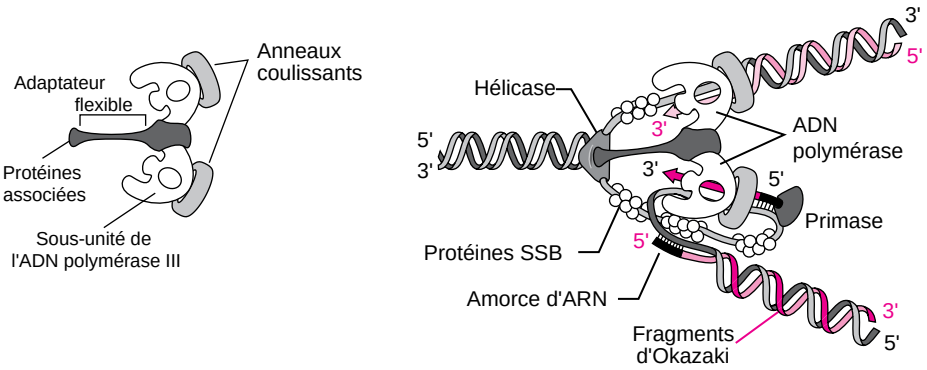


Figure 2 : La réplication est bidirectionnelle

3. La fourche de réplication : lieu d'assemblage complexe

À l'endroit de la fourche, chaque initiation d'un fragment d'Okasaki nécessite la primase. Le complexe primase associé aux hélicases est nommé le primosome. Le cœur de la machinerie d'élongation est l'ADN polymérase (POL III chez les procaryotes). L'holoenzyme est un complexe de plus de 900 kDa qui englobe un dimère de sous-unités catalytiques. Ce dimère va synthétiser les deux brins d'ADN comme le montre la figure 2. Les fragments d'Okasaki seront finalement raboutés les uns aux autres après excision de la partie ARN. Suivant les organismes, cette digestion est réalisée par une ADN polymérase possédant une activité exonucléase 3' → 5' (ADN polymérase I chez les bactéries) ou par une RNase H (figure 3). Chez les bactéries, l'ADN polymérase I qui allonge le fragment d'Okazaki par son activité de polymérase 5' → 3' retire l'amorce d'ARN du fragment d'Okazaki suivant par son activité d'exonucléase 5' → 3'.

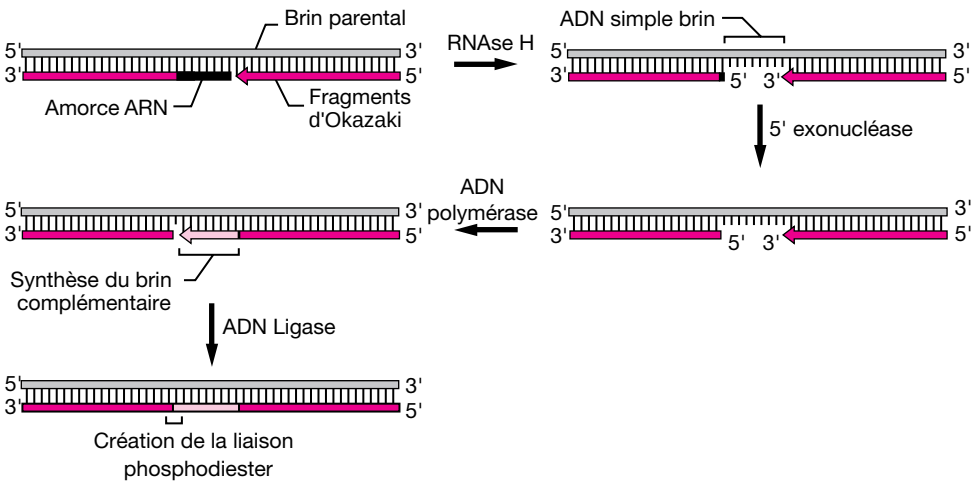


Figure 3 : Actions successives de la réplication

fiche 32

La cohésion des chromosomes

L'ADN double brin va former une chromatide. Après la réplication, chaque chromosome possède deux chromatides. À chaque mitose, ces deux chromatides se séparent au moment de l'anaphase. Cette séparation est précédée par la métaphase qui permet un alignement des chromosomes dont les chromatides sont encore liées par leur centromère.

1. Le centromère

C'est une région d'ADN qui va permettre la fixation du kinétochore et va maintenir liées entre elles les deux chromatides sœurs (figure 1). La position du centromère va définir les deux bras du chromosome : le bras p (pour petit) et q (le bras long). Selon sa position, les chromosomes seront métacentriques (les deux bras de longueur équivalente), submétacentriques (deux longueurs inégales), acrocentrique (le bras p est extrêmement petit), télocentriques (le centromère est situé à l'extrémité du chromosome), holocentrique (le chromosome s'attache aux microtubules sur toute sa longueur) comme chez le nématode *C. elegans*.

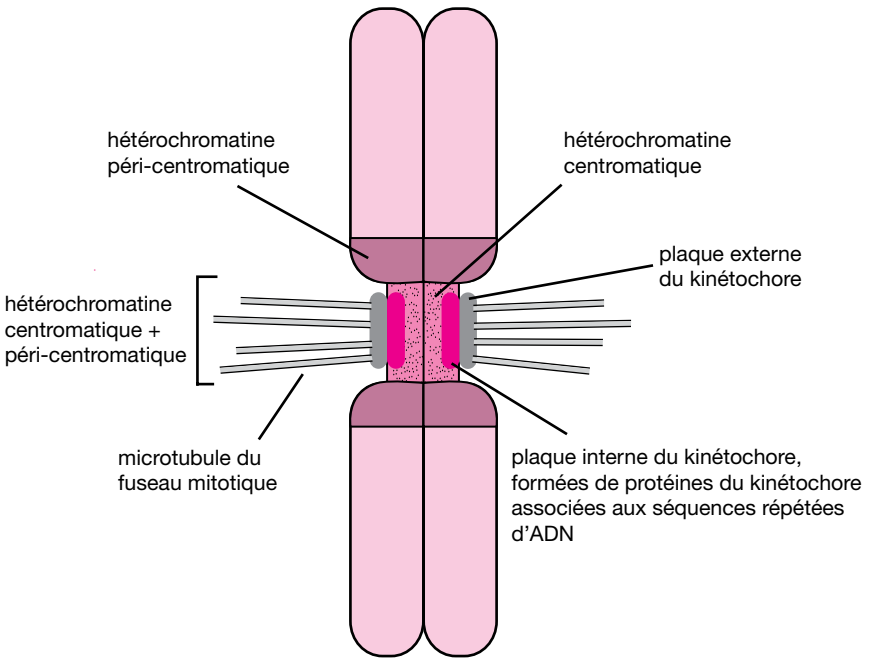


Figure 1 : Organisation schématique des régions centromériques

Les séquences répétées d'ADN sont indiquées en rouge. En microscopie électronique, le kinétochore présente une structure tri-lamellaire. Le faisceau de microtubules s'attache au kinétochore en phase M du cycle cellulaire.

Cette séquence est propre à l'espèce. Chez la levure *S. cerevisiae*, elle se résume à moins de 200 bases contenant deux motifs conservés sur lesquels se fixent les protéines du kinétochore. Chez l'homme, il n'y a pas de séquence consensus. Le centromère s'étend sur des milliers de bases contenant des séquences répétées. La structure chromatinienne est particulière et l'histone CENP-A y remplace l'histone H3. Le centromère est dans une structure d'hétérochromatine.

2. Le cycle de la cohésion

La cohésion des chromatides est variable au cours de la mitose et de la méiose. Cette cohésion est assurée par un complexe protéique : les cohésines. Leur action permet aux chromatides de résister à la force de traction exercée par les microtubules *via* les kinétochores. Le chargement des cohésines sur les chromosomes non répliqués s'effectue de la télophase à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire, suivant les organismes. Durant un cycle cellulaire normal, l'établissement de la cohésion a lieu seulement en phase S, par une réaction couplée à la réplication. La cohésion entre les deux chromatides sœurs doit être maintenue tout au long de la phase G2 et est finalement détruite en mitose pour permettre la ségrégation des chromosomes (figure 2).

Fiches 136, 154

Fiche 138

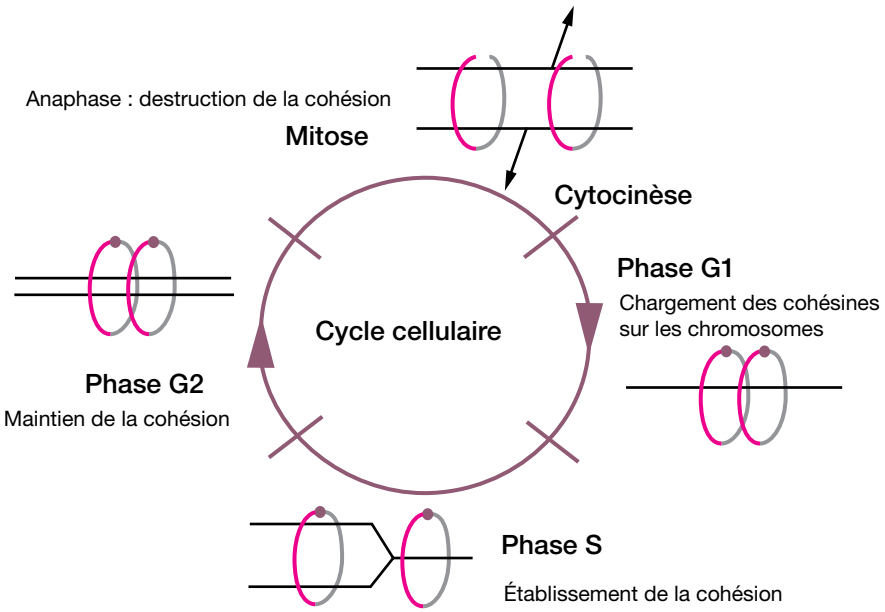


Figure 2 : Le cycle de la cohésion au cours du cycle cellulaire

Au moment de la séparation des chromatides, une enzyme particulière (la séparase) clive les cohésines et permet la ségrégation des chromosomes. La régulation de cette interaction fait intervenir d'autres partenaires comme la sécurine. Cette protéine s'associe avec la séparase afin d'éviter le clivage des cohésines. Au moment de l'anaphase, la dégradation de la sécurine va permettre l'action de la séparase et donc la séparation des chromatides.

fiche 33

Les mécanismes de mutation

Les mutations introduites dans un génome surviennent lors de la réplication ou indépendamment de celle-ci. Ces mutations sont « naturelles » ou induites par des agents chimiques, physiques ou biologiques.

1. Les mécanismes naturels

Tautomérisation

La tautomérisation est un mécanisme normal qui engendre l'existence de formes céto (fréquent) ou énol (rare) pour la thymine et la guanine. Par le même mécanisme, l'adénine et la cytosine se trouveront sous forme amino (fréquent) ou imino (rare). Comme le montre la figure 1, la tautomérisation va changer un groupement donneur de liaison hydrogène en un groupement accepteur. Lors de la réplication, il y aura donc un changement de nucléotide, puisque l'ADN polymérase associera la forme céto de la guanine et la thymine aux formes énol de la thymine et guanine respectivement. De même aux formes imino de la cytosine et de l'adénine seront associées respectivement les formes amino de l'adénine et de la cytosine.

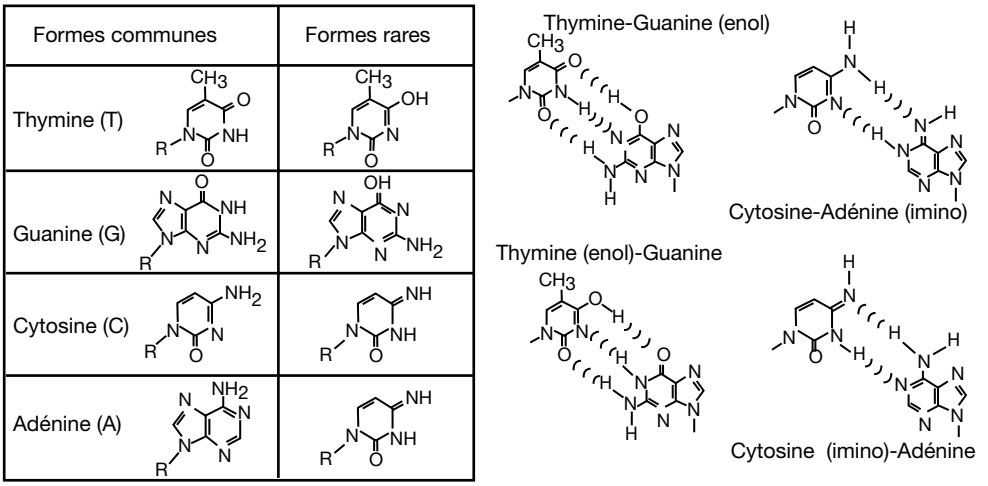


Figure 1 : Équilibre céto-énolique et amino-imino

Dépurination, désamination des cytosines

La dépurination est un processus naturel aboutissant à la rupture entre le désoxyribose et la base purinique (A ou G). Une cellule animale perd ainsi 10 000 purines par jour.

La désamination des cytosines aboutit à la formation d'uracile. S'il n'y a pas de réparation, cela provoquera donc une transition (figure 2).

Insertion, délétions

Ces « Indels » sont à la base de la variation de taille des microsatellites. Ils s'expliquent par un glissement de la chaîne copiée ou en cours de synthèse lors de la réplication. Le modèle de Streisinger est explicité dans la figure 2.

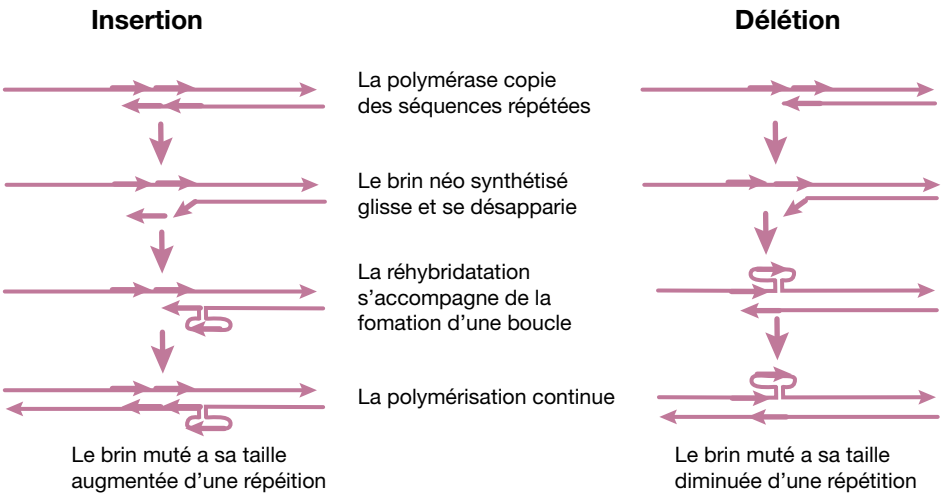


Figure 2 : Modèle de Streisinger

Ce type de mutation peut provoquer un décalage du cadre de lecture (si la répétition n'est pas un multiple de 3 !) et donc changer la fonction du gène où elle se produit.

2. Les mutations induites

Par des agents chimiques

Les agents mutagènes agissent à différents niveaux. Certains comme l'acide nitreux ou la N-nitroso-N-éthylurée vont modifier les bases (désamination de la cytosine et de l'adénine ou alkylation de la guanine respectivement). Les bases modifiées sont reconnues comme un autre nucléotide lors de la réplication et cela entraîne une mutation ponctuelle.

Par des agents physiques

L'utilisation de divers rayonnements provoque des effets mutagènes. Le rayonnement ionisant (X ou gamma) endommage l'ADN en induisant des coupures ou des modifications de bases. Il s'ensuit de grands réarrangements. L'effet du rayonnement ultraviolet est plus limité. Il provoque la formation de dimères de pyrimidines par création de liaison de type cyclobutane. Ces dimères déforment la double hélice et bloquent la fourche de réplication.

Fiche 31

Par des agents biologiques

Les mutations induites par des agents biologiques ne sont pas des mutations changeant une seule base (mutation ponctuelle). La mutation provient de l'insertion d'un fragment d'ADN (venant d'un transposon, d'un phage, d'un virus…) dans un gène. Si cette insertion se réalise dans la phase codante d'un gène, il ne pourra plus y avoir production d'une protéine normale. Ce mécanisme de « disruption » conduit alors le plus souvent à un changement radical et donc potentiellement à une mutation.

fiche 34

Surveillance et réparation de l'ADN

1. Le mécanisme co-réplicatif

Fiches 31

L'essentiel de ce mécanisme est assuré par l'ADN polymérase elle-même. La vérification de l'appariement est appelée la relecture. Cette relecture est réalisée grâce à l'existence de l'activité exonucléase 3' vers 5' qui permet à la polymérase de revenir d'un nucléotide en arrière. De cette manière, si une base est incorporée par erreur, la réplication se bloque et l'activité exonucléase peut s'exercer. L'ADN polymérase isolée à partir du procaryote *Thermus aquaticus* et qui a permis de réaliser les premières expériences de PCR ne possède pas cette activité et est souvent décrite comme peu fidèle. L'autre voie de réparation au cours de la réplication passe par un système de détection des mésappariements : le système MutS-MutL (ou système MMR)

Le système MMR

C'est le système de réparation des mésappariements (*Mismatch Mutation Repair* en anglais). La réparation du mésappariement (figure 1) va se faire sur le brin en cours de synthèse, et ceci implique donc la capacité de discriminer le brin matrice du brin néosynthétisé. Ceci est assuré par l'existence de sites palindromiques de quatre bases qui sont méthylées. Cette méthylation est post-réplicative, tant qu'elle n'est pas effectuée, il est aisé pour la cellule de reconnaître le brin ayant servi de matrice. Le dimère MutS reconnaît le mésappariement et y recrute MutL, ce qui permet l'activation de MutH (figure 1). Ce complexe va permettre la formation d'une boucle (le mésappariement n'est plus lié à MutS). MutH va alors cliver le brin d'ADN non méthylé (qui est la « copie ») au niveau du premier site de méthylation qui rentre en contact avec le complexe MutLHS. La formation de la boucle est alors stoppée. Le brin clivé est ensuite dégradé par une exonucléase et le trou correspondant réparé par l'ADN polymérase III.

Chez les eucaryotes, un système analogue existe mais n'est pas basé sur la reconnaissance de sites de méthylation permettant de distinguer le brin matrice du brin néosynthétisé.

2. Le mécanisme post-réplicatif

Les systèmes de surveillance et de réparation de l'ADN peuvent être très différents selon les cellules étudiées. Les mécanismes basés sur la recombinaison seront abordés dans la fiche suivante.

La réparation directe

Peu de lésions peuvent être réparées sans excision de bases ou de nucléotides. On trouvera dans cette catégorie la ligature de l'ADN par la ligase après la rupture de la liaison phosphodiester (pouvant être induite par une irradiation). Il existe également des enzymes comme la O6 methyl-Guanine-DNA méthyltransférase qui permettent de déalkyler les bases modifiées. Un troisième type de réparation directe est obtenu grâce à la photolyase. Cette enzyme permet la réparation des dimères de thymine chez certains organismes unicellulaires (elle n'a pas été trouvée chez l'homme).

Dans ces trois cas, l'action des enzymes citées permet à l'ADN polymérase de progresser dans la réplication qui aurait été sinon interrompue.

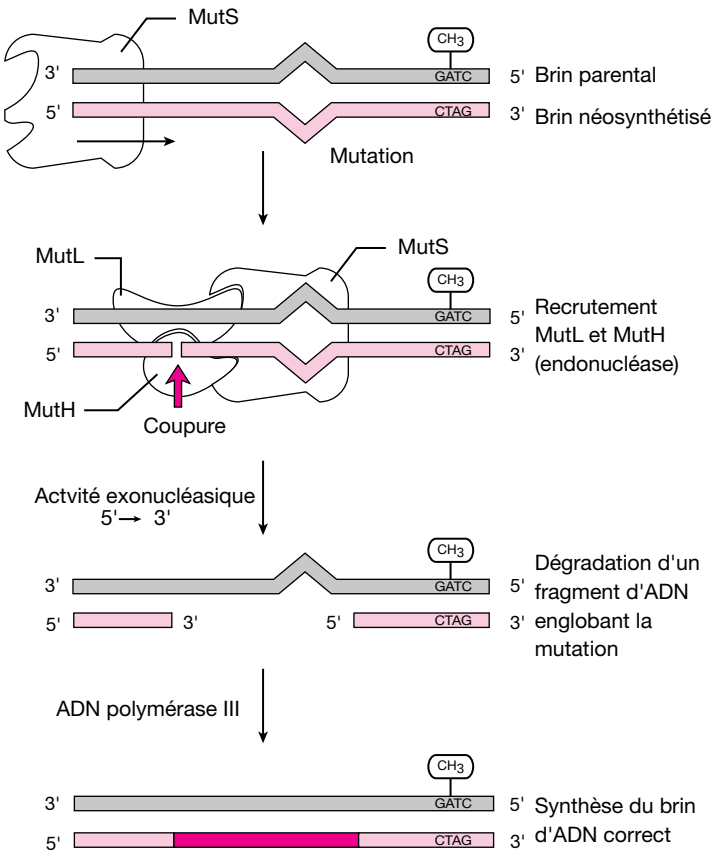


Figure 1 : Le système de réparation de mésappariement (MMR)

L'excision de bases

Dans ce cas, la base endommagée est retirée par une ADN glycosidase. Cette enzyme permet une rotation de la base qui sort du sillon et est ainsi clivée au niveau de la liaison glucosidique. Il reste alors un site abasique qui est reconnu par une AP endonucléase. La cassure simple brin résultante est ensuite réparée en copiant la base complémentaire de la base endommagée ou en recopiant une dizaine de nucléotides autour de la base endommagée. Après action de l'ADN polymérase, le brin est refermé grâce à l'ADN ligase.

L'excision de nucléotides

Dans ce cas, la déformation de l'ADN (due par exemple à un dimère de thymine) va être reconnue par un complexe qui chez *E. coli* est formé de UvrA-UvrB. La fixation de ce complexe va alors s'accompagner du relargage de UvrA et de l'arrivée d'UvrC qui de concert avec UvrB va libérer un segment de 12 nucléotides. Le « trou » sera ensuite comblé par l'ADN polymérase et la ligase. Chez les eucaryotes, un mécanisme analogue existe et implique soit une surveillance générale (réparation génomique) soit une surveillance couplée à la transcription (réparation couplée à la transcription).

fiche 35

La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est au cœur de processus importants comme les crossing-overs et la réparation des cassures d'ADN double brins. La recombinaison est un mécanisme qui fait appel à quatre brins d'ADN (deux molécules d'ADN bicaténaires).

1. Le modèle de Holliday

Ce modèle proposé par R. Holliday en 1964 repose sur l'existence de deux cassures simple brin sur deux molécules d'ADN identiques. Ces deux molécules d'ADN doivent être alignées et, dans ce cadre, il est facile d'imaginer que les deux brins identiques s'échangent en se croisant (figure 1). La fermeture des brins crée une véritable fourche : la fourche de Holliday. Cette fourche « glisse » dans un sens ou dans un autre sur des centaines de nucléotides. Ce déplacement aboutit à la formation de deux molécules hybrides d'ADN (les hétéroduplex).

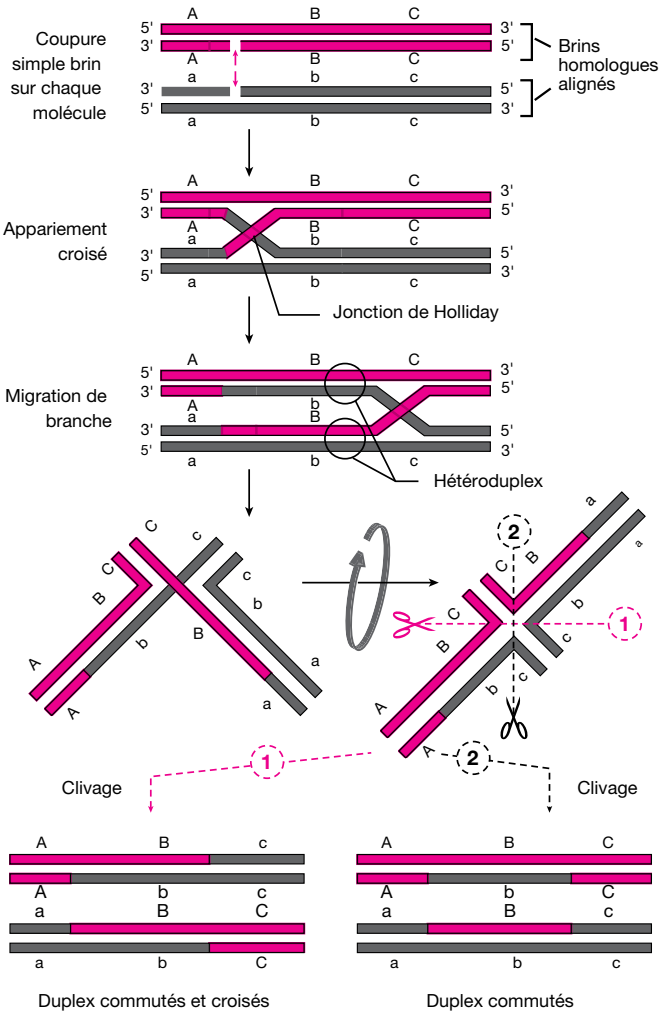


Figure 1 : Le modèle de Holliday

Il est important de comprendre que ces ADN bicaténaires peuvent être non appariés sur une position (figure 1) d'où le fait qu'il ne s'agit pas forcément d'homoduplex. Cette propriété est à la base de phénomène comme la conversion génique.

Les brins représentés sous forme de croix peuvent être les brins ayant initié l'échange ou les deux autres brins. Une simple isomérisation permet de passer de l'un à l'autre comme le montre la figure 1. Lors de la résolution de la fourche (coupure et religature

des brins), il y a donc deux cas selon que les brins servant à la résolution aient ou non initié la formation de la fourche. Chez les procaryotes c'est la protéine RecA qui stimule l'échange de brins, le complexe RuvABC permettant la migration et la résolution de la fourche. Chez les eucaryotes, on retrouve un équivalent de ces protéines.

2. La réparation par recombinaison

Lors d'une cassure d'ADN double brin, la recombinaison homologue permet de reconstituer un ADN bicaténaire identique si la même séquence est « disponible ». La figure 2 montre les différentes étapes nécessaires. Ces étapes impliquent des facteurs protéiques qui, chez *E. coli*, sont le complexe RecBCD (impliqué dans la formation du simple brin) et RecA. Chez les eucaryotes, le complexe MRX chez la levure ou MRN (pour MRE11/RAD50/NBS1) chez les mammifères joue un rôle analogue à RecBCD de par l'activité exonucléasique 5'-3'. L'échange de brin implique Rad51, un équivalent de RecA.

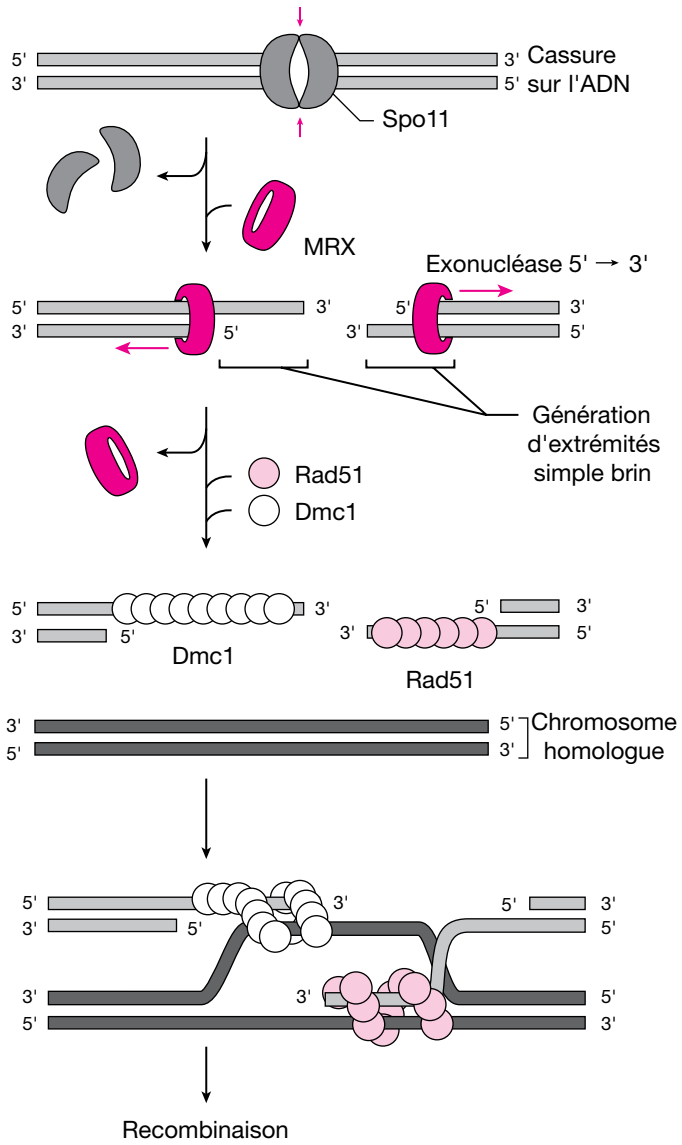


Figure 2 : Réparation par recombinaison homologue d'une cassure double brin

fiche 36

La transposition

La caractérisation des transposons comme éléments mobiles du génome a valu à B. McClintock l'obtention du prix Nobel en 1983. La transposition est un mécanisme de recombinaison qui permet à un segment d'ADN (le transposon) de migrer d'un endroit à un autre du génome. Le transposon est donc une séquence possédant toute l'information nécessaire à sa mobilité. Les transposons peuvent être classés en trois groupes.

1. Les transposons de classe II

Ce sont essentiellement des transposons à ADN conservatifs (ils se déplacent en suivant un mode « couper-coller », leur nombre restant constant). Le mécanisme implique une enzyme particulière (la transposase) dont le gène de structure fait partie du transposon lui-même. La transposase se fixe aux extrémités du transposon qui sont constituées par une séquence répétée et inversée. Le site d'insertion est reconnu par la transposase qui va le couper (comme certaines enzymes de restriction). Une fois insérée, l'ADN polymérase va combler les « trous » en créant deux séquences identiques encadrant le transposon (figure 1). Outre la transposase, le transposon dont la longueur est de l'ordre du kpb peut comporter d'autres gènes comme un gène de résistance à des antibiotiques.

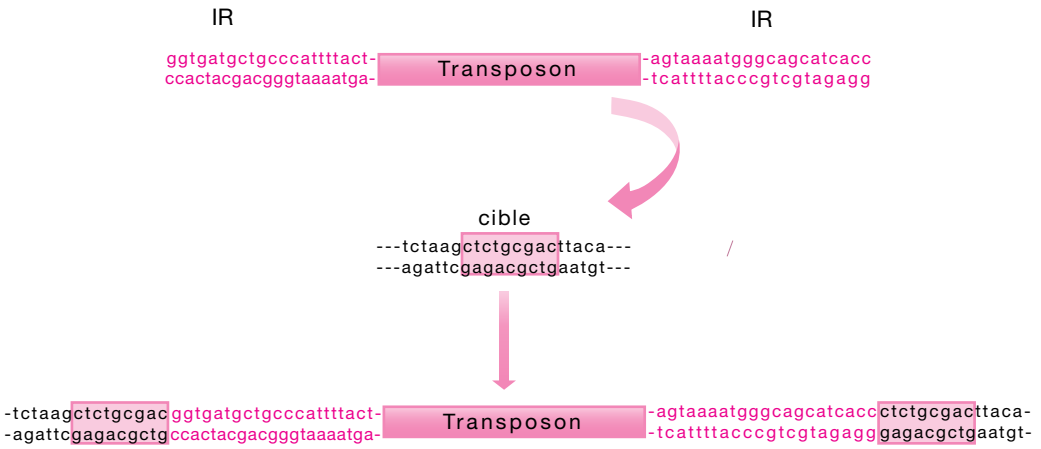


Figure 1 : Un transposon est bordé de deux séquences répétées inversées (IR) et s'insère en dupliquant l'ADN de la cible

La transposase va digérer cet ADN cible pour permettre l'insertion du transposon qui a des extrémités compatibles.

Dans certains cas, le transposon peut inclure un gène particulier : la résolvase. Cette enzyme permet alors au transposon de s'insérer dans le génome en se copiant. Le nombre de ces transposons augmente donc au fur et à mesure de leur transposition.

2. Les transposons de classe III

Ces transposons sont connus sous le nom de *Miniatures Inverted Repeats Transposable Element* (MITES). Ce sont des séquences de 400 paires de bases flanquées de séquences inverses répétées d'une quinzaine de nucléotides. Ces séquences jouent le même rôle que celui des transposons de classe II (déplacement suivant un mode « couper-coller »). Ces transposons sont trop petits pour contenir une phase codante permettant la production de transposase. La transposition doit probablement faire intervenir un autre élément permettant la production d'une transposase reconnaissant les séquences IR des « MITES ». Cette catégorie de transposon est particulièrement abondante dans certains génomes comme celui du riz où elle représente près de 6 % du génome.

3. Les transposons de classe I

Ces transposons sont aussi appelés rétrotransposons. Ils fonctionnent sur le principe du « copier-coller », leur originalité venant de la nature « ARN » et non « ADN » de la copie. Cette copie ARN est ensuite rétrotranscrite par la reverse transcriptase en un fragment d'ADN qui est inséré à son tour dans le génome. Certains transposons possèdent de longues séquences terminales répétées inverses (LTR) pouvant aller jusqu'à 1 000 bases. Le génome humain contient 42 % de ces transposons représentés majoritairement par les LINEs et les SINEs.

LINEs (*Long Interspersed Elements*)

Ils représentent 17 % du génome humain. D'une taille moyenne de 6 500 pb, ils contiennent des phases codantes dont une permettant de couper l'ADN et une permettant la rétrotranscription. Le cycle de transposition commence par la transcription *via* l'ARN polymérase II. L'ARN est alors traduit dans le cytoplasme et les protéines s'associent à l'ARN pour retourner dans le noyau. L'endonucléase coupe alors un brin d'ADN et la reverse transcriptase produit un nouveau transposon qui est insérée à l'endroit de la coupure.

SINEs (*Short INterspersed Elements*)

Ce sont de petites séquences d'ADN (de l'ordre de 300 pb) qui s'insèrent grâce à des enzymes produites par d'autres rétrotransposons. L'archétype est la séquence ALU qui, chez l'homme, est présente à un million d'exemplaires et représente 11 % du génome.

fiche 37

Télomérase et longévité

Le chromosome eucaryotique n'étant pas circulaire, il possède de fait deux extrémités. Cette particularité pose deux problèmes théoriques intéressants. Le premier concerne la réplication de l'ADN et le deuxième est lié aux cassures double-brin de l'ADN.

1. Réplication à l'extrémité du chromosome

Comme le montre la figure 1, le processus de réplication de l'ADN ne permet pas de copier l'extrémité 3' du brin d'ADN (le brin retardé est donc plus court que le brin matrice). Les deux chromatides issues de la réplication sont donc différentes, et à la génération suivante, le chromosome subirait un raccourcissement de 50 à 200 paires de bases. Pour résoudre ce paradoxe, il existe une structure particulière : le télomère.

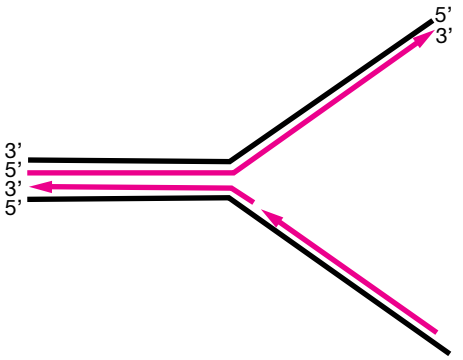


Figure 1 : La réplication du brin tardif implique qu'une partie (en noir) soit absente du brin néosynthétisé

Séquence des télomères

Les télomères sont des répétitions en tandem ((5'TTAGGG3')n chez les vertébrés) trouvés à l'extrémité des chromosomes. Leur longueur varie selon les chromosomes et l'espèce mais fluctue entre la centaine et la dizaine de millier de paires de bases. Les télomères vont permettre, outre d'assurer la réplication complète de l'ADN, de protéger l'extrémité du chromosome en évitant qu'ils ne soient considérés comme des cassures d'ADN. Plus spécifiquement, ceci évite la dégradation ou la fusion des extrémités des chromosomes. Ils permettent également de positionner le chromosome dans le noyau. À la fin de la réplication, une enzyme particulière (la télomérase) vient se fixer sur l'extrémité 3' du brin (figure 2). Grâce à son activité reverse transcriptase, cette ribonucléoprotéine (complexe protéine + ARN) va ajouter un certain nombre de motifs GGTAGG, provoquant ainsi une extension du brin matrice. Un nouveau fragment d'Okazaki va alors être synthétisé permettant de maintenir constante la longueur du chromosome. L'hydrolyse de la dernière amorce ARN de ce fragment d'Okazaki va générer une extrémité simple brin pour le brin répliqué. L'autre duplex d'ADN (brin précoce répliqué) va subir une dégradation par une exonucléase 5'-3' pour aboutir à une structure terminale en simple brin.

Structure des télomères

Par définition la structure est dynamique. Pour éviter d'être considérée comme une cassure, l'extrémité doit être « camouflée » tout en étant accessible au moment de la réplication. Ceci est permis par l'existence d'une séquence simple brin à l'extrémité 3'. Le télomère va former une boucle en « T » qui va se refermer grâce à l'appariement de la séquence simple brin dans la région d'ADN répétée. Cette invasion va provoquer l'apparition d'une boucle en « D » qui sera stabilisée par la fixation de protéines particulières comme TRF2.

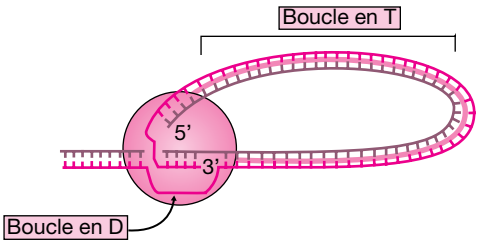


Figure 2 : Structure des télomères

2. Expression de la télomérase

Le gène *TERT* codant pour la télomérase est réprimé dans la plupart des cellules humaines. Il s'ensuit une érosion du chromosome à chaque génération ce qui est une cause proposée pour expliquer la sénescence cellulaire. En effet, des cellules somatiques transformées pour exprimer fortement la télomérase se divisent un plus grand nombre de fois. Cette érosion n'existe pas dans les cellules germinales qui expriment la télomérase. Ceci permettra, lors de la fusion des gamètes, de générer une cellule possédant des télomères non raccourcis.

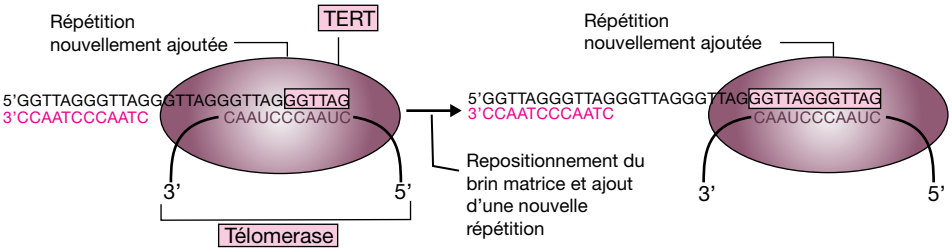


Figure 3 : Allongement du télomère dans l'action de la télomérase

fiche 38

Les techniques classiques de séquençage du génome

Comme nous l'avons vu, la structure primaire du génome est la somme des séquences nucléotidiques formant chaque chromosome. Les techniques de biologie moléculaire ne permettant pas de manipuler un chromosome facilement, on ne peut en lire directement la séquence. Il faut « réduire » le chromosome en une suite d'objets pouvant être facilement amplifiés et séquencés. Historiquement, ce changement d'échelle a été basé sur l'amplification *in vivo* des fragments d'ADN et donc impliquait leur clonage dans des vecteurs pouvant être multipliés chez la bactérie *E. coli.* Cette approche a permis d'obtenir une carte physique du génome avec une résolution de plusieurs milliers de nucléotides.

1. Fragmentation du génome

La démarche de séquençage peut être différente et peut reposer sur l'obtention d'une collection de fragments d'ADN clonés mais non positionnés les uns par rapport aux autres. Cette approche dite *Shotgun* ou « en vrac », impliquera que l'on lise plusieurs fois la même séquence. En fait, ces deux approches s'avèrent complémentaires, l'approche « en vrac » pouvant être réalisée sur un fragment de chromosome.

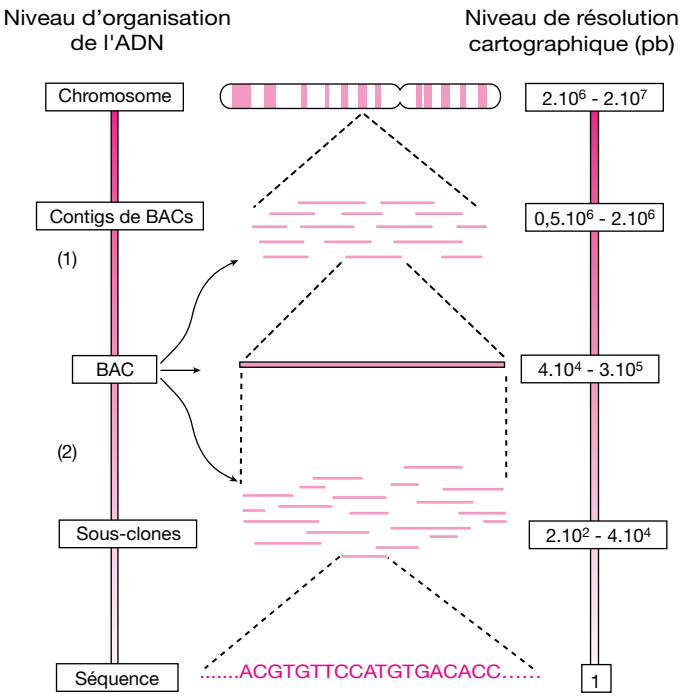


Figure 1 : Fragmentation du génome préalable à la réalisation du séquençage

À l'issue de cette fragmentation, la phase de séquençage proprement dite aura lieu. Classiquement, la séquence repose sur la technique mise au point par F. Sanger.

2. La méthode de Sanger

Cette technique consiste à fabriquer une molécule d'ADN à partir d'une amorce s'hybridant sur l'ADN que l'on souhaite « décrypter ». L'intelligence du procédé repose sur l'utilisation de didesoxynucléotides (figure 2). Ces nucléotides n'ayant pas de fonction hydroxyle en position 3', ils agissent comme des terminateurs de réplication. L'incorporation d'un didesoxynucléotides va donc provoquer la fin de l'élongation. Historiquement, la séquence se faisait en préparant quatre tubes contenant chacun les quatre dNTPs (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) dont un était marqué radioactivement et le ddNTP correspondant. Ensuite, on ajoutait dans chaque tube l'ADN polymérase, une amorce simple brin s'hybridant sur l'ADN cible, lui-même sous forme simple brin. Le tube A contenant le ddATP permettra donc de synthétiser des molécules se finissant par un A. Du fait de la faible concentration en ce didésoxynucléotide, lorsque l'ADN polymérase doit incorporer ce nucléotide, elle prendra soit une molécule de dATP (dans la majorité des cas), soit un ddATP et la réplication de cette molécule s'arrêtera. La longueur de ces molécules permet alors de positionner les « A » par rapport à l'amorce. En analysant la longueur des fragments obtenus dans les quatre tubes, on peut en déduire la séquence nucléotidique. On peut ainsi « lire » des fragments d'ADN jusqu'à une longueur de plusieurs centaines de nucléotides (au-delà, on ne peut plus séparer physiquement des longues molécules ne différant que d'un seul nucléotide).

À l'heure actuelle, on utilise des didésoynucléotides qui sont liés à un colorant détectable par un laser. Chaque didésoynucléotide est fixé à un colorant différent. La réaction de séquence se fait donc en mélangeant les quatre didésoynucléotides en faible concentration, les quatre dNTPs, l'ADN polymérase, une amorce simple brin s'hybridant sur l'ADN cible. Après polymérisation, les molécules sont séparées grâce à une électrophorèse. Le faisceau laser permettra alors de savoir si la molécule éluée se fini par un A, T, G ou C.

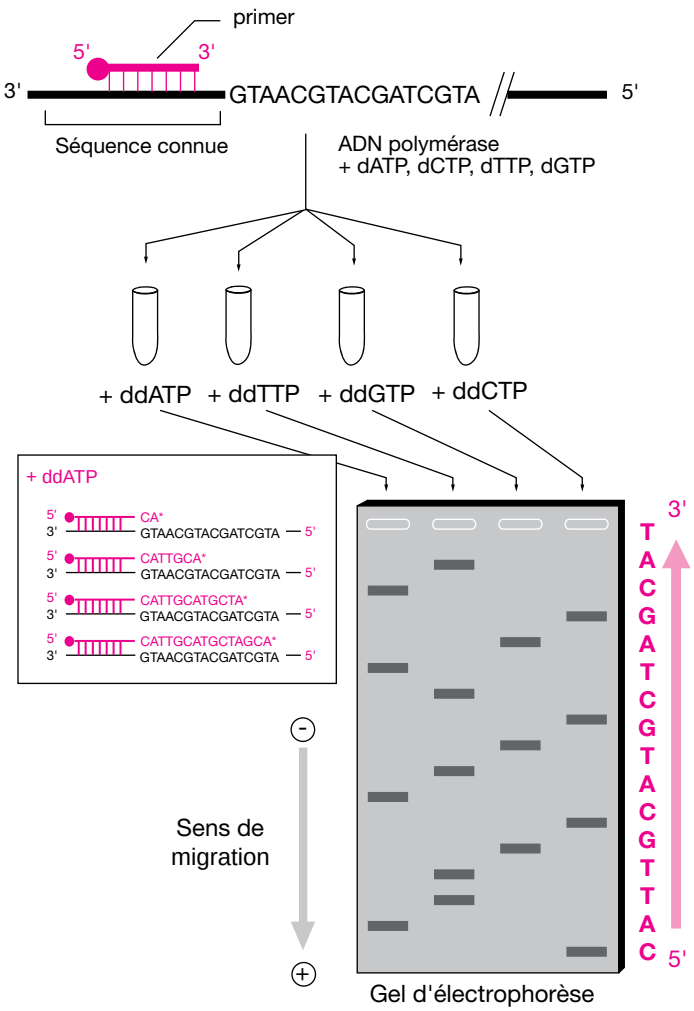


Figure 2 : La méthode de Sanger

fiche 39 Les techniques haut débit de séquençage du génome

Les approches haut débit correspondent à l'obtention massive de séquence. De manière schématique, la démarche consiste à obtenir en une fois des millions de séquences (le séquençage va se réaliser en parallèle) alors que les approches plus traditionnelles permettaient d'obtenir les séquences une par une.

1. De la levure à l'homme

L'automatisation des procédés décrits a permis dans un premier temps de séquencer simultanément 384 échantillons. L'appareillage restait le même et dans ce cadre la robotisation a permis de gagner un facteur 100 dans le débit de séquençage entre 1990 et 2000. La première séquence du génome humain a été publiée en 2001. Cette séquence était incomplète, mais elle a véritablement lancé l'ère « post-génomique ». Celle-ci repose sur le séquençage haut débit. Ce terme signifie que l'on obtient des séquences avec un gain de temps et d'argent correspondant à plus qu'un facteur 1 000. Trois technologies principales (Séquençage 454, méthode Solexa/Illumina et méthode SOLID) ont été employées. Ces approches ont des propriétés différentes qui sont résumées dans le tableau 1. Ces méthodes représentent ce qui a été baptisé NGS pour *Next Generation Sequencing.*

	Taille du fragment lu	Temps d'acquisition (jours)	Gigabase/acquisition
Roche 454	330	0,33	0,45
Illumina	33 à 100	4	18
Applied SOLID	50	7	30

Tableau 1 : Caractéristiques des séquenceurs « haut débit »

2. Le séquençage 454

Grâce à cette technique développée en 2005, le génome de J. Watson a été obtenu en 2007 en moins de deux mois et pour un coût inférieur à 1 million de dollars. Le principe repose sur le pyroséquençage (figure 1). Pour cela, l'ADN à séquencer est fragmenté en petits segments (il n'y a donc pas fabrication d'une banque clonée ce qui est un gain de temps énorme). Chaque fragment est fixé à une microbille grâce à un adaptateur (petite séquence d'ADN connue). Un certain nombre d'astuces permettent alors de multiplier chaque fragment pour arriver à obtenir plusieurs millions de fragments identiques par microbille. Chaque microbille est alors déposée dans une plaque (qui peut contenir des millions de billes). Ensuite, on met en contact chacune des billes avec un mélange réactionnel. Celui-ci contient l'ADN polymérase, une ATP sulfurylase, une luciférase et une apyrase ainsi que les substrats de ces différentes enzymes (adénosine phosphosulfate (APS), D-luciférine) et l'amorce de séquence (complémentaire de l'adaptateur). Les nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés de manière cyclique un par un, toujours dans le même ordre et successivement.

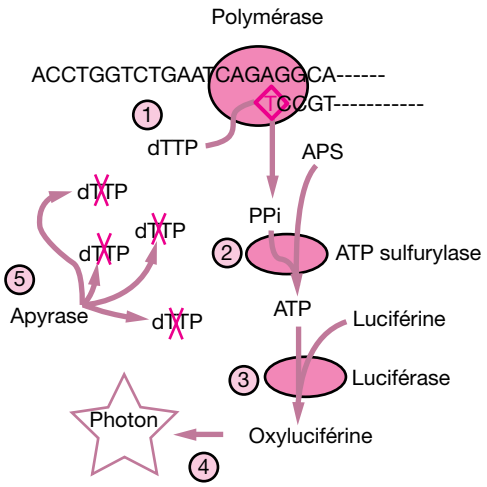


Figure 1 : Principe du pyroséquençage

En ①, la polymérase incorpore le dTTP. Cette réaction libère un pyrophosphate (PPi) qui est utilisée pour générer une molécule d'ATP ② elle-même utilisée par la luciférase ③ qui va émettre un photon ④. Les nucléotides non incorporés et l'ATP sont alors dégradés par l'apyrase ⑤.

Une caméra CCD mesure le signal de bioluminescence produit dans chaque micropuits à chaque ajout de nucléotide. Ceux-ci sont ajoutés séquentiellement. Le puits correspondant à la séquence indiquée dans la figure 1 émettra donc de la lumière uniquement lors de l'ajout du dTTP et on en déduira que la séquence cible possède un A à ce niveau. La caméra enregistre tous les puits où de la lumière est émise et qui contiennent donc un A à cette position, les autres n'en contenant pas. Lors du tour suivant, il y aura émission de lumière lors de l'ajout du dCTP uniquement. De cette façon, pour chaque puits, on pourra lire une séquence et simultanément lire les séquences des autres fragments dans tous les puits.

3. La troisième génération : TGS (*Third-Generation Sequencing*)

Bien que puissantes, ces techniques de NGS posent le problème de lire des séquences courtes. Il reste compliqué de pouvoir assembler toutes ces séquences (dont beaucoup sont répétées) pour obtenir des chromosomes complets. En 2011 et 2014 Pacific Biosciences et Oxford Nanopore technologies (ONT) ont révolutionné le domaine en offrant la possibilité de séquencer, en temps réel des molécules uniques d'ADN d'une longueur de plusieurs milliers voire même de millions de bases ! La technologie d'ONT est probablement la plus révolutionnaire puisqu'il n'y a plus d'ADN polymérase. Un des deux brins de la molécule d'ADN va être amenée à traverser un nanopore. Celui-ci est inséré dans une membrane qui sépare deux compartiments contenant des solutions ioniques différentes. En fonction de la base traversant le pore, le flux ionique sera différent. En enregistrant ce flux (par mesure du courant électrique), on peut alors, en temps réel, déduire la nature de la base. La variation de ce courant au cours du temps permet ensuite de connaitre l'enchaînement des nucléotides et donc la séquence de la molécule d'ADN analysée. Bien que présentant un taux d'erreur important (de l'ordre du %), ces techniques permettent d'obtenir rapidement et sans équipement coûteux des séquences complètes de génomes.

fiche 40

La PCR

Le terme PCR est l'acronyme de *Polymerase Chain Reaction* qui signifie donc que cette technique permet d'amplifier une séquence d'ADN. Cette réaction est basée sur les caractéristiques d'hybridation de l'ADN et de polymérisation par une enzyme thermostable.

1. Hybridation de l'ADN

L'ADN double brin peut, dans certaines conditions (pH alcalin, haute température) perdre sa structure bicaténaire. Cette fonte est due à la rupture des liaisons hydrogène formées entre les bases complémentaires. Cette séparation est totalement réversible et si l'ADN a été dénaturée en augmentant la température, il pourra se renaturer en baissant doucement celle-ci afin que les brins complémentaires puissent se réassembler. Si on chauffe un fragment d'ADN double brin en présence d'un oligonucléotide (court segment d'ADN simple brin synthétique) dont la séquence est complémentaire à un brin, il va y avoir une compétition entre cette amorce et le brin complémentaire au moment où la température sera abaissée. Si la concentration de cette amorce est nettement supérieure, cette compétition sera biaisée en faveur de l'association d'un brin avec cet oligonucléotide plutôt qu'avec l'autre brin (figure 1).

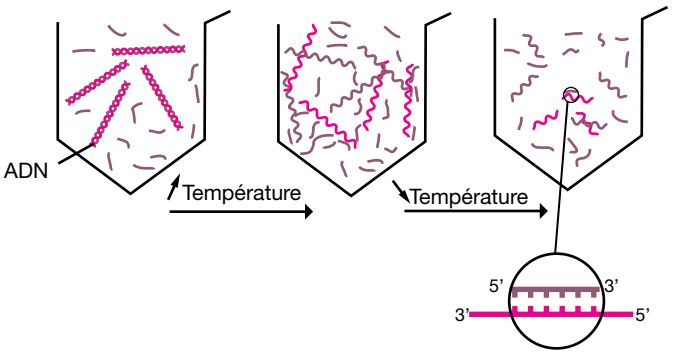


Figure 1
Compétition lors de l'hybridation

Dans des conditions optimales, cette réassociation sera rapide (de l'ordre de la seconde). L'amplification en chaîne repose en partie sur cette association/dissociation. En mettant en présence un grand excès de deux sondes complémentaires des deux brins d'ADN, il sera ainsi possible de créer deux types d'hybrides permettant d'initier un cycle de réplication. Pour cela il suffira de chauffer l'ADN au-dessus de son point de fusion (température correspondant à la dénaturation de la moitié des molécules) et de baisser rapidement cette température. Ce cycle se fait habituellement en moins d'une minute.

2. Polymérase thermorésistante

Si les techniques d'hybridation étaient connues depuis longtemps, l'utilisation de la PCR a été rendue populaire par sa facilité d'utilisation. Celle-ci s'appuie pour beaucoup sur des enzymes résistantes à de hautes températures. Certains micro-organismes comme *Thermus aquaticus* vivent dans des conditions extrêmes. Cette bactérie est trouvée dans les sources d'eau chaude à des températures supérieures à 70 °C. Toutes les protéines nécessaires à la vie sont donc résistantes à plus haute température et c'est le cas particulier de l'ADN polymérase (la Taq polymérase) dont la température optimale de fonctionnement est de 72 °C.

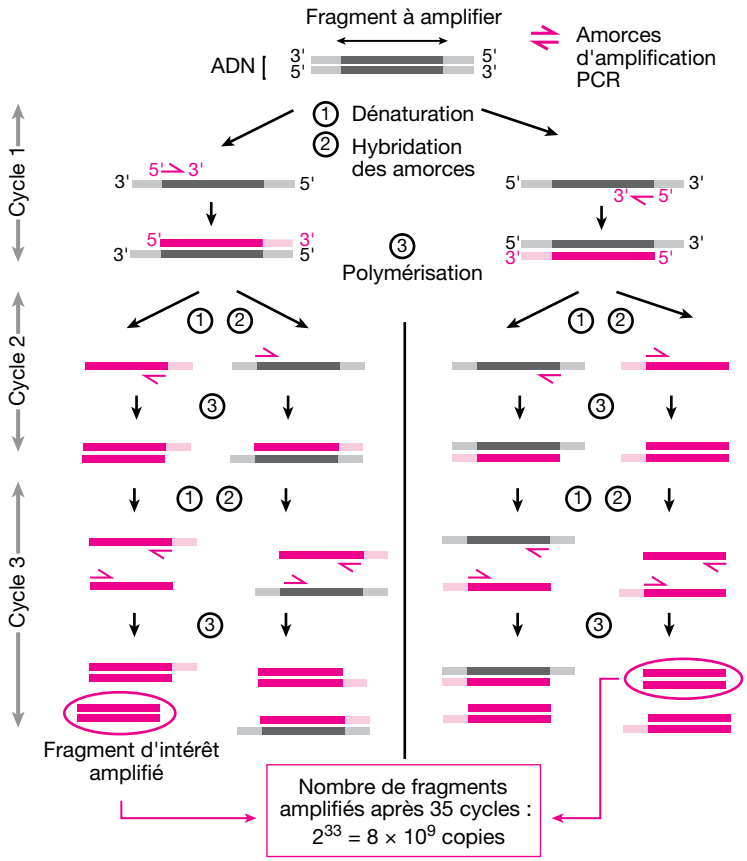


Figure 2

3. La réaction de polymérisation en chaîne

Chaque cycle se compose de trois étapes. Dans la première, toutes les molécules d'ADN sont dénaturées. Après quelques secondes à 95 °C, cette dénaturation est avérée. L'étape 2 consiste à descendre rapidement la température pour permettre l'hybridation des amorces qui sont en très large excès. Cette étape d'hybridation dure quelques secondes et joue sur une gamme de 45 à 65 °C (dépendant de la nature et longueur des amorces). Il reste alors à procéder à l'élongation des amorces par la polymérase. Cette étape de polymérisation est réalisée à 72 °C et dépend de la longueur du fragment souhaité (la vitesse d'élongation étant de 75 nucléotides/seconde et les amplifiats d'une taille de l'ordre de 1 000 bases, le temps d'élongation est de l'ordre de 30 secondes). Comme on peut le calculer, un cycle complet s'étend sur un temps de l'ordre de la minute auquel il faut ajouter les montées et descentes en température. Ces étapes sont contrôlées par un thermocycleur qui est devenu un outil indispensable à chaque laboratoire.

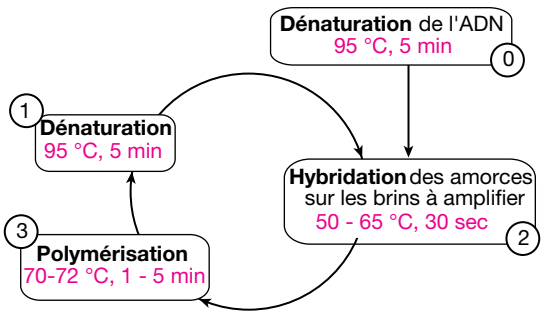


Figure 3

fiche 41

Les technologies de l'ADN recombinant

Les procédés décrits permettent d'isoler un fragment d'ADN à partir du génome. Le terme consacré est souvent « clonage » ou « sous-clonage ». Le terme clonage est initialement réservé aux micro-organismes et consiste à isoler une colonie dont toutes les cellules dérivent d'une seule cellule par divisions successives. La propriété d'un clone est donc de présenter une parfaite identité génétique entre toutes les cellules qui le constituent. Dans le cas d'un fragment d'ADN, le clonage va permettre d'obtenir une population de molécule d'ADN identiques entre elles. Pour cela, il faut dans un premier temps isoler le fragment d'intérêt (étape du « découpage »).

1. Le découpage de l'ADN

Les enzymes de restriction

Ce découpage fait appel à l'utilisation de véritables ciseaux moléculaires que sont les enzymes de restriction. Ces enzymes sont souvent produites par des micro-organismes qui les utilisent pour inactiver un ADN étranger (ces micro-organismes protègent leur propre ADN en méthylant ses bases qui ne sont alors plus reconnues). La coupure de l'ADN par ces enzymes de restriction se produit après la reconnaissance par ces protéines de sites ayant une séquence déterminée. Cette séquence (le site de restriction) est généralement courte (entre 4 et 15 paires de bases). La fixation de l'enzyme de restriction sur l'ADN permet une double coupure (une coupure sur chaque brin d'ADN). Cette double incision aboutit à séparer la molécule d'ADN à l'endroit où s'est fixée cette enzyme. Il s'agit donc d'endonucléases. Selon la position de chaque coupure, à l'issue de cette digestion, les deux fragments seront « bouts francs » ou « bouts sortants ». À l'heure actuelle, on dispose de plusieurs centaines de ces enzymes qui permettent donc de couper comme on le souhaite un fragment d'ADN.

La PCR

Fiche 40

La technique vue précédemment permet également de produire un segment d'ADN dont les bornes seront déterminées par les amorces utilisées. Théoriquement, ce segment d'ADN est « bout franc », mais la TAQ polymérase possédant une activité supplémentaire de type « transférase terminale », elle ajoute un nucléotide A sur chaque extrémité 3'. L'amplifiat sera donc à extrémités cohésives (« bouts sortants »). Certaines polymérases thermostables sont dépourvues de cette activité.

2. Le « polissage »

Après digestion ou amplification, il est souvent nécessaire de rendre « bouts francs » des extrémités cohésives comme celles de la figure 1 qui illustre une digestion du site *EcoRI*. L'utilisation d'une endonucléase simple brin comme la nucléase de haricot *mungo* transforme une extrémité 3' ou 5' sortante en une extrémité « bout franc ». Une autre possibilité consiste à utiliser une ADN polymérase comme l'ADN polymérase du phage T4. Pour une extrémité 5' sortante, l'ADN polymérase rebouche l'ADN en allongeant l'extrémité 3' OH par une copie de l'autre brin (figure 1). Si l'extrémité est 3' sortante, cette même polymérase digérera cette extrémité par son activité exonucléase 3' vers 5'.

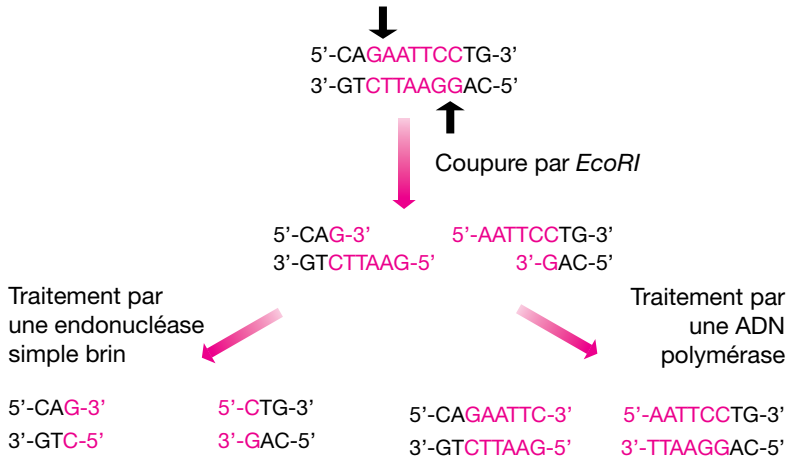


Figure 1 : Le polissage de sites de restriction

3. La ligature

Cette activité est fondamentale pour le clonage. Elle crée une liaison phosphodiester entre le phosphate en 5' et la fonction hydroxyle en 3'. La formation de ces deux liaisons covalentes sur les deux brins d'ADN de deux molécules permet alors de n'en former plus qu'une. Pour favoriser la ligature d'un fragment d'ADN dans un vecteur en empêchant celui-ci de se refermer sur lui-même, on procède souvent à une déphosphorylation de celui-ci. La phosphatase utilisée est une phosphatase alcaline (extraite à partir de muqueuse intestinale de veau, de bactéries ou encore de crevettes). Un vecteur traité de cette façon reformera une liaison phosphodiester entre son extrémité 3'OH et l'extrémité 5' Phosphate de l'insert. Ce clonage aboutira donc à la formation d'une molécule comportant deux cassures simple brin (figure 2) qui seront réparées ultérieurement par la bactérie lors de la transformation. Il est à noter l'existence de systèmes de clonage ne faisant pas appel à la ligature mais à la recombinaison : c'est le cas du système Gateway par exemple.

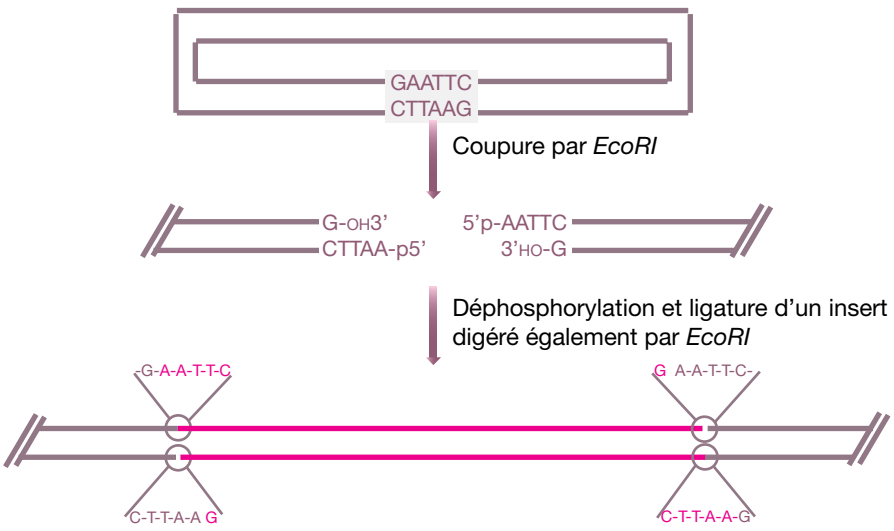


Figure 2 : La ligature de fragments d'ADN reconstitue les sites de restriction

fiche 42

L'édition des génomes

Derrière ce terme, on retrouve différentes approches ayant le même but : changer le génome d'une cellule. La plupart de ces interventions visent à éliminer un gène pour connaître sa fonction ou remplacer un gène exprimant une protéine responsable d'une maladie génétique, par un gène permettant l'expression d'une protéine « saine » (approche de thérapie génique). Il s'agit donc de créer une mutation inactivant un gène ou rétablissant une expression non pathologique et ainsi de changer l'expression génétique de la cellule. Dans un certain nombre d'autres cas, le but est d'améliorer ou de créer une caractéristique offrant un intérêt industriel et/ou agronomique (création d'OGM dans le monde agricole) en introduisant le cas échéant un gène provenant d'un autre organisme

1. Principe général

Quelle que soit l'approche considérée, l'expérimentateur disposera de deux éléments : un transgène et une cellule réceptrice. Le transgène provient d'un travail moléculaire basé sur les outils moléculaires. Dans de nombreux cas, cette séquence est modifiée.

Fiche 41

Mutagénèse dirigée par PCR

Lorsque la mutation cible un acide aminé particulier, on utilise une approche de mutagénèse dirigée. Il existe de nombreuses manières de réaliser une mutagénèse dirigée, dont celle décrite Figure 1. Dans cet exemple, la séquence initiale issue par exemple du génome d'un individu malade possède un codon gat (codant pour un acide aspartique) qu'il faut changer en gct (codant pour une thréonine). On réalise deux amplifications séparément avec deux amorces incorporant le changement de nucléotide (amorces 2 et 3). Le mésappariement n'empêche pas l'hybridation du reste de l'amorce sur la matrice ADN. Les deux amplifiats sont alors réunis dans un même tube et une nouvelle PCR est réalisée avec les amorces 1 et 4. On obtient alors un fragment d'ADN contenant une séquence corrigée.

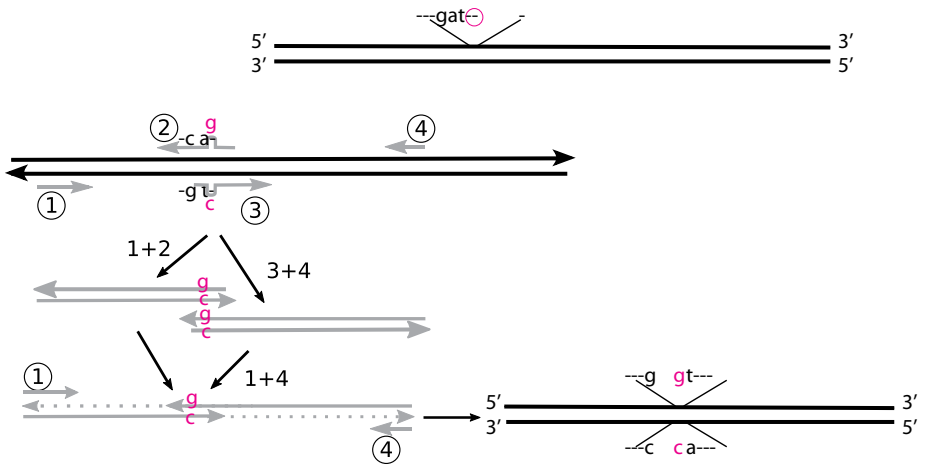


Figure 1 : Mutagénèse dirigée par PCR

Insertion du transgène

L'insertion du transgène implique une recombinaison entre le chromosome et l'ADN linéaire qui est introduit dans la cellule. Cette recombinaison peut être faite de manière aléatoire (à un locus quelconque) ou bien être ciblée au locus du gène dont on souhaite changer (éditer) la séquence. Dans ce cas, la réaction est une recombinaison homologue. Pour forcer la recombinaison homologue et éviter une insertion aléatoire, il existe des outils permettant de couper le chromosome au locus du gène dont on veut modifier la séquence. L'outil le plus populaire est sans conteste le système Crispr-Cas9.

Fiches 35, 163

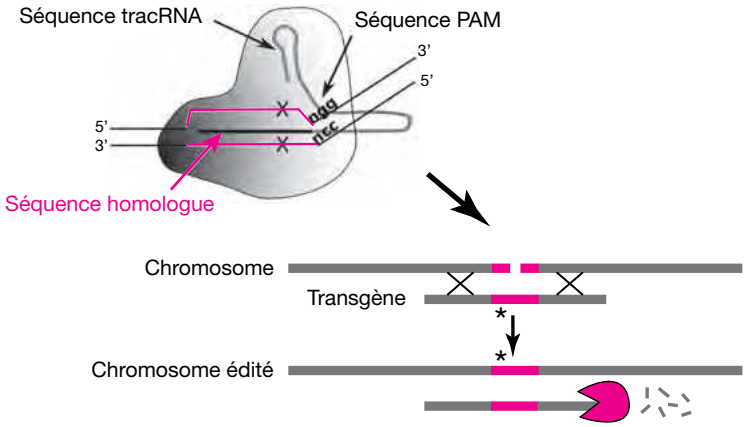


Figure 2 : Insertion ciblée d'un transgène

Le système Crispr-Cas9

Ces ciseaux moléculaires dérivent du monde bactérien et en particulier de *S. pyogenes* qui l'utilise pour détruire un ADN étranger. Cas9 est une protéine avec une activité endonucléase. Elle devient active en s'associant avec deux fragments d'ARN (crRNA qui va s'hybrider sur l'ADN à cliver et tracrRNA qui va activer Cas9). Ces ARNs sont issus de la transcription et maturation d'une région contenant des séquences répétées en palindrome séparée par des séquences espaceurs (***C**lustered **R**egular **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats* ou courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées). La domestication de ce système implique la capacité à obtenir *in vivo* un ARN guide. Celui-ci sera complémentaire de la séquence à cliver sur une vingtaine de nucléotide et se situera avant la séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Cette séquence (5'-NGG-3') est reconnue par Cas9 et est nécessaire à son activité endonucléasique. L'ARN contient également une séquence tracRNA. Le même ARN peut donc activer et positionner Cas9 pour cliver un ADN cible (figure 2).

FOCUS La découverte de la double hélice

La découverte de la structure de l'ADN est une étape importante pour la biologie moléculaire. En effet, ses propriétés structurales permettent d'expliquer les mécanismes de réplication et apportent une réponse satisfaisante aux connaissances préalables. Grâce à F. Griffith et O. Avery, il était clair dès la fin des années 1930 que l'ADN était le principe transformant et donc le gardien de l'hérédité. E. Chargaff en 1949 avait montré que cet ADN possède autant de thymine que d'adénine et autant de guanine que de cytosines. Pour autant, il était difficile d'imaginer comment cette molécule pouvait s'organiser. La technique qui allait permettre ce bond en avant est la cristallographie aux rayons X. Les clichés qui ont permis de comprendre l'organisation en double hélice ont été obtenus par R. Franklin, une chercheuse du King's College de Londres. L'histoire reconnaît maintenant que les fameux clichés ont été abusivement « empruntés » par M. Wilkins qui les a montrés à F. Crick et J. Watson. Ces clichés montrent une figure cruciforme, caractéristique des structures en hélice. Cette analyse a permis de proposer le fameux modèle qui a été publié en avril 1953 dans la revue *Nature* (on pourra se procurer gratuitement une copie de cet article d'une page en suivant ce lien : http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf).

Crick, Watson, et Wilkins reçurent en 1962 le prix Nobel pour ces travaux. R. Franklin qui est la grande oubliée de cette histoire est morte en 1958. Chacun pourra se forger ses convictions sur la déontologie de cette découverte en s'appuyant sur deux livres (*Rosalind Franklin : The Dark Lady of DNA* de B. Maddox et *La Double Hélice* de J. Watson).

La structure en double hélice permet de comprendre l'égalité des proportions d'adénine et thymine d'une part et de guanine et cytosine d'autre part (la règle de Chargaff). Chaque brin de l'hélice étant complémentaire de l'autre, il devient intellectuellement facile d'imaginer comment cette molécule peut être recopiée. La démonstration formelle ne viendra qu'en 1959 grâce au travail remarquable de Meselson et Stahl qui démontreront que la réplication est un mécanisme semi-conservatif (après copie, chaque double hélice est composée d'un brin original et de sa copie).

Il y a donc plusieurs points remarquables dans cette découverte. Le premier tient à la simplicité de la solution proposée. Les propriétés biologiques peuvent se déduire de cette structure qui est accessible à tout le monde. La nature de cette molécule qui est la clé de l'hérédité contribue aussi à l'impact de ce travail. Enfin, la jeunesse des signataires de cet article (J. Watson avait 24 ans et F. Crick 36) est tout aussi remarquable que les problèmes déontologiques qui ont accompagné cette publication.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

3.1 Le promoteur chez les procaryotes :
- ☐ a. possède une boîte TATA
- ☐ b. est reconnu par la protéine régulatrice des gènes dont l'expression est contrôlée
- ☐ c. est constitué de deux séquences consensus

3.2 Le génome chez les eucaryotes est :
- ☐ a. exclusivement nucléaire
- ☐ b. composé exclusivement par l'ensemble des séquences codantes
- ☐ c. identique au sein d'une même espèce

3.3 L'hétérochromatine :
- ☐ a. ne contient pas de nucléosome
- ☐ b. est de l'ADN étranger à la cellule
- ☐ c. est une forme de compaction de la chromatine possédant des signatures moléculaires précises

3.4 La primase :
- ☐ a. est une ARN polymérase
- ☐ b. sert à fabriquer une amorce
- ☐ c. est une ADN polymérase

3.5 Les mutations dans l'ADN :
- ☐ a. sont exclusivement dues à l'environnement
- ☐ b. conduisent exclusivement au changement d'un nucléotide par un autre
- ☐ c. sont délétères pour la cellule
- ☐ d. peuvent être générées dans tout le génome

3.6 La recombinaison homologue :
- ☐ a. aboutit systématiquement à la formation de « crossing-over »
- ☐ b. implique au minimum une cassure et un raboutage d'ADN simple brin
- ☐ c. implique chez la bactérie l'aide de Rad 51
- ☐ d. implique chez les eucaryotes la protéine RecA
- ☐ e. implique au minimum quatre cassures et quatre raboutages d'ADN simple brin

3.7 La télomérase :
- ☐ a. protège l'extrémité du chromosome des exonucléases
- ☐ b. digère l'extrémité des chromosomes
- ☐ c. est une reverse transcriptase
- ☐ d. permet la synthèse d'un seul motif d'ADN

3.8 Cocher les réponses exactes :
- ☐ a. La méthode de Sanger n'est pas celle utilisée dans les approches de séquence haut débit type « 454 »
- ☐ b. Le séquençage haut débit permet d'obtenir simultanément énormément de séquences plus courtes que le séquençage « classique »
- ☐ c. Le séquençage « haut débit » permet d'obtenir en une réaction une séquence plus longue que le séquençage classique
- ☐ d. la PCR permet d'amplifier un chromosome avec deux amorces
- ☐ e. La PCR permet d'éviter le clonage de fragments d'ADN dans les vecteurs

3.9 Pour amplifier un fragment de 50 paires de bases à partir de la séquence donnée, quels oligonucléotides utiliseriez-vous ?

5'atggacgctgaattccgtcacgactctggttacgaagttcaccaccagaagctggtgttcttcgctgaagacgtgggttctaacaagggtgctatcatcggtctgatggttggtggcgttgtg

- ☐ a. 5'atggacgctgaattcc
- ☐ b. 5'gaagttcaccaccagaa
- ☐ c. 5'ttctggtggtgaacttc
- ☐ d. 3'cttcaagtggtggtctt

Réponses

3.1 **c**. (boîte -35 et Pribnow box), **b.** et **c.** faux. La boîte TATA est trouvée chez les eucaryotes et se situe à -40 (ne doit pas être confondue avec la boîte de Pribnow de séquence TATAAT). Les protéines régulatrices se fixent sur les opérateurs.

3.2 **a**, **b** et **c**. faux. Il y a un génome mitochondrial et chloroplastique. **b.** faux car le génome comprend aussi de l'ADN qui n'est pas transcrit en ARN messager comportant une phase codante. **c.** faux (par exemple chez l'homme il existe des millions de différences entre individus (comme les SNP)).

3.3 **c**, **a** et **b**. faux. Les nucléosomes représentent une forme d'organisation trouvée aussi bien dans l'hétéro que dans l'euchromatine.

3.4 **a** et **b**. Une ADN polymérase ne peut synthétiser de l'ADN sans la présence d'une amorce. Lors de la réplication, cette amorce est un court fragment d'ARN produit par la primase.

3.5 **d** et **a**. faux (tautomérisation des bases). **b.** faux (voir la variation de la longueur des répétitions et le modèle de Streisinger). **c.** faux. Certaines mutations n'ont pas de conséquences (elles sont neutres), certaines sont positives (et seront conservées au cours de l'évolution) et certaines peuvent être délétères.

3.6 **e** et **a**. faux car la résolution de la fourche peut faire intervenir les brins qui l'ont initiée. **c** et **d.** faux. Rad51 catalyse l'échange de brins chez les eucaryotes et RecA possède la même activité chez les procaryotes.

3.7 **c** et **d**. La télomérase est une ribonucléoprotéine qui est capable de restaurer les télomères aux extrémités des chromosomes de la cellule.

3.8 **b** et **e**. L'amplification par la technique de PCR est limitée par la processivité de la Taq polymérase. Les conditions expérimentales impliquent que cette polymérase « décroche » de la matrice d'ADN et ne puissent recopier efficacement l'ADN sur des longueurs dépassant la dizaine de millier de paires de bases (ceci est un ordre de grandeur). On ne peut donc pas amplifier un chromosome dont la taille est très au-dessus de cet ordre de grandeur

3.9 **a** et **c**, ou **a** et **d**. L'oligonucléotide b s'hybride sur le même brin que l'oligonucléotide a et ne peut donc servir à amplifier un fragment d'ADN avec celui-ci. L'oligonucléotide c est complémentaire du b (il correspond à la même séquence lue sur l'autre brin). Il permet donc une amplification avec a d'une fragment qui sera « 5'atggacgctgaattccgtcacgactctggttacgaagttcaccaccagaa3' ». Cet ADN a bien une longueur de 50 nucléotides. L'oligonucléotide d est le même que le c (attention il est écrit de l'extrémité 3' vers le 5' dans le sens gauche droite).

Chapitre 4
De l'ADN aux protéines

Objectifs

Le dogme central de la biologie moléculaire postule que l'information contenue dans l'ADN sous forme de gènes est copiée en ARN messager. Cet ARN est alors déchiffré lors de la traduction. Ce flux d'information postulé par Francis Crick en 1958 reste une règle générale, même si elle est émaillée de nombreux contre-exemples. La transcription qui permet la formation des ARN messagers nécessite de nombreux acteurs (ARNs, protéines…) et est régulée par des mécanismes complexes. La traduction, qui aboutit à la formation de protéines, se déroule au sein du ribosome.

L'ensemble des transcrits présents dans une cellule à un moment donné forme le transcriptome qui peut être étudié par des techniques spécifiques. Un même transcrit peut produire plusieurs protéines. Ces dernières subissent également souvent des modifications post traductionnelles. Différentes technologies sont actuellement disponibles pour étudier le protéome.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 43

La découverte du code génétique

La découverte du code permettant de faire correspondre un message sous forme d'acide nucléique à la fabrication d'une protéine a été l'objet d'une intense compétition. Pour atteindre cet objectif, M. Nirenberg et H. Matthei, prix Nobel en 1968 ont dans un premier temps mis en place un test *in vitro*. Pour cela, ils ont combiné trois approches originales.

1. Purification des aminoacides radioactifs

Cette purification impliquait au préalable la culture d'une algue en présence de carbonate marqué au C^{14}. Les protéines étaient ensuite hydrolysées et leurs constituants élémentaires (acides aminés) purifiés. De cette manière, H. Matthei a pu obtenir les 20 acides aminés nécessaires à mesurer de manière très sensible la formation de polymères d'acides aminés.

2. Préparation d'extraits cellulaires aptes à mesurer la traduction

Le problème est de pouvoir disposer d'un extrait brut capable de produire des protéines mais uniquement dans des conditions contrôlées par l'expérimentateur. Il faut en particulier que cette production soit insignifiante sans ajout d'un ARN ! C'est principalement M. Nirenberg qui a mis en place un protocole permettant d'obtenir des extraits de la bactérie *E. coli* possédants cette capacité.

3. Une mesure de la traduction

Le problème provient du fait que dans le tube à essai, on trouvera des acides aminés « libres » et des acides aminés incorporés dans des protéines ou peptides néosynthétisés. Comment arriver à séparer efficacement et rapidement ces deux espèces ? Nirenberg et Matthei ont pour cela ajouté à la fin de l'incubation de l'acide trichloracétique (TCA). Cet acide provoque la précipitation des macromolécules comme les protéines, les acides aminés restants en suspension. Une filtration sur du papier buvard qui retient le précipitât et laisse passer le reste permet, en mesurant la radioactivité associée au buvard, de mesurer l'activité d'incorporation des acides aminés, c'est-à-dire l'efficacité de la traduction.

4. Un jeu de déduction

Les auteurs ont alors préparé 20 tubes contenant chacun 20 acides aminés dont un seul était marqué au C^{14}. Après addition d'une matrice ARN polyU, seul le tube contenant la phénylalanine marquée au C^{14} a permis d'obtenir une incorporation de radioactivité. De même, l'addition de polyC dans le même type d'expérience a montré l'incorporation spécifique de la proline. En réalisant la synthèse de différentes matrices utilisées comme substrat de traduction, la correspondance entre protéine et ARN a pu être établie.

Les quatre bases (A, U, G et C) doivent être regroupées trois par trois (triplet) pour former un codon. Il y a donc $4 \times 4 \times 4 = 64$ codons possibles. Plusieurs codons pouvant spécifier l'incorporation d'un même acide aminé, le code est dit dégénéré (figure 1).

Trois codons ont un rôle singulier car ils ne correspondent pas à un aminoacide. Il s'agit des trois codons STOP (ocre, opale et ambre). Le nom ambre provient d'un jeu de mot du chercheur qui travaillait sur ce codon (UAG) et dont le nom de famille était Bernstein (ambre jaune en allemand). Pour continuer le jeu, les deux autres codons stop ont été baptisés ocre (UAA) et opale ou azur pour UGA. Ce code génétique a longtemps été considéré comme universel dans le monde vivant, mais il est maintenant clairement établi que certains codons ne correspondent pas aux mêmes aminoacides chez certains organismes. La mitochondrie utilise également un code altéré.

1re position (extrémité 5')	2e position								3e position (extrémité 3')
	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	**UAA**	**Stop**	**UGA**	**Stop**	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	**UAG**	**Stop**	UGG	TRP	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ille	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUC	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	**MET**	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Figure 1 : Représentation du code génétique

Les acides aminés sont représentés par les trois premières lettres de leurs noms, les bases des nucléotides par leurs initiales.

5. Biais codonique

Le code génétique étant dégénéré, il peut y avoir plusieurs façons d'indiquer l'incorporation d'un acide aminé à une position donnée. On parle alors de codons synonymes. Mis à part la méthionine et le tryptophane (un seul codon possible AUG et UGG) le nombre de codons spécifiant les autres acides aminés peut aller jusqu'à 6. Chaque codon sélectionnant un ARNt particulier, cela veut dire que pour un acide aminé, il y a plusieurs ARNt possibles. Ces ARNt sont dits isoaccepteurs. Les codons synonymes ne sont pas utilisés au hasard. En effet, pour les protéines fortement exprimées, le type de codon utilisé correspondra à un ARNt abondant. Cela veut donc dire qu'il y a un biais dans le choix des codons synonymes et que ce biais est lié au niveau d'expression protéique. L'abondance relative de ces ARNt peut varier d'une espèce à l'autre. C'est pourquoi il n'est pas rare de devoir changer la séquence lors d'expression hétérologue (expression d'un gène provenant d'un organisme donné dans un autre organisme) pour optimiser le biais codonique propre à l'espèce « réceptrice ».

fiche 44

Les différentes classes d'ARN

Le monde des ARN est certainement celui qui a le plus évolué au cours des années 2000. Ces ARN peuvent être regroupés en fonction de grandes fonctions (ARN messager, ARN de transfert, ARN ribosomique et ARN régulateurs). Il est également possible de regrouper les ARN en fonction de leurs rôles dans l'ajustement de l'expression génique (maturation, traduction, dégradation des ARN). Enfin, il est également possible de classer les différents ARN en fonction de leur mode de production. Chez les procaryotes, les ARN sont transcrits par la même ARN polymérase et peuvent le cas échéant subir des transformations (coupure, modification de bases…). Chez les eucaryotes, la situation est encore plus complexe puisque les ARN sont produits à partir de trois ARN polymérases différentes.

Fiches 29, 45 et 46

1. Les ARN messagers (*mRNA* en anglais)

Cette classe d'ARN, est transcrite par l'ARN polymérase II chez les eucaryotes. Les ARNm ont une séquence nucléotidique qui, une fois traduite, spécifie la protéine devant être produite. Chez les eucaryotes, ces ARNm subissent des clivages internes (épissage), des modifications chimiques (coiffe à l'extrémité 5') et l'ajout d'une queue polyA à l'extrémité 3'. La forme mature (c'est-à-dire ayant subi ces modifications) se retrouve dans le cytoplasme où elle sera traduite.

Fiche 51

2. Les ARN de transfert (*tRNA* en anglais)

Ces ARN sont transcrits par l'ARN polymérase III chez les eucaryotes. Ils subissent des épissages, un clivage en 5' par la ribonucléase P, un clivage en 3'par une exonucléase ou la ribonucléase Z, un ajout de base en 3' et des modifications chimiques de bases.

3. Les ARN ribosomiques (*rRNA* en anglais)

La classe des ARN ribosomiques correspond chez les procaryotes à l'ARN 16S (localisée dans la petite sous-unité du ribosome), 5S et 23S (associées à la grande sous-unité). Chez les eucaryotes, la petite sous-unité contient l'ARN 18S, alors que la grande sous-unité regroupe les ARN 5S, 5,8S et 28S (tableau 1). Les ARN 5,8S, 18S et 28S sont obtenus par clivage et modification d'un précurseur (ARN 35S) qui est synthétisé dans le nucléole. Il y a un grand nombre d'étapes de maturation impliquant également des modifications chimiques de bases. Chez les eucaryotes, ces ARNr sont produits par différentes polymérases (tableau 1).

Tableau 1 : Provenance des ARNr

	Procaryotes	Eucaryotes
Petite sous-unité	16S	18S (polymérase I)
Grande sous-unité	5S 23S	5S (polymérase III) 5,8 S (polymérase I) 28S (polymérase I)

4. Les ARN régulateurs

La catégorie des ARN régulateurs a connu et connaît un grand intérêt ces dernières années, en particulier grâce au mécanisme d'interférence d'ARN (*RNAi* en anglais). Pour autant certaines fonctions dans l'épissage et la maturation des ARNr étaient déjà bien établies.

Les petits ARN nucléaires

Ces ARN (*snRNAs* en anglais), sont « non codants », c'est-à-dire qu'ils ne contiennent pas de phase de lecture ouverte. Leur taille varie entre 100 et 200 nucléotides. Les ARN nucléaires de petite taille les plus étudiés sont ceux jouant un rôle dans l'épissage des ARN messagers. Ces petits ARN comme U1, U2, U4, U5, et U6 sont transcrits par l'ARN polymérase II (U1, 2, 4 et 5) ou III (cas de l'ARN U6). Le petit ARN 7SK de 331 nucléotides est produit par l'ARN polymérase III. Il participe à la régulation de la transcription des gènes contrôlés par l'ARN polymérase II.

Les petits ARN nucléolaires

Ces ARN (*snoRNA* en anglais) ne se distinguent physiquement des petits ARN nucléaires que par leur localisation nucléolaire. Leur fonction est clairement différente puisque la plupart ont pour rôle de modifier les bases (méthylation en 2' du ribose, isomérisation de l'uridine en pseudouridine) des ARNr, ARNt ou encore… de petits ARN nucléaires ! Comme les petits ARN nucléaires, ces ARN agissent en complexe avec des protéines (pour former des snoRNP). L'origine de ces ARN est également variée (chez l'homme, la plupart de ces ARN correspondent à des introns générés au cours de l'épissage d'ARNm). Il existe plusieurs centaines de ces ARN.

Fiche 47

Les petits ARN interférents

Ces petits ARN (*siRNA* en anglais) ont en commun d'être de très petite taille et surtout d'avoir une structure double brin. Ces ARN sont associés au mécanisme d'interférence et sont le résultat d'un processus biologique strictement déterminé.

Fiche 59

Les microARN

Les microARN (*miRNAs*) sont des ARN de très courte taille (20 à 30 nucléotides) produits par l'ARN polymérase II. Leur synthèse se fait par la formation d'un précurseur (pré-miARN) qui peut faire plusieurs milliers de paires de base. Ils sont la plupart du temps produits par leurs propres promoteurs dans des zones intergéniques et sont souvent complémentaires de la partie 3' d'ARNm. Chez l'homme, on estime à plus de 1 500 le nombre de ces miARNs. Ils pourraient être impliqués dans la régulation de près de 40 % de nos gènes en agissant comme des inhibiteur post-transcriptionnels. Les miARNs sont de plus en plus souvent associés à des pathologies.

Les longs ARN non codants

Ce sont des ARN de plus de 200 nucléotides. Ils agissent essentiellement en régulant l'expression de gènes en pouvant par exemple se lier à l'ADN. L'exemple le plus connu est certainement celui de Xist et Tsix qui permettent l'inactivation du chromosome X chez les mammifères.

Focus chap. 4

fiche 45

Les grandes étapes de la transcription chez les procaryotes

1. L'initiation de la transcription

Cette première étape va permettre à l'ARN polymérase de venir se fixer sur l'ADN. Cette fixation va se réaliser par la reconnaissance des séquences promotrices. C'est l'ARN polymérase procaryotique qui effectue cette reconnaissance. L'ARN polymérase est une protéine de près de 480 kDa basée sur un complexe de 5 sous-unités. Ce cœur catalytique (qui possède l'activité de transfert de nucléotides permettant la polymérisation de ribonucléotides à l'extrémité 3'OH du brin transcrit) est du type $\alpha 2\beta\beta'\omega$. Ce noyau à une forme de moufle pouvant entourer l'ADN. Pour lui permettre de reconnaître le promoteur, il faut une sous-unité supplémentaire : la sous-unité σ. L'holoenzyme ($\alpha 2\beta\beta'\omega\ \sigma$) est en équilibre avec le cœur catalytique par association/dissociation du facteur d'initiation σ (figure 1). Une bactérie comme *E. coli* possède 7 facteurs sigma différents qui permettent d'initier la transcription de gènes de manière contrôlée. Par exemple, le facteur σ54 qui sera exprimé dans des conditions de stress et va permettre la transcription de gènes permettant de remédier à une carence azotée.

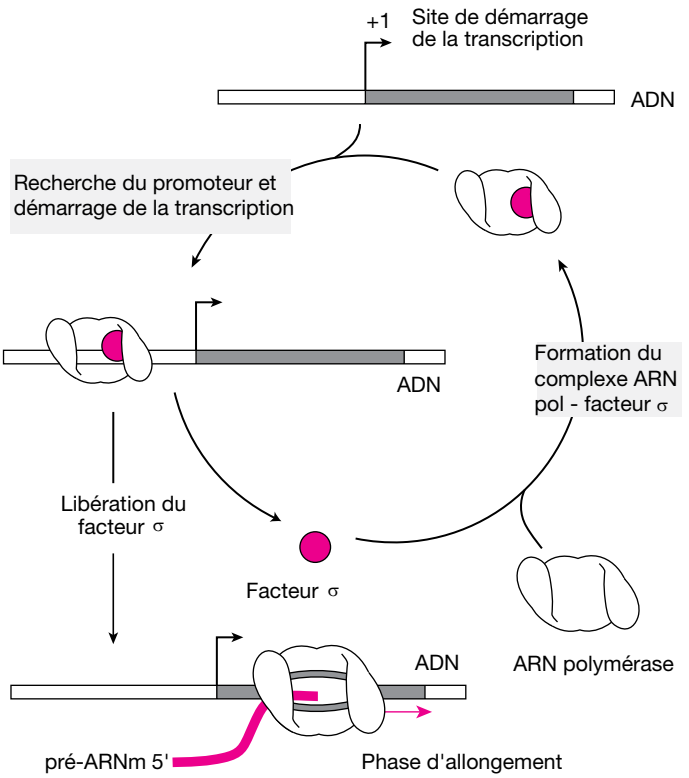


Figure 1 : Association/dissociation de l'ARN polymérase avec le facteur σ

Lors de la fixation de l'holoenzyme sur l'ADN, l'ARN polymérase va devoir faire fondre (séparer) les deux brins d'ADN sur lesquels elle s'est fixée. Cette transition d'un état fermé vers un état ouvert implique l'ouverture de la double hélice sur une longueur d'une quinzaine de nucléotides dans la région -10 qui étant riche en A et T s'ouvre plus facilement. Cette ouverture locale permet à l'holoenzyme de présenter le premier

nucléotide complémentaire du brin codant de l'ADN. À ce stade, chaque addition de ribonucléotide à l'extrémité 3' s'accompagne de la dissociation du complexe ADN/ARN/ARN polymérase provoquant ainsi l'arrêt de la transcription. Lorsque l'élongation atteint une dizaine de nucléotides, ce complexe est stabilisé. La phase d'initiation prend alors fin avec la libération du facteur σ. Cette libération permet à l'ARN polymérase d'engager la phase d'élongation.

2. L'élongation de la transcription

Pendant cette phase, l'ARN polymérase est représentée par son noyau catalytique ($\alpha 2\beta\beta'\omega$). La polymérisation s'effectue à une vitesse moyenne d'une cinquantaine de nucléotides par seconde. La polymérase recouvre une trentaine de nucléotides contenant la bulle de transcription qui représente 12-14 paires de bases. Au sein de cette bulle, l'ARN est hybridé à l'ADN sur une huitaine de nucléotides (figure 2).

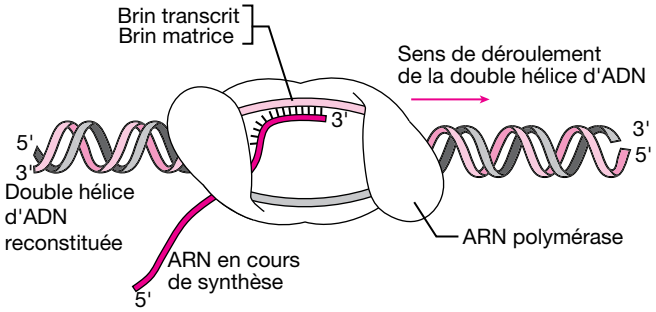


Figure 2 : Représentation de la bulle de transcription

3. La terminaison de la transcription

La fin de la transcription implique la dissociation du complexe ADN/ARN/ARN polymérase. Chez les procaryotes, il y a deux mécanismes différents pour cette terminaison.

La terminaison ρ indépendante

La dissociation du complexe est toujours possible et va donc dépendre des conditions thermodynamiques. Sur des séquences « ordinaires », celles-ci sont en faveur de la polymérisation (le mécanisme est processif et ne s'interrompt pas spontanément). En présence de terminateurs intrinsèques, l'ARN palindromique néotranscrit va se replier et former une structure en épingle à cheveux. Cette double hélice ARN-ARN va se faire au détriment de l'hétéroduplex ADN-ARN présent au sein de la bulle de transcription. Ces interactions passent alors de 8 paires de bases à 4. La séquence riche en A implique que ces 4 hybrides sont du type A-U et donc forment une interaction la plus faible possible (deux liaisons hydrogène, alors que G-C en implique trois). L'ARN peut alors se décrocher du brin ADN provoquant la fin de la transcription.

Fiche 29

La terminaison ρ dépendante

Dans ce cas, la dissociation de l'ARN polymérase dépend de la présence d'une séquence particulière (terminateur) correspondant à une structure de type épingle à cheveux qui provoque une pause de l'ARN polymérase. Cette séquence n'est pas suivie par une répétition de A et la dissociation de l'ARN au sein de la bulle de transcription ne peut se faire seule. Elle implique la protéine Rho. Cette protéine possède une activité hélicase (capable de dissocier les doubles hélices d'acides nucléiques). Elle forme un hexamère qui va se déplacer sur l'ARN jusqu'à rencontrer l'ARN polymérase et va alors terminer la transcription en dissociant l'ARN de sa matrice ADN.

fiche 46 Les grandes étapes de la transcription chez les eucaryotes

La transcription chez les eucaryotes procède du même principe que chez les procaryotes et peut aussi se décomposer en trois étapes qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. Nous allons analyser le cas de la transcription par l'ARN polymérase II.

1. Initiation : formation du pré-complexe d'initiation

L'ARN polymérase en tant que telle ne peut se fixer sur la zone promotrice. La structure du gène eucaryotique est moins conservée que les gènes procaryotiques (la conservation de nucléotides à une position donnée est moins stricte). L'initiation va se réaliser dans la zone promotrice (figure 1).

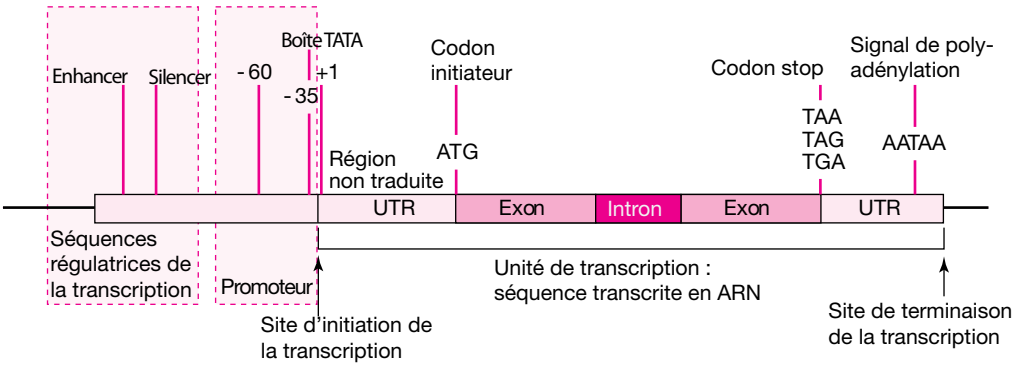


Figure 1 : Structure type d'un gène eucaryotique

Les signaux sont donc différents de ceux trouvés chez les procaryotes. Le point crucial est l'existence de la boîte TATA. C'est à partir de cette boîte que se met en place le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC en anglais). Ce complexe est basé sur la TBP (*TATA Box Binding Protein*) qui est une protéine ayant une forme en « selle de cheval ». La TBP, en association avec des facteurs ancillaires nommés TAF (*TBP Associated Proteins*) forme le complexe TFIID. Une fois lié à la boîte TATA, ce facteur stabilisé le cas échéant par TFIIA recrute le facteur de transcription TFIIB, permettant ainsi la formation d'une plateforme pouvant accueillir l'ARN polymérase. Cette dernière est elle-même un complexe multiprotéique important et associé au facteur TFIIF qui joue un rôle équivalent au facteur sigma chez les procaryotes. Le complexe présent sur l'ADN recrute alors TFIIE et TFIIH (figure 2). TFIIE permet l'ouverture de la bulle de transcription, le facteur TFIIH étant plus spécifiquement relié à la phosphorylation du domaine CTD de l'ARN polymérase II qui permet la transition vers la phase d'élongation. Ce domaine possède une répétition d'un motif riche en sérine, thréonine et tyrosine qui peuvent être phosphorylées sur leur groupe hydroxyle.

Le complexe de pré-initiation implique un dernier élément : le médiateur. Le médiateur est un complexe multiprotéique de 26 sous unités chez l'homme (ce qui correspond à un ensemble de 1,2 MDa…). Sa fonction est celle d'un co-activateur de la transcription et ce complexe permet l'assemblage de l'appareil transcriptionel. Son interaction avec l'ARN polymérase interviendra également dans sa phosphorylation.

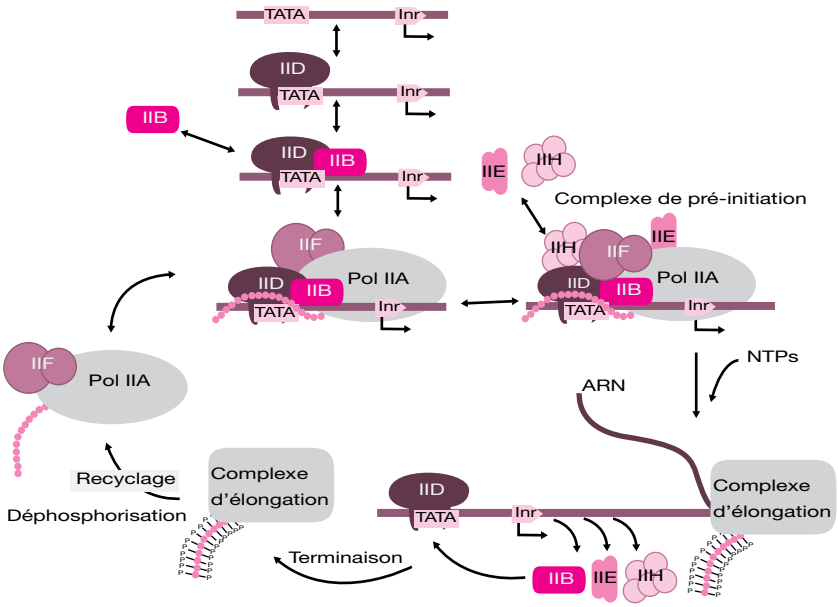


Figure 2 : Formation du complexe de pré-initiation
D'après Nikolov et Burtley, *Proc. Natl. Acad Sci.*, 1997.

2. Élongation et terminaison

La phase d'élongation implique l'augmentation de la phosphorylation du domaine CTD (figure 3). Celle-ci contient de nombreuses répétitions « YSPTSPS » qui sont substrat de kinases associées à TFIIH. Ces modifications provoquent le démarrage de la transcription par l'ARN polymérase qui se dissocie du complexe de pré-initiation. Le premier nucléotide est généralement un A.

Au cours de l'élongation, l'ARN polymérase rencontre différents facteurs protéiques qui assurent la maturation des ARN. La terminaison de la transcription est différente de ce que nous avons vu pour les procaryotes. Il n'y a pas de terminateur à proprement parler et l'ARN polymérase « décroche » plusieurs centaines de nucléotides après ce qui sera l'extrémité 3'OH de l'ARN.

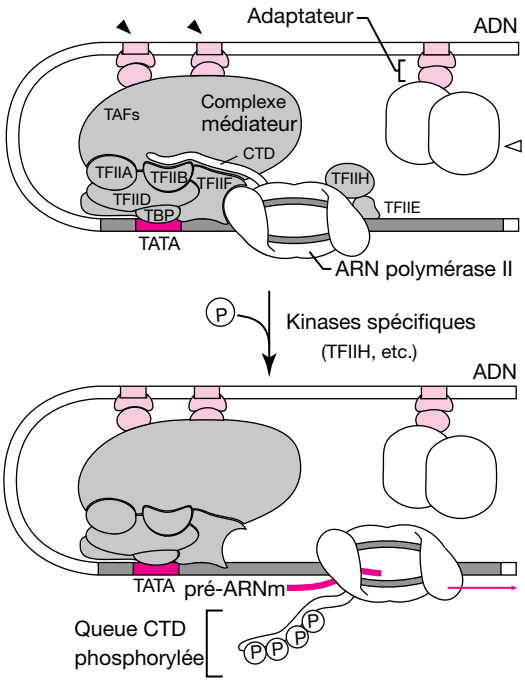


Figure 3 : Démarrage de la transcription

fiche 47

L'épissage

L'épissage est l'étape de maturation des ARN au cours de laquelle une séquence interne à l'ARN est enlevée. Cette excision nécessite une absolue précision, faute de quoi la phase de lecture pourrait être changée et donc la structure de la protéine correspondante modifiée. Ce mécanisme reconnaît des séquences spécifiques sur l'ARN et fait appel aussi à une machinerie de ribonucléoprotéines (complexes d'ARN et de protéines) : le spliceosome (de *splicing* qui signifie épissage en anglais).

1. Séquences de reconnaissance

Ces séquences forment la jonction entre l'exon et l'intron. Il y a une jonction en 5' et 3' de l'intron (à gauche et à droite respectivement sur la figure 1). Ces jonctions sont également appelées sites donneurs (en 5') et accepteur (en 3'). Sur la figure 1 est indiqué le pourcentage d'occurrence d'une base donnée au sein de chaque site. Ces sites ainsi qu'une zone riche en pyrimidine sont reconnus par 5 petites particules ribonucléoprotéiques : les snRNP U1, U2, U4/U6 et U5.

Figure 1 : Séquences consensus impliquées dans l'épissage

2. Assemblage du spliceosome

La première étape consiste en la reconnaissance par le snRNP U1 du site donneur (5'). Cette première étape est suivie par la fixation du snRNPU2 au site de branchement, cette reconnaissance étant favorisée par un facteur auxiliaire U2AF. Il est important de comprendre qu'au sein du snRNP, c'est le snARN qui permet de positionner correctement ce complexe au site choisi. Ceci est souligné dans la figure 2 en montrant l'appariement de type Watson et Crick entre le snARN U1 et le site donneur. Chaque snRNP est structuré autour d'un snARN et de protéines qui ont un rôle d'assemblage et de stabilisation du complexe pour positionner l'ARN en position ad hoc. Au sein du snRNPU2, le snARN U2 comporte une uridine modifiée (pseudouridine). Cette base se trouvant positionnée en face d'une adénine intronique, l'adénine ne pourra pas s'appareiller selon le modèle Watson et Crick. Cette singularité permet à cette adénine de remplir un rôle particulier en devenant le point de branchement.

Le recrutement de U4, U5 et U6 se fait alors *via* des interactions protéines/protéines, mais également ARN/ARN.

3. Épissage

Le complexe formé permet un réarrangement qui provoque la première réaction de transestérification. Celle-ci implique le groupe 2'OH de l'adénine du point de branchement (figure 2). La conséquence sera la formation d'un lasso et l'obtention d'une extrémité 3'OH du premier exon. La structure du spliceosome ayant conduit à cette première réaction va également permettre la deuxième réaction de transestérification (figure 2). Cette dernière réaction raboutera les deux exons et aboutira à la libération de l'intron sous forme d'un lasso qui sera ultérieurement linéarisé.

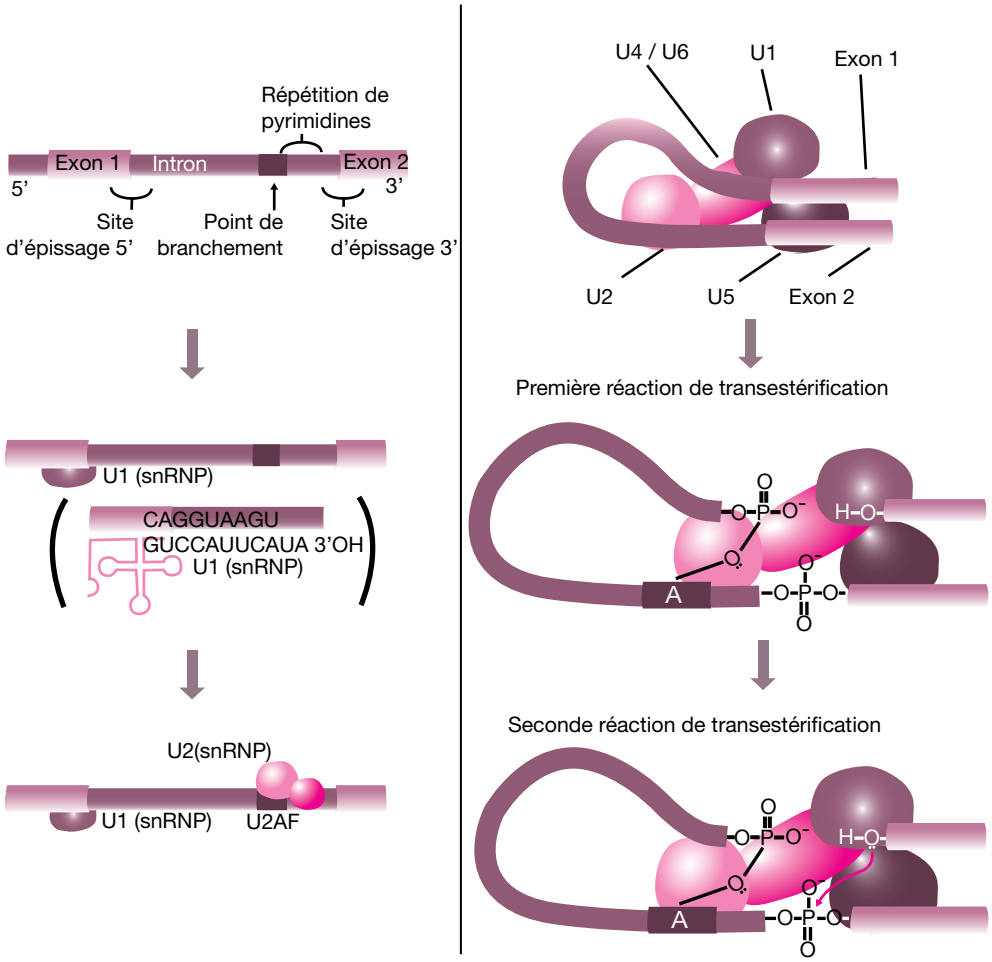


Figure 2 : Formation et action du spliceosome

4. Épissage et ARN catalytique

Le mécanisme que nous venons de décrire concerne la maturation des ARNm eucaryotiques nucléaires. L'ensemble de ces mécanismes (transestérification aboutissant à la formation d'un lasso et raboutage des exons) peut être également observé sans aucune intervention de facteurs extérieurs. Ce cas assez rare est trouvé par exemple dans des organelles comme les mitochondries. Toute la réaction se passe *in vitro* sans ajout d'extrait cellulaire. L'ARN se structure de telle manière que les deux transestérifaction se font spontanément. *In vivo*, cette réaction nécessite une protéine : la maturase. Ce type d'introns caractérise un groupe : le groupe II. Le groupe I est un troisième groupe d'introns trouvé notamment dans les ARNr des eucaryotes unicellulaires. L'épissage ne nécessite aucune protéine et est déclenché par une guanosine exogène. On parle de ribozyme pour indiquer que l'ARN est doué d'une activité catalytique. Cette découverte a valu l'obtention du prix Nobel à T. Cech et S. Altman en 1989.

fiche 48

Modification en 5' et 3' des ARNm

Les modifications dont nous allons parler concernent exclusivement les ARN messagers eucaryotiques. Chez les procaryotes, le couplage transcription-traduction implique que la traduction démarre avant la fin de la transcription et les processus de maturation n'ont donc pas l'importance qu'ils ont chez les cellules possédant un noyau.

1. Maturation de l'extrémité 5'

Ce processus se fait au cours de la transcription, lorsque l'ARN naissant est d'une longueur inférieure à une trentaine de nucléotides. L'ajout de la coiffe en 5' de l'ARN messager implique l'ajout d'une structure particulière. Cette coiffe est constituée par une guanine, mais la spécificité vient de la liaison de type 5'-5' (figure 1). Le complexe de coiffe est associé à l'ARN polymérase II et donc l'ARN naissant le contactera physiquement dès sa sortie de la machinerie de transcription. Ce complexe réalise trois modifications successives. Le clivage du phosphate γ par une ARN phosphatase terminale, le transfert d'un guanylate à partir d'un GTP grâce à la guanylyl transférase et la méthylation de cette guanine sur l'azote en position 7 par une méthyle transférase. Cette coiffe dite « de type 0 » pourra le cas échéant subir d'autres modifications comme la 0-méthylation en 2' du deuxième ou troisième ribonucléotide (coiffe de type 1 ou type 2). La coiffe ainsi que ces modifications jouent un rôle important pour différentes fonctions. L'export des ARN sera réalisé grâce à la reconnaissance de l'ARN « coiffée » par le complexe de reconnaissance de coiffe. Cette structure protège les ARN d'une dégradation par des ARNases 5'-3'. Enfin, la traduction des ARN messagers nécessite également cette modification.

2. Maturation de l'extrémité 3'

Cette maturation correspond à la polyadénylation. L'ajout de cette queue poly(A) pouvant être longue de quelques centaines de nucléotides est un mécanisme nucléaire couplé à la terminaison de la transcription. Lorsque l'ARN polymérase II arrive dans la zone 3' non traduite, elle va transcrire une suite de séquences consensus (figure 2). Ces séquences vont alors permettre une interaction avec trois complexes protéiques : CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), CF (facteur de clivage) et CSTF (*Cleavage Stimulation Factor*). Le clivage va intervenir alors que le complexe CSTF est encore associé à l'ARN polymérase II (figure 2). Cette coupure va aider à la terminaison de la transcription qui génère deux fragments d'ARN. Un fragment court qui sera rapidement dégradé, et un fragment d'ARN possédant une coiffe en 5'. Le recrutement de la poly(A)polymérase permet à celle-ci d'être positionnée idéalement pour reconnaître l'extrémité 3' de cet ARN. Elle va alors allonger cette extrémité en y ajoutant de l'AMP résultant du clivage de l'ATP et la queue poly(A) résultante sera stabilisée par une protéine s'y fixant : la PAB (*Poly(A) Binding Protein*).

La polyadénylation stabilise l'ARNm. Elle joue aussi un rôle fondamental dans sa capacité à être traduit. Chez les mammifères, la moitié des gènes possède deux sites possibles de polyadénylation permettant ainsi de changer la séquence 3' non traduite. Ceci est particulièrement important puisque cette partie de l'ARN messager peut être le lieu de l'interaction avec des miARNs. Un changement de séquence permettra donc à un ARNm d'échapper à cette régulation.

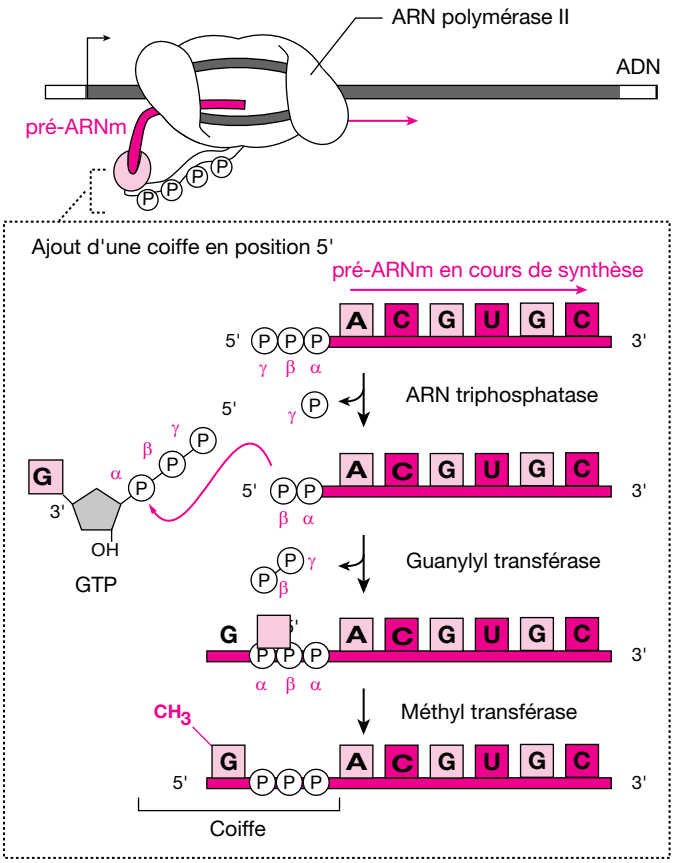


Figure 1 : Ajout d'une coiffe en 5' de l'ARNm eucaryotique

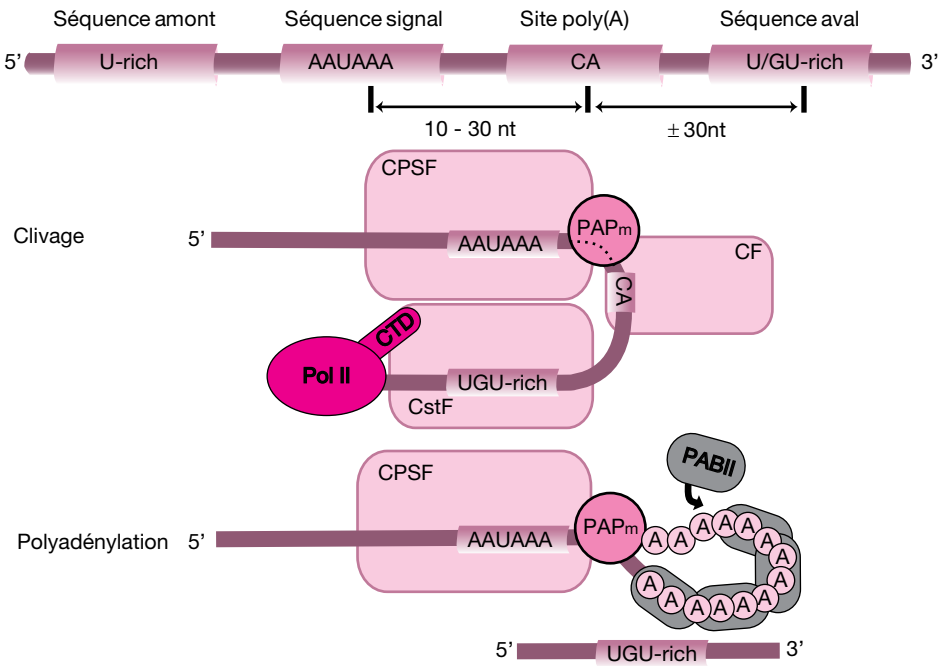


Figure 2 : Mécanisme de polyadénylation
D'après la thèse du Dr L. Minvielle-Sébastia, mai 1992.

fiche 49 Les ARNt

La fonction des ARN de transfert est intimement liée à leur structure dans l'espace. La formation de ces structures comporte plusieurs particularités

1. Biogénèse des ARN de transfert

Fiche 44

Comme nous l'avons vu, ces ARN sont transcrits par l'ARN polymérase III chez les eucaryotes. Les gènes correspondant ont une structure différente de celle des ARN transcrits par l'ARN polymérase II (figure 1). Contrairement à tous les autres gènes, les signaux de reconnaissance et de fixation de l'ARN polymérase sont internes à la séquence transcrite (figure 1). Ces deux séquences (boîtes A et B) sont reconnues par le facteur de transcription TFIIIC. Cette fixation permet le recrutement du facteur TFIIIB dont une sous-unité est la TBP. Cette fixation entraîne l'entrée de l'ARN polymérase III au site d'initiation de la transcription.

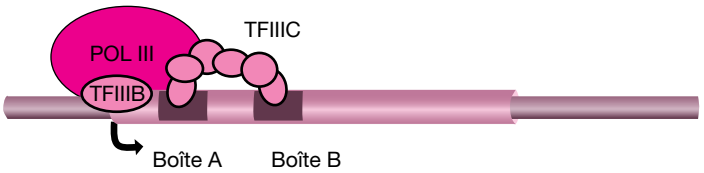


Figure 1 : Structure d'un gène d'ARNt
Avec l'aimable autorisation de M.Teichmann (IECP, Pessac).

Ces gènes sont assez nombreux et chez l'homme, on compte par exemple près de 500 gènes permettant la transcription des ARN de transfert cytoplasmiques.

2. Structure

Tous les ARNt (eucaryotiques ou procaryotiques) sont transcrits sous forme de précurseurs. Ces précurseurs subissent des coupures par des ribonucléases (endo et exonucléases). Chez *E. coli*, la RNaseP génère la nouvelle extrémité 5'P (activité endonucléasique). L'endonucléase Rnase E ou F reconnaît également une séquence en 3'et coupe l'ARN dans ce site. L'exonucléase D digère alors une dizaine de nucléotides à partir de cette extrémité 3'. Si la séquence CCA ne termine pas l'ARNt en 3', elle est ajoutée par une ARNt nucléotidyltransférase. Ces étapes sont communes aux eucaryotes et procaryotes. Toutes ces coupures nécessitent la structuration de la molécule d'ARN grâce à la formation d'ARN double brin. Ces structures « tiges-boucles » se font par appariement de bases en suivant les règles observées pour l'ADN. Certains ARNt chez les eucaryotes possèdent une séquence intronique qui est éliminée par un processus enzymatique purement protéique (équivalent à un système de coupure par enzyme de restriction et ligature par la ligase) et donc n'ayant rien de commun avec l'épissage des ARN messagers.

Les nucléotides des ARN de transfert vont eux-mêmes subir de nombreuses modifications chimiques pour aboutir à l'ARNt mature (figure 2).

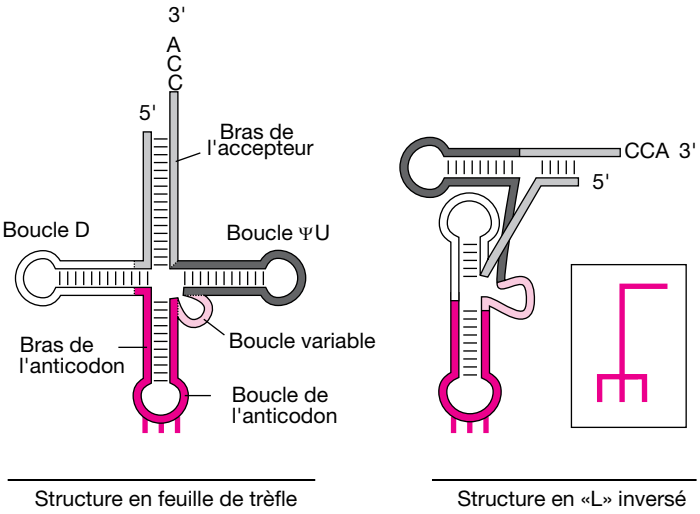


Figure 2 : Structure des ARNt

Cet ARNt se caractérise par la formation de structures tiges-boucles. La première tige de 7 paires de bases est la tige (ou bras accepteur). Elle est suivie par la tige D de 3-4 paires de bases. Cette tige porte la boucle D, riche en dihydro-uridine qui joue un rôle dans l'aminoacylation. La tige (ou bras) anti codon de 5 paires de bases est suivie de la boucle anticodon qui reconnaît et s'hybride avec l'ARNm. Une boucle de longueur variable précède la tige TΨC de 5 paires de bases. Cette tige précède la boucle ΨU (ou boucle T), riche en pseudo-uridine et thymine (seul cas où une thymine est trouvée au sein d'ARN). Cette boucle de 7 nucléotides va interagir avec la boucle D dans la formation tri-dimensionelle de l'ARNt et va également permettre la reconnaissance ARNt-ribosome.

3. Aminoacylation

Cette étape correspond à la fixation d'un acide aminé à l'extrémité 3' OH de l'ARNt (figure 3). Cette réaction de « chargement » est catalysée par une vingtaine d'amino-acyl-ARNt synthétases. Un acide aminé donné est toujours chargé par la même enzyme qui va reconnaître le ou les ARNt grâce à leur structure et à la boucle anti-codon.

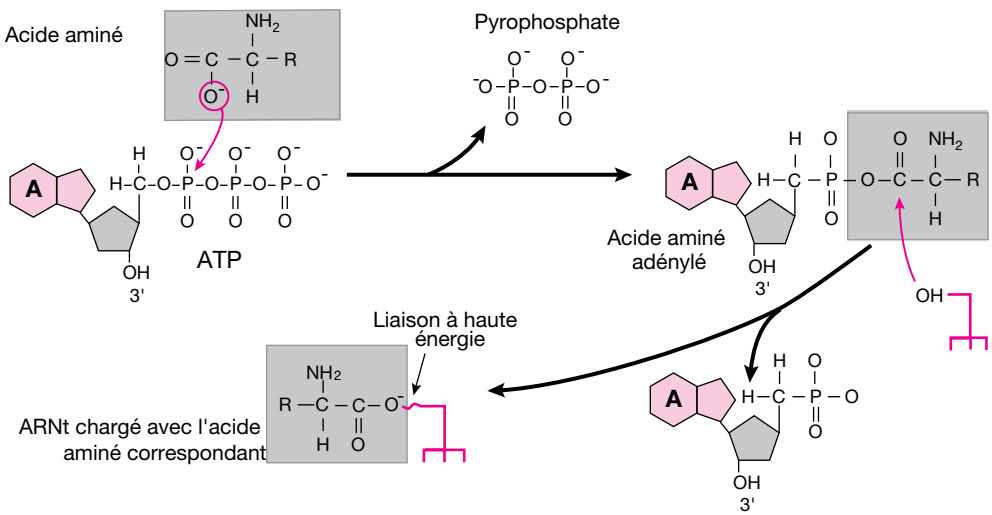


Figure 3 : Fixation des acides aminés sur l'ARNt

fiche 50

Les ribosomes

Le ribosome est le plus grand complexe ribonucléoprotéique connu. Il contient plus de 50 protéines qui forment la petite et grande sous-unité. La structure tri dimensionnelle des ribosomes est connue et a été consacrée par l'obtention du prix Nobel à V. Ramakrishnan, T. A. Steitz et A. E. Yonathen en 2009. Elle permet de confirmer la haute structuration des ARNr qui imposent la forme des sous-unités et portent l'activité catalytique permettant de créer la liaison peptidique. Les protéines sont situées à la périphérie du ribosome. Elles stabilisent l'assemblage et interagissent avec les facteurs de traduction. Que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes, les sous unités ont un rôle équivalent. La petite sous-unité décode l'information portée par l'ARNm et la grande sous-unité catalyse la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés portés par les ARNt.

1. Composition des ribosomes

Les deux sous unités (30S et 50S ou 40S et 60S respectivement chez les procaryotes et eucaryotes) ont une dimension exprimée en Svedberg. La taille importante de ces objets explique cette dimension qui exprime un coefficient de sédimentation. Ces valeurs ne sont donc pas additives (les ribosomes procaryotiques et eucaryotiques ont une taille respective de 70S et 80S. La figure 1 résume ces dimensions et indique les masses correspondantes ainsi que la composition brute de ces complexes.

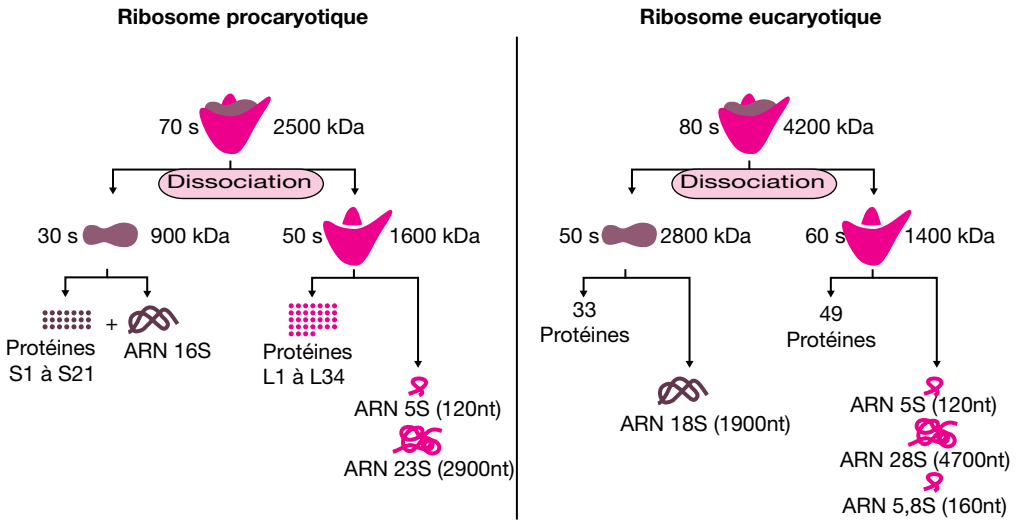


Figure 1 : Constitutions des ribosomes pro et eucaryotes

Les ribosomes peuvent exister à l'état dissocié (les deux sous-unités séparées) ou assemblés sur l'ARN messager. Lorsqu'un ARNm est traduit simultanément par plusieurs ribosomes, l'ensemble est appelé un polysome.

Les ribosomes représentent jusqu'à 40 % de la masse sèche d'un procaryote. Leur quantité représente un enjeu en terme de régulation puisque la cellule doit coordonner la production de protéines et d'ARNr. Cet ajustement implique la molécule de ppGppp

et est connu sous le nom de contrôle stringent : il évite de fabriquer trop de ribosomes dans des conditions de carence où il n'y a pas beaucoup d'acides aminés disponibles pour la synthèse protéique.

Chez les eucaryotes, les ARNr sont transcrits dans une région particulière du noyau : le nucléole. Les précurseurs sont clivés et les bases modifiées (méthylation de l'oxygène du ribose en 2' et pseudo-uridylation des uraciles) par des snoRNAs. Il est admis que plus de 70 snoRNAs sont impliqués dans la biogénèse des ARNr. L'assemblage des protéines se déroule lors de l'export du noyau vers le cytoplasme et implique l'existence de précurseurs pre-60S et pre-40S.

Fiche 44

2. Fonction des ribosomes

Le ribosome catalyse la formation de la liaison peptidique (figure 2). On représente classiquement le ribosome comme dans la figure 2. On considère l'existence de trois sites permettant la liaison des ARNt. Le site A (pour aminoacyl) permet l'entrée de l'ARNt chargé d'un acide aminé. Le site P (pour peptidyl) est le site où l'on trouvera un ARNt portant un acide aminé lié à la chaîne peptidique en cours d'élongation. Enfin, le site E (exit) contient l'ARNt « déchargé » avant sa libération par le ribosome.

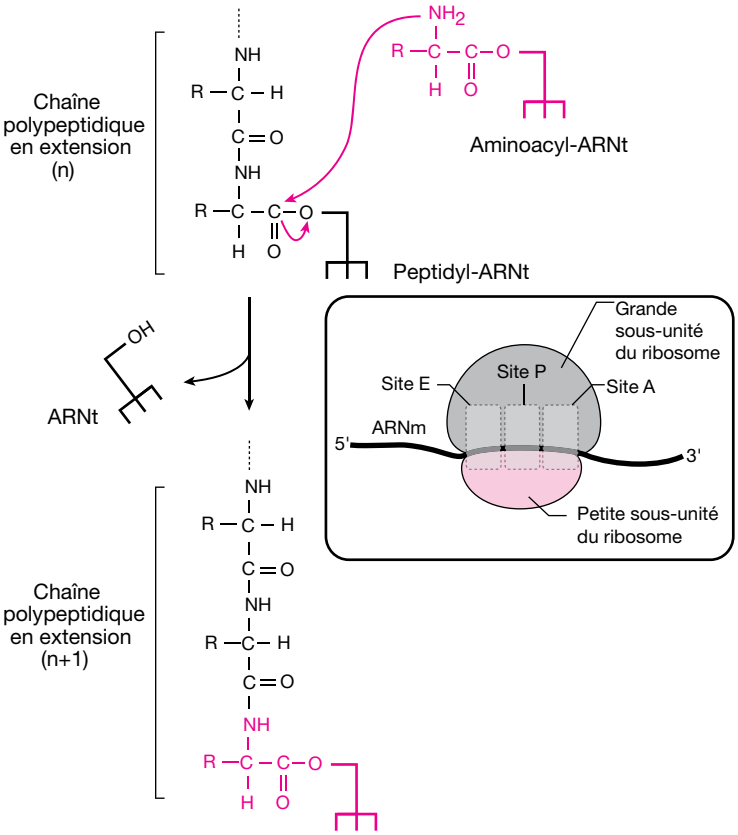


Figure 2 : Le ribosome relie l'ARNm et les ARNt pour catalyser la formation de liaison peptidique

fiche 51

Les grandes étapes de la traduction

1. Initiation

Cette première étape est très différente chez les eucaryotes et les procaryotes. Chez les procaryotes (figure 1), la reconnaissance du codon initiateur (AUG) est due à l'appariement entre l'ARNr 16S de la petite sous-unité et une séquence sur l'ARNm située à quelques nucléotides de l'AUG : la séquence Shine & Dalgarno ou encore RBS (*Ribosome Binding Site*). Trois facteurs d'initiation (IF1, 2 et 3) facilitent cette initiation. IF2 reconnaît un ARNt de structure légèrement différente qui est lié à un acide aminé modifié : la N-formyl-méthionine. Cet ARNt initiateur se positionne au site P grâce à la stabilisation apportée par IF1, IF3 permettant le maintien de la sous-unité 30S dissociée de la grande sous-unité. La présence de l'ARNt initiateur au site P modifie légèrement la structure du ribosome qui va se dissocier de IF3 permettant alors le recrutement de la grande sous-unité. L'assemblage du ribosome complet s'accompagne du départ des facteurs IF2 et IF3, finissant ainsi le cycle de l'initiation.

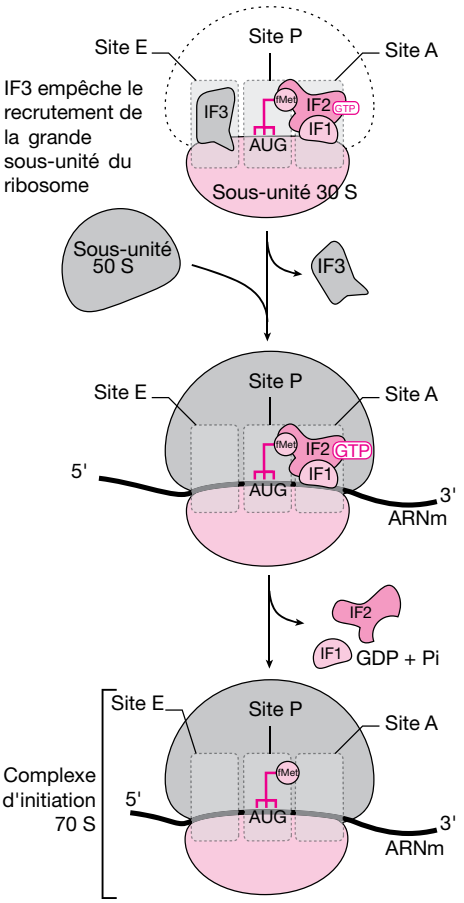


Figure 1 : Initiation de la traduction chez les procaryotes

Chez les eucaryotes, la petite sous-unité 40S ne reconnaît pas une séquence interne, mais se fixe au contraire à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ce mécanisme implique la coiffe qui est reconnue par le facteur eiF-4F (lui-même composé de trois protéines distinctes, eIF4E, eIF4A et eIF4G). eIF4F reconnaît également la PAB qui est fixée à la queue poly(A) provoquant une circularisation de l'ARNm traduit.

L'autre partie du complexe est formée par la petite sous-unité du ribosome. Celle-ci fixe le Met-ARNti (ARNt initiateur chargé), eIF2 et une molécule de GTP grâce aux trois autres facteurs d'initiation eIF1A, eIF1 et eIF3. Cet ensemble forme le complexe 43S. Cet ensemble se relie à l'extrémité 5' en se complexant avec le facteur eiF4G. Le complexe va alors se déplacer sur le brin d'ARN. Au cours de cette progression l'activité hélicase de eIF4A permet de dénaturer les structures secondaires de l'ARNm. Lorsque le complexe arrive au codon d'initiation AUG (qui est encadré par un consensus formant la séquence dite de Kozac ACC**AUG**A), eIF5 catalyse l'hydrolyse du GTP entraînant la dissociation de ce complexe. La sous-unité 60S s'assemble alors pour former le ribosome 80S. Comme chez les procaryotes, l'ARNt initiateur a une structure légèrement différente qui lui confère ses propriétés.

2. Élongation et terminaison

Chez les procaryotes, ce mécanisme implique les facteurs EF-Tu et EF-G. Chez les eucaryotes ce rôle est joué à l'identique par eEF-1 et eEF-2. L'élongation implique l'arrivée d'un ARNt chargé au site A par une reconnaissance codon-anticodon. Cette entrée est rendue possible par la formation du complexe EF-Tu, aminoacyl ARNt-GTP. Après formation de la liaison peptidique, le peptide en cours de synthèse se trouve au site A. EF-G lié au GTP assure le déplacement du ribosome de trois nucléotides en hydrolysant son GTP. Cette migration positionne l'ARNt déchargé au site E, l'ARNt avec la chaîne peptidique au site P et le site A sera libre pour un nouveau cycle (figure 2).

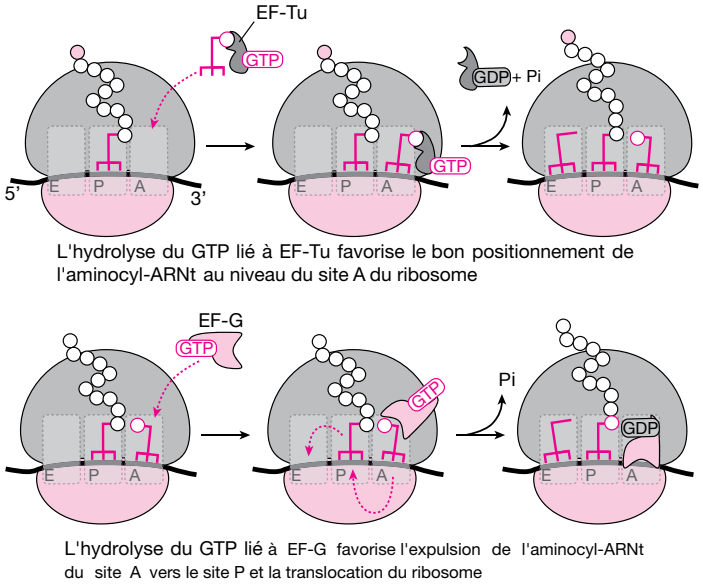


Figure 2 : Élongation de la traduction

Lorsqu'un codon stop se trouve au site A, à la place d'un ARNt pouvant reconnaître le codon, c'est un facteur de terminaison de traduction qui est choisi. À l'aide d'un deuxième facteur fixé à une molécule de GTP, il catalyse l'hydrolyse de la liaison entre l'ARNt et la protéine qui est libérée en même temps que le GTP est hydrolysé.

fiche 52 Les modifications post-traductionnelles

Après l'étape de traduction, les protéines peuvent subir des modifications. Ces changements jouent sur le repliement de la protéine, son association avec d'autres protéines (structure quaternaire) mais également sur sa localisation ou sa durée de vie. L'ensemble des modifications possibles est absolument gigantesque et ne peut être abordé de manière exhaustive. Il faut garder en tête que seulement un petit pourcentage de protéines ne subira pas une de ces modifications.

1. Modification par ajout d'un groupe réactif : la phosphorylation

Fiches 29, 62 et 63

L'ajout de nouveaux groupes va permettre à la protéine de changer sa capacité d'interaction avec des partenaires cellulaires. Nous avons déjà vu des modifications comme l'acétylation et la méthylation et son rôle dans la compaction de la chromatine.

Fiche 93

Parmi les modifications fréquemment trouvées et utilisées dans des processus de régulation, l'ajout d'ubiquitine est un processus également utilisé pour contrôler la dégradation ou la localisation d'une protéine.

L'exemple de la glycosylation et son rôle dans la sécrétion feront l'objet d'une fiche à part.

Fiche 89

La phosphorylation est un processus également extrêmement utilisé par la cellule pour changer les propriétés des protéines. On estime à plusieurs milliers le nombre de protéines pouvant être ainsi modifiées. Cette phosphorylation est réversible. Elle est réalisée par une classe d'enzyme (les kinases), la déphosphorylation étant effectuée par les phosphatases. Dans une cellule humaine, on compte plus de 500 kinases qui vont reconnaitre différents sites consensus de phosphorylation. Pour l'essentiel, ces phosphorylations seront réalisées par addition d'un groupement phosphate sur la fonction hydroxy des sérines, thréonines et tyrosines (figure 1).

Fiches 46, 140 et 90

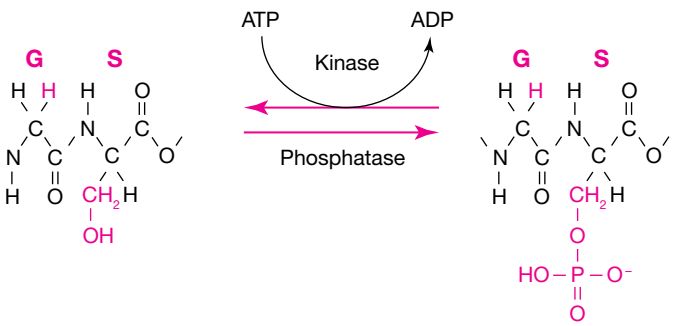


Figure 1 : Action des kinases et phosphatases

2. Modification par protéolyse

Si les ARN subissent des processus de clivage, les protéines peuvent également y être soumises.

Fiche ???

Certaines protéolyses sont impliquées dans le ciblage de protéines dans des compartiments cellulaires (voire translocation), mais la protéolyse peut également être impliquée dans l'acquisition de fonction de protéines. C'est le cas bien connu de la production d'insuline. Cette hormone polypeptidique est formée de deux peptides de 21 et 30 acides aminés. Ces deux peptides sont reliés par deux ponts disulfures (figure 2).

L'insuline est produite à partir d'un précurseur : la pré-pro-insuline. Lors de la translocation dans le réticulum endoplasmique, la séquence signal est clivée pour générer la pro-insuline. Celle-ci subira d'autres protéolyses dans les vésicules de sécrétion pour éliminer le peptide C (31 acides aminés) et générer ainsi un dipeptide à partir d'un seul précurseur.

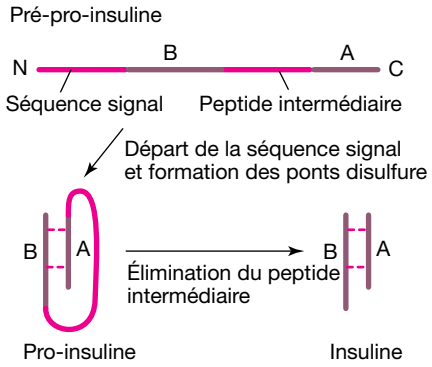


Figure 2
Production de l'insuline

2. Modification aminoterminale

Chez les eucaryotes, le clivage de la méthionine initiatrice en position N-terminale et l'acétylation de l'extrémité N-terminale représentent les modifications les plus courantes (touchant les 2/3 d'un protéome donné et 80 % des protéines cytosoliques respectivement). Le clivage aminoterminal éliminant la méthionine par une méthionine aminopeptidase est la plupart du temps un mécanisme co-traductionel.

Chez les procaryotes, la formyl-méthionine N-terminale est d'abord déformylée par une peptide déformylase. La méthionine aminopeptidase peut alors prendre le relais.

Dans les deux cas, le clivage dépend de l'acide aminé en deuxième position (tableau 1). Schématiquement, l'élimination de la méthionine s'observe lorsque le deuxième acide aminé est de petite taille ou non chargé.

Tableau 1 : Élimination de la méthionine amino-terminale chez les eucaryotes et les procaryotes

	Gly	Ala	Ser	Cys	Thr	Pro	Val	Asp	Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	His	Phe	Lys	Tyr	Trp	Arg	Met
Proc	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Euca	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

fiche 53

Les méthodes d'étude du transcriptome

Le transcriptome représente l'ensemble des ARN transcrits à un moment donné. Son étude peut être exhaustive ou limité à une classe d'ARN. Cette analyse repose essentiellement sur l'utilisation de « puces à ADN » ou le séquençage direct, même si l'analyse par la méthode SAGE a été historiquement importante.

1. Méthode SAGE

Cette méthode (*Serial Analysis of Gene Expression*) ne s'intéresse initialement qu'aux ARNm polyadénylés. Elle consiste à préparer un ADN complémentaire bicaténaire (ADNc) à partir d'ARN poly(A) (figure 1).

Cet ADNc subit ensuite différentes étapes de coupures et d'addition d'oligonucléotides afin de générer des fragments d'ADN de petite taille (typiquement 10 nucléotides). Ces étiquettes sont alors concaténées de manière à obtenir des fragments d'ADN qui sont clonés et séquencés.

Fiche 38

Chaque étiquette étant spécifique d'un gène, le nombre de fois où cette étiquette est trouvée est directement proportionnelle à la fréquence de l'ARN dans la population de départ.

Cette méthode est intéressante car elle ne nécessite aucune connaissance préalable du génome et permet de comparer le transcriptome de n'importe quel organisme dans deux conditions différentes. L'inconvénient est que cette approche ne s'adresse qu'aux ARN messagers.

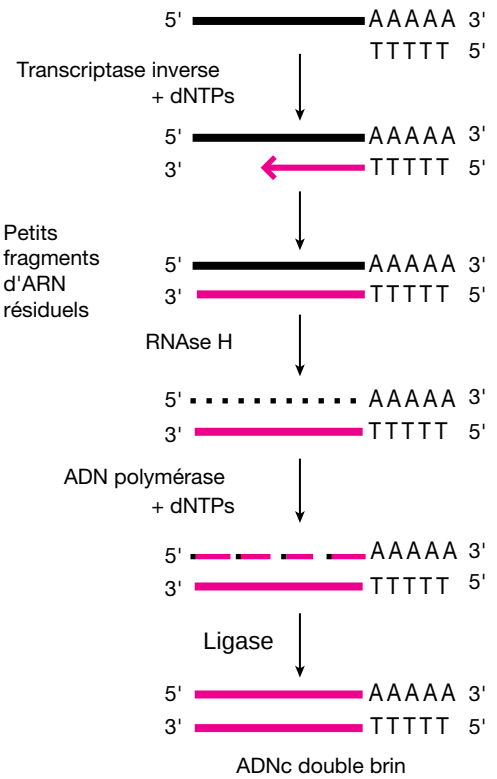


Figure 1 : Synthèse d'un ADNc

2. Analyse par « puce à ADN »

Cette analyse est basée sur la technique classique d'hybridation par appariement de type Watson et Crick. Sa spécificité vient de la miniaturisation de la méthode. La « puce à ADN » est en fait une plaque de verre ou de silice équivalent à une lame de microscope. Sur cette lame, des technologies appropriées vont permettre soit la synthèse, soit la fixation de courts fragments d'ADN. Chaque dépôt ou synthèse est effectué dans une zone restreinte de la lame. Une fois cette étape réalisée, l'opérateur sait qu'aux coordonnées en X et Y de la lame correspond par exemple un oligonucléotide complémentaire d'un gène donné. Dans ce type d'approche, la sonde ADN fait typiquement une trentaine de nucléotides de longueur. On peut synthétiser jusqu'à 300 000 oligonucléotides sur une surface d'environ 1 cm^2 ! Cette densité permet donc de pouvoir analyser l'expression

de tous les gènes d'un organisme donné simultanément. Dans l'exemple de la figure 2, les ARN messagers de deux populations de levures sont marqués par des fluorochromes différents, cyanine 3 et cyanine 5. Cette approche permet de mesurer une différence de niveau d'expression de cellules de levure placées dans deux conditions différentes. Si les fluorescences dues à la cyanine 3 et à la cynanine 5 sont équivalentes, c'est que le gène est exprimé au même niveau. Un déséquilibre entre ces deux fluorescences indiquera une différence d'expression et donc une régulation transcriptionelle. Cette méthode nécessite bien évidemment de connaître la séquence du génome afin de pouvoir synthétiser les amorces correspondantes aux différents gènes. On peut aussi mesurer le niveau d'expression de petits ARN par cette technique.

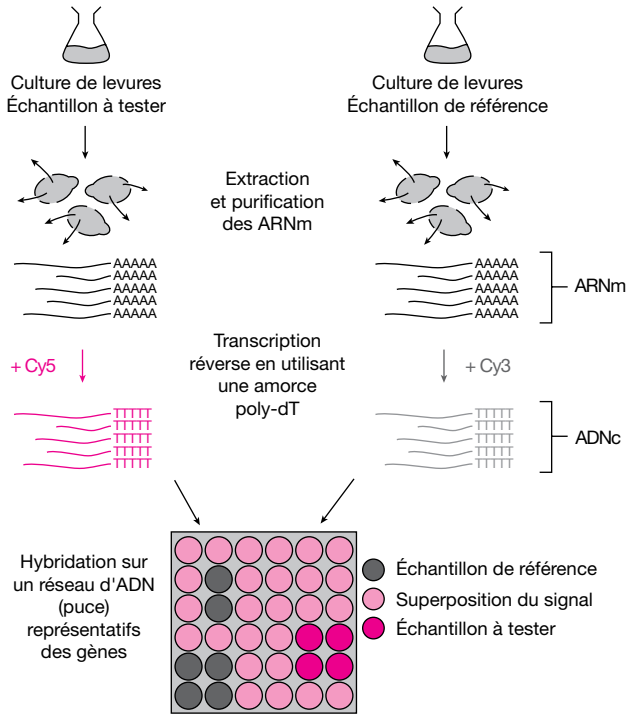


Figure 2 : Analyse du transcriptome par une puce à ADN

Dans cet exemple les « spots » rose vif indiquent une expression plus forte dans l'échantillon à tester, les « spots » gris correspondant à une expression plus faible.

3. Séquençage d'ARN

Cette approche est basée sur les techniques de séquençage à haut débit.

À partir des ARN, la première étape consiste à générer un ADNc. L'utilisation d'amorces peut permettre de ligaturer à un ARN quelconque une séquence en 3' qui jouera un rôle équivalent à la séquence poly(A) des ARNm pour la synthèse d'ADNc. Le séquençage direct de ces ADN est particulièrement bien adapté à des séquences courtes comme celle des petits ARN, et permet également d'analyser le profil d'expression d'organismes dont le génome n'est pas séquencé.

Fiche 39

fiche 54

Les méthodes d'étude du protéome

Le protéome se définit comme l'ensemble des protéines exprimées à un instant donné dans une cellule ou un tissu. Son étude permet de mesurer les variations quantitatives et qualitatives d'une espèce protéique donnée. La variation quantitative est la plupart du temps corrélée à la variation du transcriptome, l'abondance d'une protéine étant presque toujours proportionnel à l'abondance de l'ARNm correspondant. L'analyse qualitative ne peut en revanche être abordée autrement. Cette analyse permet de connaître les modifications post-traductionelles qui peuvent influer sur l'activité cellulaire.

1. Gels bidimensionnels

Fiche 25

Ces gels permettent de séparer les protéines selon deux critères. Le premier critère est celui de la charge des protéines. Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide de large porosité en présence d'ampholytes.

Le deuxième est celui de la taille. Cette séparation est réalisée grâce à un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence d'un détergent fort comme le *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS).

Les protéines se répartissent alors sous forme de tâches. Ces dernières sont révélées par des colorants spécifiques (nitrate d'argent, bleu de coomassie…). L'identification de chaque tâche doit alors être entreprise.

2. Spectrométrie de masse

Chaque tâche est découpée et la protéine séparée de son support physique. La protéine est alors digérée par des endoprotéase comme la trypsine. Les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse. Cette technique est basée sur la mesure du temps de vol des protéines préalablement ionisées. Ce temps étant directement proportionnel à la masse, celle-ci peut être déduite avec une précision du dixième de Dalton. Différents algorithmes permettent alors de comparer le profil obtenu avec celui qui l'aurait été avec des protéines répertoriées dans des bases de données.

3. Puces à protéines

Le principe de base est équivalent à celui d'une puce à ADN. La première étape consiste à produire chaque protéine d'un génome en fusion avec une étiquette. Ceci a pu être fait pour des organismes comme la levure *S. cerevisiae.* Chaque protéine étiquetée est fixée grâce à son étiquette sur un support approprié. La densité peut être extrêmement importante (chaque dépôt pouvant atteindre 150 µm de diamètre). Ce type de puce peut être incubé par exemple avec une kinase dont la présence sera révélée par un anticorps. La présence de l'anticorps à un endroit donnée indiquera que la protéine correspondante est substrat de la kinase. Ce type d'approche permet de rechercher au sein d'un protéome les espèces interagissant avec une molécule donnée.

4. Purification de complexes

La technique la plus communément utilisée est celle du « TAP-TAG ». Cette approche permet de purifier des complexes dans des conditions natives et donc permet de dresser une carte d'interactions physiques. Le système est basé sur la production d'une protéine

« appât » doublement étiquetée (figure 1). Les deux étiquettes sont la *Calmoduline Binding Protéine* (CBP) et la protéine A. Cette dernière se fixe sur une colonne d'immunoglobuline avec le complexe éventuel (cette purification se fait dans des conditions natives). L'élution du complexe est réalisée par clivage endoprotéolityque grâce à la TEV. Cette protéase reconnaît spécifiquement une courte séquence entre les deux étiquettes. Une seconde purification par affinité (et donc dans des conditions natives) va permettre de fixer et d'éluer le complexe protéique en jouant sur la concentration de calcium.
Cette approche a été réalisée sur l'ensemble des protéines exprimées par un organisme et a permis de dresser des cartes d'interactions accessibles dans des bases de données.

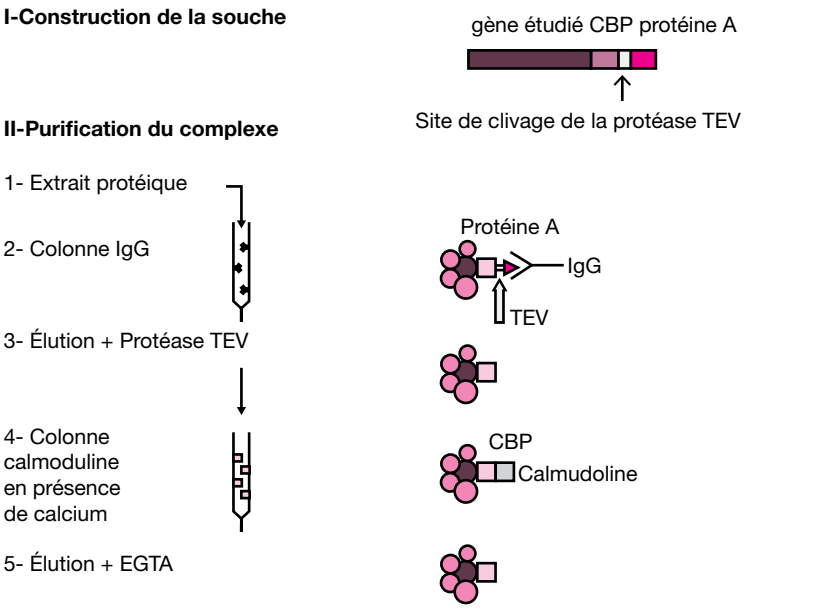


Figure 1 : Principe du « TAP-TAG »

Human Proteome Project

L'ADN est une seule molécule, certes de taille importante mais qui possède une séquence définie pour chaque individu. Les protéines sont les produits des gènes mais les modifications post-transcriptionnelles et post-transcriptionelles sont très complexes et beaucoup plus nombreuses que ce que l'on imaginait il y a encore 10 ans. La connaissance exhaustive du protéome humain, le *human proteome project*, sera donc une aventure longue et coûteuse qui nécessitera la coopération des chercheurs du monde entier.

FOCUS Les protéinopathies

L'étude du repliement des protéines est un domaine scientifique qui englobe aussi bien les questions fondamentales (existe-t-il des règles universelles, particulières, quelles sont les forces contrôlant ce phénomène…) qu'appliqués (comment stabiliser telle ou telle protéine d'intérêt biologique…).

À ce champ fertile et historique qui est presque par définition trans disciplinaire (allant de la génétique à la biologie structurale), il faut maintenant ajouter un nouveau domaine. Celui-ci repose sur un constat alternatif à celui classiquement enseigné dans les premiers cycles universitaires. Au lieu d'associer une organisation spatiale à une séquence protéique donnée, nous constatons que dans un grand nombre de cas, il existe plusieurs organisations structurales pour une unique séquence. Il est indéniable qu'une grande partie de l'attention portée à ce phénomène tient aux répercussions dramatiques de la maladie dite de la vache folle et de son potentiel de transmission à l'homme. Pour autant, les Encéphalopathies Spongiforme Transmissibles, appartiennent à la grande famille des pathologies liées au mauvais repliement des protéines au même titre que la plupart des amyloïdoses (Maladie d'Alzheimer, Chorée de Huntington, Maladie de Parkinson, Sclérose latérale amyotrophique…).

De manière intéressante, les retombées des recherches sur un type de maladie dépassent largement le cadre de celle-ci et montrent de façon insistante une convergence et l'existence de processus similaires. L'énumération même partielle de ces pathologies essentiellement neurodégénératives montre également à quel point les questions fondamentales font écho à des angoisses et des interrogations sociétales.

Au regard de la bibliographie, de plus en plus de données convergent vers un mécanisme moléculaire universel pour ces pathologies. Celles-ci impliquent de manière récurrente les mêmes grandes fonctions que sont l'élimination de protéines anormales et la formation d'agrégats protéiques.

De nombreuses recherches tentent de comprendre le lien entre cette agrégation et la formation d'espèces toxiques pour la cellule. S'il est maintenant clair que certaines protéines peuvent adopter des structures secondaires, tertiaires et quaternaires différentes, il n'est pas pour autant évident de comprendre en quoi ces structures peuvent être délétères.

Dans l'état actuel des connaissances, deux hypothèses peuvent rendre compte de cette toxicité. Dans certains cas, l'agrégation protéique provoque une co-agrégation d'autres facteurs protéiques essentiels à la vie cellulaire. Cette déplétion peut à son tour entraîner un dysfonctionnement voire la mort de la cellule. L'autre hypothèse repose sur la formation d'intermédiaires lors de l'agrégation protéique. Ces intermédiaires peuvent interagir avec les lipides des membranes et provoquer une perturbation de celle-ci pouvant alors conduire à une dérégulation cellulaire.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

4.1 Le code génétique est dégénéré car :

- ☐ a. un codon peut permettre l'incorporation de plusieurs acides aminés
- ☐ b. un acide aminé peut être codé par plusieurs codons
- ☐ c. le code est différent chez la mitochondrie

4.2 Les petits ARN nucléaires peuvent :

- ☐ a. coder pour des petites protéines
- ☐ b. être transcrits par l'ARN polymérase II
- ☐ c. être impliqués dans la réaction d'épissage

4.3 Les micro ARNs :

- ☐ a. sont transcrits sous forme de long précurseur
- ☐ b. permettent la coupure des ARN cibles
- ☐ c. forment des ARN matures de 20 à 30 bases

4.4 L'ARN polymérase procaryotique :

- ☐ a. initie la transcription au codon AUG
- ☐ b. se fixe sur la boite « TATA »
- ☐ c. s'associe au facteur sigma pour initier la trascription

4.5 Le brin matrice :

- ☐ a. a la même séquence que l'ARN produit
- ☐ b. est complémentaire de l'ARN produit
- ☐ c. est un ARN

4.6 La terminaison de la transcription chez les procaryotes :

- ☐ a. s'observe au codon STOP
- ☐ b. implique toujours le facteur ρ
- ☐ c. est due à la formation de structure tige-boucle de l'ADN
- ☐ d. nécessite la structuration de l'ARN transcrit

4.7 Le domaine CTD de l'ARN polymérase II :

- ☐ a. est phosphorylé par l'intermédiaire du facteur TFIIH
- ☐ b. contient la répétition du motif YSYSSPY
- ☐ c. permet à l'ARN polymérase d'initier la phase d'élongation

4.8 L'épissage des ARN nucléaires :

- ☐ a. implique la reconnaissance de l'ARN par des snRNP grâce à des interactions ARN-protéines
- ☐ b. aboutit à la formation d'un lasso
- ☐ c. implique la formation de deux réactions de transestérification

4.9 L'extrémité 5' des ARN :

- ☐ a. est toujours protégée par une coiffe
- ☐ b. est clivée
- ☐ c. commence toujours par un G

4.10 L'ARNt initiateur :

- ☐ a. est lié à la formyl-méthionine
- ☐ b. a une structure particulière
- ☐ c. se fixe au site A

Réponses

4.1 **b**. La dégénérescence du code vient de la possibilité pour un acide aminé d'être associé à différents ARNt et donc d'être spécifié par différents codons. Dans la mitochondrie le code est différent et aussi dégénéré !

4.2 **b**, **c** et **a**. Les petits ARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II et III. U1, 2, 4, 5 et 6 sont impliqués dans l'épissage.

4.3 **a** et **c**. Ce sont les siARN qui provoquent une coupure.

4.4 **c**. Attention à ne pas confondre transcription et traduction. Le début de la transcription va produire une extrémité 5' non codante qui précédera le codon AUG d'initiation de la traduction. La boîte TATA se retrouve chez les eucaryotes.

4.5 **b**. Le brin matrice est le brin d'ADN qui est copié et où se trouve physiquement l'ARN polymérase. L'ARN produit est donc complémentaire

4.6 **d**. Là encore, ne pas confondre transcription et traduction. La structure tige-boucle ne s'observe pas sur l'ADN mais sur l'ARN qui vient juste d'être transcrit et qui va agir comme un « décapsuleur ».

4.7 **a** et **c**. Le domaine CTD de l'ARN contient la répétition du motif YSPTSPS. Une fois le complexe d'initiation formé, il faut que le domaine C-terminal soit phosphorylé pour amorcer la phase d'élongation.

4.8 **b** et **c**. Les introns nucléaires sont reconnus par les snRNP grâce aux interactions entre snARN et séquence de l'intron.

4.9 Attention, les ARNs produits par l'ARN pol I et III ne sont pas « coiffés » ! Il n'y a pas de clivage en 5' des ARN.

4.10 **b** et **c**. L'ARNt initiateur a une structure particulière qui lui permet de se positionner au site P. C'est le seul ARNt qui ne « rentre » pas par le site A qui est reconnu par des facteurs d'initiation de la traduction. Chez les procaryotes, il est lié à la formyl-méthionine, mais chez les eucaryotes, c'est une méthionine.

Chapitre 5

Le contrôle de l'expression des gènes

Objectifs

Toutes les cellules d'un organisme aussi complexe que l'homme dérivent d'une seule cellule. L'information génétique stockée sous forme ADN va donc autoriser différents programmes et aboutir à générer des cellules très différentes les unes des autres. Cette différenciation repose sur différents mécanismes fondamentaux comme l'épissage, la modification de la chromatine, le contrôle de la transcription, mais aussi sur des phénomènes plus « exotiques » comme l'édition. Différentes méthodes d'analyse ont été développées pour étudier ces mécanismes.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 55 Le contrôle de la transcription chez les procaryotes

La transcription peut être régulée de manière positive ou négative. Pour une régulation positive, les facteurs modulant la transcription agissent en la stimulant. En leur absence, la transcription est donc faible. À l'inverse, dans le cadre d'une régulation négative, les facteurs de régulation inhibent la transcription et donc leur absence provoque une augmentation de celle-ci. En plus de ce type de régulation, l'existence d'un couplage transcription traduction permet aussi le phénomène d'atténuation.

1. Régulation positive et négative : l'opéron lactose

Cet opéron régule l'expression de trois gènes permettant d'utiliser le lactose comme source de carbone. Les trois phases codantes permettent la production de la ß-galactosidase (*lacZ*), la perméase (*lacY*) et une transacéthylase (*lacA*). Le promoteur permettant l'expression de ces trois protéines est sous contrôle de deux régulateurs : l'activateur CAP (*Catabolic Activator Protein*) et le répresseur LacI.

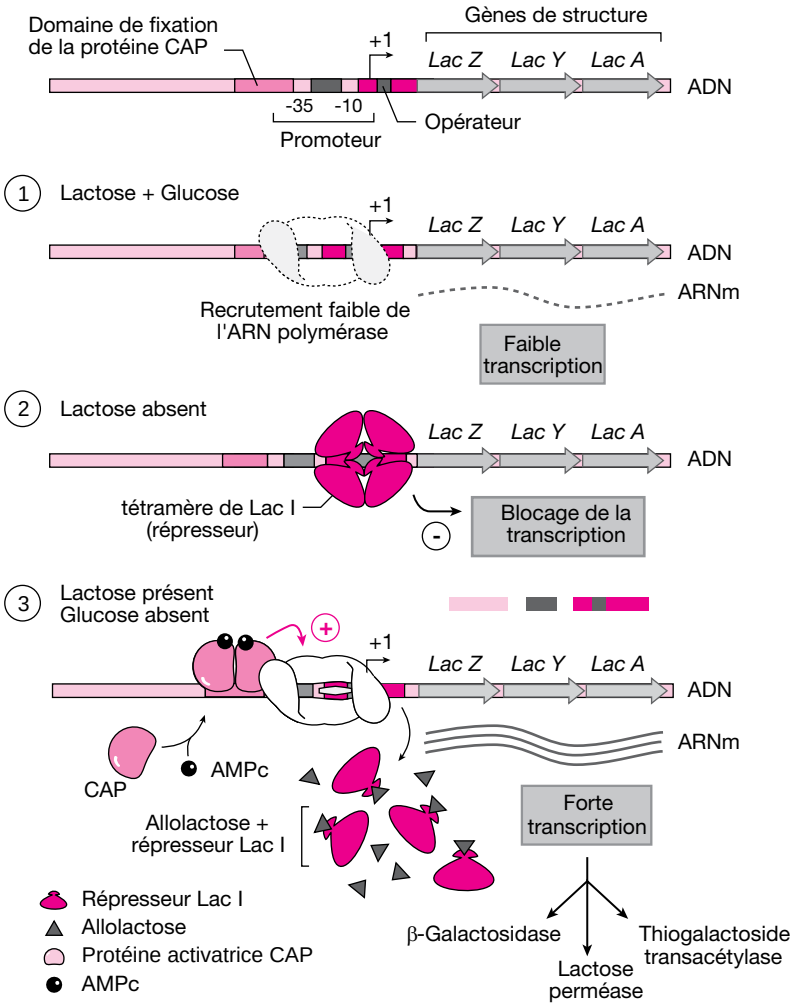


Figure 1 : Opéron lactose

Activateur CAP

Cette protéine se fixe en amont du promoteur (figure 1). Sa présence permet alors un recrutement plus efficace de la polymérase : il y a donc activation de la transcription. Ce régulateur est contrôlé par la quantité d'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc en se fixant sur CAP, provoque un changement de structure. CAP devient alors actif. Le niveau d'AMPc étant lui-même relié à la concentration en glucose (sa concentration est inversement proportionnelle à celle du glucose), l'activation de l'opéron sera observée en absence de glucose. Ce mécanisme favorise l'utilisation de glucose par rapport à d'autres sources de carbones moins efficaces.

Répresseur LacI

Cette protéine est sensible à la quantité de lactose présent dans la bactérie. Le lactose interagit directement avec la protéine LacI et provoque sa stabilisation dans une conformation inactive. En son absence, LacI adopte une autre forme dans l'espace. Dans cette conformation un tétramère se forme et se fixe sur l'ADN, empêchant ainsi la transcription de l'opéron. Ce mécanisme évite de produire inutilement les enzymes en absence de lactose.

2. Atténuation

Ce mécanisme est trouvé par exemple dans la régulation de l'opéron tryptophane (figure 2). Ce type de régulation passe alors par la capacité à traduire une séquence *leader*. La présence de ribosomes va être la clef du système. En présence de tryptophane, les ARN de transferts correspondants sont « chargés » et la traduction est efficace. Le ribosome en avançant favorise l'hybridation des séquences 3 et 4 et donc la terminaison de la transcription. Si le ribosome avance plus lentement (ce qui est le cas lorsqu'il y a peu d'ARNt « chargés »), les séquences 2 et 3 peuvent s'apparier et la transcription aura donc lieu. C'est donc la concentration en ARNt chargés (et donc en tryptophane) qui va permettre de produire ou non les enzymes de la chaîne de biosynthèse de cet acide aminé.

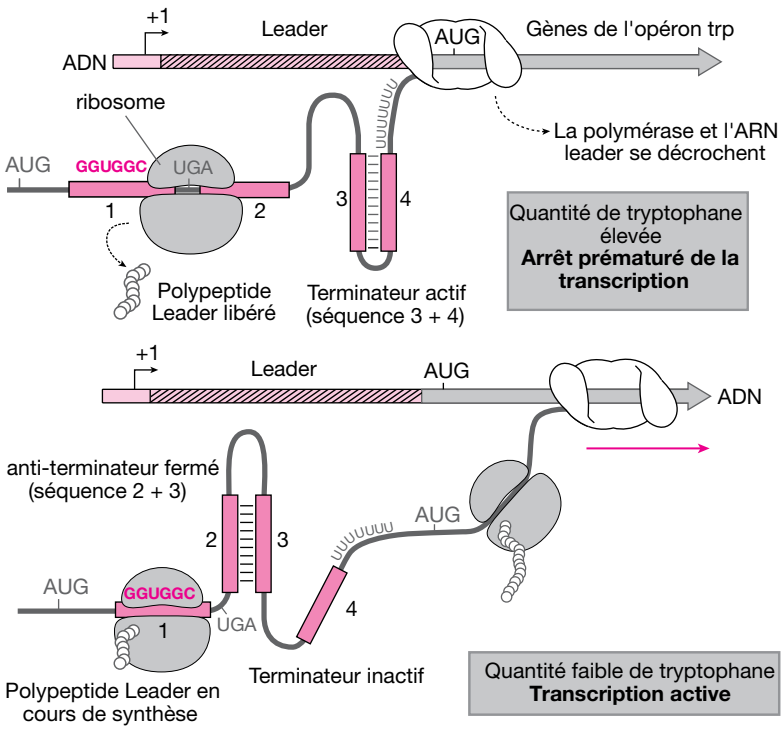


Figure 2 : Mécanisme d'atténuation de l'opéron tryptophane

fiche 56

Le contrôle de la transcription chez les eucaryotes

La transcription peut aussi être régulée de manière positive ou négative. Chez les eucaryotes, cette régulation implique un niveau de complexité supérieur *via* la structure de la chromatine. Les activateurs ou répresseurs se fixent à des distances lointaines des gènes dont ils régulent l'expression. Les sites de fixation (enhancers, silencers, *Upstream Activating Sequences* (UAS)…) peuvent donc être situés à des milliers de nucléotides du site de fixation de l'ARN polymérase. Ces facteurs agissent à deux niveaux impliquant la structuration de la chromatine et l'interaction avec un complexe particulier : le médiateur.

1. Activation et chromatine

Dans l'exemple donné figure 1, l'activateur va recruter une histone acétylase. C'est le cas de l'activateur Gal4 de la levure *S. cerevisiae.* Cet activateur stimule la transcription des gènes et permet l'utilisation du galactose lorsque celui-ci est la meilleure source de carbone. Cette protéine se fixe sur l'ADN à une séquence UAS d'activation située juste en amont des gènes contrôlés. En présence de glucose (conditions de répression), l'autre partenaire clef, Gal80 se fixe sur Gal4 et bloque son activité d'activateur. En présence de galactose, l'interaction entre Gal4 et Gal80 se relâche et Gal4 recrute des facteurs protéiques formant le complexe SAGA.

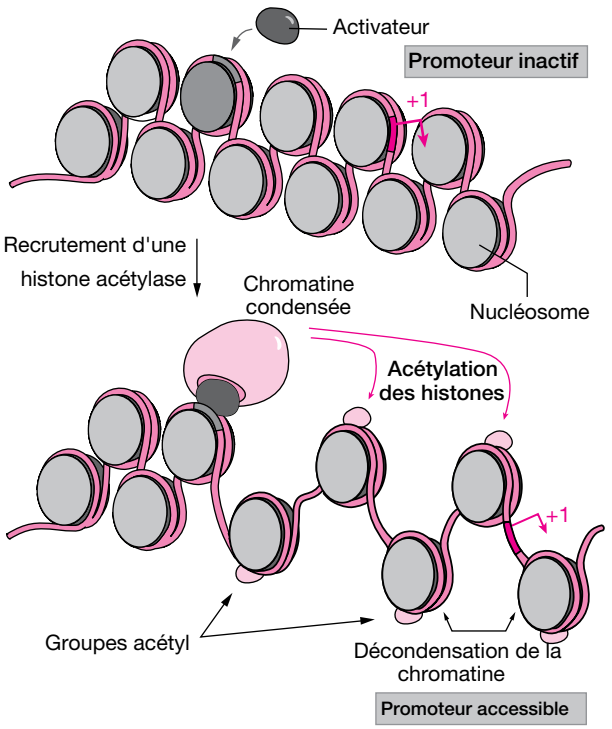


Figure 1 : Activation par décondensation de la chromatine

Ce dernier acétyle le prometteur et active la transcription (figure 2). De manière symétrique, certains répresseurs agissent en désacétylant les histones au niveau des promoteurs. Cette désacétylation empêche alors la fixation des facteurs généraux de la transcription et donc inhibe la transcription du gène cible. Dans l'exemple de la régulation

de l'utilisation du galactose, ce phénomène est aussi trouvé ! La protéine Mig1 (*Multi copy Inhibitor of Galactose genes)* en présence de glucose se fixe sur une séquence *URS (Upstream Repressing Sequence)* située entre l'UAS et la boîte TATA. Mig1 recrute alors la protéine Tup1 qui *in fine* recrute une histone désacétylase. Dans la figure 2, l'activateur Gal4 est représenté avec ses domaines d'activation (AD) et de fixation (BD).

Fiche 134

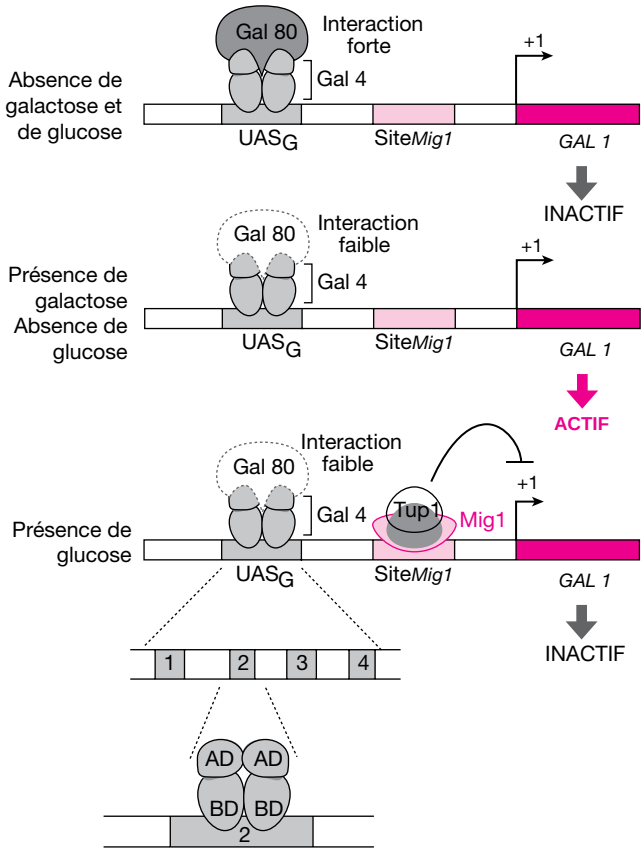


Figure 2 : Régulation des gènes liés au catabolisme du galactose

2. Activation et médiateur

Le médiateur est un complexe multiprotéique pouvant se fixer à l'ARN polymérase II et à certains activateurs. Ce complexe permet une hyperacétylation des histones et est aussi impliqué dans l'activation de l'ARN polymérase II.

C'est un véritable co-activateur impliqué dans la transcription de la plupart des gènes. Son recrutement par les activateurs permet donc d'augmenter le taux de transcription d'un gène (figure 3).

Fiche 46

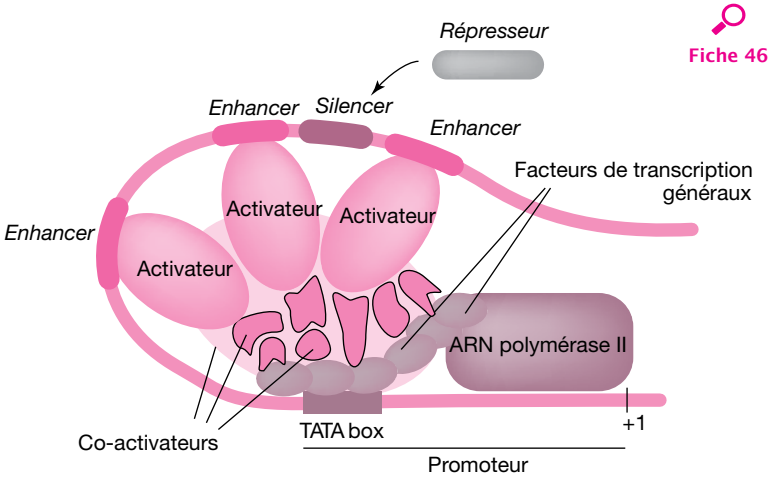


Figure 3 : Implication du médiateur (co-activateur) dans l'activation de la transcription

fiche 57

Les régulateurs de la transcription

La transcription d'un gène donné peut être contrôlée dans le temps et dans l'espace. Pour les organismes multicellulaires (les métazoaires) certaines fonctions sont nécessaires au cours du développement puis sont remplacées par d'autres. Cela nécessite le contrôle de la production des acteurs impliqués dans ces fonctions à un moment donné. Cette programmation de type « ON-OFF » se retrouve également dans la capacité de certaines cellules à produire des facteurs spécifiques (comme les neuromédiateurs pour les cellules nerveuses, l'hémoglobine pour les hématies…). Cette différentiation est basée sur la capacité pour la même séquence d'ADN contenu dans le génome à être active ou non. Cette activation est contrôlée au niveau de la transcription. De manière tout à fait remarquable on peut ainsi inverser le cours « normal » de la différenciation grâce à des facteurs de transcription. C'est ainsi qu'en surexprimant quatre de ces facteurs, il est possible d'obtenir des cellules souches pluripotentes induites (iPS).

Fiche 162

Pour les organismes unicellulaires eucaryotiques et procaryotiques, la transcription permet une adaptation de la cellule aux conditions de croissance. La cellule doit donc « savoir » quelles sont ces conditions (présence de tel ou tel sucre, acide aminé…) pour programmer en conséquence l'expression des gènes impliqués dans ces métabolismes.

1. Les senseurs métaboliques

Ces senseurs sont donc les déclencheurs de la régulation. Ce sont bien souvent les molécules produites ou utilisées par les chaînons métaboliques qui régulent la transcription. C'est le cas des opérons étudiés précédemment. La présence dans le milieu extra-cellulaire du métabolite se répercute sur sa concentration intracellulaire et celle-ci va à son tour être le facteur déclencheur. Dans le cas de l'opéron tryptophane (figure 1), cet acide aminé se fixe sur le répresseur.

Fiche 55

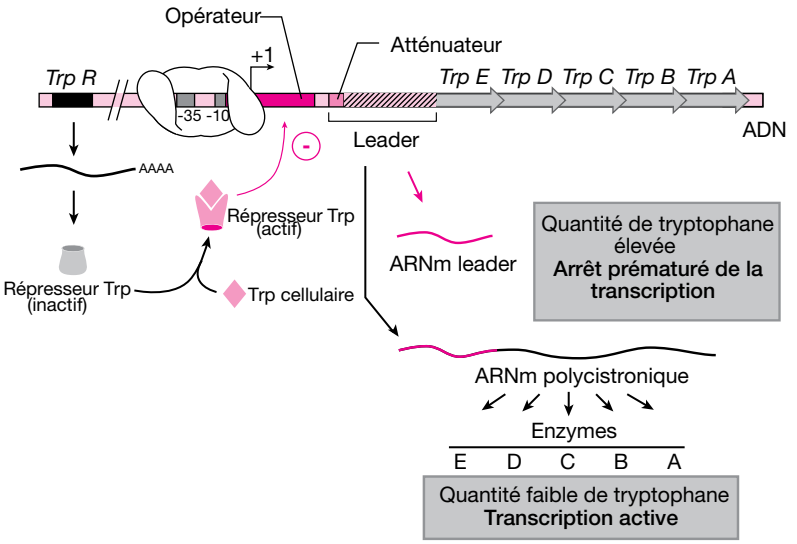


Figure 1 : Opéron tryptophane

2. Les voies de signalisation

Chez les métazoaires, le contrôle de la transcription est inscrit dans un cadre plus global d'une programmation spatio-temporelle. Il y a donc une transduction du signal. Dans l'exemple de la figure 2, l'activateur de la transcription est produit de manière basale. Sa localisation est nucléaire ou cytoplasmique. Il agit comme un récepteur dont l'activation est contrôlée par la présence du ligand. Dans notre exemple, les ligands sont hydrophobes (ce sont typiquement des hormones stéroïdes comme les glucocorticoïdes, la testostérone ou les œstrogènes, mais différentes autres molécules lipophiles sont aussi retrouvées dans cette catégorie). Dans le cas des récepteurs stéroïdiens, le ligand se fixe sur le récepteur cytoplasmique et provoque sa migration dans le noyau. Le récepteur se dimérise et se fixe sur la séquence cible *Hormone Response Element* (HRE). Dans le cas des récepteurs non stéroïdiens, le ligand peut diffuser jusqu'au noyau où les récepteurs sont déjà présents. La fixation du ligand va alors moduler l'activité transcriptionelle. Les récepteurs aux hormones stéroïdes contiennent trois domaines permettant la régulation des gènes, la reconnaissance du site HRE et la fixation du ligand.

Fiche 131

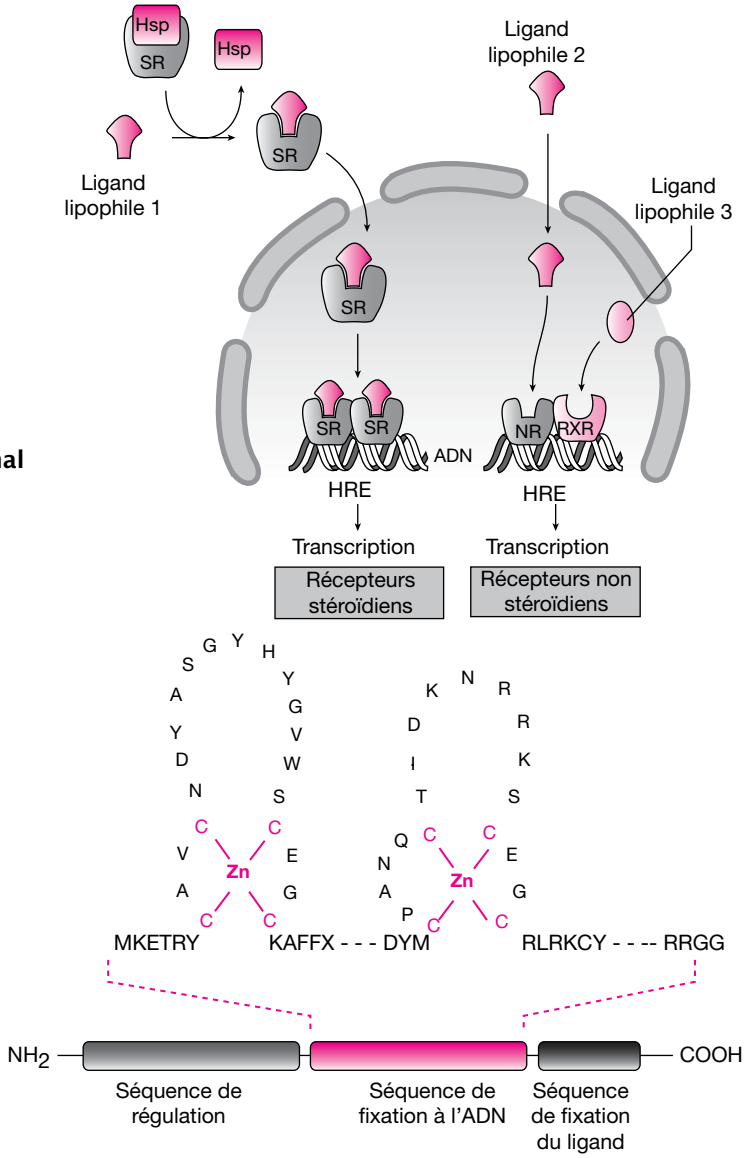


Figure 2
Transduction du signal par des ligands hydrophobes

fiche 58

L'épissage alternatif

L'étape d'épissage est un processus qui n'est pas univoque. La capacité de former plusieurs ARNm matures à partir d'un même pré-ARNm permet ainsi à la cellule de varier l'expression génétique. Ceci permet d'ajouter une étape de complexité et de régulation permettant une augmentation de la diversité des protéines produites sans augmenter le nombre de gènes.

1. Un gène, plusieurs protéines

Dans l'exemple de la figure 1, on constate les conséquences de deux épissages différents à partir d'un même précurseur. L'exemple choisi concerne le gène Bcl-x. Ce gène permet l'expression d'une protéine anti-apoptotique : Bcl-xL. Cette protéine est exprimée dans les lignées hématopoïétiques. Cette protéine est également associée à des processus de cancérisation. Sa fonction anti-apoptotique permet à la cellule cancéreuse d'échapper au contrôle cellulaire. Sa surexpression (par rapport à un tissu sain) est ainsi retrouvée dans de nombreux exemples de tumorogénèse. De manière intéressante, le même gène permet la production d'une protéine en partie identique : Bcl-xS. Contrairement à Bcl-xL, Bcl-xS peut promouvoir l'apoptose. L'équilibre entre ces deux isoformes produites à partir du même ARN messager permet donc une régulation du destin cellulaire. Cet équilibre est régulé par un épissage alternatif. Dans un cas, la partie IIB est considérée comme un exon alors que dans l'autre cas, cette séquence est considérée comme un intron. Cette différence permet la formation de deux protéines de différentes longueurs et de fonctions opposées.

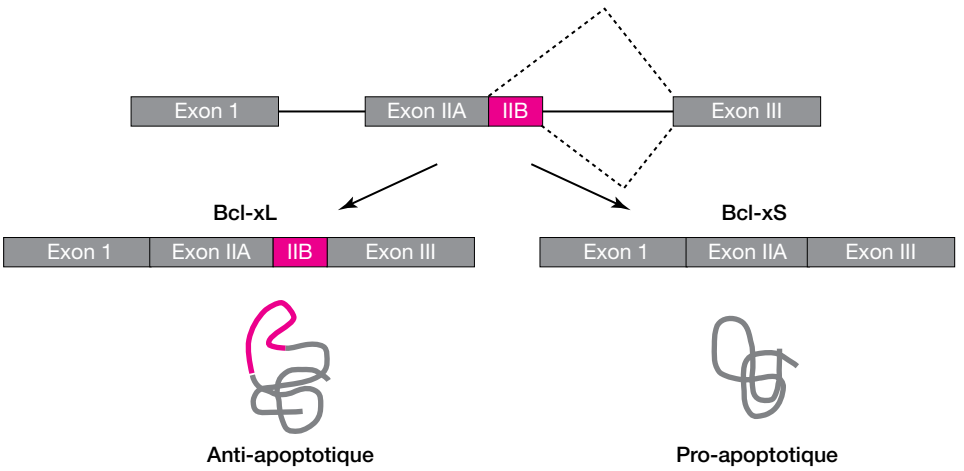


Figure 1 : Conséquence possible d'un épissage alternatif : cas de Bcl-x

2. Régulation de l'épissage alternatif

Puisqu'il existe plusieurs possibilités pour un précurseur d'être maturé par épissage, comment la cellule peut-elle savoir celui qui doit être privilégié ? En plus du mécanisme complexe d'assemblage du spliceosome, il existe des facteurs protéiques capables d'augmenter ou de diminuer l'efficacité des sites donneurs et accepteurs de l'épissage. Cette modulation se fait essentiellement *via* les protéines *SR* (protéines riches en sérine (S) et arginine (R)) qui sont des activateurs de l'épissage. Ces activateurs peuvent se positionner dans la séquence intronique, les sites de reconnaissance étant des *Intron Splicing enhancer* (ISE) ou dans la séquence exonique, les sites de reconnaissance étant des *Exon Splicing Enhancer* (ESE). Ces protéines SR augmentent l'affinité de l'intron pour le facteur U2. La présence de ces « recruteurs » va donc amener à la formation du spliceosome dans l'intron et *in fine* à son épissage.

C'est la présence de protéines SR dans un type cellulaire qui conduira vers l'une ou l'autre de ces formes. Ce mécanisme d'épissage alternatif impliquant des protéines *SR* est à la base de la détermination du sexe par expression du gène *sex-lethal*, *transformer* et *double-sex* chez la drosophile. La cascade d'évènement d'épissage fait intervenir des régulateurs positifs mais aussi négatifs (figure 2).

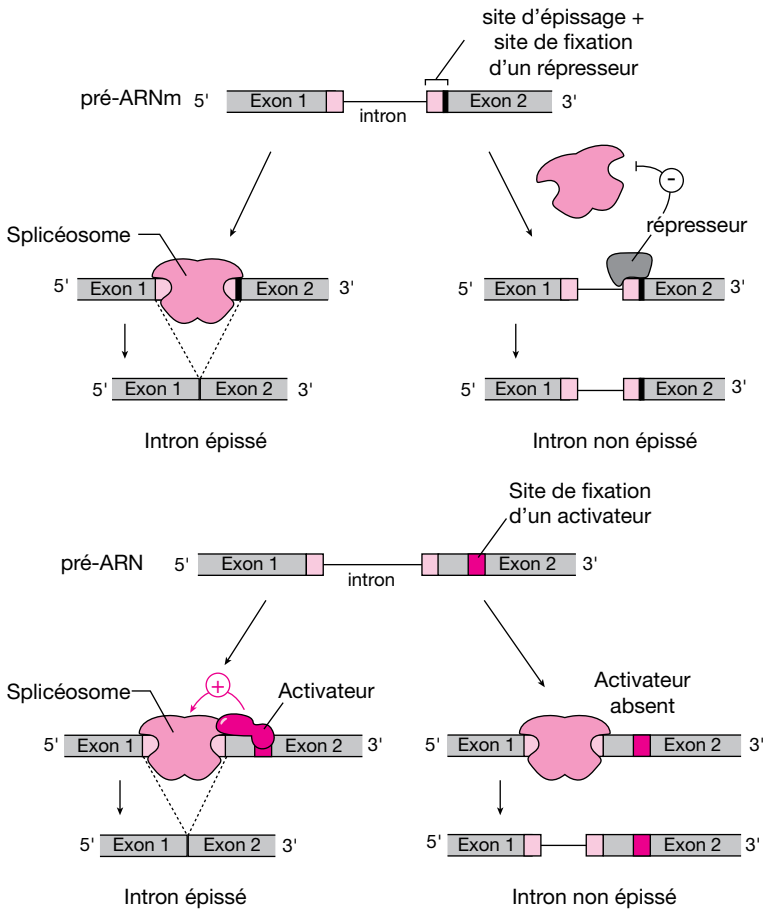


Figure 2 : Contrôle positif et négatif de l'épissage

fiche 59 Les contrôles post-transcriptionnels

Fiches 46, 47, 48

La transcription de l'ARNm est concomitante à sa maturation. Celle-ci comporte chez les eucaryotes différentes étapes déjà discutées (coiffe, polyadénylation, épissage). L'ARNm mature est alors transporté jusqu'au cytoplasme où il sera traduit. Chaque étape comporte des mécanismes de contrôle qui assurent une régulation fine (figure 1).

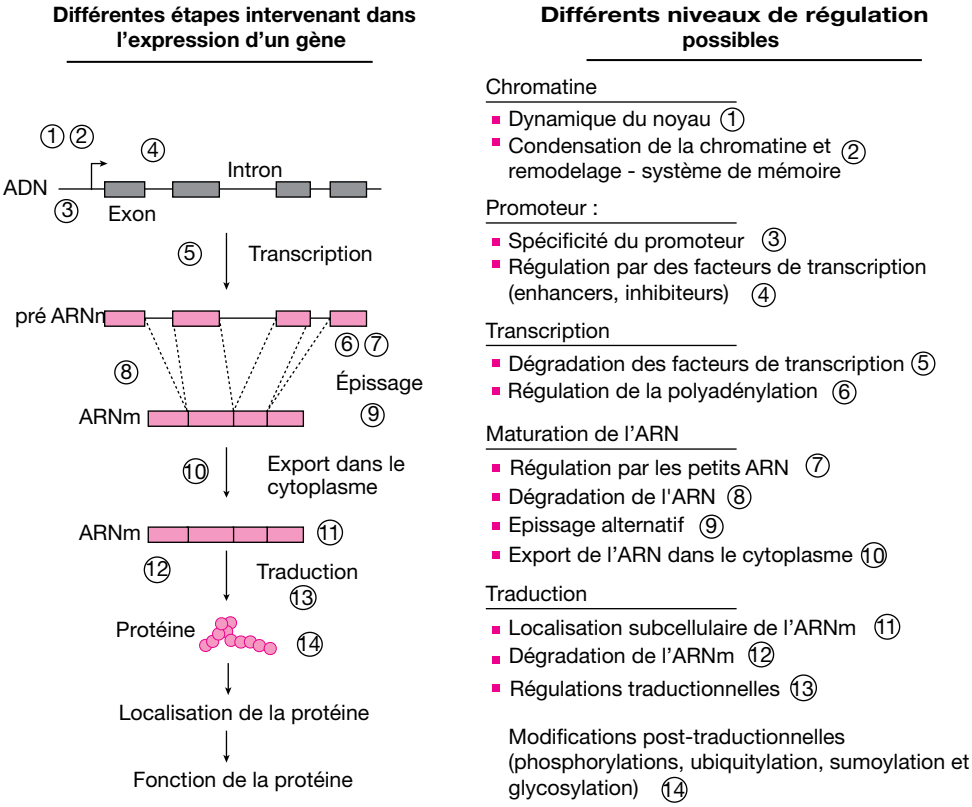


Figure 1 : Contrôle de l'expression génique

Une fois dans le cytoplasme, un défaut de la coiffe ou de la queue poly-A entraînera une dégradation de l'ARNm. Ce niveau de régulation n'est pourtant pas le seul, et il existe chez les eucaryotes comme chez les procaryotes des processus fins qui interviennent sur l'expression génétique.

1. Régulation par ARN interférant

Le phénomène d'ARN interférence a été découvert initialement chez les végétaux, mais a depuis été étendu au règne animal. Il permet de dégrader spécifiquement un ARN. Les ARNmi codés par le génome permettent ainsi une régulation de l'expression génétique. Ce mécanisme implique deux étapes.

Production d'ARNi

La première étape consiste en la production d'un petit ARN double brin. Celui-ci est produit par une ribonucléase de la famille de la RNase III appelée Dicer. Cette première phase aboutit à la production de petits ARN de 21 à 25 nucléotides. Dicer est aussi impliquée dans la production d'une autre classe de petits ARN : les micro ARN (ARNmi). Pour ces derniers, un autre facteur essentiel est *Drosha*. *Drosha* intervient dans le nucléoplasme où elle convertit un transcrit primaire (pri-miARN) en un ARN ayant une forme d'épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides : le pré-miARN.

Activation de RISC

Les ARNsi ou ARNmi, après avoir été produits grâce à Dicer, guident par la suite le complexe effecteur endonucléasique *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) sur l'ARNm homologue à détruire ou à inhiber. Les ARNsi vont permettre de détruire l'ARN cible en s'y hybridant. Pour les miRNAs, l'hybridation est souvent observée dans la partie 3' non codante et va aboutir au blocage de la traduction du gène et donc à l'inhibition de la synthèse de la protéine correspondante (figure 2).

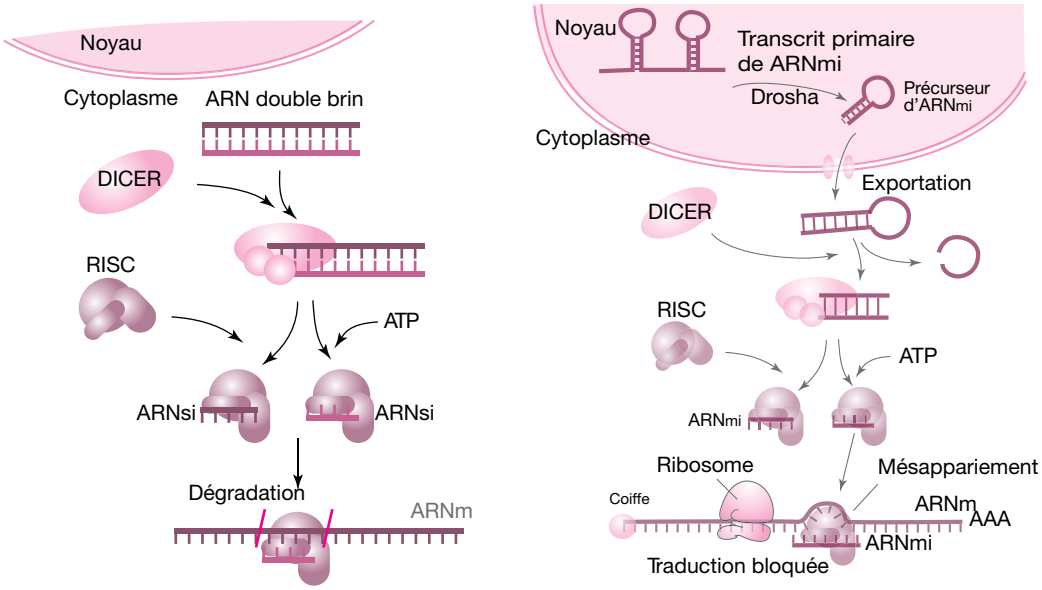


Figure 2 : Mécanisme de l'ARN interférence

2. Régulation de la traduction chez les procaryotes : « riboswitch »

Le « riboswitch » qui peut être traduit par ribo-régulateur ou ribo-commutateur est un mécanisme trouvé chez les procaryotes et certains eucaryotes (champignons, levures…). C'est un mécanisme qui met en jeu la structure de l'ARNm. Le riboswitch est une partie de la séquence dont le repliement dans l'espace est dépendant de la présence d'un ligand. Ce ligand est généralement un métabolite produit grâce à la protéine codé par l'ARNm. Ce métabolite va donc influer sur la structure et par voie de conséquence influera sur l'accessibilité à la machinerie de traduction. Il est à noter que certains riboswitch contrôlent la formation de terminateurs de transcription mais peuvent aussi amener au clivage de l'ARN qui les abrite.

fiche 60

Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription peuvent être classés dans trois catégories.

1. Les activateurs

Les activateurs vont donc avoir comme rôle de stimuler la transcription. Ils doivent par nécessité avoir deux caractéristiques.

Liaison à l'ADN

Fiche 56

Le domaine de liaison à l'ADN permet à ces facteurs de se positionner de telle manière qu'ils puissent induire la transcription des gènes régulés. Ce site de liaison à l'ADN est souvent basé sur un motif structural de type « hélice-boucle-hélice ». On trouve néanmoins d'autres motifs structuraux comme la fermeture éclair basée sur la présence de leucine (*Leucine zipper*) ou encore le motif à doigt de zinc (figure 1). La fixation de ces facteurs peut se faire à l'état de monomère, dimère mais aussi de trimères selon les cas. Le site sur lequel ces facteurs se fixent est nommé le site de réponse. Le site de liaison à l'ADN peut souvent se structurer indépendamment du reste de la protéine. Cette propriété est à la base de la méthode du « double-hybride ».

Fiche 134

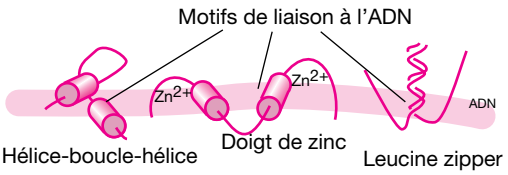


Figure 1 : Représentation schématique des motifs de liaison à l'ADN

L'interaction avec l'ADN est basée sur la formation de liaison hydrogène avec des bases azotées situées dans le grand sillon de la double hélice.

Domaine d'activation de la transcription

Le domaine d'activation, comme le domaine de fixation, peut se structurer indépendamment du reste de la protéine. Ce domaine n'a pas de spécificité envers l'ADN. On peut tout à fait échanger des domaines d'activation entre deux activateurs sans changer sa capacité d'activer la transcription. Son seul rôle est de recruter la machinerie de transcription. Contrairement aux domaines de liaison à l'ADN, il n'y a pas de signature structurale. Ces domaines contiennent souvent des acides aminés acides ou hydrophobes.

2. Les répresseurs transcriptionnels

Ces répresseurs agissent de manière symétrique à ce que nous avons vu pour les activateurs. Ils doivent également posséder des domaines de fixation spécifique permettant leur positionnement précis sur la double hélice d'ADN. Le domaine de répression est lui aussi modulaire et peut être échangé d'un répresseur à un autre. La nature de ce domaine est en revanche extrêmement différente du domaine d'activation. Ceci est lié au mode d'action des répresseurs qui peuvent agir selon les modes suivants : (a) masquage d'un domaine d'activation de la transcription, (b) inhibition de l'interaction d'un activateur avec la machinerie de transcription (c) inhibition *via* le médiateur, (d) inhibition indirecte par condensation de la chromatine (figure 2).

Bien que les répresseurs transcriptionnels soient moins étudiés que les activateurs, leur importance est grande. Une maladie héréditaire (maladie de Rett) en atteste. Le syndrome de Rett se caractérise par un trouble grave et global du développement du système nerveux central. Il est dû à une mutation du gène MeCP2 (*Methyl-CpG-Binding Protein 2*) qui est un répresseur de la transcription. Son inactivation entraîne la surexpression de certains gènes, qui serait dommageable pour le développement du système nerveux central.

3. Les isolateurs

Bien que ces acteurs ne soient pas spécifiques de la transcription, ils jouent un rôle prépondérant chez les eucaryotes. Ces isolateurs (*insulators*) sont constitués de plusieurs protéines formant une barrière chromatinienne. L'isolateur évite ainsi qu'un activateur ne soit actif sur beaucoup de gènes (puisque l'activation peut agir à grande distance). Il va donc être trouvé entre un site activateur (*enhancer*) et le gène qui ne doit pas être régulé par cet activateur. Il n'empêche cependant pas un autre activateur d'agir sur ce gène (figure 3).

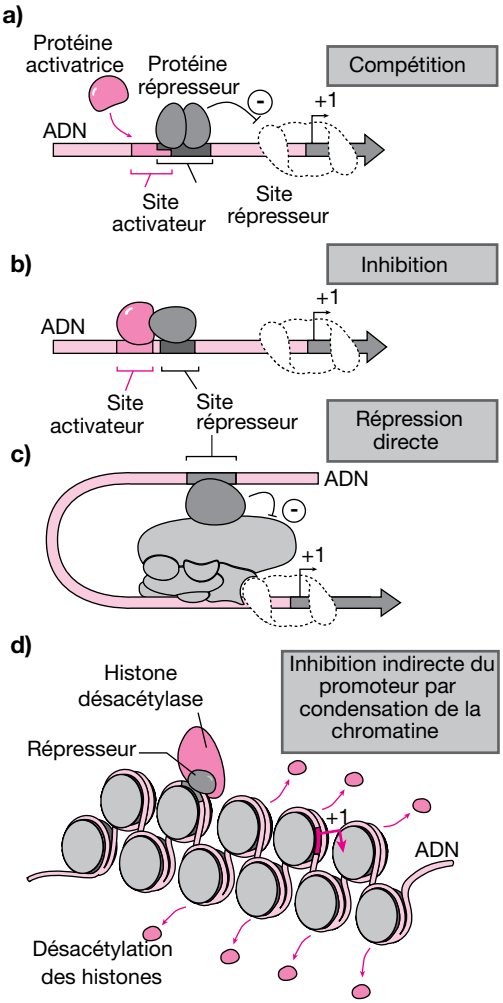


Figure 2
Mode d'action des répresseurs

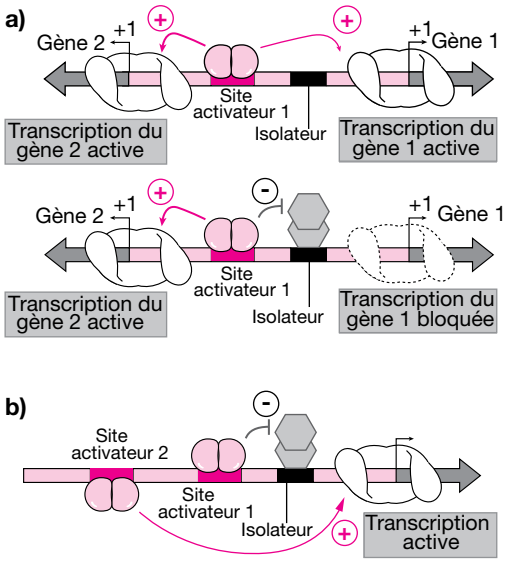


Figure 3
Mode d'action d'isolateurs

Fiche 56

fiche 61

L'édition des ARN

Après la transcription, certains ARN subissent des modifications qui aboutissent aux changements de certaines bases. Il n'y aura alors plus de concordance entre la structure primaire de l'ARN et la séquence correspondante sur l'ADN.

1. Mécanisme de l'édition

Ce phénomène d'édition implique deux réactions. La première est une désamination. Le substrat peut être une cytosine (aboutissant à la formation d'uracile par action d'une cytidine désaminase) ou une adénine (aboutissant à la formation d'une inosine par l'action de l'adénosine désaminase réductase « ADAR »). L'inosine qui n'est pas une base trouvée d'ordinaire dans l'ARN sera reconnue comme un G lors de la traduction. La figure 1 représente ce processus. Dans le cas présenté, le codon CAG de départ (permettant l'insertion d'une glutamine) aboutira à CIG (reconnu comme CGG et permettant l'incorporation d'une arginine). La deuxième réaction consiste en un ajout ou une élimination d'uridine.

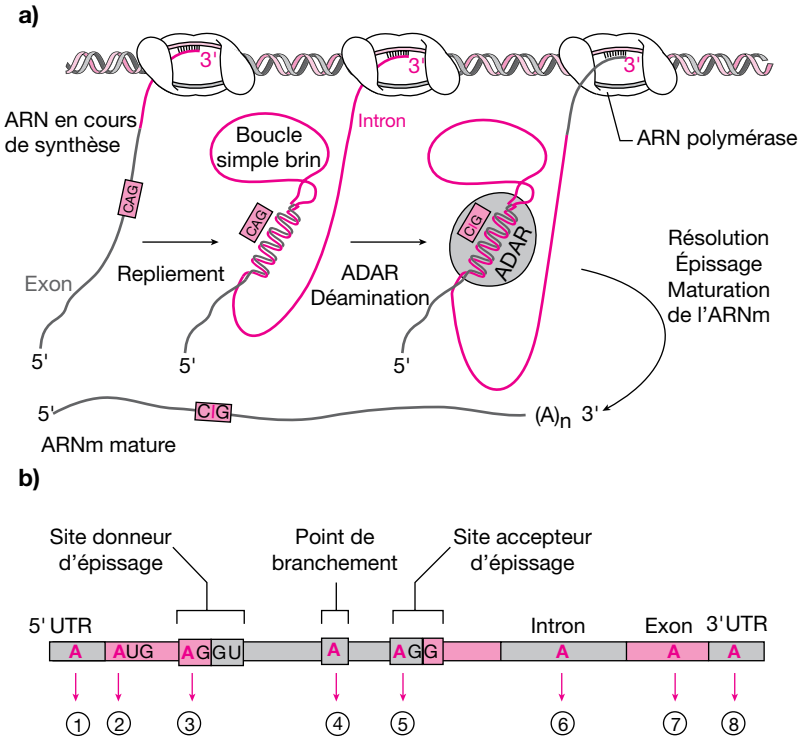


Figure 1 : Mécanisme d'édition par l'ADAR et conséquences fonctionnelles

Comme montré sur la figure, la position ne concerne pas uniquement la phase codante (position 2,7). L'édition peut aussi concerner les régions 3' et 5' non codantes (position 1 et 8), les jonctions introns-exons (3,5), le site de branchement (4,6).

2. Rôle de l'édition

Comme le montre la figure 2, il y a plusieurs conséquences possibles après une édition de l'ARN. Dans le premier cas, l'insertion de 2 uraciles va changer le cadre de lecture. L'édition va donc provoquer une mutation de type changement de cadre (aboutissant le plus souvent à rencontrer un codon stop et donc à la formation d'une protéine plus courte). Le deuxième cas correspond à la formation d'une mutation non-sens.

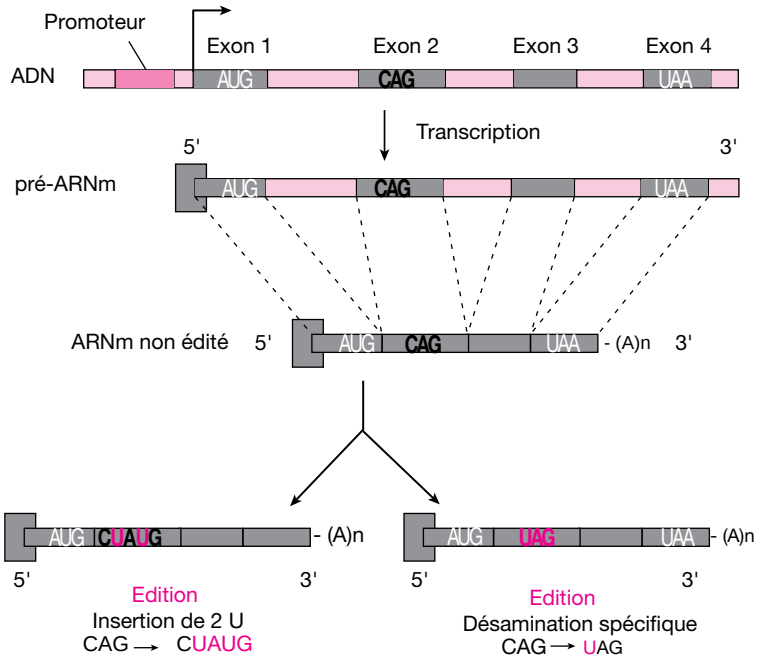


Figure 2 : Conséquences possibles de l'édition

3. Utilisation de l'édition

Le mécanisme d'édition est indissociable de l'étude du trypanosome qui est l'agent responsable de la malaria. Le génome mitochondrial de *Trypanosoma brucei*, parasite unicellulaire eucaryote, possède deux types d'ADN circulaire correspondant à des mini-cercles (qui codent pour des petits ARN guides, les ARNg) et des maxi-cercles (impliqués notamment dans la formation des complexes respiratoires). Les ARNg permettent d'ajuster très précisément le nombre d'uridine. Ces ARNg agissent comme des guides et forment des complexes avec les ARN pré édités par des appariements de type Watson et Crick. Ce mécanisme est complexe et très concerté. À titre d'exemple, l'ARN messager de l'enzyme COXIII (cytochrome C oxydase III) va subir des centaines d'insertion/délétions d'uridines pour aboutir à la production d'un ARN mature ! Ce phénomène d'édition permet de moduler la séquence de l'ARN, mais est aussi potentiellement utilisé pour aider à la dégradation d'ARN au sein de complexes de surveillance.

fiche 62 La modification épigénétique

L'hérédité de type épigénétique est un processus qui comporte une information supplémentaire à celle contenu dans la séquence primaire d'un gène.

En effet, on nommera épigénétique, tous les mécanismes permettant à une cellule d'avoir un phénotype différent d'une autre cellule alors qu'elle a **exactement** la même séquence génomique.

L'exemple le plus frappant au niveau cellulaire se trouve dans la comparaison des différentes lignées constituant l'homme ou la femme que nous sommes. Il est impossible de confondre un fibroblaste et un hépatocyte alors que pourtant ils ont le même génome ! De même, les vrais jumeaux (jumeaux monozygotes) montrent des différences. L'étude de différents jumeaux a permis de montrer que les profils d'expression génique sont très proches pour des jumeaux très jeunes (3 ans) et divergent au fur et à mesure de l'avancée dans l'âge. L'apparition de mutations ne peut à elle seule expliquer cette divergence et cela met donc en avant un niveau de régulation plus « perméable » qui est au cœur de l'épigénétique.

1. Le code des histones

Fiche 56

Comme nous l'avons vu, la structure de la chromatine peut directement influer sur l'activité de la transcription. Une structure décondensée (ouverte) est favorable à la fixation de la machinerie de transcription. À l'inverse, une structure condensée comme celle trouvée dans l'hétérochromatine inhibe l'expression génique. Ceci est en pratique vérifié sur le plan expérimental. Si, par manipulation génétique, on déplace un gène d'une région d'euchromatine vers une région du chromosome condensée, l'expression de ce gène va s'éteindre. Ce phénomène est à la base du processus de variégation qui a permis par analyse génétique de caractériser les gènes impliqués dans la structure chromatinienne.

Tableau 1 : Le code des histones

Le chiffre après le H indique le nom de l'histone et le chiffre après le K, le numéro de l'acide aminé modifié (K est la lettre qui représente la lysine).

Type de modification	Histone et acide aminé modifiés						
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H4K20	H2BK5
Mono-méthylation	+	+		+	+	+	+
Di-méthylation		-		-	+		
Tri-méthylation	+	-		-			-
Acétylation		+	+				

L'état de la chromatine est dicté par les modifications post-traductionnelles des protéines histones liées à l'ADN. La méthylation de ces protéines au niveau de résidus lysines entraîne une fermeture de la chromatine. Au contraire, l'acétylation des lysines entraîne une ouverture de la chromatine permettant ainsi la transcription. Au moment de la réplication de l'ADN, ces modifications sont pour l'essentiel reproduites à l'identique. En conséquence, après la division cellulaire, le « patron » chromatinien est le même dans les deux cellules. La conséquence est donc la persistance de l'information contenue par les modifications des histones.

Fiche 52

Les enzymes impliquées dans ce code sont les histones acétyl transférase (HAT), histones désacétylase (HDAC), les méthylases. Ces modifications impliquent différentes lysines des histones H3, H4 et H2B. Ce tableau n'est cependant pas exhaustif, certaines autres modifications comme la phosphorylation, l'ubiquitination étant, entre autres, également trouvées.

2. La méthylation des bases

Comme le montre la figure 1, la méthylation des îlots CpG est également une clef de l'épigénétique. Cette modification chimique des bases transforme la cytosine en 5-methylcytosine. Dans les cellules normales, ces îlots (situés pour l'essentiel en amont des gènes) ne sont pas méthylés. Au cours du développement, on a pu constater une méthylation aboutissant à l'extinction de l'expression du gène situé en aval. Cette méthylation se maintient au cours de la mitose et permet ainsi de continuer à assurer la répression des gènes au cours des divisions. La méthylation des îlots CpG permet de recruter des facteurs protéiques qui vont alors modifier les histones. Ces deux niveaux sont donc interconnectés.

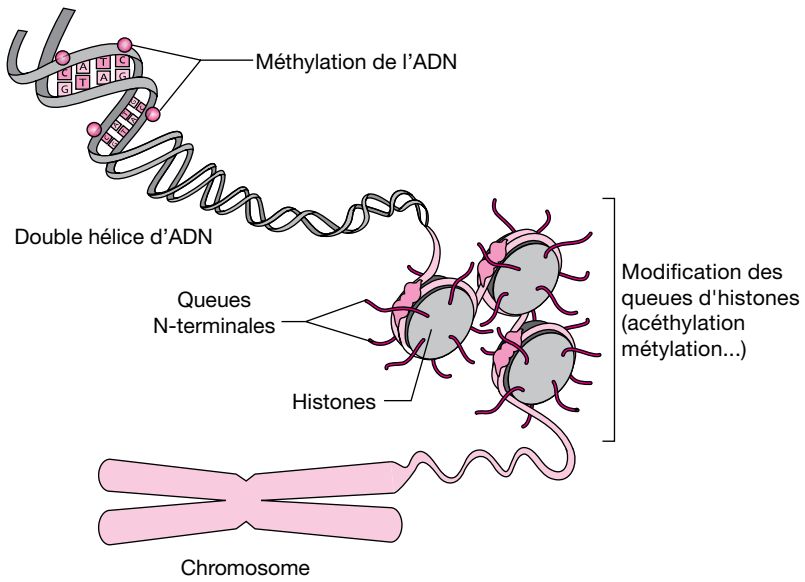


Figure 1 : Les deux principaux composants du code de l'épigénétique

fiche 63

L'empreinte génomique

Chez les mammifères, et singulièrement chez les humains, nous possédons deux copies de génome par cellule (hormis bien évidemment les gamètes !). Chaque gène autosomal (situé sur un chromosome autre que le X ou Y) est donc représenté en deux exemplaires. Une copie nous provient de notre père, l'autre de notre mère. Ces deux copies (allèles) sont généralement exprimées de la même manière (la transcription des deux gènes est réalisée au même niveau). Certains gènes échappent à cette règle. Pour ces gènes, seule une copie est exprimée, l'autre étant réprimée. Cette différence d'expression est trouvée dans toutes les cellules de notre corps et représente donc une information ubiquitaire. Cette répression génique, dépendante de l'origine parentale, s'appelle l'empreinte génomique.

1. L'empreinte, un cas particulier de l'épigénétique

L'extinction d'une copie implique des mécanismes déjà vus pour les phénomènes d'épigénétique (figure 1).

Fiches 55, 61

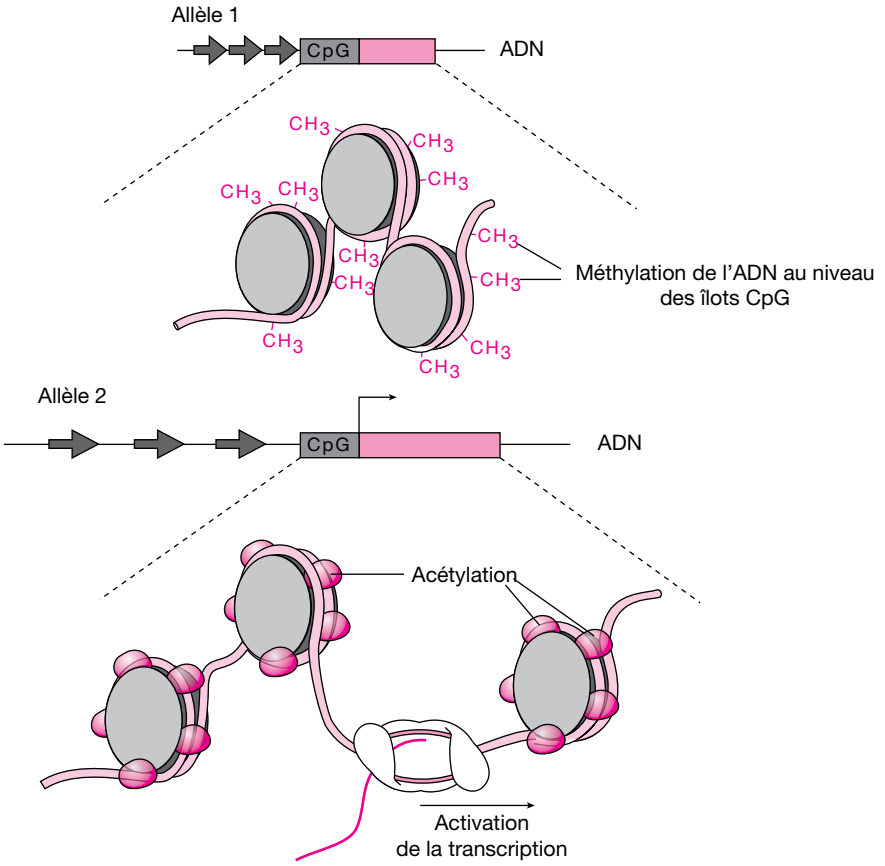


Figure 1 : Caractéristique des gènes porteurs d'empreintes

Dans cette figure, un couple d'allèles soumis à empreinte est représenté. L'allèle 1 sera réprimé alors que sur l'autre chromosome, l'allèle 2 sera transcrit. Les modifications au niveau de la chromatine (méthylation de l'ADN et acétylation des histones) sont schématisées.

2. L'empreinte, un phénomène dynamique

Bien que l'empreinte soit maintenue lors de la division cellulaire, elle est complètement réversible dans les lignées germinales. Il existe donc un mécanisme d'effacement de l'empreinte des parents (dans les cellules germinales primordiales). Suite à cette étape, l'empreinte va être rétablie au cours de la formation des spermatozoïdes et des ovules. Il va donc y avoir une phase de méthylation de novo (phase d'établissement). Chez le mâle, cet établissement débute dans les gonocytes quiescents (période prénatale), pour être complété au stade pachytène des spermatogonies après la naissance. Chez la femelle, la méthylation n'est complète qu'après la naissance, dans les ovocytes matures.

Fiche 154

3. Importance de l'empreinte

Un défaut de cette empreinte peut être catastrophique et c'est ainsi que les perturbations de l'empreinte parentale sont fréquemment associées à des maladies, notamment au cancer. Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie génétique rare (incidence 1/26 000 naissances). C'est la principale cause d'obésité syndromique. À un âge plus tardif les enfants présentent un retard statural associé à une obésité liée à une atteinte hypothalamique. Certains gènes d'une région du chromosome 15 sont inactivés par une empreinte d'origine maternelle. Dans la majorité des cas, le syndrome de Prader- Willi survient suite à une mutation dans le chromosome 15 paternel qui est le seul exprimé pour les gènes impliqués dans cette pathologie. À l'inverse, une surexpression due à la perte de l'empreinte génomique peut être délétère pour l'organisme. C'est le cas du gène IGF2 dont la surexpression conduit au syndrome de Beckwith-Wiedemann. Ce syndrome est caractérisé à la naissance entre autres par un gigantisme. De plus, ce syndrome prédispose à la survenue de cancers de l'enfant. Les anomalies génétiques responsables du syndrome de Beckwith-Wiedemann sont complexes mais la majorité des malades présentent une expression biallélique du gène au cours du développement (seule la copie paternelle de ce gène est normalement active).

Fiche 204

À l'heure actuelle, on connaît plus d'une quarantaine de gènes soumis à l'empreinte génomique, les spécialistes estimant qu'au total c'est une centaine de gènes qui serait concernés par ce phénomène. Ces gènes sont regroupés dans des *clusters* de gènes sur le génome. Ce regroupement explique que certaines maladies génétiques impliquant l'empreinte génomique pointent vers des gènes situés dans les mêmes régions chromosomiques (comme celle du chromosome 15 retrouvée pour les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi).

fiche 64

Clonage et reprogrammation nucléaire

Fiche 14

Dès le début des années 1960, à partir d'expériences de transplantation nucléaire, J. Gurdon avait théorisé l'existence des mécanismes d'épigénétique et la nécessité d'une reprogrammation du noyau d'une cellule différenciée pour pouvoir redémarrer un programme complet de développement.

1. Notion de reprogrammation nucléaire

Dans les années 1950, juste avant la découverte de la double hélice, R. Briggs et T. King réalisent chez l'amphibien des expériences de transplantation de noyau afin de savoir si le noyau d'une cellule différenciée est capable, lorsqu'il est remis dans une cellule œuf, de conduire un programme complet de développement. Ils constatent à l'époque qu'ils ne peuvent obtenir des clones qu'avec des noyaux prélevés dans des cellules au tout début du développement. Ils en déduisent qu'il se produit au cours du développement des modifications irréversibles dans le noyau. Les développements de la génétique, la découverte du rôle de l'ADN dans la transmission de l'information, conduisent J. Gurdon à reprendre ces expériences. Ces résultats montrent cette fois que le clonage est possible avec des noyaux de cellules différenciés mais que le taux de succès est beaucoup plus faible lorsque l'on part du noyau d'une cellule différenciée. Il n'arrivera d'ailleurs pas à obtenir de façon probante des animaux adultes. De ces résultats il déduit que si le noyau de la cellule somatique contient bien toute l'information génétique nécessaire au développement d'un organisme adulte, des modifications se sont produites au cours du développement. La notion d'épigénétique est ainsi renforcée. Et les bases moléculaires de ce mécanisme commencent à être connues. J. Gurdon va plus loin en démontrant également que ces mécanismes sont réversibles et que la cellule œuf possède un ensemble de molécules que l'on commence à découvrir qui œuvrent à la reprogrammation du noyau afin de le rendre apte à conduire un programme complet de développement. Il réalise des expériences très élégantes de « transplantation sériée » qui consistent à prendre le noyau d'une cellule somatique, à le remettre dans une cellule œuf puis à reprendre ce noyau au stade blastula afin de la replacer dans une nouvelle cellule œuf. En réalisant plusieurs transplantations, il peut ainsi augmenter le temps de contact du noyau avec le cytoplasme des cellules embryonnaires. Il constate ainsi que plus ce temps de contact est long, meilleur sont les résultats.

Fiche 62

2. Les limites du clonage

En 1996, l'équipe de I. Wilmut réalise le premier clonage d'un mammifère avec la naissance de la brebis Dolly, démontrant cette fois définitivement que le clonage était possible y compris chez les mammifères. Depuis, de nombreuses autres espèces ont été clonées. Mais comme l'illustre bien la figure 2, la reprogrammation du noyau de la cellule somatique utilisée pour le clonage doit subir une reprogrammation qui est rarement parfaite. On constate ainsi que non seulement le taux de succès est inversement corrélé à l'état de différenciation du noyau, mais qu'en plus il n'est pas possible d'affirmer à la naissance que l'animal cloné ne présentera pas de graves pathologies. Ainsi Dolly est décédée à 5 ans alors que l'espérance de vie normale d'une brebis est d'environ 12 ans.

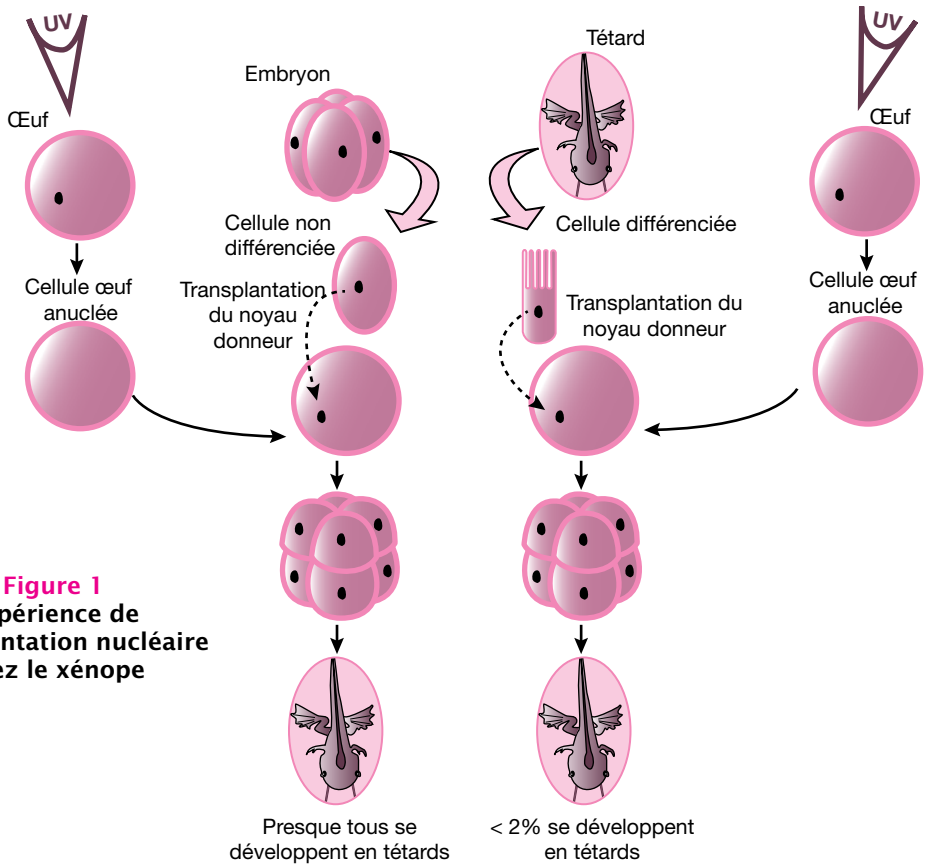


Figure 1
Expérience de transplantation nucléaire chez le xénope

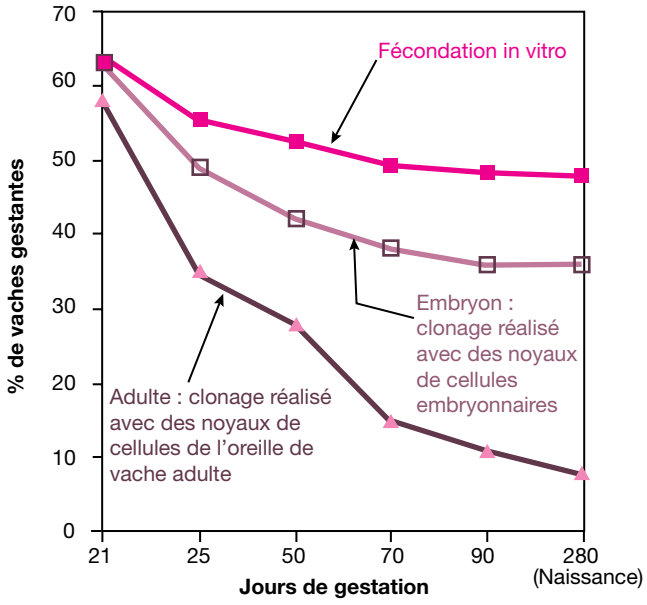


Figure 2
Comparaison des taux de survie après transplantation nucléaire ou fécondation *in vitro*
D'après Wilmut *et al.*, *Nature* 2002, vol 419, p. 583.

On verra plus loin que ces travaux ont été réutilisés pour cette fois essayer de contrôler directement cette reprogrammation en ajoutant dans une cellule adulte quatre gènes correspondant à quatre facteurs de transcription. C'est ainsi que S. Yamanaka a réussi à produire en 2006 des cellules souches pluripotentes induites et qu'il a été associé à J. Gordon pour l'attribution du prix Nobel en 2012.

Fiche 162

fiche 65 La production de protéines recombinantes

Une protéine recombinante est produite par des cellules productrices, génétiquement modifiées par l'apport d'un transgène. Le système d'expression est généralement hétérologue : il s'agit d'une espèce différente de celle produisant la protéine naturelle.

La production de telles protéines permet de les purifier et d'en disposer en grande quantité pour les étudier *in vitro* mais aussi dans un usage médical (Antigène Hbs utilisé pour le vaccin contre l'hépatite B) ou industriel (production d'enzymes). Pour des études structurales par diffraction aux rayons X ou par RMN, il est parfois nécessaire d'utiliser des milieux marqués contenant ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ou sélénométhionine.

Fiche 25

Les transgènes sont placés sur des vecteurs d'expression variés selon les hôtes, sous le contrôle de promoteur inductible le plus souvent, ce qui réduit la toxicité liée à la surexpression de la protéine recombinante.

Pour choisir le bon système d'expression, il importe de savoir quelle quantité et qualité de protéines sont nécessaires aux utilisations ultérieures.

1. Production en bactéries *Escherichia coli*

C'est de loin le système le plus courant car très économique (le milieu et le matériel de culture sont bon marché), pouvant être mis en place dans tous les laboratoires. Après transformation d'un plasmide contenant le transgène, celui-ci est maintenu de façon stable par une sélection antibiotique. Les rendements peuvent atteindre jusqu'à 5 g de protéines recombinantes par litre de culture et l'échelle de production peut être augmentée en fermenteur.

Ce système est spécialement adapté aux protéines de taille moyenne (moins de 50 kD) en un seul domaine structural présentant peu de ponts disulfure et peu de modifications post-traductionnelles. En effet, les protéines sont produites dans le cytosol qui est réducteur (pas de ponts S-S) et ne permet pas les glycosylations. Certaines phosphorylations sont possibles.

Dans le cas le plus favorable, la protéine recombinante s'accumule dans le cytosol bactérien. Des vecteurs induisant sa sécrétion dans le périplasme peuvent être choisis (facilite les ponts S-S). La protéine surexprimée peut se retrouver agrégée et insoluble dans des corps d'inclusion. Dans ce dernier cas, la purification peut en être facilitée mais il faut ensuite renaturer la protéine pour qu'elle retrouve une structure native. Cette étape est parfois difficile à franchir. Les choix de la souche bactérienne, du promoteur sur le vecteur d'expression, des conditions de culture et d'induction peuvent être optimisés pour réduire la formation de corps d'inclusion.

2. Production en systèmes eucaryotes

En levures

Les levures sont également un système de production peu coûteux. Les espèces les plus utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Cette dernière présente l'avantage d'être très efficace aux grandes échelles de production. Le transgène doit cependant être intégré au chromosome car cette espèce ne contient pas de plasmides.

Les rendements sont comparables à ceux obtenus avec les systèmes bactériens ; les avantages sont la possibilité d'expression de protéines de grande taille et la réalisation des modifications post-traductionnelles (sauf carboxylation et sulfatation). Attention, celles-ci ne seront pas forcément identiques à elles obtenues en cellules de mammifères. La rupture de la paroi des levures pour l'extraction des protéines produites dans le cytosol est parfois difficile.

En cellules d'insectes

Ce sont des cellules issues de papillons *Spodopera frugiperda* (Sf9, Sf21) ou de drosophiles (S2) qui sont les plus communément utilisées pour la production de protéines recombinantes. Contrairement aux systèmes précédents, la production en cellules d'insectes est généralement transitoire car l'un des systèmes les plus courants utilise l'infection par un baculovirus modifié contenant le transgène. Les conditions d'infection doivent être optimisées pour chaque protéine. Les cultures peuvent être réalisées en bioréacteurs, les niveaux de production peuvent atteindre jusqu'à 0,5 g/L de culture avec des modifications post-traductionnelles. L'expression de complexes protéiques est rendue possible par la co-infection de cellules par plusieurs baculovirus.

En cellules de mammifères

C'est bien sûr le système à choisir pour conserver l'activité biologique d'une protéine glycosylée ou associée dans un complexe, de préférence après sécrétion. Les problèmes sont les coûts de production très élevés et les rendements très bas (de l'ordre de 10 mg par litre de culture). Une production transitoire peut être induite par transfection de cellules d'intérêt. Pour des productions à grande échelle, des lignées telles que HEK293, CHO ou COS peuvent être transformées de manière stable et des promoteurs forts sont utilisés.

3. Production en système acellulaire

La production en système acellulaire devient de plus en plus accessible. Elle est spécialement adaptée aux protéines toxiques ou instables. Les systèmes les plus communs sont les extraits de réticulocytes, les extraits de germe de blé ou les systèmes procaryotes acellulaires. Ils permettent le criblage à haut débit.

Les protéines recombinantes sont aussi un enjeu sur le marché des biotechnologies. L'insuline a été la première protéine recombinante commercialisée en 1982, mais en 2012 plus de 130 « biomédicaments » sont disponibles en France. Il s'agit d'anticorps monoclonaux (20 %), de vaccins (18 %) ou de protéines thérapeutiques (comme l'insuline). Ce marché représente 150 milliards de dollars dans le monde et 5 milliards d'euros en France en 2014.

fiche 66

L'immunoprécipitation de la chromatine

La technique d'immunoprécipitation de la chromatine ou « *chip* » est une approche qui a véritablement révolutionné l'étude de la transcription. L'étude de la fixation de complexes sur l'ADN reposait classiquement sur les techniques de retard sur gel et d'empreintes.

1. Retard sur gel

Le principe de ce test repose sur la capacité pour une protéine donnée de reconnaître un segment d'ADN. Si l'association se réalise, alors le complexe formé aura une masse plus importante que le fragment d'ADN seul ce qui se traduira par un retard de migration sur un gel d'électrophorèse (figure 1). Cette technique ne permet pas de savoir précisément la séquence du site de liaison, mais elle présente l'intérêt de visualiser l'affinité d'une protéine pour un fragment d'ADN. C'est une approche *in vitro* qui ne peut donc pas permettre d'affirmer que le même complexe se formera *in vivo* surtout dans un contexte de structure chromatinienne.

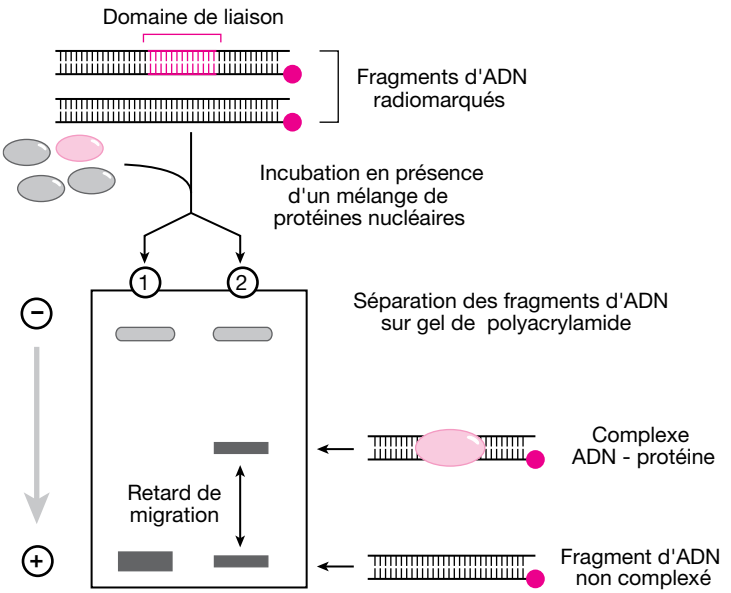


Figure 1 : Principe du retard sur gel

2. Empreinte à la DNaseI

Cette technique était la technique de choix pour déterminer la séquence reconnue par des protéines se fixant sur l'ADN (et donc singulièrement pour les facteurs de transcription). Cette technique repose sur la protection procurée par la fixation d'une protéine sur une molécule d'ADN. Le recouvrement du site de liaison bloquera donc l'action d'enzymes comme la DNaseI (une endonucléase clivant l'ADN sans spécificité de séquence). En ajoutant une quantité limitée de cette DNaseI au complexe formé, l'enzyme va couper de manière aléatoire toutes les positions accessibles (matérialisées par une flèche sur la figure 2).

3. Immunoprécipitation de la chromatine

Cette approche permet de constater la fixation in vivo d'une protéine sur un locus du génome. Elle repose sur le pontage entre les protéines et l'ADN par le formaldéhyde. Ce pontage établit des liaisons covalentes et permet de « geler » les complexes ADN-protéines. L'ADN est alors extrait, cassé en courts fragments par ultrasons. L'ajout d'un anticorps contre la protéine d'intérêt permet alors d'isoler cette protéine (et le segment d'ADN sur lequel elle est fixée). La dernière étape consiste à déterminer la présence d'une séquence d'ADN en utilisant par exemple la PCR (figure 3). Cette technique extrêmement puissante

Fiches 198, 40

est la seule permettant de connaître de manière exhaustive tous les sites de fixation d'une protéine à un moment donné et est donc l'approche de choix pour étudier la fixation des régulateurs de la transcription en fonction des conditions de croissance cellulaires.

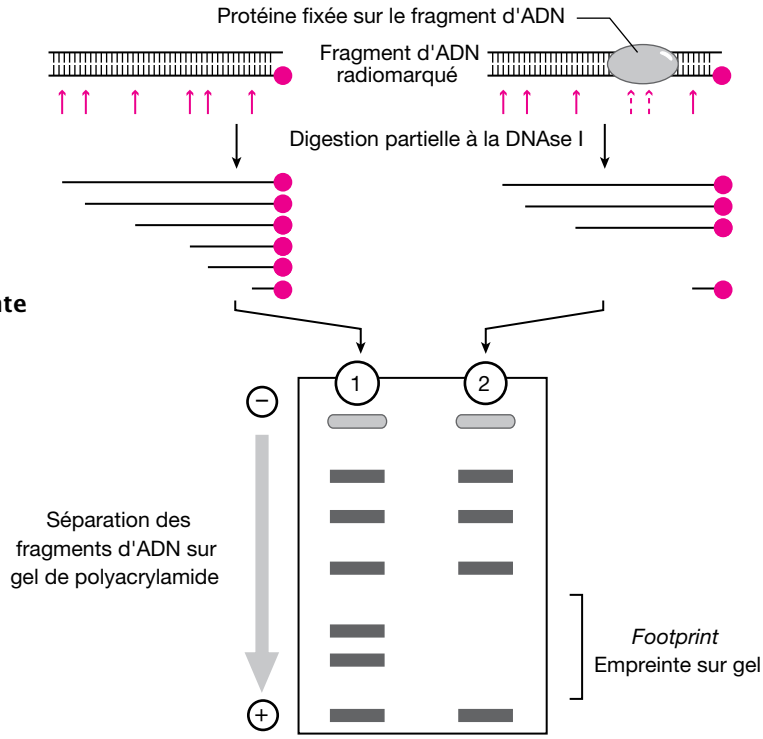


Figure 2
Technique d'empreinte à la DNase I

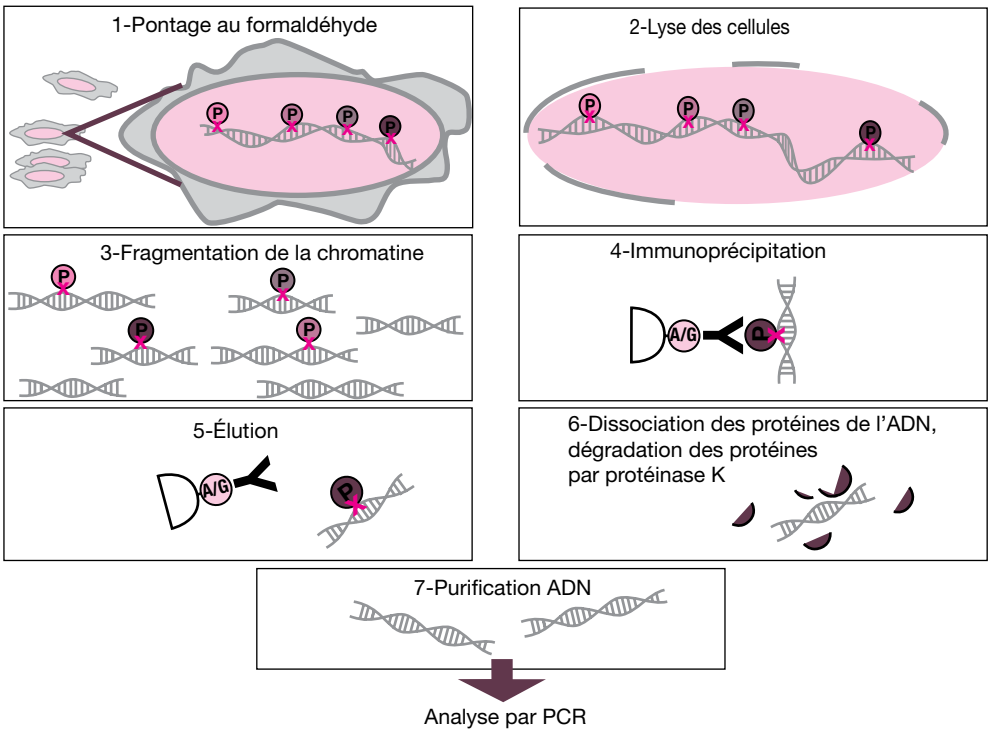


Figure 3 : Principe de l'immunoprécipitation de la chromatine

FOCUS L'inactivation du chromosome X

L'inactivation du chromosome X illustre parfaitement l'évolution des connaissances dans le domaine de la génétique et de l'organisation des chromosomes. Les expériences de M. L. Barr et E. G. Bertram sur des neurones de chats femelles en 1949 avaient permis de montrer la présence d'un corpuscule de couleur sombre absent dans des cellules nerveuses des mâles. Cette structure d'un micromètre de diamètre est très condensée et se localise près de l'enveloppe nucléaire (elle est quelquefois dénommée corps de Barr). Comme nous allons le voir, cette particule est directement liée à l'activité des chromosomes sexuels comme l'a proposé S. Ohno en 1956 en avançant l'hypothèse qu'il corresponde au chromosome X condensé.

Chez les mammifères, on trouve des paires de chromosomes identiques chez les mâles et les femelles (les autosomes) et une paire qui diffère en fonction du sexe. Les femelles possèdent deux chromosomes X alors que les mâles ont un chromosome X et un chromosome Y dans leur caryotype. C'est M. Lyon en 1961 qui a proposé qu'un des deux chromosomes X soit inactivé. Cette inactivation permet d'équilibrer l'expression des gènes situés sur le chromosome X et d'éviter un « surdosage » dont les conséquences seraient délétères. Puisqu'un chromosome est d'origine paternel et l'autre maternel, cette inactivation conduit à se poser un certain nombre de questions.

Le chromosome inactivé est-il le même dans toutes les cellules germinales ? Cette inactivation est-elle aléatoire ou affecte-t-elle un des deux chromosomes en particulier ?

M. Lyon avait basé ses observations sur des souris femelles hétérozygotes pour des gènes de couleur de pelage liés au chromosome X. Le pelage de ces souris ne présente pas une couleur homogène. Ce phénomène s'explique parfaitement si pour une tâche de couleur donnée le même chromosome est inactivé, la tache adjacente représentant l'inactivation de l'autre chromosome X. Ce phénomène se retrouve chez les chats femelles « écaille de tortue » et « calico » et n'est bien sûr pas observé chez les chats mâles. Puisque l'inactivation du chromosome X est également observée chez les humains, cela implique que les femelles présentent une structure chimérique (toutes les cellules d'un organe peuvent ne pas être équivalentes sur le plan de l'expression des chromosomes).

Le fait que l'on observe des secteurs de pigmentation implique que l'inactivation touche aussi bien le chromosome d'origine maternel que paternel. De plus, cette inactivation une fois réalisée se maintient dans les cellules filles (sinon, il n'y aurait pas de secteurs). Il y a donc transfert d'une information (inactivation d'un des deux chromosomes) de façon fidèle dans les cellules permettant la formation d'une tache de couleur ou d'une autre alors que le génome est le même !

Cette transmission relève donc de l'épigénétique. Le mécanisme moléculaire est complexe et fait appel à l'existence d'un ARN particulier : Xist. Cet ARN ne permet pas de produire une protéine. Il va s'étendre sur l'un des deux chromosomes X et va provoquer un changement de structure chromatinienne. Ce sont ces changements qui vont se maintenir lors des divisions cellulaires permettant ainsi le maintien de l'inactivation du même chromosome X.

Fiche 62

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

5.1 Dans le cas d'une régulation positive, une mutation dans le facteur de régulation aboutit à :

- ☐ a. une baisse de la transcription en l'absence de la molécule régulatrice
- ☐ b. une augmentation de la transcription en l'absence de la molécule régulatrice
- ☐ c. aucun changement de la transcription en l'absence de la molécule régulatrice
- ☐ d. une baisse de la transcription en présence de la molécule régulatrice

5.2 Dans le cas d'une régulation par atténuation, le ribosome

- ☐ a. rattrape l'ARN polymérase et va provoquer son décrochage de la matrice ADN
- ☐ b. ne peut pas rattraper l'ARN polymérase à cause de structure tige-boucle de l'ARNm
- ☐ c. module par sa présence la formation de structure tige-boucle de l'ARNm qui peuvent faire « décrocher » l'ARN polymérase

5.3 L'ARN polymérase II se fixe directement sur la boite « TATA » :

- ☐ a. vrai
- ☐ b. faux

5.4 L'édition des ARN peut aboutir à :

- ☐ a. un changement de la phase codante
- ☐ b. la formation de protéines plus courtes
- ☐ c. la formation de protéines plus longues

5.5 La régulation épigénétique implique :

- ☐ a. la présence de mutations dans les séquences qui sont exprimées differentiellement
- ☐ b. la formation d'une structure de chromatine sans histones
- ☐ c. l'établissement d'une chromatine modifiée par méthylation et acétylation des histones

5.6 L'empreinte génomique s'observe :

- ☐ a. chez le mâle
- ☐ b. chez la femelle
- ☐ c. chez le mâle et la femelle

5.7 Dans le cas du syndrome de Beckwith-Wiedemann l'empreinte génomique concerne :

- ☐ a. l'allèle IGF2 donné par le père (il est muté et la copie maternelle est éteinte)
- ☐ b. l'allèle IGF2 donné par la mère (il est muté et la copie maternelle est éteinte
- ☐ c. IGF2, mais le mécanisme est différent
- ☐ d. le chromosome X

5.8 L'immunoprécipitation de la chromatine permet :

- ☐ a. de mesurer l'affinité d'une protéine pour l'ADN
- ☐ b. de déterminer quelle base est protégée par la fixation d'une protéine
- ☐ c. de déterminer la fixation d'une protéine à un locus

Réponses

5.1 **a** et **d**. En absence du facteur de régulation, la cellule ne peut plus « sentir » la présence de la molécule régulatrice et donc la transcription sera la même dans les deux cas (absence ou présence de la molécule régulatrice).

5.2 **c**. Le mécanisme d'atténuation implique que la région 5' puisse se structurer dans deux états qui vont conditionner la poursuite de la transcription. Ces états dépendent eux-mêmes de la présence du ribosome.

5.3 **b**. L'ARN polymérase II ne reconnaît pas directement l'ADN mais la TBP. C'est un différence importante avec les ARN polymérases procaryotiques.

5.4 **a**, **b** et **c**. Le changement de taille peut provenir d'une modulation de l'épissage ou d'une mutation changeant le cadre de lecture.

5.5 **c**. Par définition, l'épigénétique est associé à une changement de phénotype (on observe un caractère différent) sans changement de séquences nucléotidiques (et donc sans mutations inscrites dans la séquence d'ADN). Cette variation implique l'activation ou la répression de la chromatine qui s'effectue en modifiant les histones qui lui sont associées.

5.6 **c**. Chez les humains et d'autres mammifères placentaires, l'empreinte est essentielle pour le développement du placenta et de l'embryon. Selon le cas, cette empreinte (extinction de l'expression d'une des deux copies d'un gène porté par un individu) peut être aléatoire, ou associé à l'origine de ce gène (le père ou la mère).

5.7 **c**. C'est l'empreinte maternelle qui est perdue et amène alors à une sur expression.

5.8 **c**. Pour mesurer une affinité, il faudrait pouvoir faire varier les concentrations des protéines en contrôlant cette quantité. L'immunoprécipitation de la chromatine est une technique figeant la cellule à un instant donné et permettant d'analyser les complexes formés entre ADN et facteurs protéiques. La détection de l'ADN se fait à travers l'analyse de sa présence sous forme d'une amplification PCR. Cette technique ne donne donc pas accès aux protections de bases par une protéine comme le ferait l'approche *in vitro* de type « foot-print ».

Chapitre 6

Les membranes cellulaires

Objectifs

La cellule, plus petite unité du vivant, constitue avant tout une unité spatiale délimitée par une membrane biologique qui sépare le dedans du dehors. Il n'existe cependant pas une mais des membranes biologiques, en particulier chez les eucaryotes.

Toutes ces membranes présentent des propriétés générales tout en étant constituées d'une grande diversité de lipides et de protéines membranaires.

Parmi les fonctions associées aux membranes, celles de compartimentation et de transport sont essentielles. Toutes les membranes biologiques possèdent une différence de potentiel électrique transmembranaire. Et certaines disposent en plus d'une capacité à faire varier ce potentiel. L'étude de ces membranes nécessite des technologies particulières dont certaines sont en plein développement.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 67

Unicité et diversité des membranes

Les membranes biologiques sont des constituants cellulaires indispensables puisqu'elles isolent les cellules vivantes et les compartiments intérieurs des cellules eucaryotes. Dans un hépatocyte, les membranes représentent 40 % du volume cellulaire total.

1. Les membranes d'une cellule

Fiches 69, 84

Il n'existe pas une seule mais plusieurs membranes dans une cellule. La membrane plasmique entoure la cellule et la délimite. La double membrane mitochondriale participe à la respiration cellulaire. L'enveloppe nucléaire est aussi une double membrane qui délimite le noyau des cellules eucaryotes. Les membranes du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi, des endosomes et des lysosomes constituent le système membranaire interne. La composition diffère beaucoup d'un type membranaire à l'autre et d'un organisme à l'autre mais la structure est toujours identique.

Pourcentage comparé des membranes pour deux types cellulaires

Type de membrane	Cellule pancréatique	Cellule hépatique
mb plasmique	5	2
enveloppe nucleaire	1,4	0,2
RE lisse	<1	16
RE granuleux	60	35
Golgi	10	7
mitochondries	21	39
autres	3	1

Composition lipidique de différentes membranes

	mb plasmique		myéline	mito-chondrie
	hématie	*E. coli*		
PC	20	-	10	40
PS	8	0,1	9	2
PE	20	70	15	30
SM	18	-	8	-
Cho	23	-	26	2
glycolipides	3	-	28	-
autres	8	30	4	26

PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, SM : sphyngomyéline, Cho : cholestérol

2. Composition des membranes

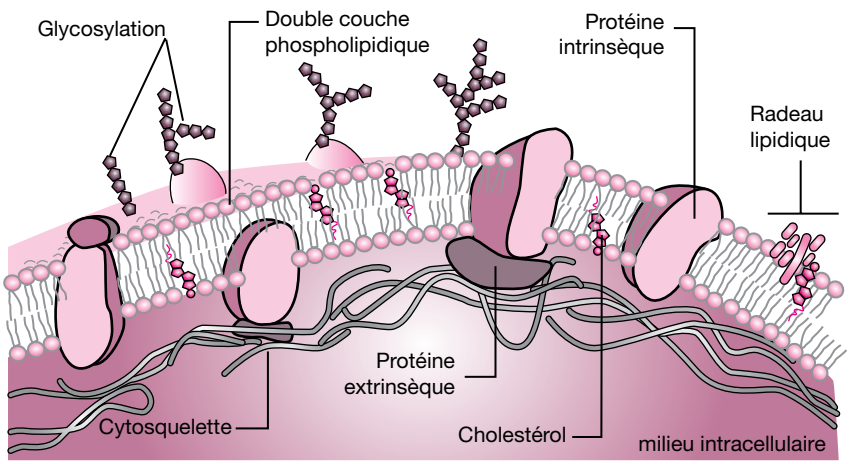


Figure 1 : Schéma d'une membrane biologique
D'après M.-C. Descamps, *Biologie cellulaire–UE2*, Dunod, 2010.

Toutes les membranes sont constituées de lipides et de protéines. Le rapport pondéral protéines/lipides varie cependant de 1:4 pour la gaine de myéline des cellules nerveuses à 4:1 pour la membrane mitochondriale. La face non cytoplasmique des membranes est souvent recouverte d'un manteau de glucides (*cell coat* ou glycocalix). Ceux-ci sont cependant toujours associés soit à des lipides, soit à des protéines.

Les lipides des membranes sont des lipides complexes amphiphiles : ils ont une tête polaire hydrophile et une queue hydrophobe. Leur structure particulière favorise une organisation en bicouche dans un environnement aqueux.

Fiche 14

Les principaux lipides présents dans les membranes sont des phospholipides, des glycolipides et des stérols. Dans les deux premières catégories, des acides gras saturés ou insaturés sont greffés sur du glycérol (phosphoglycérides et glycéroglycolipides) ou de la sphingosine (sphingophospholipides et sphingoglycolipides). La flexibilité de ces lipides dépend des acides gras alors que leur charge vient de la tête polaire. Chez les bactéries et les végétaux, on ne trouve que des glycéroglycolipides alors que chez les animaux les sphingoglycolipides sont plus abondants. Les stérols, bien que n'étant pas vraiment des lipides, y sont apparentés du fait de leur caractère amphiphile. La tête polaire est réduite à un groupement –OH fixée sur un noyau stéroïde rigide et prolongée par une queue aliphatique. Le cholestérol est caractéristique des cellules animales.

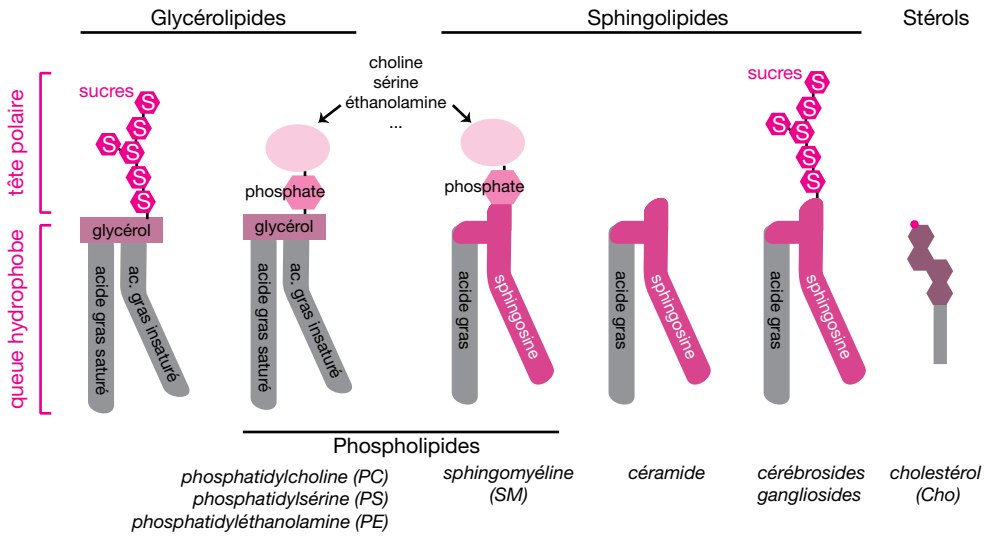


Figure 2 : Les principaux lipides des membranes

Les protéines membranaires intrinsèques interagissent avec la partie hydrophobe des lipides, alors que les protéines membranaires extrinsèques ont une interaction de surface avec la tête polaire des lipides ou avec d'autres protéines membranaires.

Fiche 71

Toutes les membranes sont fluides et asymétriques. Elles jouent un rôle de compartimentation et participent à d'autres fonctions biologiques en fonction des protéines qui y sont associées.

fiche 68 La biosynthèse des lipides membranaires

Fiche 14

Les lipides membranaires, phospholipides ou sphingolipides, sont construits de façon modulaire par fixation d'acides gras à un noyau glycérol (dans le cas des phospholipides) ou à un noyau céramide (dans le cas des sphingolipides). Il convient donc dans un premier temps de produire des acides gras, longues chaînes carbonées et dans un deuxième temps d'utiliser ces acides gras pour assembler les lipides.

1. Production et élongation d'acides gras dans le cytoplasme

Les acides gras sont synthétisés par ajout itératif de fragments de deux carbones sur un premier squelette acide acétique. Ce premier squelette est fourni sous forme d'acétyl-coA, et les fragments dicarbonés sont également fournis par l'acétyl-coA. Ces ajouts successifs forment cependant des squelettes oxydés (sous forme d'acide bêta cétonique). La production de groupements uniquement hydrogénés est assurée par une séquence réduction-déshydratation-réduction qui fait intervenir une protéine essentielle : l'*Acyl Carrier Protein* (ACP).

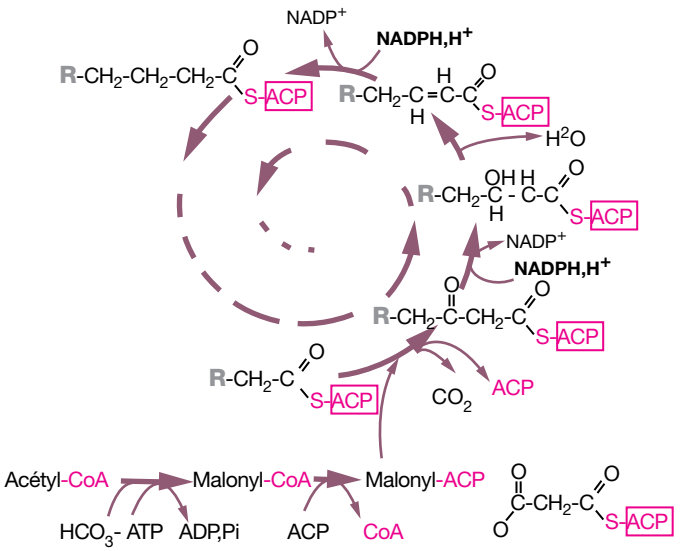


Figure 1 : L'élongation des acides gras à partir d'acétyl-coA

Fiche 114

Les acétyl-coA sont produits à partir de citrate exporté par la mitochondrie (le citrate est un intermédiaire du cycle de Krebs). L'incorporation des fragments dicarbonés fait intervenir une carboxylation (par du dioxyde de carbone) de l'acétyl-coA, ce qui produit du malonyl-coA (à trois carbones, donc). Ce malonyl-coA fournit alors deux carbones à la chaîne en cours d'élongation, avec libération de dioxyde de carbone.

2. Synthèse de phospholipides membranaires dans le réticulum

Production de glycérol

Le glycérol est une petite molécule qu'il est facile de produire à partir du di-hydroxy-acétone par une réduction. Le di-hydroxy-acétone est un intermédiaire de la glycolyse. Plus précisément, c'est du glycérol-phosphate qui est produit, à partir de di-hydroxy-acétone-phosphate.

Assemblage d'un phospholipide

La première étape est la production de phosphatidate par accrochage de deux acides gras sur un glycérol phosphate.

Ensuite, le phosphatidate est associé à un alcool par estérification. Le phosphate réalise donc un pont phosphodiester entre l'alcool et le glycérol. L'estérification du phosphatidate requiert l'activation de l'un des deux réactifs. Dans le cas de la synthèse d'un phosphatidiyl-inositol, c'est le phosphatidate qui est activé au préalable par une liaison au CTP (Cytidine Tri Phosphate). Dans le cas d'une phosphatidyl-éthanolamine, c'est l'éthanolamine qui est préalablement activée, là encore par liaison à un CTP. Ces processus finissent par augmenter la surface du réticulum par incorporation de phospholipides. Cette surface membranaire est ensuite transférée au golgi ou à la membrane plasmique.

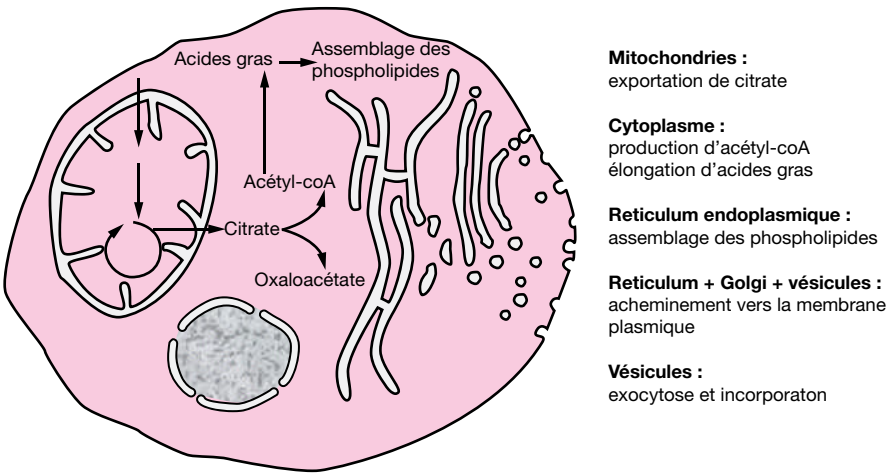


Figure 2 : Cytologie de la synthèse des lipides membranaires

3. Synthèse du cholestérol

C'est encore l'acétyl-coA qui est à l'origine du cholestérol. Il est condensé dans le cytoplasme en un précurseur : l'isopentényl pyrophosphate. Dans le réticulum, cette dernière molécule est alors condensée (à partir de six molécules) en squalène. Le squalène est alors cyclisé puis transformé en cholestérol. L'ensemble du processus consomme de nombreuses molécules d'ATP.

fiche 69 Structure et dynamique des membranes

Les progrès de la microscopie électronique ont permis de comprendre la structure membranaire. Les observations en coupes ultrafines montrent une structure trilamellaire dont les zones sombres correspondent aux protéines membranaires et aux têtes polaires des lipides et la zone claire aux chaînes d'acides gras. Cela correspond à une bicouche de phospholipides dont l'épaisseur varie de 6 à 10 nm. Le noyau, les mitochondries et les chloroplastes sont entourés d'une double membrane (deux bicouches).

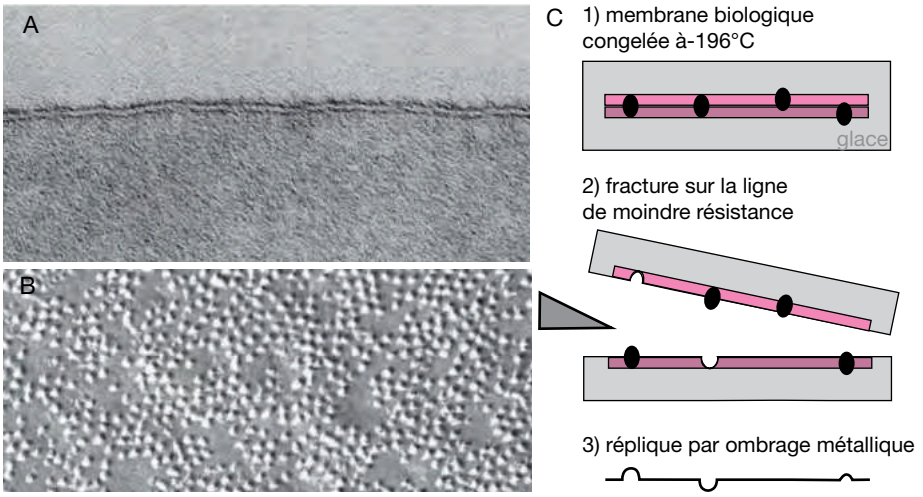


Figure 1 : Observation de membranes en MET
A : coloration négative. B : cryofracture. C : la technique de cryofracture.

La technique de cryofracture a révélé que les protéines ne forment pas un film continu sur la surface lipidique mais sont des petits grains dispersés ce qui a conduit au modèle de mosaïque fluide par J. S. Singer et G. L. Nicolson en 1972.

1. Mosaïque fluide et paramètres de la fluidité

Les membranes biologiques peuvent être considérées comme un auto-assemblage de lipides dans lequel se déplacent des protéines. Les lipides peuvent tourner sur eux-mêmes, peuvent se déplacer latéralement et transversalement. Les protéines peuvent également tourner sur elles-mêmes et se déplacer dans un feuillet. En moins de 40 minutes après la fusion de deux cellules marquées différemment, les marqueurs sont uniformément répartis.

Le coefficient de diffusion des lipides est estimé en moyenne à 1µm^2/sec mais cette fluidité membranaire dépend de l'organisation moléculaire des lipides. En fonction de la température et de la nature des acides gras présents (longueur, nombre d'insaturations), les lipides sont en phase ordonnée compacte ou désordonnée et plus fluide. La fluidité membranaire d'une cellule peut donc être modulée par des modifications des acides gras présents dans les phospholipides membranaires. Le cholestérol a également un effet d'encombrement : il écarte les chaînes compactées (augmente la fluidité) et

stabilise les chaînes déjà écartées (diminue la fluidité). La fluidité des membranes joue un rôle clé pour l'assemblage des membranes et dans tous les processus de mouvement, croissance, trafic…

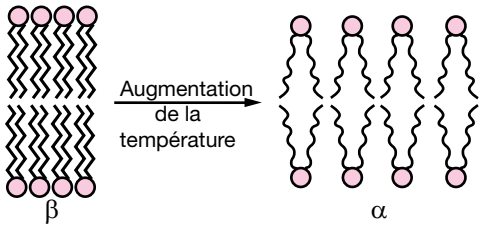


Figure 2 : Transition de phase des lipides
Les lipides ordonnés (β) en phase gel ont une épaisseur plus grande que les lipides désordonnés (α) en phase fluide, qui occupent plus de surface.

2. Diffusion confinée et domaines membranaires

Domaine et polarité cellulaire

La diffusion latérale des protéines et des lipides peut être limitée par des barrières étanches de diffusion qui provoquent une spécialisation fonctionnelle des membranes et une polarité cellulaire. Par exemple les jonctions serrées sur les cellules épithéliales permettent de délimiter une membrane apicale et une membrane basolatérale qui ont des fonctions différentes.

Fiche 147

Modèle des « barrières et piquets » pour la diffusion confinée

Le suivi de particules uniques montre que les coefficients de diffusion sur les membranes biologiques sont bien plus réduits que dans les modèles simplifiés. A. Kusumi a introduit en 1993 la notion de barrière, ou enclos, constituée par le cytosquelette immédiatement sous la membrane. Certaines protéines membranaires établissent des interactions avec ce « squelette membranaire » et sont immobilisées ou freinées. Elles servent alors de « piquet » et limitent la diffusion des autres constituants. L'association de protéines avec la matrice extra-cellulaire participe également à ce phénomène.

Fiche 82

Micro-domaines et radeaux lipidiques

Des micro ou nano-domaines sont parfois identifiés dans les membranes biologiques. Il peut s'agir de domaines protéiques avec des auto-associations en cristaux bidimensionnels (cristaux de bactériorhodopsine dans les membranes pourpres). Des domaines lipidiques peuvent résulter de la présence de certains ions, de protéines associés ou de la séparation entre phase gel et phase fluide.

La notion de radeaux lipidiques (*lipids rafts*) a été introduite par K. Simons et G. Van Meer en 1988. Ce sont des nano-assemblages de cholestérol, glycogolipides et autres phospholipides à acides gras saturés, qui sont en phase gel et dans lesquels se concentrent certaines protéines à domaine transmembranaire long, des protéines à ancre GPI ou couplées à des acides gras. Ces assemblages font partie d'une fraction insoluble dans les détergents. Ces *nanorafts*, hétérogènes et dynamiques, peuvent se regrouper en « plateforme raft » d'une centaine de nanomètres de diamètre ce qui concentre des protéines de fonction associée. Ces plateformes sont impliquées dans la signalisation cellulaire, le trafic membranaire, etc.

fiche 70

L'asymétrie des membranes

L'asymétrie est une propriété de toutes les membranes qui a été constatée dans les années 1970.

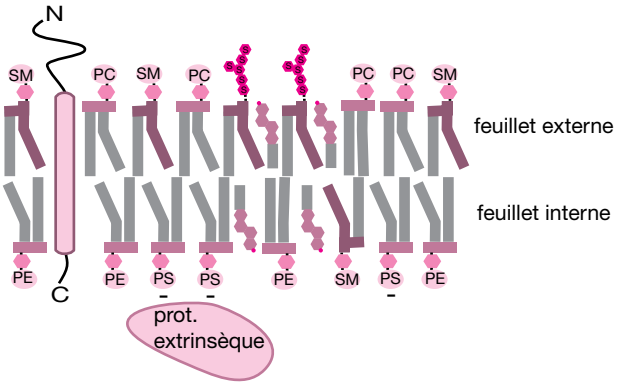


Figure 1 : L'asymétrie membranaire concerne les protéines, les lipides et les glucides

1. Asymétrie liée aux protéines

Si les protéines peuvent se déplacer latéralement dans les membranes, elles ne peuvent pas avoir de mouvement transversal, c'est-à-dire changer de feuillet ni traverser la bicouche lipidique. Les protéines intrinsèques, insérées dans les membranes, ou les protéines sécrétées, présentes sur la face extracellulaire, ont leur organisation et leur orientation définies dès leur synthèse dans le réticulum endoplasmique granuleux. Les protéines extrinsèques cytoplasmiques ne peuvent généralement pas traverser ces membranes. Différentes classes de protéines membranaires sont définies en fonction du type d'association avec les lipides et en fonction de leur orientation.

Fiche 58

Fiche 71

La présence de protéines particulières sur la face interne ou externe des membranes est responsable des propriétés physiologiques de ces membranes.

2. Asymétrie liée aux lipides

Différence de composition des feuillets

Il existe une différence de composition lipidique des deux faces des bicouches membranaires : parmi les principaux lipides déjà mentionnés, 80 à 90 % des phosphatidylcholines (PC) et des sphingomyélines (SM) sont localisés sur la face externe alors que 80 % des phosphatidyléthanolamines (PE) et des phosphatidylsérines (PS) sont sur la face interne. Seuls les stérols et les céramides semblent avoir une distribution homogène entre les deux feuillets.

Fiche 67

Cette asymétrie a des conséquences physico-chimiques et physiologiques. Les feuillets peuvent être différents du point de vue de la fluidité et du point de vue de la charge (négative côté cytosolique) néanmoins compensée par des ions. La présence de phospholipides chargés négativement (comme les PS) ou de têtes polaires particulières

Fiche 79

(phosphatidylinositol) est importante pour le fonctionnement de protéines associées à la signalisation intracellulaire. L'externalisation des PS sur les plaquettes sanguines est reçue comme un signal d'activation de la coagulation. Sur toutes les autres cellules, c'est un signe d'apoptose qui favorise l'élimination de la cellule en question par les macrophages.

Fiche 139

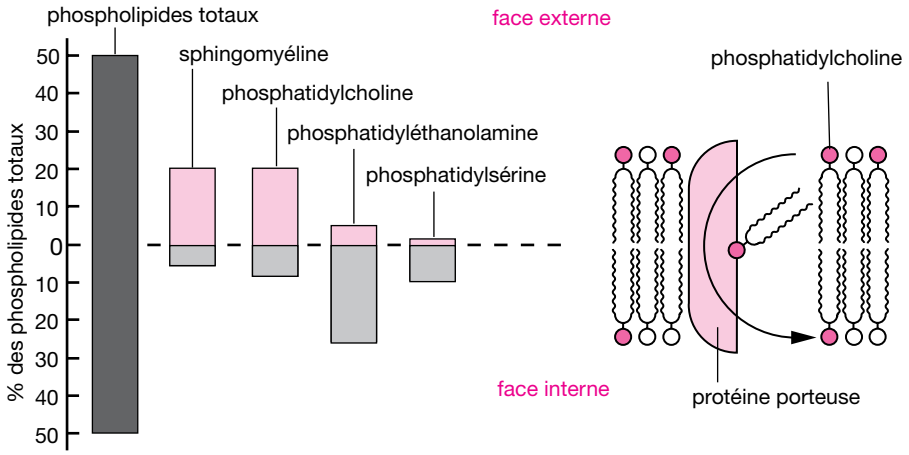


Figure 2 : Diagramme montrant l'asymétrie de composition lipidique d'une membrane plasmique d'hématie et le passage d'un feuillet à l'autre

Mise en place et maintien de l'asymétrie

La biosynthèse des lipides et donc l'accroissement de la surface des membranes est principalement réalisée par voie enzymatique dans des membranes biogéniques (REL chez les animaux). Alors que les nouveaux lipides sont toujours ajoutés au feuillet cytoplasmique, on observe un flip-flop très rapide entre les deux feuillets pour les PC. Ce phénomène de diffusion transversale est très lent dans les systèmes modèles, il existe donc dans les membranes biogéniques une translocase de type flippase qui permet une diffusion facilitée des PC et un équilibre entre les deux feuillets. Cette protéine ne permet pas la diffusion des PS et PE. Les stérols et les céramides qui ont une tête polaire très réduite, peuvent diffuser spontanément.

Fiche 68

Dans les membranes non biogéniques (comme la membrane plasmique chez les animaux), une translocase de type floppase catalyse au contraire un transport actif pour déplacer les PS et PE vers le feuillet cytoplasmique, donc dans le sens opposé au gradient. Dans le cas de l'externalisation des PS lors de l'apoptose, après que la floppase ait été inactivée, une scramblase non sélective permet la diffusion transversale facilitée de tous les lipides.

3. Asymétrie liée aux glucides

La glycosylation des protéines et des lipides se produit dans la lumière du RE ou de l'appareil de Golgi, c'est pourquoi les sucres ne se trouvent que sur la face extracellulaire des membranes. Ils jouent un rôle dans les phénomènes d'adhérence et de reconnaissance cellulaire.

Fiche 89

fiche 71

Les types de protéines membranaires

Fiche 72

Les protéines membranaires représentent 30 % des produits du génome, 50 % des cibles des médicaments, mais 4 % des protéines dont la structure 3D a été déterminée. Elles sont impliquées dans presque toutes les fonctions des membranes. Pour les extraire des membranes, il est parfois nécessaire d'utiliser des détergents qui déstructurent la bicouche lipidique, on parle alors de protéines intrinsèques. Lorsque l'interaction est moins forte et que des traitements doux suffisent, il s'agit de protéines extrinsèques, ou périphériques. Un classement est fait également selon que la protéine traverse ou pas la membrane.

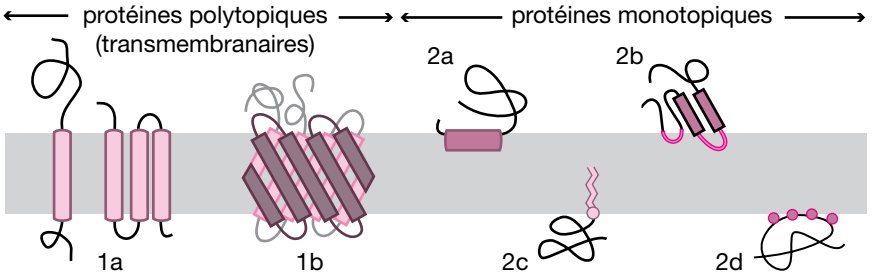


Figure 1 : Types d'ancrage des protéines dans la membrane

1. Les protéines transmembranaires

Ces protéines intrinsèques transmembranaires (TM) sont en contact avec les chaînes aliphatiques des acides gras à l'intérieur de la bicouche et ont donc des domaines hydrophobes qui leur permettent de s'y insérer.

Hélices alpha transmembranaires (figure 1a)

Fiche 127

La majorité des protéines transmembranaires s'insèrent dans la bicouche lipidique grâce à une ou plusieurs hélices alpha TM. L'analyse de l'hydrophobie des acides aminés peut prédire leur existence. Elles sont longues de 18 à 20 résidus. Lorsque la protéine contient plusieurs TM (exemple RCPG avec 7 TM), ceux-ci ont une face hydrophobe tournée vers les lipides et une face hydrophile tournée vers un autre segment. Il s'agit d'hélices amphiphiles.

Les segments TM peuvent être au cœur de la fonction de la protéine (canaux) mais peuvent aussi servir seulement d'ancrage pour des récepteurs ayant leurs domaines fonctionnels de part et d'autre de la membrane. Au moment de leur synthèse, selon les séquences signal, l'extrémité N-terminale se retrouve côté cytosolique (protéine de type II) ou non (type I).

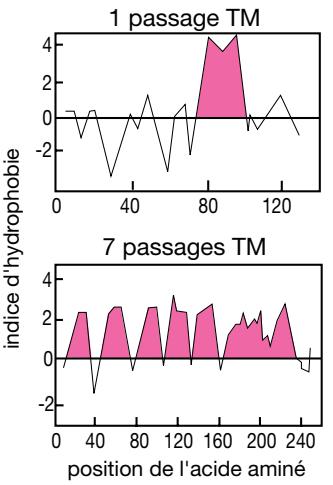


Figure 2 : Prédiction des hélices transmembranaires

Tonneau béta (figure 1b)

Les protéines de la membrane externe des bactéries ont une structure originale. Leurs segments TM ne sont pas prédits par les profils d'hydrophobie car il s'agit de brins béta organisés en tonneau, créant un pore central ouvert de part et d'autre. La membrane externe bactérienne est donc perméable à toutes les molécules assez petites (jusqu'à 800 Da environ) pour traverser ces « porines ». Certaines toxines bactériennes, telle que l'hémolysine, détruisent les cellules en y créant des tonneaux béta.

2. Les protéines monotopiques

Ces protéines sont présentes sur une seule face de la membrane. Il y a quatre principaux types d'ancrages aux lipides, mais les protéines extrinsèques peuvent aussi établir des interactions protéiques avec des protéines intrinsèques.

Hélice alpha parallèle (ancre IPM) (figure 1, 2a)

Quelques protéines sont ancrées dans la membrane par une hélice alpha amphiphile dans le plan de la membrane (IPM *In Plane Membrane*). Une face hydrophobe interagit avec les acides gras alors que l'autre face hydrophile interagit avec les têtes polaires. La cyclo-oxygénase 1, qui métabolise l'acide arachidonique en divers médiateurs cellulaires, en est un exemple. Il s'agit de protéines intrinsèques.

Fiche 182

Boucles hydrophobes (figure 1, 2b)

Des segments de la protéine, sans structure périodique particulière, contenant des acides aminés hydrophobes, se retrouvent insérés plus ou moins profondément dans l'interface membranaire. Ce type d'interaction est notamment présent dans les défensines qui conduisent à la destructuration des membranes cibles.

Lipidation (figure 1, 2c)

Il s'agit d'une liaison covalente entre une protéine soluble et un lipide, qui ancre donc la protéine fortement dans la membrane. La plus fréquente est la glypiation, ou ancre GPI (GlycosylPhosphatidylInositol) qui implique un phospholipide modifié par des sucres. Les protéines à ancre GPI sont extracellulaires, elles sont abondantes dans les radeaux lipidiques et cette ancre peut être clivée par une phospholipase spécifique.

Fiche 89

Les autres réactions sont des acylations qui lient un acide gras à la protéine (myristoylation, palmitoylation, prénylation), seule la palmitoylation est réversible. Les protéines sont ancrées sur la face cytoplasmique.

Interaction électrostatique (figure 1d)

Ce sont typiquement des protéines extrinsèques, liées aux têtes polaires des lipides. Ces interactions sont très souvent dynamiques, les protéines étant recrutées à la membrane en fonction de la physiologie cellulaire. Les annexines par exemple se lient aux PS en fonction du taux de calcium intracellulaire. Le marquage par de l'annexine 5 couplée à un fluorochrome est utilisé pour identifier des cellules en apoptose précoce qui ont externalisé des PS.

fiche 72 La diversité des fonctions membranaires

Les membranes sont constituées de lipides et de protéines, on considère souvent que les lipides ont principalement un rôle structural, permettant l'étanchéité de la membrane, et que les protéines jouent tous les autres rôles. Pourtant beaucoup de protéines membranaires perdent leur fonction hors de leur environnement, l'interaction avec certains lipides est donc indispensable à leur fonction.

Les différentes fonctions possibles des membranes, listées ici, seront détaillées dans divers chapitres de cet ouvrage. Chez les bactéries, 40 à 50 % des protéines membranaires serviraient au transport, alors que chez les eucaryotes, la fonction de signalisation et de communication est fortement développée (15 % des protéines membranaires sont des récepteurs couplés aux protéines G).

Fiche 127

1. Fonction de barrière et fonction de transport

La fonction de barrière et de compartimentation est une propriété de base partagée par toutes les membranes biologiques. Elle se fonde essentiellement sur la nature amphiphile des lipides et leur capacité à s'associer en une bicouche qui délimite deux compartiments aqueux. Les compartiments ainsi crées servent à séparer des composés, à les concentrer, stocker ou transporter d'un organite à l'autre et à séparer des activités cellulaires.

L'existence de barrière est indissociable de la mise en place de mécanismes de transport pour les ions, les nutriments, et toutes les molécules nécessaires au fonctionnement cellulaire. Les petites molécules transitent par des mécanismes de diffusion ou de transport actif. Les macro-molécules traversent les membranes par exocytose et endocytose.

Fiches 73, 74, 75, 76, 101, 102

2. Fonction de capture et conversion d'énergie

L'existence de compartiments cellulaires peut conduire à des gradients de concentration de molécules qui sont ensuite utilisés pour la conversion d'énergie par des processus de couplage. Ces processus se produisent notamment dans les chloroplastes et les mitochondries qui sont des organites entourés par des doubles membranes avec un espace intermembranaire.

Fiche 107

L'énergie (lumière ou nourriture) est utilisée pour créer un gradient de protons de part et d'autre de cette double membrane. Le centre réactionnel de *Rhodopseudomonas viridis* a été le premier complexe dont la structure atomique a été résolue (prix Nobel 1988 pour J. Deisenhofer, H. Hartmut et R. Huber). Le gradient de protons est ensuite converti par les ATP synthases en énergie utilisable par toutes les cellules.

Fiche 109

3. Fonction de signalisation et transfert d'information

La membrane plasmique de chaque cellule contient des récepteurs particuliers qui lui permettent de détecter des signaux de son environnement. Ce sont des protéines dont la partie extracellulaire collecte le signal, ce qui modifie la partie intracellulaire. Le signal est ainsi transmis à l'intérieur de la cellule jusqu'à mise en place de la réponse physiologique (voir chapitre 11). Chez l'homme, 1/3 des cibles pharmacologiques sont des récepteurs couplés aux protéines G. Grâce à la formation de micro-domaines dans les

membranes, des plateformes de signalisation peuvent se constituer. Elles regroupent un grand nombre de récepteurs et de molécules nécessaires à la transduction du signal, ce qui amplifie le signal. Les radeaux lipidiques (*raft*) sont un exemple de ces plateformes.

Fiche 69

Les lipides peuvent également participer à la transmission du signal, certains médiateurs lipidiques qui diffusent librement à travers la bicouche sont des produits de dégradation de phospholipides par des enzymes dont l'activité est régulée (phosphatidylinositol, prostaglandines).

La transmission de l'information peut parfois se faire à longue distance. Dans le cas des cellules nerveuses, une information sensorielle est transformée en signal électrique *via* un potentiel d'action qui se propage sur toute la longueur du neurone grâce à l'ouverture de canaux ioniques.

Fiche 79

4. Fonction de reconnaissance et d'adhérence

Chez les animaux pluricellulaires, les cellules vivent en société organisée (voir chapitre 13). La membrane plasmique des cellules permet l'ancrage et la communication directe *via* des jonctions intercellulaires. Les membranes portent également des molécules de reconnaissance d'un individu (protéines du CMH), d'un type de tissu, d'un type de cellules. Ces molécules peuvent être des protéines ou des sucres (groupes sanguins). Elles permettent notamment les interactions cellulaires ou la migration des cellules. Les cellules tissent aussi des contacts *via* leur membrane plasmique avec la matrice extracellulaire.

Fiche 190

5. La membrane, support d'activité enzymatique

De nombreuses enzymes sont associées aux différentes membranes : pour modifier les acides gras des phospholipides, pour le métabolisme énergétique, pour la production de médiateurs lipidiques, mais aussi pour bien d'autres fonctions qui ne sont pas associées aux lipides. En effet les membranes constituent des surfaces activées qui peuvent concentrer en deux dimensions les participants d'une même voie biochimique, ce qui en améliore l'efficacité. Les enzymes sont généralement ancrées dans la membrane alors que les substrats diffusent librement. Cela permet une séparation physique qui limite les interférences entre les voies métaboliques.

fiche 73

Fonction de compartimentation et perméabilité des membranes

La fonction de compartimentation est une fonction par défaut des membranes. La membrane plasmique permet de réunir dans un espace clos et délimité tous les éléments nécessaires à la vie cellulaire. Pour assurer leurs fonctions, toutes les cellules doivent extraire les éléments nutritifs de leur milieu de vie et doivent rejeter leurs déchets métaboliques à travers cette membrane plasmique. Pour les cellules eucaryotes de plus grande taille, les membranes internes permettent de délimiter des compartiments exerçant des fonctions spécifiques. Cette répartition des tâches est possible car les membranes ont une perméabilité sélective.

1. Perméabilité membranaire et Loi de diffusion

Les lois générales de la physique décrivent que, dans l'univers, le désordre (l'entropie) augmente : si vous versez un verre d'eau salée dans un verre d'eau douce, vous obtenez de l'eau moyennement salée et vous ne conservez pas deux régions distinctes. Les molécules libres de diffuser vont donc se déplacer aléatoirement jusqu'à ce que l'environnement soit homogène. Le flux net de diffusion (la moyenne de tous les déplacements) est proportionnel au gradient de concentration (ΔC) et au coefficient de diffusion D du soluté dans le solvant. C'est la loi de la diffusion (loi de Fick).

Lorsqu'une membrane sépare en deux l'environnement, le coefficient de diffusion est transformé en coefficient de perméabilité P en tenant compte de l'épaisseur de la membrane P = D/épaisseur membrane. P équivaut à une vitesse. La détermination des coefficients P pour diverses molécules (figure 1) a montré que les membranes sont semi-perméables.

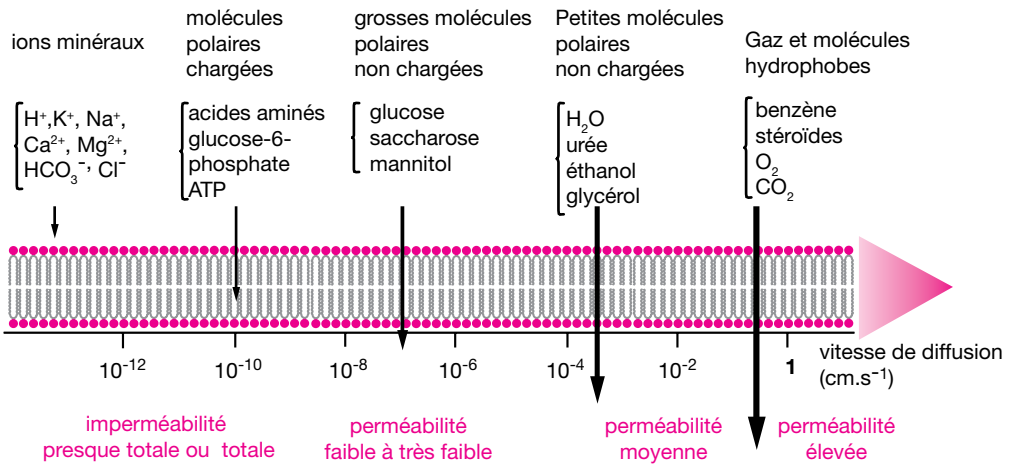


Figure 1 : Perméabilité de bicouche lipidique artificielle selon la nature des molécules

Les membranes, ayant une importante composante hydrophobe, sont perméables aux petites molécules hydrophobes (stéroïdes, dérivés des acides gras), aux gaz et aux molécules non chargées en fonction de leur taille. Les macromolécules et les ions ne peuvent pas franchir seuls les membranes.

2. Gradient de concentration, gradient électrochimique et pression osmotique

Deux compartiments différents peuvent donc avoir des contenus différents en ions, solutés ou protéines, ce qui est une des bases du fonctionnement cellulaire. Lors de la diffusion simple (ou passive) d'une molécule non chargée, le flux entre les compartiments dépend de la différence de concentration et du coefficient de perméabilité (Flux = P*ΔC). Lorsque la molécule est chargée, la différence de potentiel électrique entre les deux côtés de la membrane doit être prise en compte. Les cations sont plutôt attirés vers l'intérieur des cellules qui est négatif par rapport à l'extérieur. Les ions suivent donc un gradient électrochimique, qui est la combinaison du gradient de concentration et du gradient électrique.

Fiche 77

L'eau est capable de diffuser lentement à travers les membranes lipidiques, il s'agit du phénomène d'osmose. Le flux net de l'eau va dans le sens de la concentration globale en ions et solutés, qu'on appelle pression osmotique. Lorsque le milieu extérieur a une pression osmotique plus élevée que la cellule (milieu hypertonique), celle-ci se vide de son eau (plasmolyse). Lorsque le milieu extérieur a une pression osmotique plus faible (milieu hypotonique), la cellule se regonfle d'eau (turgescence).

3. Diffusion simple et transporteurs

L'observation des flux à travers les membranes biologiques montre qu'ils sont très souvent supérieurs à ceux estimés par une diffusion passive. Lorsque la vitesse atteint un plateau pour de fortes concentrations et que des analogues structuraux du soluté bloquent le transport, c'est qu'une protéine accélère le passage de la molécule à travers la membrane. Si le flux respecte le sens du gradient électrochimique, il s'agit de diffusion facilitée. Pour transporter une molécule à l'inverse du gradient, il faut fournir de l'énergie, c'est un transport actif. Dans le cas de co-transport, le transport actif d'une molécule Y est permis par le co-transport d'une molécule X dans le sens de son gradient.

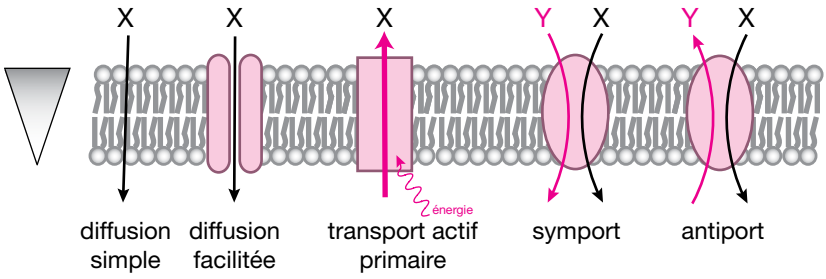


Figure 2 : Les différentes voies de passage de molécules X et Y à travers une membrane

Le triangle indique le sens du gradient pour X. Les flèches noires symbolisent des transports dans le sens des gradients électrochimiques, les flèches roses dans le sens inverse.

fiche 74

La diffusion facilitée

Fiche 73

La diffusion facilitée suit le sens du gradient électrochimique et implique une protéine de transport qui rend possible ou accélère la diffusion d'ions ou de petites molécules.

Fiche 71

Dans la membrane externe des bactéries, des protéines organisées en tonneau beta ayant un large pore central permettent la diffusion de nombreuses molécules de petite taille (< 800 Da). Cette famille des porines est très peu spécifique. Nous nous intéresserons par la suite aux transporteurs sélectifs

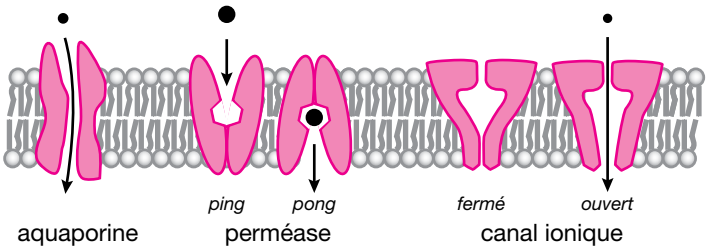


Figure 1 : Trois familles de transporteurs sélectifs permettant une diffusion facilitée

1. Les aquaporines, des canaux à eau et à petits solutés

Les aquaporines sont responsables des mouvements rapides d'eau à travers les membranes chez toutes sortes de cellules et d'organismes et sont impliquées dans de nombreuses fonctions. Elles appartiennent à la superfamille des *Major Intrinsic Proteins* (MIP, plus de 800 protéines) qui comprend aussi les aquaglycéroporines. Alors que les aquaporines sont des canaux à eau, les aquaglycéroporines laissent passer des petits solutés non chargés tels que le glycérol. Ces protéines sont constituées de six hélices transmembranaires (TM) délimitant un pore central, avec une forme globale de sablier. La sélectivité pour l'eau ou les petits solutés est établie par une réduction du diamètre (jusqu'à 0,3 nm environ), une répulsion électrostatique et, soit un enchainement de liaisons hydrogène pour les canaux à eau, soit un filtre amphiphile pour les aquaglycéroporines. P. Agre a reçu le prix Nobel en 2003 pour la découverte de l'aquaporine 1 dans les globules rouges.

2. Les perméases, des transporteurs sélectifs de petites molécules

Les perméases sont des uniporteurs, ne transportant qu'une sorte de molécule et dont la structure est affectée par la liaison avec le composé transporté. Contrairement aux canaux, il n'y a pas d'ouverture d'un bout à l'autre de la membrane lipidique. La perméase présente un seul site de fixation spécifique du composé qui peut être accessible d'un côté, puis de l'autre, de la membrane par un mécanisme surnommé « ping-pong ».

Le transport par des perméases peut être caractérisé par une constante d'affinité et une vitesse maximale, à la manière des couples enzymes/substrats. C'est la liaison du soluté sur le transporteur qui entraîne le changement de conformation nécessaire au transport. Celui-ci respecte toujours le sens du gradient électrochimique.

L'une des perméases les mieux étudiées est GLUT1 (Glucose transporter 1), responsable du transport du glucose dans les globules rouges et de nombreuses autres cellules. GLUT1 est une protéine à 12 TM. Elle reconnaît des sucres tels que le glucose et le mannose (seulement les isomères D). Le Km, soit la concentration qui permet d'atteindre la moitié de la vitesse maximale, est de 1,5 mM pour le glucose (alors que la glycémie normale à jeun est autour de 5 mM) et de 20 mM pour le mannose. La vitesse de transport est alors multipliée par 10 comparée à une diffusion passive. Il existe différents transporteurs du glucose avec des caractéristiques différentes selon les tissus.

3. Diversité des canaux ioniques

Les canaux ioniques forment des pores remplis d'eau dans les membranes, ce qui permet à des ions sélectionnés par un filtre de traverser la couche hydrophobe. On estime que 10^6 à 10^8 ions peuvent traverser un tel canal par seconde (soit mille fois plus qu'avec un transporteur). L'architecture des canaux ioniques est globalement conservée. Elle est en forme de « tipi inversé » avec des hélices internes formant un filtre sélectif et des hélices externes qui peuvent changer de conformation pour ouvrir ou fermer le canal. Ces hélices externes sont éventuellement en contact avec d'autres sous-unités servant de senseur du signal. En effet, la plupart des canaux ioniques ne s'ouvrent qu'après une stimulation. Selon le type de signal, on distingue :

- des canaux ligands-dépendants. Les ligands intracellulaires sont des ions (calcium…) ou des nucléotides. Les ligands extracellulaires sont le plus souvent des neurotransmetteurs pour des canaux présents au niveau des synapses, ils permettent une dépolarisation membranaire. Le plus étudié est le récepteur nicotinique à l'acetylcholine (nAChR), constitué de 5 sous-unités avec chacun une hélice coudée. Le changement de conformation de ces hélices ouvre ou ferme le canal ;

Fiche 152

- des canaux potentiel (ou voltage) dépendants. Surtout présents dans les cellules excitables (nerfs, muscles), ils permettent la transmission des potentiels d'action. Des hélices chargées se déplacent lors de la dépolarisation de la membrane, conduisant à l'ouverture du canal ;

Fiche 79

- des canaux mécanosensibles, activés par des tensions membranaires suite à des chocs osmotiques ou à des déformations imposées par le cytosquelette...
- des canaux de fuite, qui sont toujours en position ouverte. Les canaux de fuite du potassium sont présents dans toutes les cellules. La structure atomique de ce canal a été déterminée par le groupe de R. MacKinnon en 1998 (prix Nobel 2003). La sélectivité du filtre est basée sur le diamètre des ions et l'interaction avec des atomes d'oxygène de résidus glycines conservés.

Plusieurs centaines de canaux ioniques sont connus à ce jour, et de nouveaux sont encore régulièrement identifiés.

fiche 75

Le transport actif primaire

Un transport actif se produit dans un sens contraire du gradient électrochimique, il faut donc fournir de l'énergie à la « pompe » pour qu'elle fonctionne.

Le transport actif primaire utilise l'énergie directement alors que le transport secondaire utilise l'énergie d'un gradient électrochimique préconstitué.

Fiche 76

Les énergies utilisables directement sont la lumière et l'ATP. Les transporteurs utilisant la lumière sont surtout présents chez les bactéries, comme la bactériorhodopsine qui permet l'accumulation de protons. La plupart des transporteurs sont en fait des ATPases qui hydrolysent l'ATP.

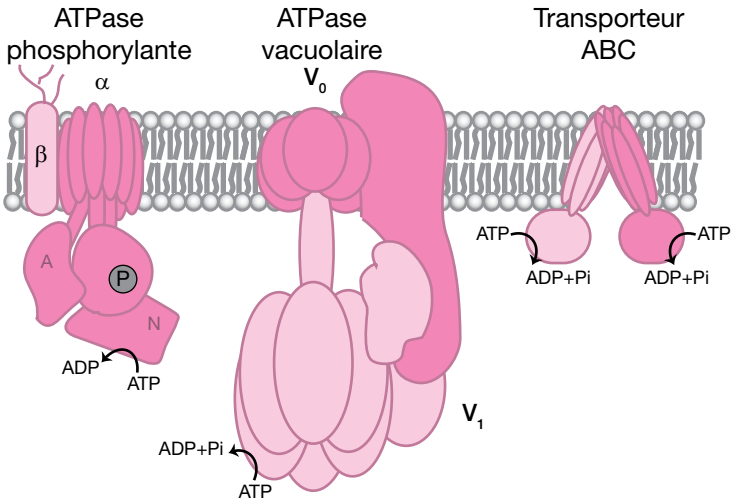


Figure 1 : Les principaux transporteurs utilisant l'ATP

1. Les ATPases ioniques

Ce sont des pompes qui transfèrent une ou plusieurs sortes d'ions. Selon le type de pompe, on distingue les ATPases de type P, V ou F.

ATPases autophosphorylantes

Les ATPases P, ou autophosphorylantes possèdent deux chaînes α identiques et parfois des chaînes β régulatrices glycosylées. La chaine α est composée de 10 TM qui constituent le filtre sélectif et permettent la liaison aux ions, et de trois domaines cytosoliques A, N et P. L'hydrolyse de l'ATP dans le domaine N permet la phosphorylation du domaine P qui s'accompagne d'un changement de conformation, ce qui libère les ions (détails figure 2). Le mécanisme du transport a été compris par l'étude structurale de la calcium-ATPase. Cette pompe permet de stocker le calcium dans le réticulum lisse et de le garder à très bas niveau dans le cytosol où il sert de messager cellulaire.

Fiches 124, 127

La pompe Na^+/K^+ est une des pompes les plus importantes pour le fonctionnement des cellules animales, d'ailleurs les cellules utilisent 1/3 de leur énergie à la faire fonctionner. Elle est responsable de la faible quantité de sodium dans le cytosol (10 mM

contre 145 mM à l'extérieur) et de l'abondance du potassium (140 mM contre 5 mM à l'extérieur). En échangeant 3 Na^+ contre 2 K^+, elle crée une dépolarisation membranaire, elle est donc électrogénique. Elle crée aussi un gradient électrochimique dont l'énergie sera utilisée pour des co-transports. Chez les végétaux, les champignons et les bactéries, son équivalent est une pompe à protons de type P.

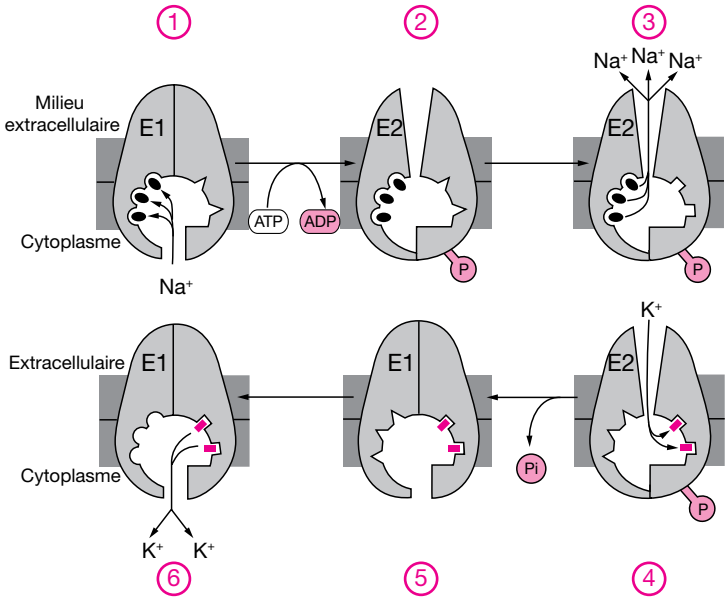


Figure 2 : Fonctionnement de la pompe Na^+/K^+

1-L'enzyme en configuration E1 lie 3 Na^+ et 1 ATP. 2- L'hydrolyse de l'ATP permet la phosphorylation du domaine P et un changement en conformation E2. 3- Les ions Na^+ sont libérés. 4- 2 ions K^+ sont chargés ce qui provoque la déphosphorylation. 5- Retour en conformation E1. 6-Libération des ions K^+.

ATPases V ou F (figure 1)

Les ATPases V et F sont des complexes multiprotéiques d'architecture similaire qui pompent des protons. Les ATPases V sont présentes dans les membranes des vacuoles et des lysosomes qu'elles acidifient. L'hydrolyse d'ATP par plusieurs sous-unités de la fraction V1 cytosolique permet le pompage des protons à travers le canal de la fraction V0 transmembranaire. Les ATPases F fonctionnent généralement à l'envers pour fabriquer de l'ATP, ce sont des ATPsynthases.

Fiche 108

2. Les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*)

C'est une vaste famille dont chaque membre est spécifique d'un substrat. Les transporteurs ABC sont constitués de quatre domaines structuraux : deux domaines cytosoliques de liaison à l'ATP et deux domaines transmembranaires (6 TM chacun) formant le passage pour les molécules transportées. Ces protéines sont très abondantes dans la membrane plasmique des bactéries (perméases bactériennes) ce qui permet leur nutrition et l'export de toxines. Chez les eucaryotes, ces protéines sont destinées à l'export de multiples substances. Les transporteurs MDR (*MultiDrug Resistance*) participent à la détoxification du cytoplasme mais leur surexpression conduit à une résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. TAP est lié à la présentation de peptides pour le système immunitaire.

Fiche 189

fiche 76

Le co-transport

Fiche 75

Le transport actif secondaire permet de transporter des ions ou des petites molécules organiques contre leur gradient de concentration mais la source d'énergie est indirecte.

Au lieu d'utiliser l'ATP ou la lumière comme les transporteurs actifs primaires, l'énergie utilisée est celle du gradient électrochimique d'un ion moteur associé. Cet ion moteur, le plus souvent Na^+ dans les cellules animales et H^+ dans les cellules végétales ou bactériennes, est accumulé par des transporteurs actifs qui utilisent de l'ATP pour créer un fort gradient de concentration. Le retour de l'ion moteur (énergétiquement favorable) est associé au transport actif de l'autre molécule (énergétiquement défavorable) au sein du transporteur secondaire. L'un ne peut pas être transporté sans l'autre, c'est un co-transport obligatoire. La fixation de l'ion moteur favorise la fixation de l'autre soluté, et la vitesse du transport dépend de la force du gradient ionique. Les deux molécules peuvent être transportées dans la même direction (symport), ou bien en sens inverse (antiport).

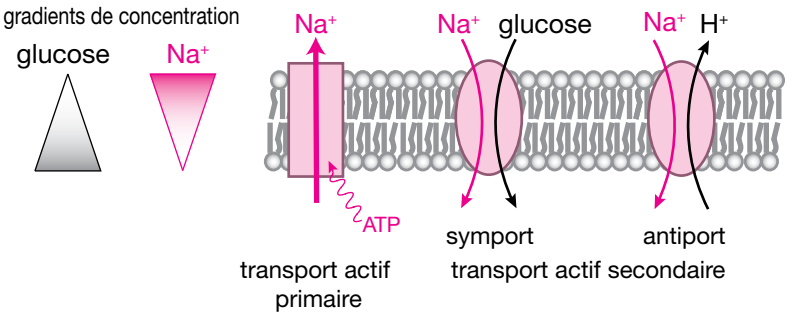


Figure 1 : Transport actif primaire et secondaire

Prenons quelques exemples de couplages importants pour la physiologie cellulaire.

1. Antiports associés au maintien du pH cytosolique

Plusieurs transporteurs sont utilisés par les cellules pour maintenir le pH cytosolique dans une gamme compatible avec l'intégrité et le fonctionnement des molécules (autour de 7,2), quel que soit le pH extracellulaire. Les deux principales stratégies sont l'export de protons H^+ ou le transport d'ions HCO_3^-. Les transporteurs sont régulés par le pH.

À pH acide, l'antiport (ou échangeur) Na^+/H^+ permet de coupler la sortie des protons en excès au retour de sodium dans la cellule. L'antiport Na^+ HCO_3^-/Cl^- permet également l'entrée de HCO_3^- associé au sodium contre la sortie d'ions chlore. HCO_3^- neutralise les protons pour dégager du CO_2 ($HCO_3^- + H^+ \Rightarrow CO_2 + H_2O$). Il y a donc une augmentation du pH.

Au contraire à pH trop élevé, un antiport Cl^- / HCO_3^- indépendant du sodium permettra l'export de HCO_3^- couplé à l'import de chlore dans le sens du gradient. HCO_3^- équivaut à $CO_2 + OH^-$. La sortie de HCO_3^- conduit donc à une baisse du pH.

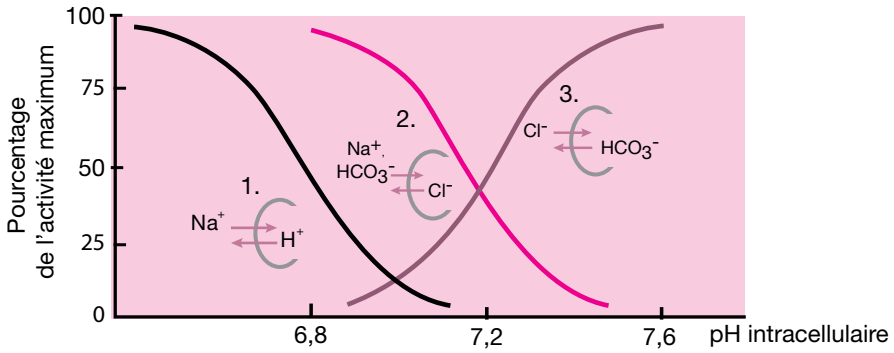


Figure 2 : Les antiporteurs impliqués dans le maintien du pH cytosolique : antiporteur Na^+/H^+ (1), antiporteur HCO_3^-/Cl^- Na^+ dépendant (2), antiporteur Cl^-/HCO_3^- Na^+ indépendant (3)

2. Symports pour l'absorption des sucres

Les nutriments nécessaires au fonctionnement cellulaire, notamment les sucres, ne peuvent pas traverser facilement les membranes biologiques.

Les bactéries utilisent le gradient de protons généré par les chaînes d'oxydo-réduction. Ainsi, la lactose perméase (codée par le gène Y de l'opéron lactose) permet l'import de lactose contre son gradient de concentration. Les cellules végétales utilisent également des symporteurs H^+/ saccharose, le gradient de protons étant initialement installé par des pompes à protons utilisant l'ATP.

Fiche 55

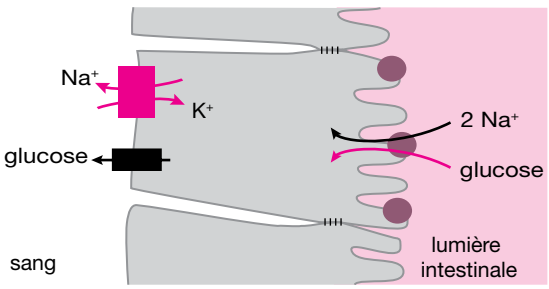


Figure 3 : Trois types de transporteurs sont utilisés pour le transport transcellulaire du glucose dans les cellules épithéliales de l'intestin

Co-transport Na^+/glucose dans la membrane apicale. Transport actif Na^+/K^+ et diffusion facilitée du glucose dans la membrane basolatérale.

Les cellules animales importent généralement le glucose abondant dans le sang par diffusion facilitée. Mais les cellules de l'épithélium intestinal doivent au contraire absorber et concentrer les sucres de l'alimentation pour les transférer vers le sang. Cela met en jeu la polarité des cellules et la présence de transporteurs distincts dans les différents compartiments de la membrane. Un symporteur Na^+/glucose est séquestré dans la membrane apicale des enterocytes. Grâce à l'entrée de deux ions Na^+, il permet l'accumulation du glucose dans la cellule jusqu'à un rapport de concentration de glucose interne vs externe de 20 000:1. Dans la membrane basolatérale, la pompe Na^+/K^+ externalise le sodium dont la concentration interne reste basse, ce qui constitue le moteur de l'import de glucose. Enfin un transporteur de glucose permet la diffusion facilitée de celui-ci vers le sang.

Les trois types de transporteurs ont une diffusion confinée à une certaine portion de la membrane plasmique grâce à la présence de jonctions serrées qui jouent le rôle de barrière dans la bicouche lipidique et qui définissent ainsi la polarité cellulaire.

fiche 77 Ions, membranes et potentiel électrique

Toutes les membranes biologiques présentent une différence de potentiel électrique transmembranaire. Dans une cellule animale, la valeur est assez proche de – 60 mV, le signe – révélant que la face interne de la membrane est chargée négativement et la face externe positivement. Une telle tension reflète les contrastes chimique et physique entretenus par la membrane.

1. Comportement d'un ion vis-à-vis d'une membrane

Perméabilité et conséquences d'un contraste de concentration

Fiche 21

La membrane plasmique contient de nombreux canaux de fuite spécifiques des ions K^+. Cela rend ces membranes beaucoup plus perméables au potassium qu'au sodium.

Nous considérerons donc dans un premier temps les membranes comme idéalement perméables uniquement aux ions potassium. Envisageons les conséquences d'un contraste de concentration de part et d'autre de cette membrane : réalisons une enceinte constituée de deux compartiments séparés par une membrane uniquement perméable au potassium. Dans le premier compartiment, 10 mM de KCl et 1 mM de KCl dans l'autre. La conséquence immédiate est l'installation d'une différence de potentiel de 58 mV entre les deux compartiments, le premier devenant légèrement négatif.

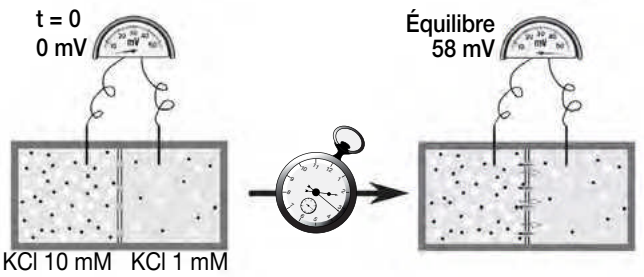


Figure 1 : Conséquences d'un contraste chimique

Lors d'une transformation comme ci-dessus, les flux d'ions qui s'établissent modifient légèrement les concentrations, mais de façon tellement infime, qu'on les considère comme inchangées.

Un équilibre entre deux tendances

Cette différence de potentiel résulte de la conjonction de deux phénomènes : la perméabilité sélective de la membrane et le contraste de concentration. En effet, dès l'instant initial, des ions K^+ migrent vers le compartiment (2) du fait du gradient de concentration. Il en résulte immédiatement un contraste électrique : le compartiment (1) devient légèrement négatif, le compartiment (2) devient légèrement positif. Mais ce contraste crée une force électrique de rappel des ions K^+ vers le compartiment (1). Au tout début, cette force de rappel est faible, mais au fur et à mesure de la migration sous l'effet du

gradient de concentration, cette force de rappel devient de plus en plus importante et elle finit très rapidement par compenser exactement la tendance chimique des K^+ à migrer vers (2).

Un équilibre est nécessairement atteint : le contraste de concentration est maintenu, la différence de potentiel membranaire est non-nulle, et cette situation est stable.

2. Modèle de potentiel de membrane avec un seul ion

Évaluation des gradients chimique et électrique.

La « tendance » chimique à aller du compartiment concentré (1) vers le compartiment peu concentré (2) s'exprime sous la forme de la variation de potentiel chimique associée au transfert.

$$\Delta rG = R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right)$$

Où R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue et C_1 et C_2 les concentrations du soluté dans chacun des compartiments.

De la même manière, la « tendance » électrique à aller du compartiment chargé positivement vers le compartiment chargé négativement (pour ce qui concerne les ions K^+, est donnée par le travail électrique associé au transfert de charge.

$$\Delta rG = z \cdot F \cdot E$$

Expression du gradient électrochimique

Au total, donc, nous avons une expression du gradient électrochimique :

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln\left(\frac{C_2}{C_1}\right)$$

Lorsque ce terme est négatif, le flux de (2) vers (1) est spontané. Lorsqu'il est positif, le flux est impossible dans ce sens. Une valeur nulle indique l'équilibre.

Le potentiel de Nernst

Notre situation expérimentale ci-dessus peut alors être modélisée. L'équilibre que l'on atteint correspond à $\Delta rG = 0$. Ce qui permet d'exprimer la valeur du potentiel de membrane :

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)$$

Cette formule est identique à la formule de Nernst (utilisée en chimie red-ox). La valeur obtenue est nommée potentiel de Nernst de l'ion considéré. Il est essentiel de bien retenir que la valeur de ce potentiel de Nernst dépend directement des concentrations de l'ion.

Le potentiel de Nernst nous donne une information capitale : c'est le potentiel qu'atteindrait la membrane si n'intervenait que l'ion considéré ; on peut également le décrire comme le potentiel que devrait avoir la membrane pour que l'on considère cet ion comme à l'équilibre.

fiche 78

Le potentiel de membrane

Lorsque plusieurs ions sont en jeu, on imagine bien que la formule de Nernst est inopérante, puisqu'elle est spécifique de chaque couple de concentration ionique. Il faut donc imaginer un comportement plus complexe de la membrane, où la tendance de chacun des ions influence le potentiel qui influence alors la tendance des autres ions. Le potentiel de membrane est alors le résultat complexe de cet équilibre dynamique.

1. Modèle à plusieurs ions

Aucun cation n'est à l'équilibre

La formule de Nernst appliquée au sodium et au potassium permet de prévoir la valeur du potentiel électrique qu'il faudrait avoir pour équilibrer ces ions. On trouve ainsi classiquement autour de + 50 mV pour le sodium et autour de – 90 mV pour le potassium. Pour le calcium, la valeur est de plus de 100 mV. Force est de constater que ces trois ions sont fort loin de l'équilibre, puisque le potentiel de membrane est classiquement de – 60 à – 70 mV. Les concentrations restant stables, nous devons admettre que ce déséquilibre est entretenu. Le chlore est, lui, proche de l'équilibre.

Tableau 1 : Concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique chez l'homme

Ion	concentration intracellulaire ($mmol \cdot L^{-1}$)	concentration extracellulaire ($mmol \cdot L^{-1}$)	Potentiel de Nernst
Na^+	7 à 12	144	env. + 50 mV
K^+	160	4	env. - 90 mV
Ca^{2+}	10^{-5} à 10^{-4}	2	+ 125 mV à + 310 mV
Cl^-	4 à 7	120	env. - 70 mV

Les pompes ATPases entretiennent le déséquilibre membranaire

La pompe Na-K ATPase et les pompes à calcium (membrane plasmique ou réticulum) sont responsables de l'entretien de ces déséquilibres. Elles maintiennent un contraste électrique et chimique tel que ces ions sont nécessairement l'objet de flux transmembranaires. Ces flux forment des courants électriques et sont compensés par les pompes de telle sorte que la situation reste stationnaire. Nous avons donc affaire à un équilibre dynamique.

Un schéma électrique équivalent

Les flux ioniques des différents cations sont portés par des protéines de type canaux de fuite. Il y a ainsi dans la membrane, des conducteurs à K^+, des conducteurs à Na^+ et des conducteurs à Ca^{2+}. Il y a également une pompe qui maintient une tension membranaire et des concentrations ioniques qui définissent un potentiel de Nernst pour chaque ion. Cela permet de construire un modèle analogique électrique d'une portion de membrane.

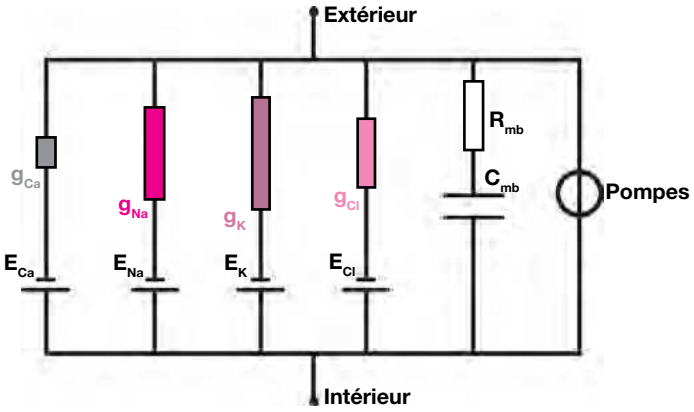


Figure 1 : Équivalent électrique de la membrane

Des pompes imposent une tension membranaire, des conducteurs spécifiques supportent des courants ioniques, et un potentiel de Nernst impose une tension particulière à chaque branche.

2. Expression du potentiel de membrane

La force iono-motrice pour chaque ion

Ainsi, il existe pour chaque ion une « force iono-motrice » (*driving force*) qui gouverne chaque flux ionique. Elle est donnée pour un ion X par : $E_{mb} - E_X$. À partir de là on peut exprimer chaque courant ionique i_X grâce à la loi d'Ohm :

$$i_X = g_X \cdot (E_{mb} - E_X)$$

où i_X est le courant, g_X la conductance, et $E_{mb} - E_X$ la tension.

Un équilibre dynamique

Comme la situation est équilibrée et que ni les concentrations ni les potentiels ne changent, nous devons admettre qu'il n'y a pas de courant total résultant de tous ces conducteurs élémentaires.

$$i_{total} = i_{Na} + i_K + i_{Ca} = 0$$

Une moyenne pondérée

En remplaçant, dans l'équation ci-dessus, chacun des termes de courant par son expression $g_X \cdot (E_{mb} - E_{Na})$, il vient aisément :

$$E_{mb} = \frac{g_{Na} \cdot E_{Na} + g_K \cdot E_K + g_{Ca} \cdot E_{Ca}}{g_{Na} + g_K + g_{Ca}}$$

Qui exprime clairement que le potentiel de membrane se stabilise sur une valeur qui est une moyenne pondérée des potentiels de Nernst des différents ions. L'élément pondérateur est la conductance de la membrane pour chacun des ions. Ainsi, une membrane très perméable au K^+ (respectivement au Na^+) verra son potentiel se stabiliser à une valeur proche du potentiel de Nernst du K^+ (respectivement au Na^+).

fiche 79

L'influx nerveux

Toutes les cellules présentent une tension membranaire non nulle, mais certaines disposent de plus d'une capacité à faire varier ce potentiel ; on nomme ces cellules des cellules excitables : cellules nerveuses, cellules musculaires. Elles produisent une variation transitoire du potentiel lorsqu'elles sont stimulées.

1. Les caractères du potentiel d'action

Seuil et invariance de l'amplitude

Excité électriquement, un neurone produit une variation brutale et transitoire de son potentiel membranaire : le potentiel d'action. Sur un même neurone, les potentiels d'action ont toujours la même amplitude et un potentiel d'action n'apparaît que si la stimulation est supérieure à un seuil. Ces deux points définissent ce que l'on nomme parfois la « loi du tout ou rien ».

Période réfractaire

Après un potentiel d'action, la membrane met un certain temps avant de restaurer son aptitude à produire un nouveau potentiel d'action. Cette durée est nommée « période réfractaire », pendant laquelle aucun potentiel d'action n'est possible.

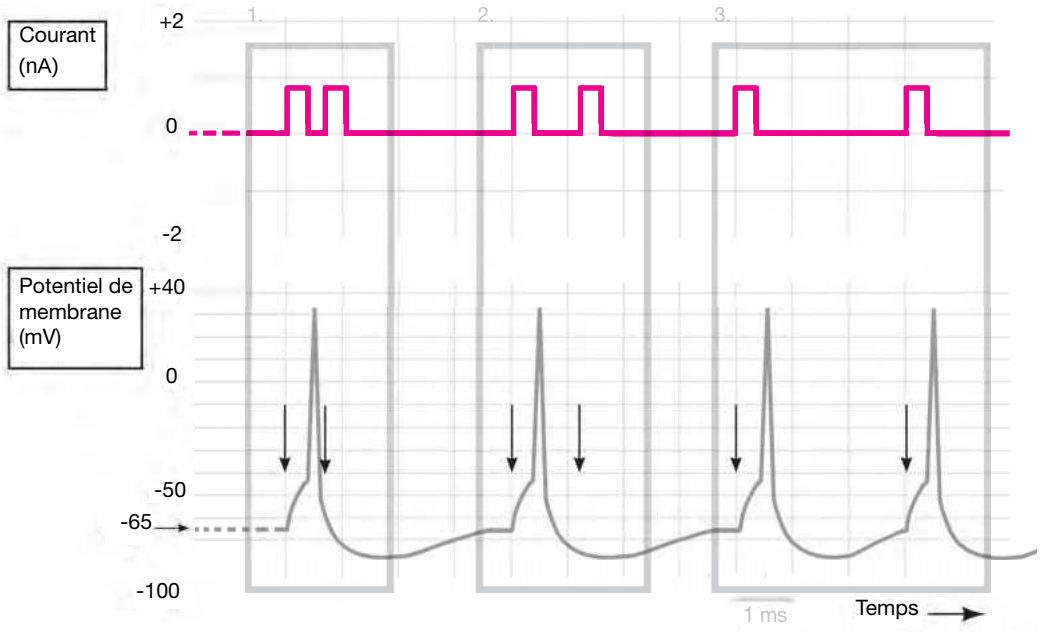


Figure 1 : Les traits caractéristiques d'un potentiel d'action

2. Des canaux ioniques à ouverture contrôlée par la tension

Un potentiel d'action révèle donc une aptitude à faire varier le potentiel membranaire. Cette aptitude repose sur des variations de conductance de certains canaux ioniques, précisément sensibles à la valeur du potentiel membranaire.

Fiche 153

Les apports de la technique du patch-clamp

La technique de patch-clamp permet d'isoler une microscopique pastille (un « patch ») de membrane et d'étudier ses propriétés électriques (principalement de conductance). Lorsque le patch contient un canal isolé, on accède à ses caractéristiques d'ouverture, de probabilité d'ouverture…

Les caractères des canaux mécanosensibles

Le potentiel d'action s'explique par l'intervention de deux populations de canaux ioniques : des canaux Sodium et des canaux Potassium, tous deux sensibles à la tension. Les canaux sodium présentent trois états : fermé (et ouvrable), ouvert, et enfin inactivé (non-ouvrable). La valeur du potentiel de membrane détermine les probabilités de ces trois états différents. Les canaux potassium obéissent à un modèle plus simple : ils n'ont accès qu'à deux états : fermé (ouvrable) et ouvert.

3. Variations de conductance lors d'un potentiel d'action

Le décours des conductances

On peut suivre le décours du potentiel d'action parallèlement au décours des conductances au sodium et au potassium, qui reflètent l'état d'ouverture et de fermeture des canaux.

Une excitation provoque un début d'ouverture de canaux Na, c'est-à-dire une augmentation de g_{Na}. Le potentiel augmente donc.

L'ouverture des canaux Na provoque une augmentation de potentiel qui provoque une ouverture de canaux Na, qui provoque… etc. Le potentiel grimpe en flèche jusqu'à une valeur proche du potentiel d'équilibre du Na.

L'inactivation des canaux Na et l'ouverture des canaux K ce qui augmente g_K et provoque l'effondrement du potentiel, jusqu'à une valeur proche du potentiel d'équilibre du K.

Ce potentiel faible provoque la fermeture de canaux K et donc un retour à la configuration initiale de perméabilité aux ions : le potentiel reprend la valeur de repos, et l'inactivation des canaux Na explique la période réfractaire.

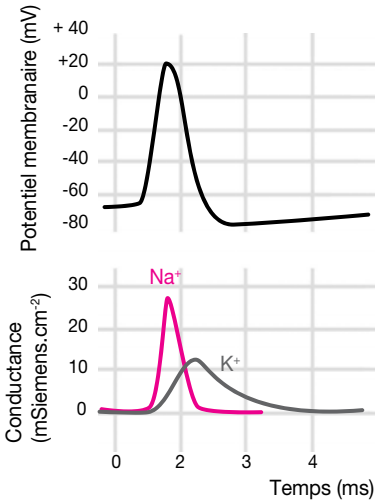


Figure 2
Conductance et potentiel d'action

La propagation régénérative de l'influx

Lorsqu'un potentiel d'action se déroule en un point, il provoque une légère dépolarisation à proximité, car des courants électriques s'installent entre les zones de potentiel différent. Cela est suffisant pour provoquer l'ouverture d'autres canaux Na^+ « un peu plus loin et presque instantanément ». Cette sensibilité des zones proches de la zone excitée permet de générer le potentiel d'action de proche en proche.

fiche 80

La diversité des potentiels d'action

Les cellules nerveuses ne sont pas les seules cellules animales excitables. Cette particularité se retrouve en effet chez les cellules musculaires striées : cellules musculaires squelettiques et cellules musculaires cardiaques.

1. Diversité des potentiels d'action nerveux

Fiche 79

Différentes cellules nerveuses présentent des potentiels d'action dont le profil varie. Cela tient aux concentrations variables des différents électrolytes, mais aussi et surtout à l'équipement des membranes cellulaires en divers types de canaux ioniques.

2. Les potentiels d'action des cellules musculaires

Les cellules musculaires striées squelettiques

Les cellules musculaires striées squelettiques sont des cellules excitables, au même titre que les neurones. Elles présentent un potentiel d'action très semblable à ces cellules.

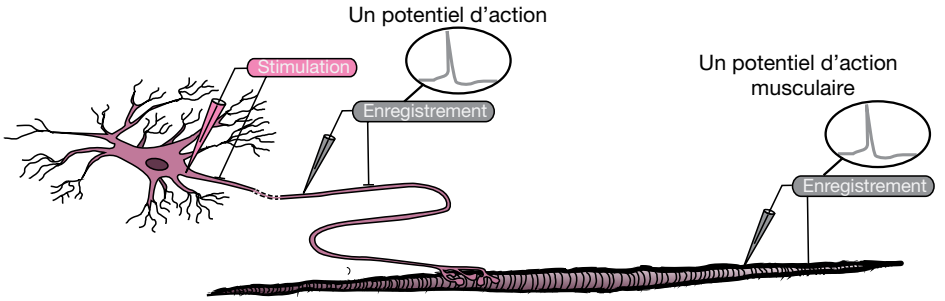


Figure 1
Excitabilité d'une cellule musculaire squelettique

Les cellules musculaires cardiaques

Les cellules musculaires cardiaques sont également striées, mais présentent un profil de potentiel d'action tout à fait original, que l'on nomme potentiel d'action à plateau calcique. La dépolarisation et le début du phénomène sont du même type que dans les cellules musculaires squelettiques. Mais s'ajoute à cela l'ouverture de canaux Ca^{2+} à fermeture lente. Cela prolonge fortement la durée du potentiel d'action : 300 ms environ au lieu de 3 ms, d'où le nom de plateau calcique (figure 2).

L'intérêt de ce dispositif est de présenter une très longue période réfractaire, permettant d'éviter qu'une cellule récemment excitée ne se trouve à nouveau excitée par une boucle de courants passant par deux trois cellules voisines. Les influx se propagent en divergeant, dans le myocarde.

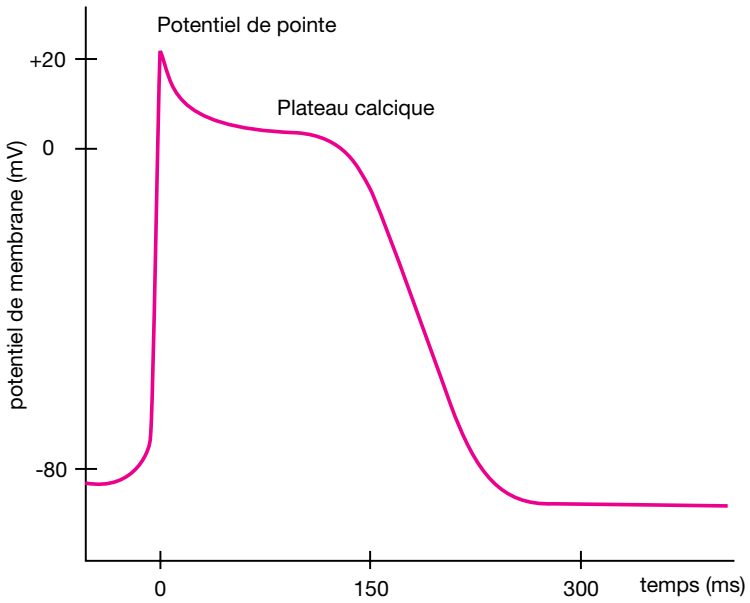


Figure 2 : Le potentiel d'action à plateau calcique

Les cellules nodales : l'automatisme cardiaque

Les cellules nodales sont des cellules myocardiques particulières, faiblement équipées en myofibrilles, et présentant une activité d'autoexcitation régulière, en raison d'un potentiel pacemaker, montée régulière du potentiel jusqu'à un potentiel d'action (figure 3). Cela s'explique par deux populations de canaux au fonctionnement particulier : les premiers sont des canaux de fuite (à K^+ et Na^+, leur effet étant surtout un flux de Na^+) dont la probabilité d'ouverture est non négligeable au repos. Ces canaux s'ouvrent donc progressivement, lentement, mais de plus en plus nombreux. Il en résulte une montée régulière du potentiel. L'autre population correspond à des canaux K^+ qui, eux, sont ouverts au repos, mais qui se ferment également spontanément, lentement, de plus en plus nombreux. Cela fait également monter le potentiel. Lorsque le potentiel d'ouverture atteint le seuil de d'excitation du potentiel d'action, celui-ci est déclenché, ce qui a pour effet de remettre « à zéro » ces canaux de fuite (ils se referment) et ces canaux K^+ (ils s'ouvrent à nouveau).

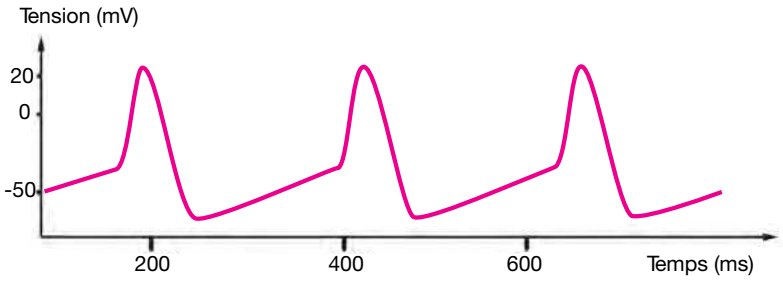


Figure 3 : Le potentiel pacemaker

fiche 81

Les modèles d'études de la membrane

L'étude des membranes biologiques peut être réalisée à partir de membranes naturelles purifiées mais les systèmes sont alors très complexes et peu modifiables, ce qui limite les études possibles. Différents modèles simplifiés de membranes sont fréquemment utilisés.

1. Les fantômes d'hématies

Les hématies sont des cellules très intéressantes pour l'étude de la membrane plasmique : ce sont des cellules abondantes et facilement purifiables qui sont dépourvues de membranes internes. Leur seule membrane est donc la membrane plasmique. Il est possible de les vider de leur contenu en les plaçant dans un tampon très pauvre en sels (choc hypo-osmotique) qui fait gonfler la cellule jusqu'à ce qu'elle éclate et se vide de son contenu. Les membranes restantes sont appelées fantômes d'hématies. En réalisant des lavages dans différents tampons et avec une dissociation mécanique, on peut obtenir des vésicules de sens normal ou « retourné » qui permettent l'étude des deux faces de la membrane. Ce modèle a permis d'établir que la membrane plasmique est une mosaïque fluide et asymétrique, concept qui a ensuite été étendu aux autres membranes.

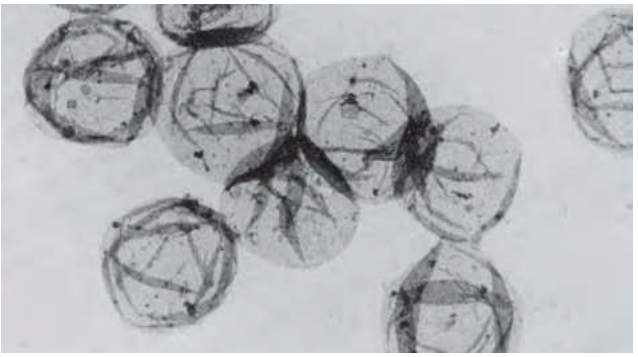


Figure 1 : Fantômes d'hématies observés en MET

Fiche 71

L'analyse par électrophorèse des protéines associées à la membrane des hématies montre seulement une quinzaine de bandes, dont 3 totalisent 60 % de l'ensemble. Ces protéines (spectrine, glycophorine et bande 3) sont des exemples typiques des différents types d'ancrages de protéines membranaires. La protéine 3 (d'après sa position sur gel de SDS-PAGE) est majoritaire, il s'agit d'un transporteur d'anions à 12 passages transmembranaires (TM) qui permet l'entrée de $HCO3^-$, et donc le convoyage du CO_2 par les globules rouges. La glycophorine est l'exemple typique des protéines à 1 TM. Il s'agit d'une protéine glycosylée dont les glucides représentent 60 % de la masse totale. La nature particulière de ces glucides définit le groupe sanguin A, B ou O. La spectrine représente 25 % des protéines membranaires, c'est une protéine extrinsèque du squelette membranaire, associée à la bande 3 et à la glycophorine soit directement, soit *via* d'autres protéines adaptatrices. Ce squelette membranaire est responsable de la forme caractéristique des hématies.

2. Les modèles artificiels de membrane

Il est possible de fabriquer des membranes artificielles pour contrôler entièrement la nature des lipides et des protéines. Des lipides dissous dans un solvant organique et déposés à la surface d'une solution aqueuse forment une monocouche. Avec des dispositifs expérimentaux simples, on peut alors obtenir des bicouches planes. Ces systèmes sont très utiles pour étudier les interactions protéines/lipides.

L'agitation d'un mélange d'eau et de lipides forme soit des liposomes soit des micelles selon la nature du lipide. Les phospholipides qui sont cylindriques forment des liposomes, c'est-à-dire des vésicules formées d'une bicouche (liposome unilamellaire) ou de plusieurs bicouches concentriques (liposome multilamellaire, comme un oignon). Selon leur diamètre, il s'agira de SUV (*Small Unilamellar Vesicle*, 30 à 80 nm), de LUV (*Large*, 100 à 900 nm) ou GUV (*Giant*, plus de 1 µm). Ces liposomes sont utilisables comme vecteurs car des molécules peuvent être encapsulées dans la partie centrale hydrophile. Il est également possible de fabriquer des protéoliposomes, accueillant des protéines transmembranaires ou périmembranaires.

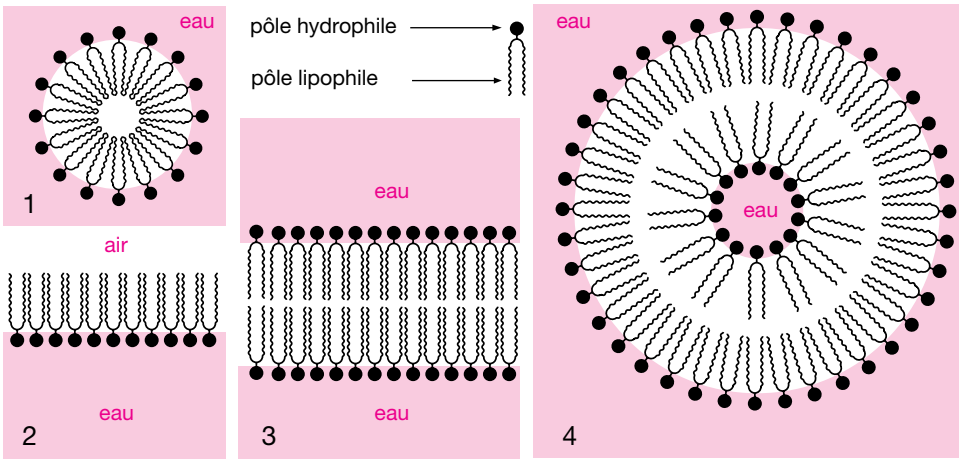


Figure 2 : Différentes structures d'assemblages des lipides membranaires
1) Micelle. 2) Monocouche. 3) Bicouche plane. 4) Liposome unilamellaire.

Les protéines transmembranaires ayant des domaines hydrophobes, elles ont tendance à précipiter en solution aqueuse lorsqu'on les purifie. Il faut donc les solubiliser en leur fournissant un environnement hydrophobe de substitution. Les détergents sont des molécules amphiphiles (une tête polaire et une chaîne hydrophobe) qui ont une forme globale conique, ce qui leur permet de s'organiser dans l'eau sous forme de micelles, dès que leur concentration dépasse une concentration micellaire critique (CMC). Les détergents peuvent déstructurer les membranes, extraire les protéines intrinsèques et les maintenir solubles. Certains détergents chargés (ioniques) dénaturent la structure des protéines (exemple SDS) alors que d'autres sont doux et préservent cette structure (exemple Triton-X100). Pour fabriquer des protéoliposomes, on mélange des micelles protéines/détergents et des micelles lipides/détergents puis le détergent est éliminé par dialyse. Ces protéoliposomes permettent d'étudier les fonctions des protéines membranaires ou de fonctionnaliser des liposomes vecteurs, pour atteindre une cible spécifique par exemple.

fiche 82

Le suivi de Particule Unique (SPT)

Parmi les techniques qui permettent de suivre la dynamique des molécules biologiques, le suivi de particule unique (SPT, *Single Particle Tracking*) » regroupe des approches permettant l'étude, en temps réel, des mouvements de molécules individuelles. Les approches de SPT ont connu un véritable essor ces 15 dernières années car elles permettent d'accéder à des informations cruciales (hétérogénéité d'une population, événements rares) perdues par les approches plus traditionnelles moyennant un ensemble de molécules.

1. Nécessité de marquer la molécule d'intérêt

Pour détecter et suivre spécifiquement et en temps réel une molécule d'intérêt en milieu cellulaire, il est nécessaire de marquer cette molécule. Le marqueur idéal doit (i) être petit comparé à la taille de la molécule à étudier ; (ii) marquer spécifiquement la molécule d'intérêt avec un ratio 1:1, et (iii) être stable du point de vue physique et optique. Les principaux marqueurs actuellement utilisés sont les fluorophores organiques, les nanocristaux semi-conducteurs ou *quantum dots* et les nanoparticules d'or.

Les marqueurs

Les fluorophores organiques présentent l'avantage d'être petits (~1 nm) mais ne peuvent être observés que pendant quelques secondes d'affilée, après quoi ils sont irréversiblement détruits par la lumière (phénomène de photoblanchiment). Les nanocristaux semi-conducteurs présentent une meilleure photostabilité et leur détection est possible durant plusieurs minutes. Les nanoparticules d'or, quant à elles, peuvent être virtuellement observées pendant des temps infinis.

Le diamètre original des quantum-dots et les nanoparticules d'or peut être inférieur à 5 nm. Cependant ils doivent être protégés par une couche de polymères ou de peptides pour être solubles et stables en milieu physiologique. Les progrès récents permettent d'obtenir ces particules protégées avec un diamètre de 7 à 15 nm.

L'attachement à la molécule d'intérêt

Le marqueur doit être attaché à la molécule d'intérêt avec une grande spécificité et une stœchiométrie contrôlée (un marqueur pour une molécule) afin que le déplacement suivi par le marqueur corresponde au déplacement suivi par la molécule d'intérêt à l'échelle individuelle. Pour cela, le marqueur doit être conjugué à un ratio de 1:1 avec une molécule pouvant elle-même s'attacher spécifiquement à un ratio de 1:1 à la molécule à étudier. Les systèmes les plus utilisés sont :

Fiche 184

(i) les fragments Fab (fragments de liaison à l'antigène) qui sont petits, monovalents et qui peuvent reconnaître la molécule native mais parfois avec une affinité assez faible ; (ii) le système de couplage streptavidine-biotine, où le marqueur est lié de manière covalente à une molécule de streptavidine monovalente qui reconnaît la molécule d'intérêt préalablement biotinylée (molécule modifiée et surexprimée). Ce système de couplage est assez volumineux (~6 nm) mais permet l'attachement covalent du marqueur à la molécule étudiée ; (iii) un autre système consiste au couplage du marqueur à une étiquette Ni^{2+}-NTA qui reconnaît la molécule d'intérêt étiquetée poly-histidine

(molécule modifiée et surexprimée). Ce système est peu volumineux (2 nm) et permet un attachement de forte affinité à la molécule à étudier.

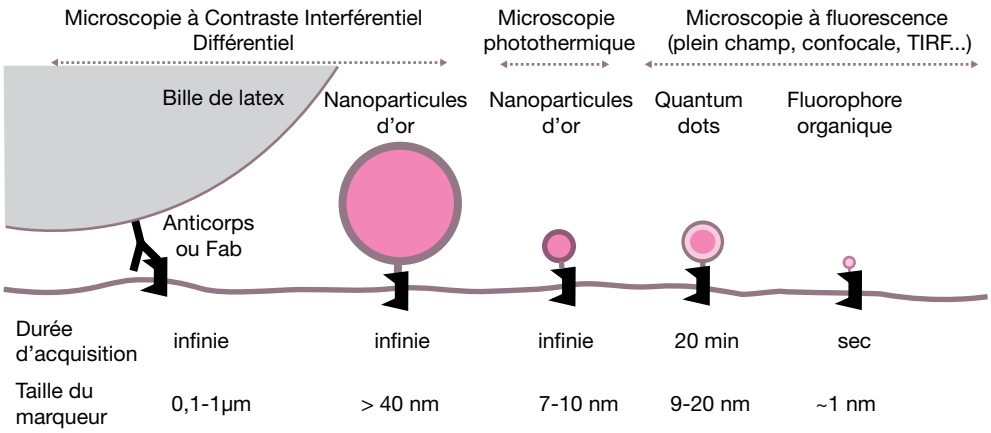


Figure 1 : Différentes techniques de Suivi de Particule Unique
Avec l'aimable autorisation de L. Duchesne, UMR CNRS 6290 Rennes.

2. Méthodes de détections

Les approches de microscopie utilisée pour le SPT dépendent du type de marqueur utilisé. Pour toutes ces approches, la résolution spatiale est limitée par la diffraction mais avec des algorithmes spécifiques, il est possible d'obtenir une résolution spatiale de l'ordre de 1 à 10 nm si le marquage est suffisamment dilué.

Fiches 6, 126

Les premières expériences de SPT ont généralement utilisé des approches basées sur la microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) avec des billes de polystyrène, de latex ou des nanoparticules d'or de taille allant de 40 nm à 1 µm. Dans ce cas, le suivi latéral des particules est assez simple (caméra CCD), la durée d'acquisition est virtuellement infinie et une très haute résolution spatiale (quelques nm) et temporelle (de l'ordre de la µs) peut être obtenue. Cependant la taille des marqueurs utilisés pose un problème d'encombrement stérique.

Les approches les plus utilisées actuellement utilisent les fluorophores organiques ou les quantum-dots avec la microscopie à fluorescence de plein champ, le TIRF (*Total Internal Reflexion Florescence*) ou la microscopie confocale. Après acquisition d'une série d'images au cours du temps par une caméra CCD, les particules sont localisées pour chaque image et leur trajectoire est reconstituée par des algorithmes spécifiques. Des efforts considérables sont portés au développement d'algorithmes et de logiciels afin d'exploiter l'ensemble considérable des données acquises. La microscopie à fluorescence de plein champ et le TIRF sont limités à l'étude des déplacements bidimensionnels mais possèdent une bonne résolution temporelle (de 1 à 50 ms). La microscopie confocale permet l'étude en trois dimensions (x,y,z) mais la résolution temporelle reste limitée. Une alternative intéressante, basée sur la microscopie bi-photon permet aujourd'hui le suivi en 3D avec une résolution de quelques dizaines de ms.

Enfin, une approche assez récente utilise la microscopie photothermique (LISNA, *Laser Induced Scattering around Nanoabsorber*) qui permet de suivre en x et y une nanoparticule d'or de moins de 5 nm en temps réel grâce à un algorithme de triangulation (sorte de GPS). La résolution spatiale est de l'ordre de 10 nm, la résolution temporelle de quelques dizaines de ms et la durée d'acquisition est virtuellement infinie.

fiche 83

La fluorescence

1. Le principe de la fluorescence

La fluorescence est une forme spécifique de luminescence, c'est-à-dire une émission de lumière « froide », sans dégagement de chaleur.

Certaines molécules, dites fluorophores ou fluorochromes, absorbent l'énergie d'une lumière de longueur d'onde λ donnée et passent dans un état excité. On parle de la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome. Les fluorophores restent dans cet état excité pendant une durée très brève, de l'ordre de 0,1 à 10 nanosecondes, c'est le temps de vie de fluorescence caractéristique de la molécule. Les fluorophores excités émettent alors de la lumière et reviennent à leur état fondamental. Les photons émis ont une longueur d'onde caractéristique (longueur d'onde d'émission) qui est toujours plus grande que la longueur d'onde d'excitation.

En général, les fluorophores sont des molécules contenant des cycles aromatiques. Il peut s'agir de molécules naturelles comme les acides aminés tryptophane ou tyrosine, le NADH, la chlorophylle… En 1992, le gène responsable de la fluorescence de la méduse *Aequorea victoria* a été cloné. La protéine résultante, la *Green Fluorescent Protein* (GFP), et ses variantes sont utilisées comme biomarqueurs. O. Shimomura, M. Chalfie et R. Y. Tsien ont été récompensé par le prix Nobel 2008 de chimie pour cette technologie. Des fluorochromes synthétiques plus robustes et plus brillants que les molécules naturelles existent depuis la fin du XIX^{e} siècle. Des dérivés de la fluorescéine comme le FITC (émettant une lumière verte) ou de la phycoérythrine (PE, émettant dans le rouge) sont très fréquemment couplés à des anticorps pour la détection de molécules cibles.

2. La microscopie de fluorescence : une technique très sensible de localisation

La microscopie de fluorescence est une technique ultrasensible pour détecter des molécules marquées car le marquage apparaît comme un point lumineux sur un fond noir, alors qu'en microscopie classique, il faut distinguer un changement de couleur sur un fond déjà coloré. Le marquage peut être dû à des anticorps couplés à des fluorochromes ou bien au couplage par génie génétique de la protéine d'intérêt à une protéine fluorescente telle que la GFP. Il est ainsi possible d'étudier la localisation d'une protéine ou par extension d'un organite. La localisation précise en x, y et z est rendue possible par l'utilisation d'un microscope confocal.

Un double marquage peut être réalisé avec des fluorochromes différents. La cellule est alors éclairée à la longueur d'onde d'excitation du 1er fluorochrome grâce à un jeu de filtres et l'émission de lumière de ce 1er fluorochrome est sélectionnée et enregistrée. On procède de même pour le 2^{e} fluorochrome puis on superpose informatiquement les images pour observer simultanément les deux marquages.

3. FRAP et FLIP : des techniques adaptées à la dynamique des membranes

L'utilisation de molécules marquées par des fluorochromes dans des cellules vivantes et non fixées permet d'enregistrer au cours du temps l'évolution de leur localisation. Par exemple, la synthèse dans le REG d'une protéine couplée à la GFP jusqu'à son insertion dans la membrane plasmique. Pour étudier la diffusion des molécules dans le plan de la membrane, il faut pouvoir distinguer les déplacements particuliers d'une molécule unique ou d'un petit groupe de molécules.

Le photoblanchiment d'un fluorochrome est sa destruction irréversible par une quantité trop importante de lumière excitatrice. L'expérimentateur peut mettre à profit cette limitation pour définir une région spécifique de l'image où le marquage des molécules d'intérêt est « blanchi » par un laser de forte puissance. Si les molécules d'intérêt marquées et non marquées se déplacent au cours du temps, une récupération de fluorescence après photoblanchiment sera observée (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP). La vitesse de déplacement et le coefficient de diffusion latérale pourront être calculés. Un exemple est donné de diffusion du récepteur aux œstrogènes fusionné à la GFP dans des cellules d'une lignée tumorale mammaire, en l'absence et en présence de l'œstrogène E2. Il apparaît clairement qu'en présence d'œstrogène, le récepteur diffuse bien moins.

Cahier couleur

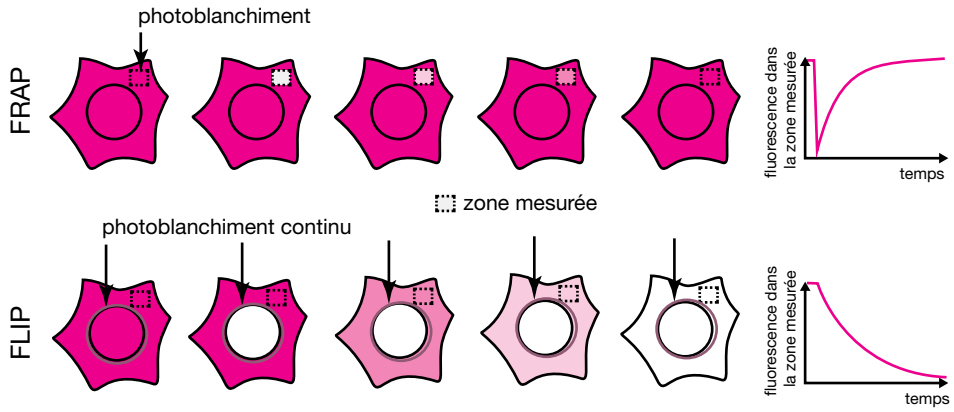


Figure 1 : Principe du FRAP et du FLIP

Pour le FRAP, le retour de fluorescence est étudié dans la région qui a été blanchie. Pour le FLIP, une zone (ici le noyau) est irradiée en continu et la perte de fluorescence est étudiée dans une autre zone. Avec l'aimable autorisation de S. Huet, UMR CNRS 6290 Rennes.

La perte de fluorescence par photoblanchiment (*Fluorescence Loss In Photobleaching*, FLIP) est une autre manière d'étudier la mobilité moléculaire dans les cellules vivantes et de mettre en évidence des continuités dans les structures cellulaires. Un faisceau laser irradie continuellement une zone délimitée et toutes les molécules marquées qui y diffusent, vidant ainsi progressivement de fluorescence des zones ou des structures communicantes.

L'étude des coefficients de diffusion de différentes protéines dans différentes membranes a permis de mettre en évidence de grandes variations, liées aux interactions entre protéines et à l'existence de micro ou nanodomaines membranaires.

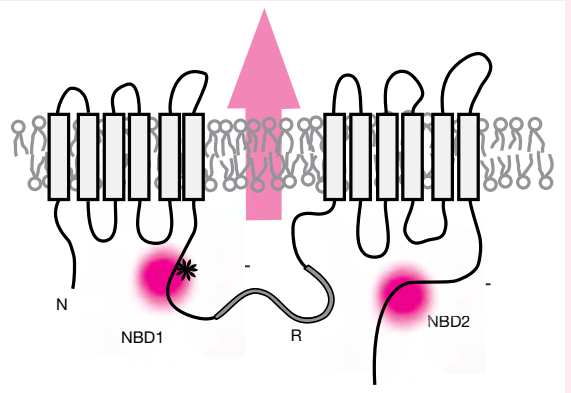
FOCUS Canalopathie – Blocage de canaux

Deux applications biomédicales bien distinctes peuvent être faites au sujet des canaux ioniques membranaires : les maladies génétiques affectant les propriétés de canaux ioniques, et les possibilités pharmacologiques d'intervention sur des canaux.

Une canalopathie : la mucoviscidose et le canal CFTR

Les progrès de l'analyse génétique et du séquençage du génome ont permis d'identifier de nombreuses pathologies liées au dysfonctionnement d'un canal ionique. On a ainsi identifié plusieurs dizaines de maladies canalopathiques. L'une des premières identifiées est la mucoviscidose. Après avoir identifié le gène responsable de la maladie, le gène CFTR (pour *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)*, on a pu trouver la protéine incriminée : un canal à chlorures des membranes des cellules épithéliales. Le canal CFTR est un canal à halogènes (Cl^-, I^-, Br^-) et à thiocyanate. Chez les patients atteints de mucoviscidose, ce canal ne fonctionne pas, ce qui affecte, dans les poumons, la viscosité des sécrétions bronchiques et la défense immunitaire du poumon.

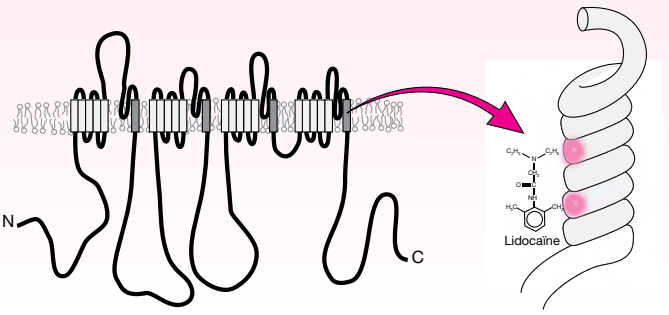
Le canal CFTR présente deux domaines présentant chacun six hélices transmembranaires, formant un canal hydrophile. De plus des boucles intracellulaires permettent le contrôle du flux de chlorures : une boucle R peut être phosphorylée, et l'on trouve deux boucles NBD (*Nucleotid Binding Domain*) qui fixent et hydrolysent l'ATP, lors de l'ouverture (NBD1) ou de la fermeture (NBD2) du canal. Une mutation sur le domaine NBD1 peut suffire à bloquer le canal.



Le canal CFTR

La lidocaïne (xylocaïne) et le blocage d'influx nerveux

La lidocaïne est un anesthésiant local très utilisé, par exemple, en soins dentaires, en injection ou en gel, il est plus connu sous le nom commercial de xylocaïne®. Cette molécule se fixe spécifiquement sur les canaux Na^+ sensibles à la tension des axones et bloque l'ouverture de ces canaux. Ainsi, tout potentiel d'action est annihilé : aucune possibilité de formation, aucune possibilité de propagation. De la sorte, la zone traitée à la lidocaïne est totalement anesthésiée.



Fixation de la lidocaïne sur l'hélice alpha S6 du canal sodium sensible à la tension

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

6.1 La membrane plasmique est :
- ☐ a. fluide
- ☐ b. homogène
- ☐ c. symétrique

6.2 Les phospholipides de la membrane plasmique sont :
- ☐ a. hydrophobes
- ☐ b. amphiphiles
- ☐ c. des macromolécules

6.3 Les protéines membranaires doivent obligatoirement :
- ☐ a. traverser la bicouche de lipides
- ☐ b. être intracellulaires
- ☐ c. être extracellulaires

6.4 Les diffusions facilitées :
- ☐ a. sont des symports
- ☐ b. sont des transferts passifs assistés par une protéine
- ☐ c. ne concernent que les ions minéraux

6.5 La membrane plasmique est perméable :
- ☐ a. aux gaz
- ☐ b. aux petites molécules hydrophobes
- ☐ c. au glucose

6.6 Un transport actif :
- ☐ a. transporte un soluté contre son gradient
- ☐ b. est couplé à une hydrolyse d'ATP
- ☐ c. est un antiport

6.7 Le potentiel de membrane :
- ☐ a. s'observe uniquement sur les cellules excitables
- ☐ b. est nul au repos
- ☐ c. est du à un contraste de concentration des ions

6.8 Le potentiel d'action :
- ☐ a. s'observe uniquement sur les cellules excitables
- ☐ b. est dû à des canaux sensibles à la tension
- ☐ c. est dû à la pompe Na-K-ATPase

6.9 La propagation du potentiel d'action :
- ☐ a. est une caractéristique de l'axone
- ☐ b. est instantanée dans les fibres myélinisées
- ☐ c. est régénérative

6.10 Un liposome :
- ☐ a. est une micelle
- ☐ b. est constitué d'une bicouche lipidique
- ☐ c. peut fusionner avec une membrane biologique

Réponses

6.1 **a**. La membrane plasmique est une structure fluide : les molécules y ont une grande liberté de mouvements tangentiels. Elle n'est en revanche pas homogène, ni dans sa constitution chimique, très hétérogène, ni entre ses deux faces (ce qui montre qu'elle n'est pas symétrique).

6.2 **b**. Si certains composés de la membrane sont hydrophobes, les phospholipides sont des molécules amphiphiles, et c'est précisément ce caractère qui gouverne l'architecture de la membrane ; ce sont par ailleurs des molécules de masse molaire inférieure ou égale à 1 000 $g.mol^{-1}$ qui ne sont en aucun cas des macromolécules

6.3 **Aucune bonne réponse**. Il existe des protéines membanaires entièrement traversantes, il en existe d'autres intégrées à une hémi-membrane seulement, d'autres qui ne sont que plaquées à la membrane, et ce tant sur la face extracellulaire que sur la face cytoplasmique.

6.4 **b**. Il y a diffusion facilitée lorsque la diffusion est assistée par une protéine, ce qui augmente considérablement le flux par rapport aux capacités d'une simple bicouche. Il s'agit de phénomènes passifs qui peuvent concerner des ions minéraux mais aussi de très nombreux solutés organiques.

6.5 **a** et **b**. Les gaz sont de très petites molécules qui, comme l'eau, s'insinuent sans difficulté entre les lipides membranaires. Les petites molécules hydrophobes sont solubles dans l'épaisseur de la membrane, ce qui facilite grandement leur traversée. En revanche, le glucose, très hydrophile ne traverse pas seul les bicouches lipidiques.

6.6 **a**. On définit un transport actif comme se faisant contre le gradient électrochimique du soluté transporté. Un tel transport exige le couplage avec un processus qui libère de l'énergie, mais ce couplage peut se faire avec autre chose qu'une hydrolyse d'ATP : le flux d'un autre soluté, par exemple. Cela n'a rien avoir avec le terme d'antiport qui ne désigne que l'orientation relative de deux flux couplés.

6.7 **c**. Toutes les cellules vivantes présentent un potentiel de membrane non nul qui résulte, du fait de pompes, d'un contraste de concentration des différents ions de part et d'autre de la membrane.

6.8 **a** et **b**. Les cellules excitables sont caractérisées par la possession de canaux ioniques sensibles à la tension (principalement des canaux sodium) dont la sensibilité et le fonctionnement permettent à ces cellules de générer et propager des potentiels d'action.

6.9 **a** et **c**. Le potentiel est propagé de façon régénérative à la surface des axones. Cette propagation repose sur les caractéristiques de canaux sensibles à la tension.

6.10 **b** et **c**. Les liposomes sont une forme d'organisation des phospholipides amphiphiles dans l'eau. À la différence des micelles (constituées d'une couche refermée de phospholipides), leur enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique refermée sur elle-même. Ces liposomes peuvent être utilisés comme vecteurs pour porter des molécules dans le cytoplasme d'une cellule.

Chapitre 7

Les compartiments cellulaires et l'adressage des protéines

Objectifs

Une cellule eucaryote est organisée en différents compartiments. Ces compartiments sont tous entourés d'une membrane qui permet d'isoler ce compartiment du reste de la cellule et ainsi de spécialiser ce compartiment. Cette spécialisation repose sur la présence de protéines spécifiques. Toutes les protéines étant synthétisées dans le cytoplasme, il existe donc des mécanismes fondamentaux permettant à ces acteurs d'être dirigés vers tel ou tel organite. D'un point de vue global, les protéines sont donc soumises à un contrôle fonctionnel (homéostasie protéique) qui repose sur la structuration de ces protéines, la vérification de leur fonctionnalité et l'adressage.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 84

La compartimentation de la cellule

1. Les procaryotes : une compartimentation minimale !

Fiche 1

La compartimentation intracellulaire est un domaine quasi réservé aux cellules eucaryotiques. Pour un procaryote comme les bactéries, on peut de fait observer un seul compartiment isolé par une membrane plasmique.
Ce compartiment est constitué d'un cytoplasme dans lequel on retrouve l'ADN chromosomique et toutes les machineries de réplication, transcription traduction nécessaires au maintien et à l'expression du génome procaryotique. C'est également dans ce seul compartiment que l'ensemble des réactions métaboliques auront lieu.

2. Les eucaryotes : organisation générale

Chez les eucaryotes, l'organisation diffère selon la nature de la cellule (animale, végétale…). Ces différences n'empêchent pas l'émergence d'une organisation similaire basée sur la compartimentation. Celle-ci va permettre d'observer des structures extrêmement organisées et spécialisées (tableau 1).

Tableau 1 : Structures membranaires intracellulaires

Structure membranaire	Constitution ou structure	Fonctions
Mitochondries	Bi-membranaire à membrane interne repliée	Respiration(oxydations) Faible partie du génome
Appareil de Golgi ou dictyosome	Sacs membranaires empilés	Maturation des protéines
Réticulum endoplasmique lisse	Réseau de membranes ramifié	Synthèse de membranes Synthèse de lipides Réserve d'ions
Réticulum endoplasmique rugueux	Réseau de membranes ramifié associé à des ribosomes	Participe à la synthèse des protéines et à leur maturation
Lysosomes	Vésicules	Digestion des nutriments et de structures défectueuses
Peroxysomes	Vésicules	Dégradation des peroxydes, β oxydation
Plastes	Bi-membranaire	Photosynthèse Réserves
Noyau	Bi-membranaire	Contient l'ADN Transcription, réplication, maturation des ARN

Le lieu de synthèse principal des protéines étant le cytoplasme, l'organisation que nous observons va donc poser le problème du routage des protéines vers la destination où elles agiront (par exemple le noyau pour les sous-unités de l'ARN polymérase). À ce premier niveau, s'ajoute celui des lipides. Au sein du cytoplasme, les différents compartiments membranaires sont des structures dynamiques qui se forment et se défont en fonction de ce flux membranaire (figure 1). Celui-ci sera bien évidemment prépondérant à la mitose

pour permettre aux deux cellules de reconstituer les organites indispensables. C'est ce même flux de membranes qui va permettre également la formation d'une membrane plasmique fonctionnelle (figure 2). La présence de protéines ancrées dans la membrane plasmique implique que celles-ci aient une affinité pour cette membrane hydrophobe. Ces protéines ont donc, de fait, été transportées jusqu'à leur destination finale *via* le flux membranaire de l'exocytose.

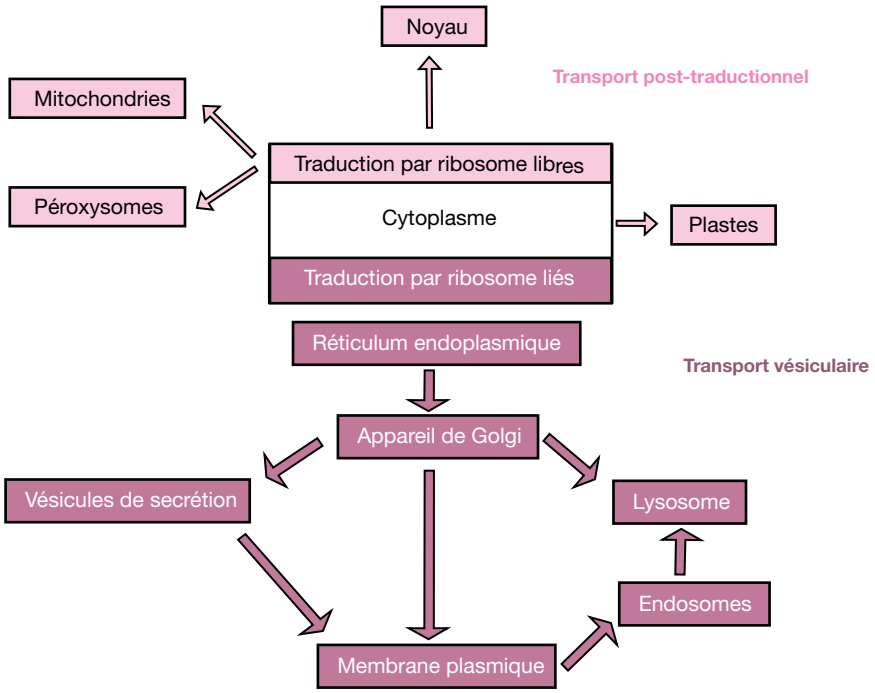


Figure 1 : Les différentes voies de transport des protéines

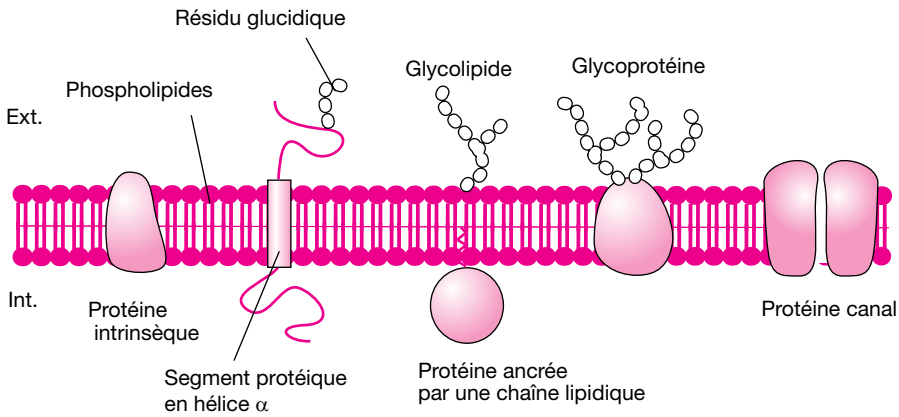


Figure 2 : Organisation de la membrane plasmique

Fiche 67

fiche 85

Du cytoplasme vers le noyau

La traduction des protéines débute invariablement dans le cytoplasme où se trouvent les ribosomes. Une première étape de tri va permettre de cibler ces protéines vers les destinations finales.

1. Structure du noyau

Comme le montre la figure 1, l'enveloppe nucléaire est constituée de deux bi-couches lipidiques formant une membrane nucléaire interne et externe. L'espace périnucléaire ainsi délimité est en continuité avec la lumière du réticulum endoplasmique. Le rapport entre le cytoplasme et le noyau implique une structure particulière : le pore nucléaire. Ce complexe de plus d'une trentaine de protéines se trouve à plus de 2 000 copies par noyau dans les cellules des vertébrés. Les pores nucléaires assurent un transport bi-directionnel. Dans le sens noyau vers cytoplasme, il va concerner l'export des ARN, des ribosomes en cours d'assemblage et de quelques facteurs protéiques. Ces mêmes pores vont également permettre l'entrée des protéines dans le noyau. Ils sont donc les gardiens contrôlant les entrées-sorties dans le rapport noyau-cytoplasme. Le pore nucléaire est un canal aqueux qui permet la diffusion des molécules dont la taille est inférieure à 50 kDa (ions, acides aminés, oses, protéines de faible masse, etc.). Les autres molécules sont donc transportées par un mécanisme actif.

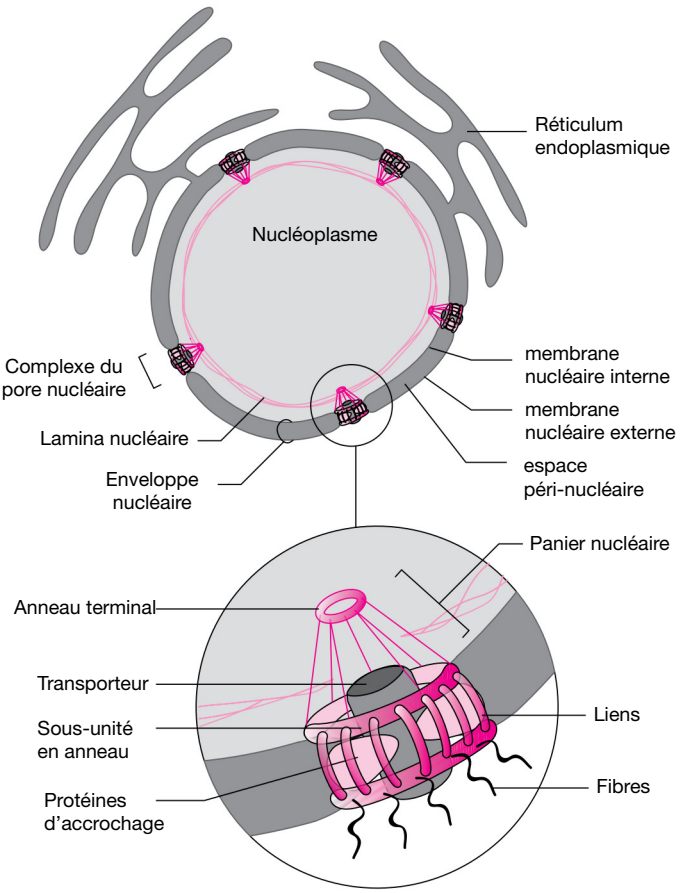


Figure 1 : Le noyau et le pore nucléaire

2. Les signaux d'adressage

Le signal d'import est une séquence cible non clivable nommée NLS (*Nuclear Localisation Signal*). Cette séquence signal n'a pas un consensus strict, mais c'est une séquence d'une quinzaine d'acide aminé présentant un fort taux d'acides aminés basiques (lysine et arginine). De même qu'il existe des séquences NLS permettant l'import dans le noyau, on trouve des séquences NES (*Nuclear Export Signal*). La séquence NES est caractérisée par la présence d'un court segment d'acides aminés hydrophobes (souvent une répétition de quatre leucines). Cette séquence est nécessaire et suffisante à l'export d'une protéine nucléaire vers le cytoplasme *via* le pore nucléaire.

3. Les récepteurs d'import et d'export nucléaire

Les récepteurs sont solubles et accompagnent les protéines à travers les pores nucléaires (figure 2). Après reconnaissance de la séquence NLS par l'importine alpha, celle-ci dimérise avec l'importine béta. Le complexe d'import (hétérodimère-NLS) se lie à la protéine Ran qui est liée au GDP. Cet ensemble se lie au pore nucléaire. Une fois dans le nucléoplasme, la Ran *Guanosine Exchange Factor* (RanGEF) destabilise ce complexe en échangeant le GDP contre le GTP. L'importine est recyclée *via* le pore nucléaire et est déphosphorylée par la Ran *Guanosine triphosphatase Activating Protein* (RanGAP).

Dans l'export nucléaire, le transporteur CRM1 reconnaît le signal NES des protéines qui sont dans le noyau. La protéine Ran liée au GTP forme alors un complexe favorisant les interactions avec les nucléoporines retrouvées dans la partie « panier » du pore nucléaire. Après translocation et à l'arrivée sur la face cytoplasmique, le complexe d'export est dissocié par la RanGAP.

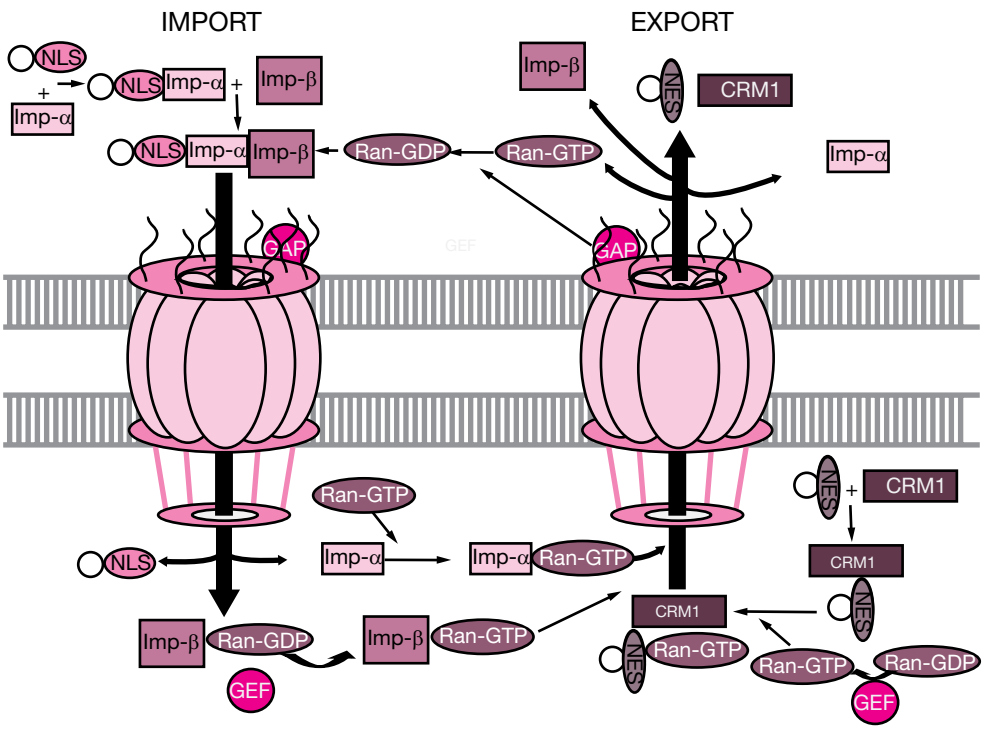


Figure 2 : Cycle d'import/export dans la communication cyto-nucléoplasmique
D'après R. S. Faustino *et al.*, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, juin 2007.

fiche 86

Le transport vers les peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites découverts bien après les plastes et les mitochondries. Chez les végétaux, ils portent le nom de glyoxysome. La présence du peroxisome est ubiquitaire chez les eucaryotes. Contrairement aux mitochondries et plastes, ces organelles ne possèdent pas de génome : toutes les protéines permettant leur fonctionnement doivent donc être importées. Une autre différence provient de l'enveloppe les délimitant qui n'est constitué que par une seule membrane, comme les vésicules issues du réticulum.

1. Ultrastructure et biochimie

Les peroxysomes ont une forme sphérique ou ovoïde (diamètre : 0,1 à 1,5 µm). Ces organites ont une concentration élevée en protéines, correspondant au « noyau » dense souvent observé en microscopie électronique. Les peroxysomes contiennent de nombreuses oxydases (urate oxydase, catalase et aminoacide oxydase) permettant d'oxyder et d'éliminer des molécules toxiques. Ce processus aboutit à la production de peroxyde d'hydrogène qui est aussi une molécule toxique pour la cellule. Cette eau oxygénée est alors prise en charge par une catalase qui va permettre sa détoxication (figure 1). Avec les mitochondries, les peroxysomes sont le lieu principal de la consommation d'oxygène dans une cellule.

$RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2$: réaction d'oxydation de RH_2

et

$2\ H_2O_2 + R'H_2 \longrightarrow R' + 2\ H_2O$: réaction peroxydasique

ou

$2\ H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$: réaction catalasique

Figure 1 : Réaction d'oxydoréduction dans le peroxysome

Outre ces réactions d'oxydoréduction, les peroxysomes participent au métabolisme des acides gras. La quantité de peroxysome pourra donc varier selon les conditions de croissance de la cellule. C'est ainsi que lorsque la levure *S. cerevisiae* est cultivée sur du glucose, il y a peu de peroxysomes. Si la même souche est cultivée en présence d'acides gras, les peroxysomes seront nombreux car ils les convertissent ces acides gras en acétylCoA. De même, si la source de carbone est constituée par du méthanol, le nombre et la taille des peroxysomes augmentent pour permettre ainsi d'oxyder l'alcool.

2. Biogénèse

Les peroxysomes se forment à partir de la membrane du réticulum endoplasmique et sont en quelque sorte une sous-compartimentation de celui-ci. Pour cela, la membrane du réticulum recrute des facteurs protéiques particuliers : les peroxines (ou peroxi-

somal/peroxisome biogenesis factors). Ces protéines, s'associent dans des structures lamellaires observables en microscopie électronique et assurent par la suite le recrutement de protéines membranaires et matricielles. La vésicule ainsi formée se détache du réticulum et devient un peroxysome (figure 2). On connaît au moins 23 peroxines.

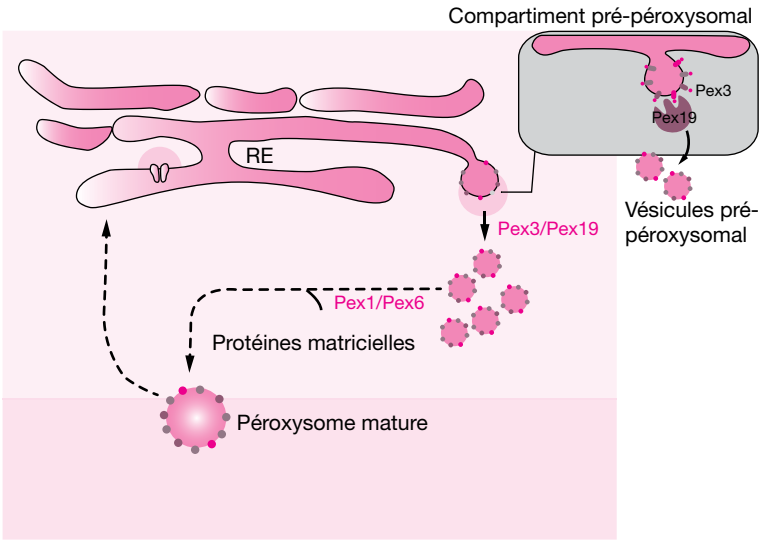


Figure 2 : Schéma de formation de peroxysome
D'après C. Ma *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 2011.

3. Import protéique

À l'extrémité C-terminale des protéines peroxysomales, on trouve une séquence particulière de trois acides aminés (Ser-Lys-Leu-COOH) qui agit comme une séquence d'import spécifique. D'autres protéines peroxysomales possèdent une séquence amino-terminale (cette séquence pouvant être extrêmement variable). Le mécanisme de transport est incomplètement compris. Il implique des transporteurs (les peroxines) qui agissent de manière analogue aux importines dans le transoprt nucléaire et jouant ainsi le rôle de cargo. Si on ignore le mécanisme moléculaire, les conséquences d'un défaut de son fonctionnement sont malheureusement connues.

4. Pathologies associées au peroxysome

Il existe ainsi une maladie génétique, le syndrome de Zellweger. Cette pathologie se traduit par de graves désordres sur le plan neurologique, rénal et hépatique aboutissant souvent à la mort en bas age. Cette pathologie est aussi appelée syndrome des peroxysomes vides. Une forme de cette maladie a été montrée comme étant la conséquence d'une mutation dans le gène de la peroxine Pex2. Une forme moins sévère est associée à un défaut dans le récepteur à la séquence d'import amino-terminale.

fiche 87 Le transport vers les mitochondries et les chloroplastes

Ces deux mécanismes possèdent des similarités. Ce sont des mécanismes post-traductionels, ils utilisent des pores spécialisés (les translocons) et consomment de l'énergie (ce n'est pas une diffusion passive).

1. Transport dans la mitochondrie

Fiche 106

La mitochondrie est entourée par deux bicouches lipidiques qui forment la membrane externe (pauvre en protéines) et interne (très riche en protéines dont les éléments constituants la chaîne de transfert des électrons). Chaque membrane contient des protéines et la matrice mitochondriale ainsi délimitée comporte plus de 200 protéines participant à de nombreuses réactions métaboliques (cycle de Krebs et oxydation des acides gras). Pour que ces protéines passent les deux membranes, elles vont devoir emprunter des canaux qui sont des translocons. TOM (*translocon of the outer membrane*) et TIM (*translocon of the inner membrane*) sont de gros complexes formés de plusieurs protéines (désignés en minuscules, Tom et Tim). Ces complexes contiennent des facteurs agissant comme des récepteurs des précurseurs mitochondriaux et des pores d'environ 0,2 nm de diamètre (figure 1).

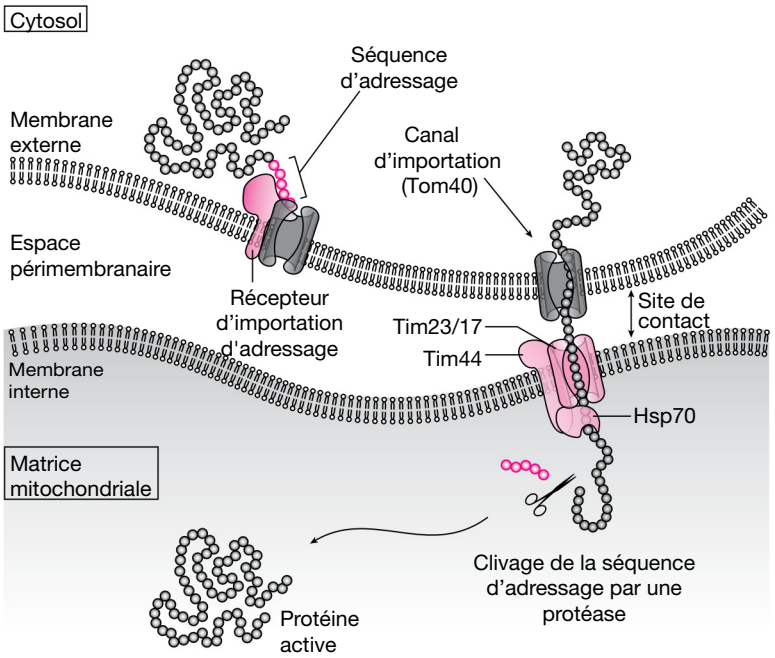


Figure 1 : Modèle d'importation des précurseurs mitochondriaux

Les précurseurs mitochondriaux, après leur synthèse, restent dans un état déstructuré grâce à l'action de protéines chaperonnes telles que Hsp70 (*heat-shock protein 70 kDa*). Pour pouvoir franchir le pore, les protéines doivent demeurer dans cet état non replié. Les protéines devant rejoindre la matrice passent à travers les deux pores dans le même mouvement. Après ce transfert, la séquence signal est clivée. Pour les

protéines devant se retrouver dans la membrane interne de la mitochondrie ou dans son espace inter membranaire, il existe une retro translocation impliquant une deuxième séquence signal. Cette deuxième étape (impliquant le complexe OXA) va donc permettre de transporter la protéine de la matrice vers la membrane interne ou l'espace inter membranaire. Ce même mécanisme permet également aux protéines de la chaîne de transfert d'électrons codées par le génome mitochondrial et traduites dans la matrice de rejoindre la membrane interne (le mouvement correspond alors à un export de protéines mitochondriales… !)

Fiche 116

2. Transport dans le chloroplaste

Les plastes sont des organites trouvés chez les eucaryotes chlorophylliens (plantes et algues). Les chloroplastes forment un sous-groupe spécialisé dans la photosynthèse. À l'instar de ce que nous venons de voir pour les mitochondries, une grande partie des protéines trouvées dans les plastes (et donc chloroplastes) est produite par la transcription en ARNm de gènes nucléaires, ces ARNm étant ultérieurement traduits sous formes de protéines cytoplasmiques. Ces protéines doivent non-seulement rejoindre les plastes, mais s'insérer dans le bon sous-compartiment (stroma, thylacoïde, lumière, etc. ; figure 2). Ce mécanisme est lui aussi relié à l'existence de séquence signal. Cette séquence, comme pour les mitochondries, est amphipathique (un côté hydrophobe et un côté hydrophile) et sera coupée au moment de la translocation. Pour atteindre les thylakoïdes, les protéines exportées possèdent donc deux séquences signal : une séquence d'adressage aux chloroplastes (qui sera clivée par une protéase dans le stroma) suivie d'une séquence d'adressage aux thylakoïdes. Cette deuxième séquence est démasquée au moment du clivage de la première.

Fiche 115

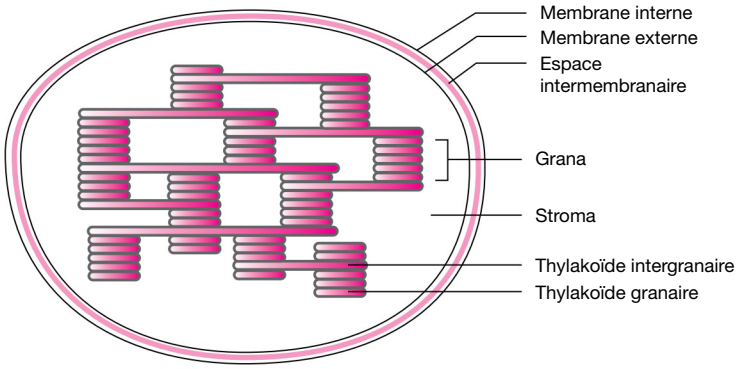


Figure 2 : Organisation d'un chloroplaste

fiche 88 L'envoi des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE)

Le réticulum endoplasmique est le lieu de synthèse des phospholipides membranaires. Il est impliqué dans différentes fonctions. Une de ces fonctions est d'assurer la première étape de la sécrétion des protéines dans le réticulum. Au cours du processus de maturation, une partie du réticulum sera impliquée dans des processus de modifications post-traductionnelles comme l'ajout de motifs oligosaccharidiques. Enfin, il est également impliqué dans la formation de l'appareil de Golgi par bourgeonnement.

Fiche 68

1. Adressage au RE

Toutes les protéines débutent leur synthèse dans le cytosol. Certaines y achèveront leur synthèse et pourront être acheminées ultérieurement vers le compartiment requis pour leur fonction.

D'autres vont être reliées physiquement vers le RE qui est alors appelé rugueux (RER). Ce ciblage vers le RE définit la première étape du processus de sécrétion (figure 1).

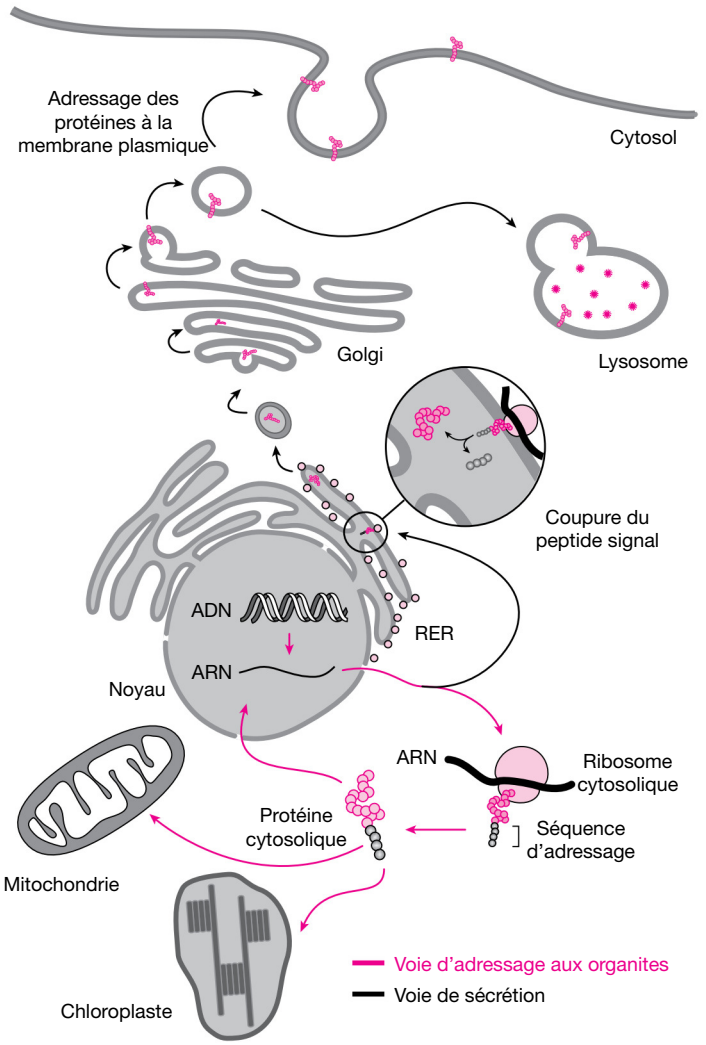


Figure 1
Voies de sécrétion, cytoplasmique et d'envoi dans les organites

2. Translocation

L'association avec le RE implique la reconnaissance d'une séquence signal N-terminale avec un complexe ribonucléoprotéique : le SRP (*Signal Recognition Particle*). Ce complexe (incluant un ARN de 7S associé à 6 protéines SRP9, 14, 19, 54, 68 et 72) en se liant avec la séquence signal émergent du ribosome, le bloque. Il s'associe alors avec un récepteur (SRP récepteur SR) situé sur la face externe de la membrane du RE. L'interaction SRP-SR est régulée par le GTP. La fixation de ce nucléotide sur SRP54 permet la dissociation de SRP du peptide signal. Le GTP stabilise également la liaison entre SRP et SR. Le peptide signal est alors reconnu par le translocon et commence à pénétrer dans le canal qu'il forme. Le complexe SRP-SR se dissocie du ribosome. Le ribosome n'est plus bloqué et reprend la traduction de l'ARNm. Le peptide en cours de synthèse va donc émerger du translocon et une signal peptidase (protéase associée à la face interne de la membrane du RE) prend alors le relais en clivant la séquence d'adressage (figure 2).

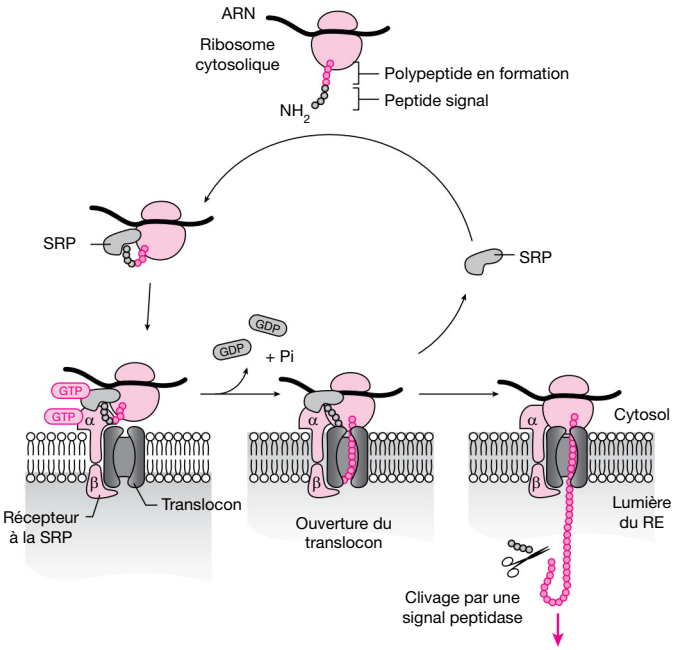


Figure 2 : Sécrétion des protéines dans le RE

3. Topologie d'insertion

Certaines protéines devront rester dans la membrane, alors que d'autres vont être localisées dans la lumière du RE. Cette répartition dépend de la présence dans la chaîne polypeptidique d'une séquence d'arrêt de translocation. En son absence, le processus suit le schéma de la figure 3 et la protéine sera soluble dans la lumière du RE.

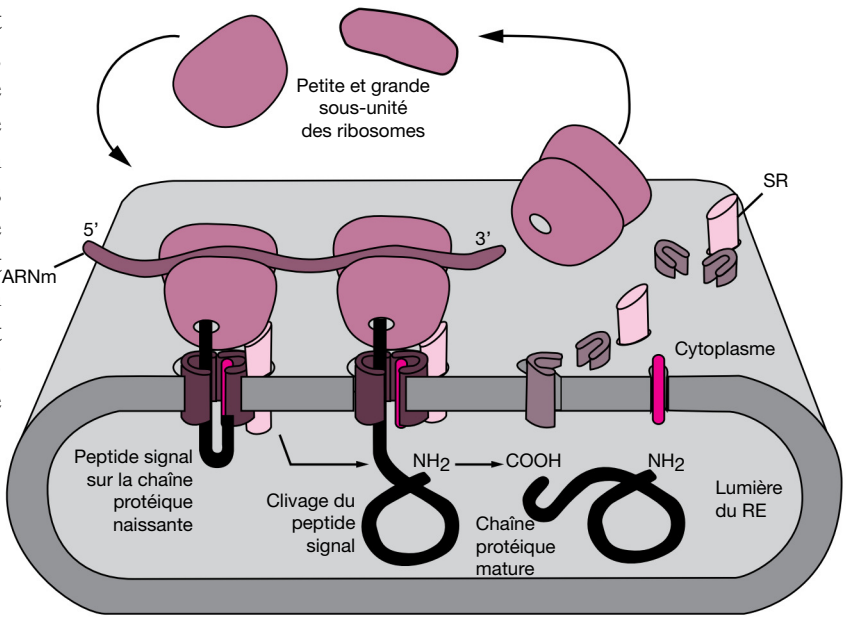


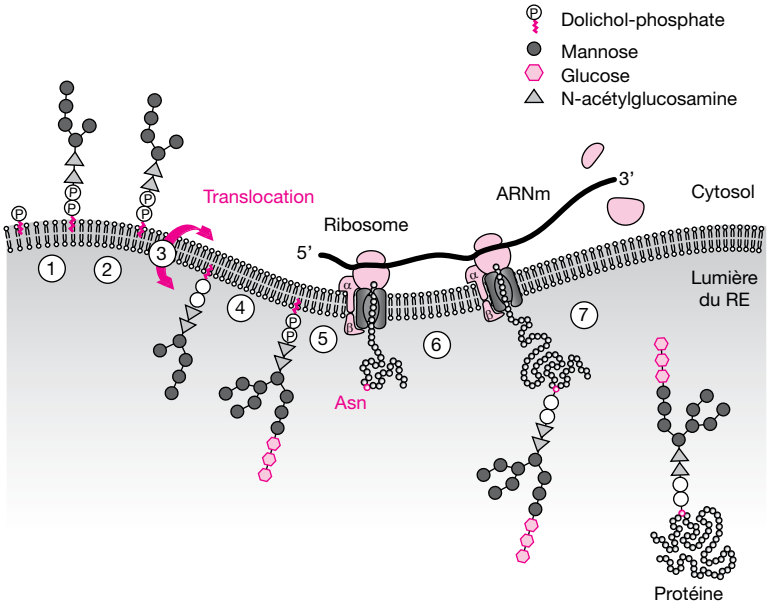
Figure 3 : Production de protéines luminales

fiche 89 La maturation et le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique

Dès l'envoi dans la lumière du RE, les protéines subissent des modifications affectant les structures primaires (la séquence), secondaires, tertiaires ou quaternaires (la structuration et l'oligomérisation). Ces évènements sont importants car un tiers des protéines transite dans le RE.

1. Glycosylation

La glycosylation consiste en l'ajout de sucres sur des résidus particuliers. Ces acides aminés peuvent être des asparagines (N) et l'on parle de N-glycosylation, ou des sérines et thréonines et il s'agit alors de O-glycosylation. La N-glycosylation est un mécanisme co-traductionnel, contrairement à la O-glycosylation qui intervient dans l'appareil de Golgi. La N-Glycosylation implique un motif préformé fait de 14 sucres disposés suivant une chaîne ramifiée. Ce motif est constitué par 3 molécules de glucose, 9 de mannose, et 2 de N-acétylglucosamine (figure 1). Le processus de biogénèse de cette structure est complexe et permet son attachement à une molécule de dolichol-phosphate qui lui permet d'être ancrée dans la membrane du RE. La chaîne oligosaccharidique est transférée par une glycosyl transférase sur les asparagines trouvées dans les motifs Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr (X peut être n'importe quel acide aminé sauf Pro) des chaînes protéiques en cours de translocation. La N-gycosylation est impliquée dans le repliement protéique, mais aussi dans le contrôle qualité des protéines fabriquées. Ce contrôle implique une modification par l'élimination des 2 glucoses en position 2 et 3 par une glucosidase.



Dolichol-phosphate (n = 9 à 22) :

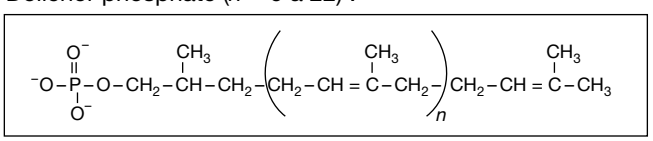


Figure 1 : N-glycosylation dans le RE

2. Glypiation

La glypiation est la modification qui ajoute un groupement glycosyl-phosphatidylinositol faisant office véritablement d'ancre (d'où le nom « ancre GPI »). L'ancre GPI est composée d'un groupement phosphatidylinositol relié à un glycane (résidus mannose et N-acétylglucosamine) lui-même lié à la phosphoéthanolamine (figure 2).

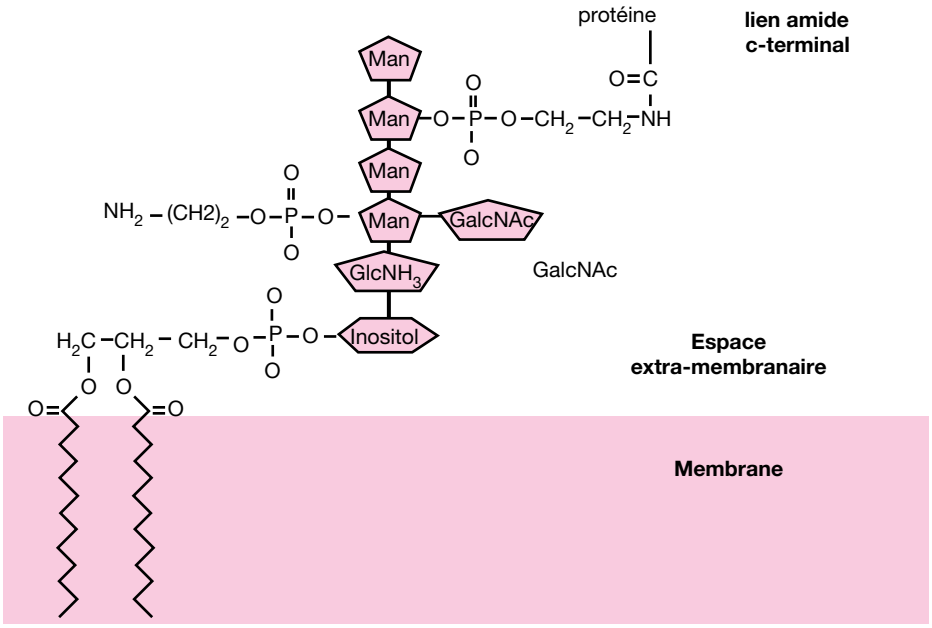


Figure 2 : Structure de l'ancre GPI

L'ancre GPI est préformée et positionnée dans la membrane. Elle est ajoutée à une protéine lors d'un clivage de celle-ci par une GPI transamidase. Cette modification de structure affecte le repliement.

Fiche 71

3. Formation des ponts disulfures intra et interchaînes

La Peptide Disulfide Isomérase (PDI) permet de créer les ponts disulfures qui stabiliseront les repliements protéiques attendus.

4. Chaperons du RE

Le repliement des protéines est contrôlé par des protéines chaperons telles que BiP (*Binding immunoglobuline Protein*) ainsi que par la calnexine et la calréticuline. Ces deux protéines sont des lectines (protéines pouvant se lier à des oses et donc aux glycoprotéines). La calnexine est une protéine membranaire qui se lie aux protéines N-gycosylées ayant déjà subi l'élimination des deux molécules de glucose. Elle va permettre le repliement pour générer une protéine dont la troisième molécule de glucose de l'oligosaccharide sera alors éliminée. La calréticuline a la même action mais est soluble dans la lumière du RE.

BiP est un chaperon de la famille des HSP70. Cette protéine chaperonne se lie donc de manière provisoire, à des segments hydrophobes de la chaîne protéique en cours de synthèse. La présence de Bip permet l'acquisition de la structure correcte et/ou l'oligomérisation. Le départ de BiP est induit par l'hydrolyse de l'ATP. Si les protéines sont incorrectement ou non repliées elles sont exportées vers le cytosol où elles seront dégradées par les protéasomes.

Fiche 91

fiche 90

La translocation des protéines hors du réticulum : ERAD et UPR

1. La voie de dégradation ERAD (*ER Associated Degradation*)

Cette voie est empruntée par les protéines dont le repliement ou l'oligomérisation sont défectueux. Le processus de repliement dans le RE est long et relativement inefficace. Une fraction des protéines transloquées n'arrivera jamais à atteindre le repliement correct. Les cellules ont donc mis en place un système permettant d'évacuer ces chaînes polypeptidiques mal repliées afin de les dégrader. Les différentes étapes vont donc être la reconnaissance de la protéine à éliminer, sa retrotranslocation dans le cytoplasme et sa dégradation.

Reconnaissance de la chaîne polypeptidique

La glycosylation est le point central du contrôle qualité. La figure 1 montre le cycle impliquant des acteurs déjà vus. Les lectines comme la calreticuline se fixent sur la forme mono-glucosylée. Le clivage du glucose par la glucosidase II termine ce cycle. Si la protéine est correctement repliée, elle peut quitter le RE. Sinon, elle est prise en charge par l'UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase (UPGG) qui greffe une molécule de glucose pour permettre un nouveau cycle. Alternativement, le mannose peut être retiré ce qui permet la reconnaissance par la protéine EDEM (*ER Degradation-Enhancing 1,2-Mannosidase-like protein*). La protéine est alors ubiquitinée, rétro-transloquée dans le cytosol par le canal de translocation et dégradée par le protéasome.

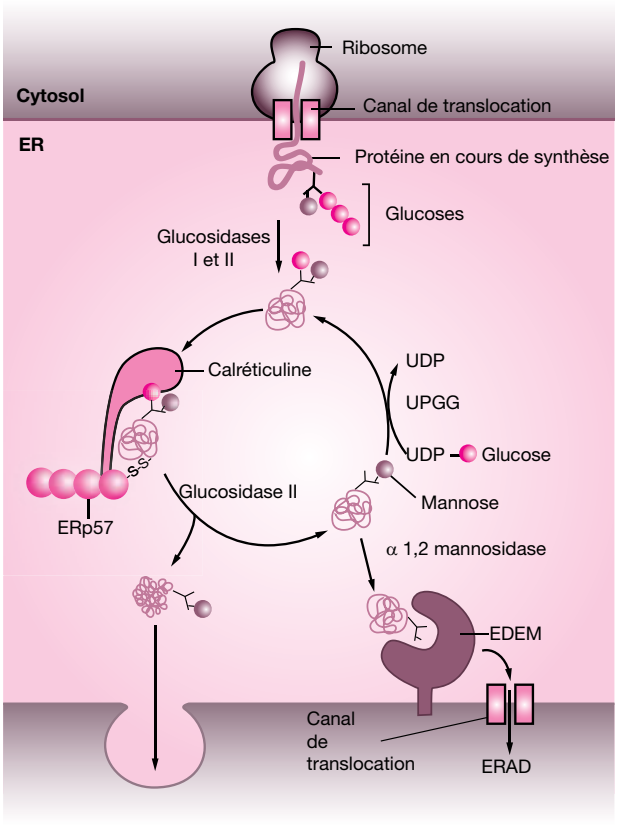


Figure 1 : Contrôle qualité par la calréticuline

D'après L. Ellgaard *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, mars 2003.

2. La réponse UPR (*Unfolded protein response*)

Dans les cellules non stressées, BiP est lié au domaine luminal des protéines IRE1, PERK et ATF6 qui sont les senseurs du stress du réticulum (figure 2). Cette fixation permet le maintien de ces protéines dans un état inactif. Si la charge en protéines dénaturées augmente, BiP s'y fixe préférentiellement.

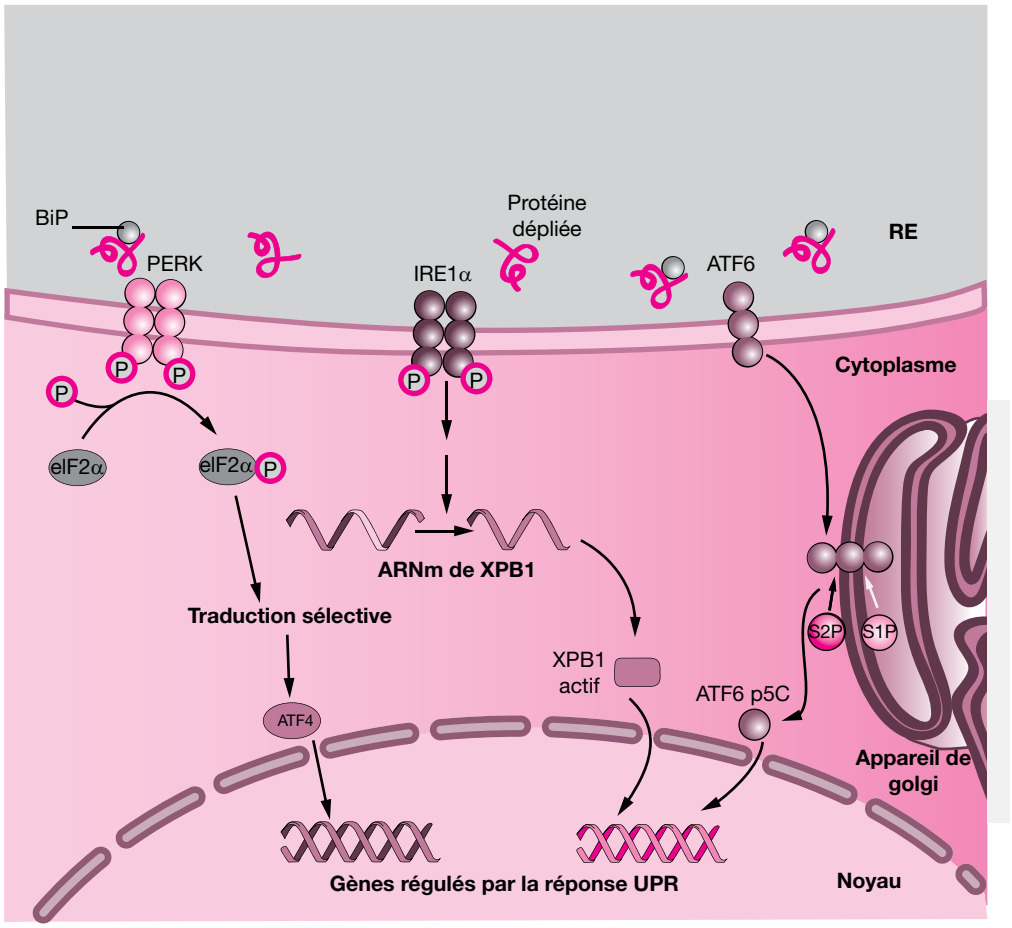


Figure 2 : La réponse UPR

Elle est induite lorsque BiP, en présence de protéines mal repliées, se détache des protéines PERK, IRE1 et ATF6. D'après Z. Zhang *et al.*, *Nature*, juillet 2008.

Le déplacement de BiP de PERK provoque sa dimérisation et son auto-phosphorylation. La forme active de PERK régule alors la traduction en phosphorylant eIF2, un facteur d'initiation de la traduction. Certains ARNm (comme celui codant pour le facteur de transcription ATF4) sont préférentiellement traduits. L'activation de PERK provoque également un arrêt du cycle cellulaire. Une fois séparée de BiP, IRE1 se dimérise également et induit l'épissage de l'ARN XPB1. La protéine produite est un activateur de transcription qui cible les gènes impliqués dans la réponse UPR (protéines chaperonnes comme BiP, protéines impliquées dans l'ERAD). Enfin, ATF6, une fois dissocié de BiP est transloqué dans l'appareil de Golgi où il sera clivé. Le fragment obtenu (ATF6p50) migre dans le noyau et va participer à l'activation des gènes impliqués dans l'UPR.

fiche 91

Les protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes (ou chaperons) sont les acteurs majeurs du repliement protéique. Ces protéines sont requises dans des conditions où l'ensemble des protéines subit une altération du repliement (exposition à la chaleur, à certains agents chimiques, etc.), mais elles assurent également un rôle important dans un contexte cellulaire ordinaire. Ces chaperons constitutifs sont impliqués dans le repliement des protéines après leur synthèse, dans la structure quaternaire, dans le contrôle qualité au sein du réticulum endoplasmique et dans le dépliement-repliement des polypeptides lors de leur passage à travers les membranes.

La découverte de ces protéines est liée à la réponse au choc thermique. Après ce stress, les cellules induisent un nombre restreint de gènes. Cette activation transcriptionelle permet la production de protéines spécifiques : les Hsp (*Heat shock proteins*, ou protéines de choc thermique), également dénommées protéines de stress. Chez les eucaryotes, les protéines Hsp sont décrites par leurs masses moléculaires comme 104, 90, 70, 60, 40, 27 kDa et sont donc dénommées Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60… Chez les procaryotes, leur nom est associé à la fonction ayant permis leur découverte (Gro pour les facteurs d'assemblage de phages, Dna car ces facteurs protéiques sont essentiels à la réplication de l'ADN…). Bien que ces noms soient différents, les mécanismes restent les mêmes chez les procaryotes et eucaryotes.

1. Rôle des chaperons

Repliement protéique

Le premier acteur du repliement des protéines est bien entendu leur séquence primaire. En fonction de la nature des acides aminés, la chaîne polypeptidique pourra se replier seule ou en sera incapable. Même dans ce cas, le temps requis pour un repliement correct est incompatible avec un mécanisme aléatoire. Ce paradoxe fut énoncé par C. Levinthal en 1969. Si on considère qu'un acide aminé peut explorer deux conformations possibles, une protéine de 100 acides aminés peut donc choisir entre 2^{100} (soit 10^{30}) conformations. En considérant qu'il faut 1 picoseconde (10^{-12} s) pour changer de conformation, il faut $10^{30} \times 10^{-12}$ soit 10^{18} secondes ou encore 3.10^{10} ans ! Ce temps est incompatible avec ce qui est observé. Cette différence s'explique par l'existence de chemins de repliement préférentiels, mais aussi par la possibilité pour certaines protéines de recruter des facteurs permettant un repliement correct : les protéines chaperonnes. Le terme chaperon vient de la propriété de ces protéines à se lier à la chaîne polypeptidique pour prévenir un repliement incorrect. Ceci est particulièrement important lors de la traduction des protéines.

Repliement co-traductionel

Fiche 51

Lors de la traduction, les acides aminés hydrophobes (qui, dans la structure finale, se retrouveront enfouis à l'intérieur de la structure protéique) auraient tendance à s'associer à d'autres surfaces hydrophobes et pourraient donc entraîner une agrégation de ces protéines. Pour prévenir cette agrégation, les protéines chaperonnes comme les HSP70 et 40 (DnaJ et DnaK chez les procaryotes) (figure 1) vont se fixer sur ces séquences hydrophobes. Cette association n'est pas spécifique comme l'est la reconnaissance d'un

substrat par une enzyme selon le modèle « clé-serrure ». Une fois la traduction terminée, un autre type d'aide au repliement peut être utilisé. Il s'agit du complexe GroEL (résultant de l'assemblage d'HSP60) GroES (résultant de l'assemblage d'HSP10) dont l'équivalent chez les eucaryotes est le complexe TRIC/CCT. Ces complexes sont des méga-structures constituées par plus d'une dizaine de sous-unités. Ces sous-unités forment un canal hydrophobe dans lequel la protéine en cours de repliement va s'engouffrer grâce notamment à Grpe qui optimise la fonction de DnaK. Une fois à l'intérieur de la véritable cage formée par GroEL des ajustements successifs consommant de l'ATP vont permettre de finaliser le repliement de la protéine.

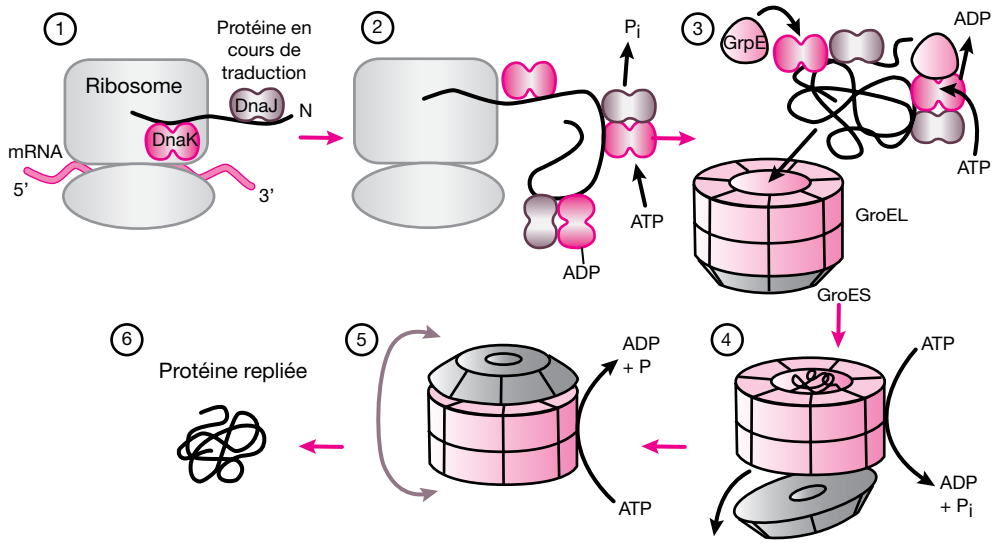


Figure 1 : Repliement protéique au cours de la traduction

Désagrégation

Les chaperons interviennent dans le cours « normal » des protéines pour leur permettre d'acquérir leur structure spatiale, mais sont aussi importants lors de stress conduisant à la formation d'agrégats. Le tableau suivant indique les fonctions dans lesquelles les différentes classes de chaperons sont plus particulièrement retrouvées.

Tableau 1 : Exemples de chaperons et des activités associées

Chaperons eucaryotiques	Équivalent procaryotique	Fonctions
HSP104	ClpB ClpA	Fragmentation des gros agrégats permettant ensuite l'action d'HSP70
HSP90	HtpG	Abondante dans le cytoplasme. Associé aux facteurs de transcription
HSP70	DnaK	Protéines constitutivement associées au repliement. Également induite en conditions de choc thermique
HSP60	GroEL	Repliement post-traductionnel, import dans la mitochondrie et les plastes
HSP40	DnaJ	Co facteur du chaperon Hsp70
HSP10	GroES	Repliement post-traductionnel

fiche 92 Les protéines intrinsèquement désordonnées et les organelles non membranaires

Fiche 18

Un des paradigmes de la biologie moléculaire repose sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine. Dans d'innombrables cas, cette structure permet de comprendre la fonction en précisant les interactions moléculaires entre les acteurs (protéines, substrats, co-facteurs, etc.). Depuis quelques années, une nouvelle classe de protéines est apparue : les IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins* ou protéines intrinsèquement désordonnées en français). Ces protéines ne possèdent pas une structure définie dans des conditions physiologiques. Il existe également des protéines dont une partie forme un domaine non structuré (région « ID »). Beaucoup de ces protéines agissent en transmettant un signal ou en régulant une activité enzymatique *via* une formation de complexe non catalytique souvent transitoire. Ces protéines sont impliquées dans des fonctions liées à la division cellulaire, la régulation de l'expression des gènes et la différenciation cellulaire. En 2018, on dénombre ainsi 803 protéines et 2 167 régions non structurées (http://www.disprot.org).

1. Mode d'action des IDPs et des régions ID

Contrairement aux protéines « classiques » qui ont besoin de se structurer pour être actives, les IDPs acquièrent une structure en se liant à leur cible. Il s'agit donc d'un mécanisme de couplage « fixation-structuration » (figure 1). La cible peut être une autre protéine, un ion métallique, de l'ADN, de l'ARN, un sucre, des lipides, etc.

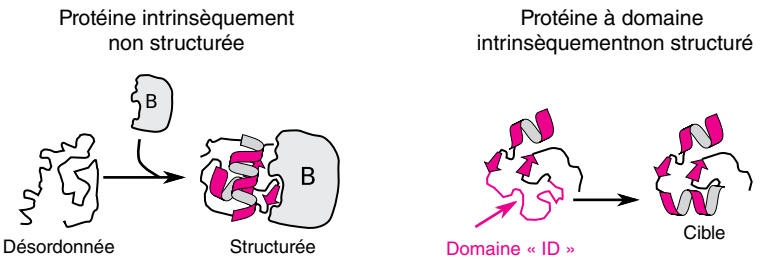


Figure 1 : Transition structurale des « IDP »

Fiche 119

Cette transition (structure désordonnée vers organisée en présence de la cible) permet alors de disposer de véritables interrupteurs moléculaires qui vont le cas échéant stabiliser des complexes (par exemple la protéine Tau qui est une MAP et va stabiliser les microtubules), servir de plateforme (par exemple la protéine HMGA qui peut lier plus de 18 protéines différentes et réguler la transcription de plusieurs dizaines de gènes), etc. Les bases moléculaires de cette reconnaissance impliquent fortement la nature des acides aminés qui sont retrouvés dans ces IDPs ou ces domaines ID. On retrouve ainsi préférentiellement des acides aminés polaires, chargés et des prolines.

Fiche 129

Les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation peuvent réguler la capacité de ces IDPs ou régions ID à se lier à leur cible permettant de réguler leur activité biologique.

2. Importance des IDPs dans la formation d'organelles non membranaires

La cellule comporte des organelles délimitées par des membranes, mais présente également des compartiments hautement spécialisés et non délimités par des membranes. Ces compartiments peuvent être nucléaires (comme le nucléole) ou cytoplasmiques comme le centrosome. Ces compartiments sont labiles et ne peuvent donc être purifiés comme les compartiments entourés d'une membrane. Dans certains cas, ces compartiments peuvent inclure non seulement des protéines, mais également des acides nucléiques. La formation de ces corps « liquides » (qui peuvent aller jusqu'à un diamètre d'un micron) implique le regroupement des facteurs qui y sont retrouvés. Cette concentration est assurée par des IDPs qui vont alors piéger les partenaires (protéines ou acides nucléiques) et permettre d'augmenter localement leur concentration (figure 2). Ce mécanisme dynamique est connu sous le terme de séparation de phase liquide-liquide (*Liquid Liquid Phase Separation* ou LLPS en anglais).

Fiches 84, 50, 137

Figure 2 : Formation d'un granule sans membrane

fiche 93 Le protéasome et l'ubiquitination

La dégradation des protéines est un processus permettant bien évidemment d'éliminer des chaînes polypeptidiques endommagées (attaques chimiques diverses comme l'oxydation d'acides aminés, etc.), mais également de dégrader des acteurs du cycle cellulaire comme les cyclines, permettant ainsi de passer à l'étape suivante du cycle. La régulation de la quantité d'une protéine ne dépend donc pas uniquement de son taux de traduction (et donc de l'abondance de l'ARNm correspondant), mais aussi de son catabolisme. Le protéasome, agissant comme un trou noir pour les protéines est donc un acteur majeur de cette régulation. L'autre voie de dégradation est basée sur la voie lysosomiale (ou vacuolaire chez la levure).

Fiches 99, 138

1. La sous-unité 20S

Le protéasome 20S est le cœur protéolytique des différentes formes de protéasome. Il forme un complexe cylindrique de 15 nm de longueur sur 11 nm de diamètre qui résulte de l'assemblage de 28 sous-unités qui aboutissent à l'existence d'un méga complexe de près de 700 kDa. Les deux anneaux extérieurs sont formés de 7 sous-unités α et les 2 anneaux internes formant la chambre catalytique de 7 sous-unités β (figure 1). Chez les eucaryotes, les extrémités N-terminales des sous-unités α interagissent entre elles et constituent ainsi une barrière physique qui obstrue l'entrée du canal et limite l'accès des protéines cytosoliques à l'intérieur de la chambre protéolytique en imposant une conformation fermée au protéasome.

2. Les complexes régulateurs

Ces complexes appelés PA ou désignés par leur constante de sédimentation contrôlent l'ouverture du protéasome. Ils s'associent aux sous-unités α qui forment l'entrée du cœur du protéasome.

Complexe régulateur 19S

Ce complexe de plus d'une quinzaine de protéines a plusieurs rôles. Le premier est de reconnaître et de fixer le substrat. Cette reconnaissance implique la présence d'un peptide particulier : l'ubiquitine. Il facilite également le dépliage et le passage de la chaîne polypeptidique vers l'intérieur du protéasome. Il contient également une isopeptidase qui enlève les ubiquitines (qui seront recyclées afin de pouvoir marquer d'autres substrats à dégrader).

Complexe régulateur 11S

Ce complexe heptamérique est capable d'activer fortement la protéolyse, mais incapable de stimuler la dégradation de protéines ubiquitinées.

3. Localisation cellulaire

De par son rôle fondamental, il n'y a pas un mais de nombreux protéasome par cellule. Ces structures s'assemblent et se dissocient en fonction des besoins. Leur localisation principale est nucléo-cytosolique. Une fraction du protéasome est également associée au niveau de la surface externe du réticulum endoplasmique, où il est impliqué dans le système ERAD.

Fiche 90

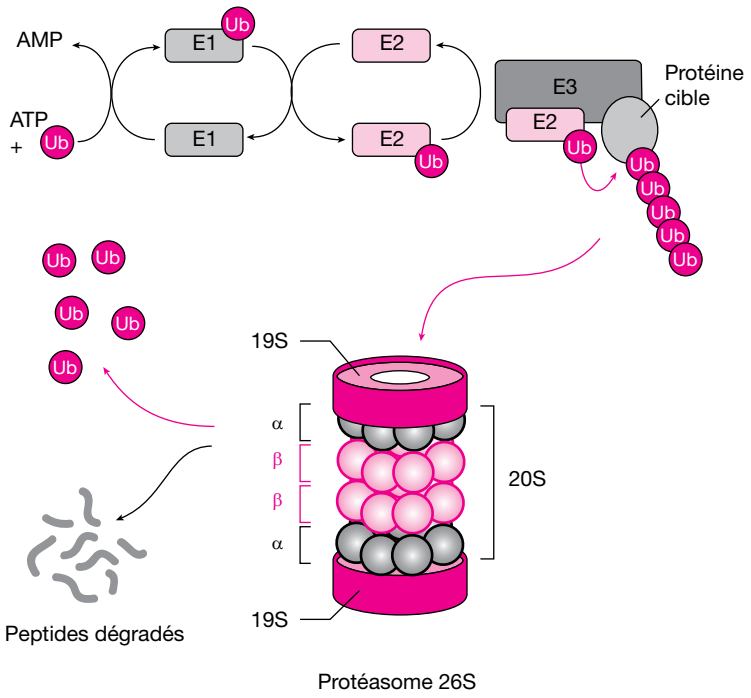


Figure 1 : Dégradation des protéines par le protéasome

4. Ubiquitination

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés, très stable, présente dans toutes les cellules eucaryotes. Elle est conservée au cours de l'évolution parmi les différentes espèces eucaryotes : l'ubiquitine humaine et celle de levure partage 96 % d'identité pour leur séquence protéique. L'addition de l'ubiquitine aux protéines est appelée la conjugaison. Ce processus est réalisé par trois complexes enzymatiques différents : E1 (enzyme d'activation de l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) et E3 (ubiquitine ligase). En présence d'ATP l'ubiquitine se fixe par son extrémité C-terminale sur le groupe SH d'une cystéine de E1. L'ubiquitine activée est alors transférée au niveau du groupement thiol de E2. Le rôle de E3 est de créer une liaison covalente entre l'ubiquitine et un groupement NH_2 d'une lysine de la protéine ciblée. D'autres ubiquitines peuvent alors se fixer à un résidu lysine de la première ubiquitine pour former une chaîne. Une chaîne d'au moins quatre molécules représente le signal de dégradation par le protéasome. Dans ce processus, E3 est l'enzyme qui va sélectionner le substrat. C'est pour cela qu'il existe plusieurs centaines de protéines de type E3 alors qu'il existe une seule enzyme de type E1.

fiche 94 Les méthodes d'étude de l'adressage cellulaire

Les méthodes permettant d'étudier l'adressage des protéines sont des méthodes *in vitro* et *in vivo.*

1. Approches *in vitro*

Ces approches sont basées pour l'essentiel sur la protection à des protéases peu spécifiques. C'est typiquement la protéinase K qui est choisie pour ce type d'expérience. Cette protéase est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques de préférence au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique. Elle présente également la caractéristique d'être active en présence de SDS. Dans une expérience de protection à la protéinase K, un extrait brut va être incubé en présence de protéase. Si la protéine testée est entourée d'une bi-couche lipidique, elle sera protégée de l'action de la protéinase et sera donc résistante. En revanche, si elle est cytosolique, elle sera dégradée et il devient impossible de la détecter. Le contrôle positif de ce type d'expérience consiste à réaliser la digestion en présence de détergents comme le SDS qui vont dissocier les membranes et permettre une dégradation totale des protéines. Dans ce cas, la protéine sera dégradée, indiquant que la protéinase K est bien active !

Fiche 1

L'autre approche classiquement réalisée consiste à fractionner le contenu cellulaire

Pour cela, il faut casser les cellules dans des conditions les plus douces possibles, en veillant notamment à ne pas rompre les membranes. Ceci implique l'utilisation de tampon de force osmotique équivalente à ce qui est trouvé dans la cellule. On peut ainsi obtenir un enrichissement en chaque fraction et analyser la présence de la protéine testée dans un compartiment particulier (figure 1).

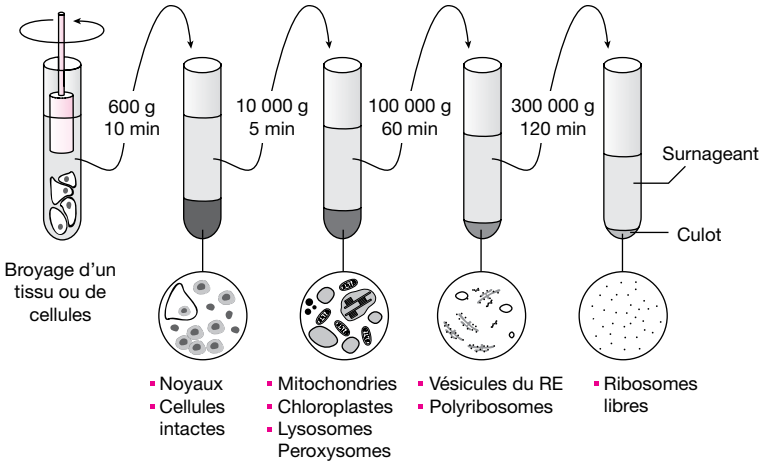
2. Analyse *in vivo*

Fiche 80

Les analyses *in vivo* ont énormément progressé grâce à l'apport des protéines fluorescentes. L'archétype de ces protéines est la GFP (*Green Fluorescent Protein*).
Par génie génétique, il est facile de fusionner la phase codante de cette protéine (qui est constituée de 238 acides aminés) à la protéine dont on veut tester la localisation. La protéine hybride ainsi obtenue pourra combiner les propriétés des deux protéines de départ. Elle sera localisée comme la protéine testée et sera fluorescente. L'immense intérêt est de pouvoir observer cette fluorescente sur des cellules vivantes. Après avoir déposé de telles cellules entre lame et lamelles, un microscope à fluorescence muni du jeu de filtre adéquat permettra de sélectionner les longueurs d'ondes spécifiques de la GFP.

Des approches originales ont également permis d'inventer des dérivés de la GFP de couleurs différentes. Il est donc possible de disposer de cellules exprimant des gènes modifiés par ces différents marqueurs. L'intérêt est alors que chaque compartiment sera « coloré » différemment d'un autre. Si on utilise toutes les « couleurs » sauf la GFP (par exemple), on pourra tester la présence de la protéine d'intérêt fusionnée à cette GFP en analysant sa co-localisation.

a) Centrifugation différentielle



b) Centrifugation en gradient de densité

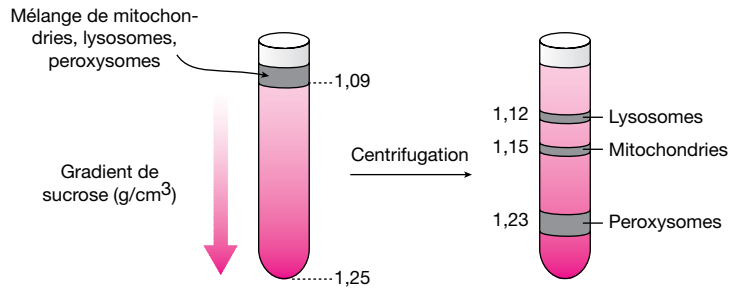


Figure 1 : Résultat du fractionnement

Des molécules de toutes les couleurs

La GFP a été découverte en 1962, son gène cloné en 1992 et son expression a été obtenue dans d'autres organismes en 1994. Cet ensemble de travaux, qui a révolutionné la biologie, a valu à leurs auteurs (O. Shimomura, D. Prasher et M. Chalfie) le prix Nobel en 2008. Depuis, de nombreux dérivés de la GFP sont disponibles, certains plus stables, d'autres au contraire présentent des demi-vie plus courtes. D'autres protéines avec des spectres de fluorescence différents ont été découvertes. On peut citer ainsi la *Cyan Fluorescent Protein*, la *Yellow Fluorescent Protein* ou la *Ds Red*.

FOCUS Les pathologies associées au dysfonctionnement du RE

Le réticulum endoplasmique est donc un lieu important. Il peut représenter plus de 50 % de la surface membranaire d'une cellule et est un centre de tri permettant ou non l'envoi des protéines dans la voie de sécrétion. Il permet le contrôle du repliement correct des protéines secrétées et est donc essentiel à la vie cellulaire. Un certain nombre de pathologies sont associées à des mutations dans la séquence de protéine secrétées qui vont altérer leur repliement. Ces pathologies de classe I sont typiquement représentées par la mucoviscidose qui est due à des mutations dans le gène de structure d'un canal à chlore exprimé dans les cellules épithéliales de nombreux tissus. Un certain nombre de mutants amènent à une protéine active, mais le repliement lent de ces mutants va conduire à la dégradation de la protéine et donc à la pathologie liée à son absence.

Les pathologies de classe II sont dues à des mutations dans la machinerie de repliement et/ou de transport amenant à une rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Un exemple de ce type est trouvé dans le syndrome de Marinesco-Sjoegren. Ce syndrome autosomal récessif fait partie de la famille des ataxies cérébelleuses et est accompagné de retard de développement, de cataracte et de myopathie. Dans près de 50 % des cas, les patients présentent une mutation dans un gène qui est impliqué dans l'activité de BiP.

Les pathologies de type III sont causées par une déficience de l'une des voies de signalisation émanant de l'UPR. L'exemple le plus connu est le syndrome de Wolcott-Rallison. C'est une maladie génétique très rare, associant un diabète néonatal permanent (DNP), une dysplasie épiphysaire multiple conduisant au nanisme et d'autres manifestations dont des épisodes d'insuffisance hépatique aiguë. Moins de 60 cas ont été rapportés à ce jour. La plupart des patients viennent de familles consanguines. Il résulte de mutations dans le gène PERK démontrant ainsi son rôle essentiel.

Enfin, dans les pathologies de classe IV, les voies de signalisation de l'UPR sont fonctionnelles, mais les réponses sont altérées. Ceci touche particulièrement le protéasome dont il est évident qu'une baisse de fonction amène à l'accumulation de protéines mépliées (dont la provenance peut être également cytosolique).

Un stress sévère du RE peut induire l'apoptose (mort programmée de la cellule) et est associé à certaines pathologies telles que le diabète ou les maladies neurodégénératives. Il y a donc une véritable balance qui permet pour la réponse au stress de réduire celui-ci (et permettre la survie de la cellule). Si la cellule est « débordée », elle va alors utiliser ce stress comme signal pour mourir. Les mécanismes, impliquant le RE, qui régulent cette « balance » moléculaire entre la survie et la mort cellulaires sont peu connus, mais sont des pistes explorées pour mieux comprendre certains mécanismes de cancérisation.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

7.1 Les protéine présentes dans le noyau sont :

- ☐ a. traduites dans un compartiment particulier : le nucléole
- ☐ b. traduites dans le nucléole ou importées
- ☐ c. importées après leur traduction qui est exclusivement cytoplasmique

7.2 Un cargo est :

- ☐ a. une protéine membranaire
- ☐ b. une protéine flottant à la surface de la membrane
- ☐ c. une protéine transportée grâce au trafic vésiculaire

7.3 L'envoi de protéines dans la mitochondrie est un mécanisme :

- ☐ a. co-traductionnel
- ☐ b. post-traductionnel

7.4 La translocation des protéines destinées à rester dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie se fait :

- ☐ a. en empruntant le canal TOM et en restant soluble grâce à des chaperons
- ☐ b. en empruntant TOM et TIM et en subissant ensuite une rétrotranslocation

7.5 La translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique implique le complexe SRP. Ce complexe est :

- ☐ a. un complexe ribonucléoprotéique
- ☐ b. un canal de translocation appelé aussi le translocon
- ☐ c. une machinerie cellulaire pouvant hydrolyser le GTP
- ☐ d. une protéase clivant la séquence signal

7.6 Cocher les affirmations justes :

- ☐ a. Toutes les protéines subissant une translocation dans le RE sont glycosylées
- ☐ b. Seules, les protéines glycosylées sont envoyées dans l'appareil de Golgi
- ☐ c. La O-glycosylation a lieu dans l'appareil de Golgi

7.7 Au cours de la dégradation par le système « ERAD », la protéine EDEM :

- ☐ a. reconnaît une protéine mal structurée comme le ferait une protéine chaperon
- ☐ b. rajoute une molécule de glucose
- ☐ c. provoque l'ubiquitination et la rétro translocation d'une protéine auquel est greffé le motif (N-acétylglucosamine)2(Mannose)9(Glucose)3
- ☐ d. provoque l'ubiquitination et la rétrotranslocation d'une protéine auquel est greffé le motif (N-acétylglucosamine)2(Mannose)9(Glucose)1
- ☐ e. provoque l'ubiquitination et la rétrotranslocation d'une protéine auquel est greffé le motif (N-acétylglucosamine)2(Mannose)8

7.8 Cochez les affirmations justes :

- ☐ a. L'ubiquitine est un petit peptide
- ☐ b. L'ubiquitine est ajoutée par le protéasome
- ☐ c. Le protéasome ne reconnaît que les protéines liées à l'ubiquitine
- ☐ d. L'ubiquitine ligase fait partie du complexe 19S

Réponses

7.1 **c**. Le nucléole est le lieu de synthèse des ribosomes. La traduction implique non seulement les ribosomes, mais aussi les ARNt et un certain nombre de facteurs qui sont trouvés dans le cytoplasme.

7.2 **c**. Toutes les protéines membranaires ne sont pas des protéines cargo. Le concept de protéines cargo s'oppose à celui de protéines résidentes (ne changeant pas de localisation).

7.3 **b**. La translocation des protéines dans la mitochondrie se fait en deux temps. Dans un premier temps, la protéine est produite par le ribosome. C'est la présence d'une séquence spécifique qui va ensuite permettre à cette protéine d'interagir avec le récepteur d'importation mitochondriale.

7.4 **b**. La situation est compliquée et va dépendre de plusieurs paramètres en plus de la présence de la séquence d'adressage (localisation membranaire ou soluble, etc.). On peut néanmoins considérer que dans la majorité des cas, la protéine sera capable d'être transféré du canal Tom au canal Tim.

7.5 **a** et **c**. Le complexe SRP contient un ARN et 6 protéines. C'est donc un complexe ribonucléoprotéique. Ce complexe s'associe avec le translocon qui est un élément distinct du SRP. L'interaction entre le complexe SRP et son récepteur membranaire dépend de la présence de GTP qui est hydrolysé par le SRP après dissociation du translocon.

7.6 **c**. La N-glycosylation est réalisée à des sites spécifiques (Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr).

7.7 **e**. EDEM est une lectine. C'est donc une molécule qui va reconnaître le profil de glycosylation des protéines. De manière spécifique EDEM va interagir avec la protéine glycosylée après hydrolyse du mannose et donc reconnaître le motif (N-acétylglucosamine)2(Mannose)8.

7.8 **a** et **c**. L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés. Il permet de cibler certaines protéines au protéasome qui reconnaît spécifiquement ce signal.

Chapitre 8

Le transport vésiculaire

Objectifs

Les compartiments décrits dans les chapitres précédents ne sont pas des objets inertes. Les phospholipides trouvés dans la membrane plasmique ont ainsi pu participer à la formation du Réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, etc. Ce flux procède globalement comme les psychédéliques lampes à lave des années 1960... S'il existe bien deux sens de circulation dans les deux cas, ces mouvements sont en revanche (et fort heureusement) hautement contrôlés dans la cellule. Ce chapitre présente un certain nombre de ces contrôles et introduit un mode de communication inter cellulaire : l'endo (exo)cytose.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 95

Les mécanismes moléculaires du transport vésiculaire

Le transport des vésicules au sein de la cellule regroupe différents trajets et différents acteurs. Il implique les protéines qui sont présentes dans les membranes, mais aussi dans la lumière des vésicules. La position et le flux de ces vésicules vont permettre la polarisation cellulaire. Ils assurent également un rôle fondamental pour adapter la composition lipidique des différentes membranes. Ce mécanisme de transport peut-être en partie schématisé selon la figure 1.

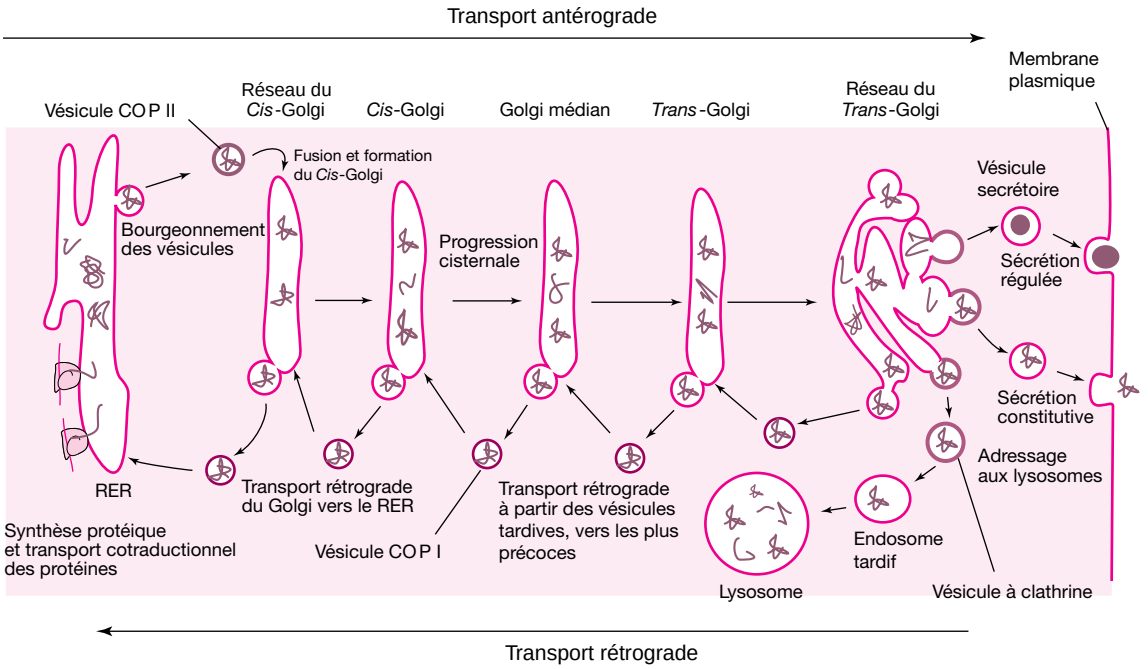


Figure 1 : Transport vésiculaire

Ce transport est donc orienté. Le transport antérograde va du réticulum vers la membrane plasmique, le transport inverse étant le transport rétrograde. C'est le contenu protéique qui va orienter le destin des vésicules. Comme on peut le voir, au niveau moléculaire, les mécanismes sont toujours du même ordre.

1. Bourgeonnement de la membrane

Ce bourgeonnement est un phénomène impliquant des acteurs protéiques. Il va aboutir à former de véritables petits sacs permettant le transport des protéines qui sont appelées « cargos ». Cette évagination implique des protéines cellulaires qui vont former littéralement un manteau. Ce manteau est constitué par des protéines qui vont différer selon le type de vésicule. Dans l'exemple de la figure 2, il s'agit de coatomères COP qui sont chargées du transport des molécules dans les compartiments précoces des voies de sécrétion (RE-Golgi, Golgi-Golgi). Il existe également un autre constituant des manteaux : la clathrine. Cette protéine est impliquée spécifiquement dans un autre transport (l'endocytose).

La formation du manteau joue un rôle physique en ajustant la taille de la vésicule de manière constante (de l'ordre de 50-100 nm). Le recrutement des protéines du manteau se fait *via* des GTPases comme la protéine Sar1. Ces GTPases sont elles-mêmes régu-

lées par les protéines GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Dans la figure 2, la vésicule à COPII est sur le point de bourgeonner (du RE). Une GEF remplace le GDP de la Sar 1 par du GTP. La Sar 1 GTP recrute alors des sous-unités de COPII, et la membrane bourgeonne en incluant les protéines membranaires sélectionnées. Une de ces protéines est fondamentale dans le processus : v-SNARE (*vesicular Soluble NSF Attachment protein Receptor*). Les protéines SNARE sont des protéines chargées de diriger les vésicules présentes dans la cellule vers un organite cible qui porte à sa surface une protéine t-SNARE (pour *target*).

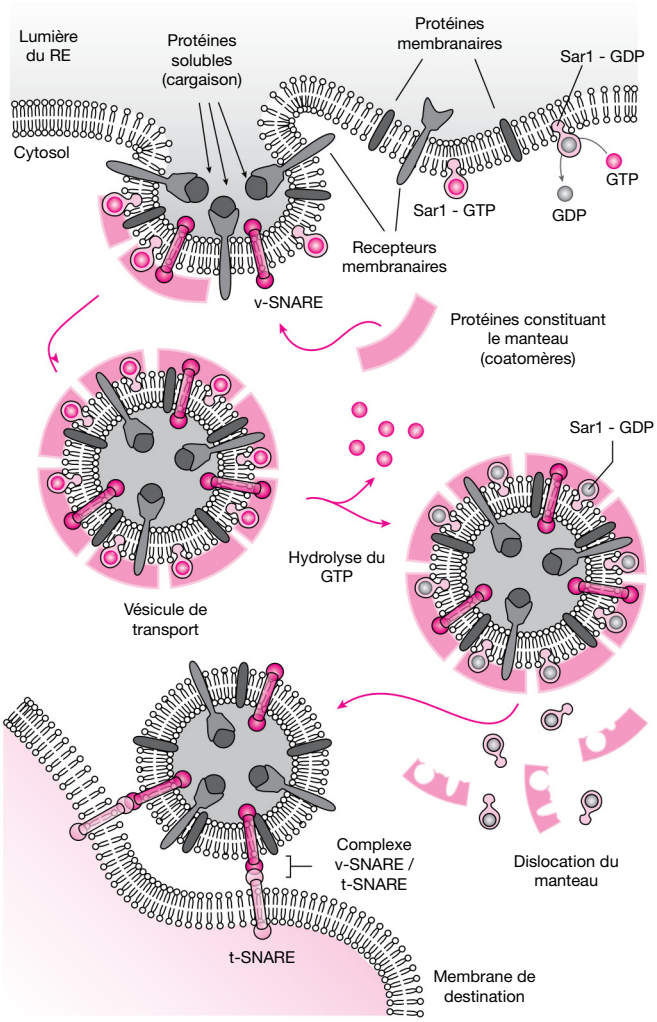


Figure 2 :
Mécanisme de bourgeonnement

2. Séparation de la membrane

Une fois formée, la vésicule se sépare de son manteau après hydrolyse du GTP par les GTPases activées par des GAP (*GTPase Activating Protein*). Cette hydrolyse conduit à exclure Sar1 de la membrane et donc à dissocier complètement la vésicule de son manteau.

3. Amarrage Fusion

L'amarrage à la membrane du compartiment accepteur implique des facteurs d'ancrage associés à des GTPases de la famille Rab. Ce sont les protéines Rab qui vont donc cibler spécifiquement les vésicules vers leur compartiment d'arrivée. La fixation de la vésicule sera alors renforcée par l'interaction des protéines v-SNARE et t-SNARE.

fiche 96

Du RE vers le Golgi

Fiche 90

Ce transport va être crucial pour le contrôle qualité (comme vu pour la glycosylation des protéines). Il va aussi permettre d'établir la structure de l'appareil de Golgi. Celui-ci est une structure polarisée. Il comporte deux faces. La face cis est tournée vers le RE, la face trans est à l'opposé.

Entre ces deux faces, on peut observer de véritables citernes (ou saccules) qui peuvent être présentes à plusieurs dizaines d'exemplaire.

Les différents réseaux formant l'appareil de Golgi ont également des compositions protéiques et lipidiques distinctes. Ceci implique donc un contrôle dans le transport des vésicules tant du RE au Golgi, qu'à l'intérieur du Golgi lui-même. Ce transport est contrôlé par deux types de coatomères COP (figure 1).

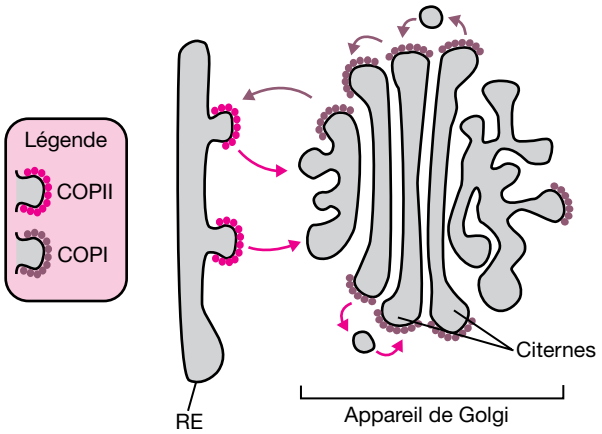


Figure 1 : Transport RE-Golgi

D'après B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 4e édition, Garland Science, 2002.

1. Les complexes COP

Le complexe COP I

C'est un complexe de près de 700 kDa résultant de l'assemblage de 7 sous-unités différentes. Ces sous-unités forment une cage qui est recrutée par la protéine ARF (une protéine se liant au GTP et assurant une fonction analogue à Sar1). Lorsque cette protéine est liée au GDP, elle est dans le cytoplasme et c'est la fixation au GTP qui va lui permettre de s'associer aux membranes et de recruter les sous-unités de COP I. Les vésicules prises en charge par COP I vont être impliquées dans le transport rétrograde. Ce transport va être interne au Golgi (du trans Golgi, au Golgi médian et du Golgi médian au Cis Golgi). Dans le cas des protéines résidentes dans le RE, le complexe COP I assure le transport du Cis Golgi au Réticulum.

Le complexe COP II

Le manteau de type COP II résulte de l'assemblage de trois composants : Sar1, le complexe Sec23/24 et le complexe Sec13/31. Il est initié par la fixation de GTP sur Sar1 suivi du recrutement séquentiel de Sec23/24 puis Sec13/31. Le nom « Sec » vient de la découverte de ces facteurs. C'est en effet une analyse génétique des mutants de Sécrétion qui a permis d'isoler ces différents acteurs. Le complexe COP II est donc impliqué dans le transport antérograde.

Fiche 104

2. Incorporation des cargos dans les vésicules de transport COP II

À l'heure actuelle, deux théories sont avancées. La première sur un modèle non sélectif. Les protéines cargos seraient donc prises dans un flux général permettant à toutes les protéines présentes dans la lumière du RE d'être envoyées dans la voie de sécrétion. Cette théorie s'appuie sur le fait qu'il existe des signaux spécifiques permettant un retour au RE des protéines qui ne doivent pas le quitter.

Dans l'autre modèle, le transport serait sélectif et régulé par des récepteurs aux protéines cargos. Ces deux modèles ne sont en fait pas inconciliables entre eux. Il est en effet admis que de nombreux cargos transmembranaires puissent être capturés par Sec24. Pour des cargos solubles, il existe quelques facteurs comme le facteur ERGIC53 qui pourraient également faire un lien entre la protéine à transporter et sa présence dans la vésicule en formation.

Fiche 97

3. Les protéines Rab

Comme les GTPases de recrutement du manteau (Arf et Sar) elles se partagent entre la membrane et le cytosol. L'état actif est la forme liée au GTP et associé à une membrane. Les protéines Rab forment une famille de plus d'une soixantaine de membres. La localisation de ces protéines Rab va permettre un ciblage préférentiel des vésicules. C'est ainsi que l'on retrouve Rab1, Rab 2 et Rab 6 dans compartiments du RE, et des différents éléments constituants l'appareil de Golgi.

fiche 97

Les protéines résidentes du RE

Nous avons vu comment les protéines pouvaient rentrer dans la voie de sécrétion et étaient transloquées dans le réticulum endoplasmique rugueux. Pour autant, toutes les protéines se retrouvant dans le réticulum ne doivent pas être acheminées jusqu'à la membrane plasmique. Un certain nombre de ces protéines sont hautement spécifiques du compartiment RE (comme BiP et les protéines impliquées dans le contrôle qualité). Il existe donc des mécanismes tout à fait particuliers permettant à ces facteurs de rester dans le compartiment réticulaire.

1. Système KDEL

Ce mécanisme est basé sur la reconnaissance d'une séquence cible par un récepteur (figure 1).

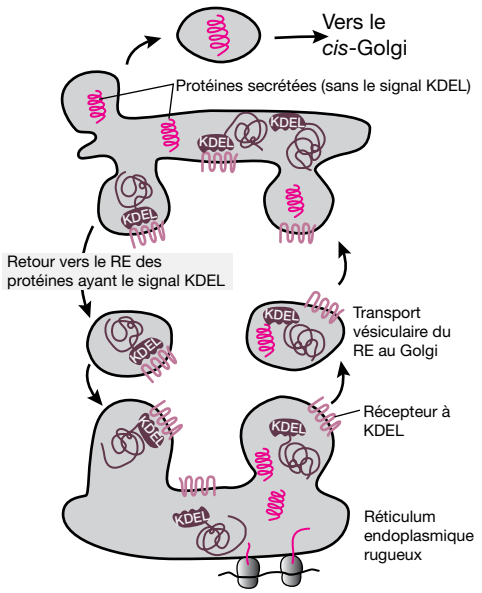


Figure 1 : Le signal KDEL dans le transport rétrograde

D'après H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, 4e édition, Freeman, 2000.

La séquence cible est composée des résidus KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) ou KDEH (Lys-Asp-Glu-His) dans la levure *S. cerevisiae*. C'est une séquence qui est souvent située sur le versant C-terminal des protéines solubles. Cette séquence est reconnue par un récepteur membranaire. Pour les protéines membranaires, la séquence de rétention est KKXX (Lys-Lys-AA-AA) à l'extrémité C-terminale des protéines de membrane du RE. Cette séquence agit en se liant directement à COP I et participe ainsi à la formation des vésicules à COP I. Les protéines membranaires vont de fait subir le transport rétrograde vers le RE.

Pour les protéines KDEL solubles, le signal de rétention ne se lie pas directement à COP I. Il faut un intermédiaire comme le récepteur à KDEL. Certaines protéines comportant la séquence KKXX servent de récepteurs au KDEL et assurent ainsi le flux rétrograde des protéines à KDEL du golgi vers le réticulum endoplasmique.

Les conditions physico-chimiques du RE (pH, concentration en différents ions, etc.) permettront alors une dissociation du complexe protéine KDEL-récepteur qui pourra être recyclé.

2. ERGIC-53

ERGIC-53 tire son nom de sa localisation (*ER Golgi Intermediate Compartments*). C'est une protéine transmembranaire de 53 kDa. Cette protéine a donc la propriété d'avoir une localisation cellulaire très précise. Pour autant, elle ne possède pas de séquence KDEL. La séquence exposée dans le cytoplasme possède un signal qui va lui permettre le recrutement dans des vésicules à COP II. Le domaine situé dans la lumière peut se lier aux sucres (c'est un domaine de type lectine). Le changement de conditions physico-chimiques entre le RE et le Golgi est probablement le facteur déclenchant la dissociation du cargo. ERGIC-53 subit alors un changement conformationel lui permettant de recruter COP I et donc de revenir dans le RE (figure 2).

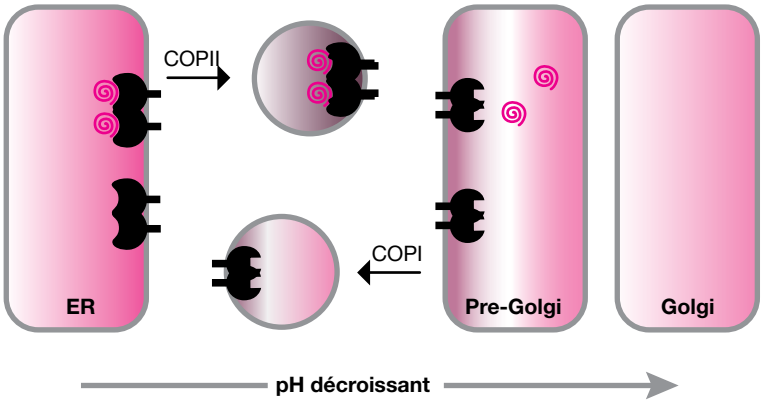


Figure 2 : Mécanisme de localisation de ERGIC-53

D'après J. Dancourt *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 2010.

fiche 98

Les compartiments golgiens

L'analyse de l'appareil de Golgi est issue d'observations directes par microscopie, mais également d'une analyse dynamique basée sur des approches de microscopie, génétique et de sensibilité à certains agents chimiques. Parmi ceux-ci, une molécule a été plus particulièrement utilisée : la bréfeldine A. La bréfeldine A est un antibiotique produit naturellement par le champignon *Eupenicillium brefeldianum.* C'est un inhibiteur d'une GEF de ARF. L'activation d'ARF ne peut donc pas se faire lorsque sa GEF est inhibée par la Brefeldine A. En conséquence, le transport impliquant COP I est inhibé. Dans ces conditions, l'appareil de Golgi disparaît mais peut être à nouveau observé après retrait de la bréfeldine A. Ceci montre bien que cette structure est dynamique et en équilibre avec les autres compartiments membranaires.

Fiche 96

1. Le Golgi centre de tri

Nous avons vu que le transport RE-Golgi est un transport bidirectionnel. Les différents compartiments de l'appareil de Golgi sont également connectés les un aux autres. Il est généralement admis que le Golgi médian est une maturation du cis-Golgi. Les protéines résidentes sont retro-transportées par des vésicules à COP I (figure 1).

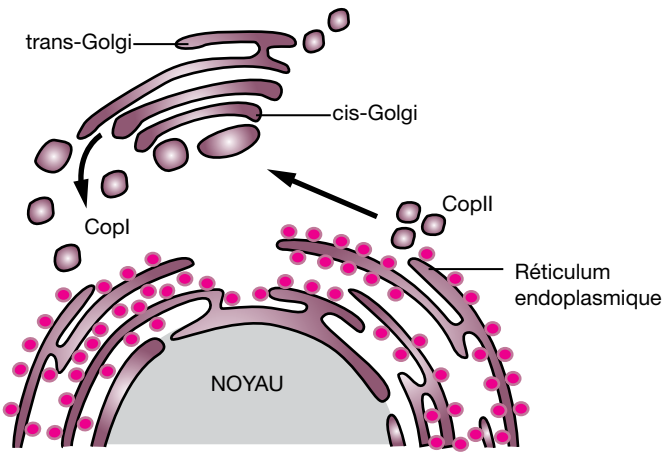


Figure 1 : L'appareil de Golgi comme centre de tri

Les vésicules arrivant dans le cis-Golgi peuvent donc être apportées par un trajet antérograde (en provenance du RE) ou rétrograde (en provenance du Golgi médian). De même, à la sortie de l'appareil de Golgi, on trouvera des vésicules à COP I (trajet antérograde à destination du Golgi médian) et des vésicules à clathrine (destinées à être recyclées dans des endosomes), et des vésicules sans manteau.

Fiche 95

2. Vésicules à clathrine

La clathrine est un dimère composée d'une chaîne lourde (190 KDa) et d'une chaîne légère (25 KDa). Les molécules de clathrine ont une forme tout à fait spécifique. Elles sont allongées et flexibles et peuvent s'associer entre elles pour former les triskélions qui sont des trimères de clathrine. Les triskélions s'assemblent en formant des hexagones et des pentagones très réguliers. Ils vont alors s'associer à des adaptateurs (Ap) qui permettent de reconnaître les récepteurs (figure 2).

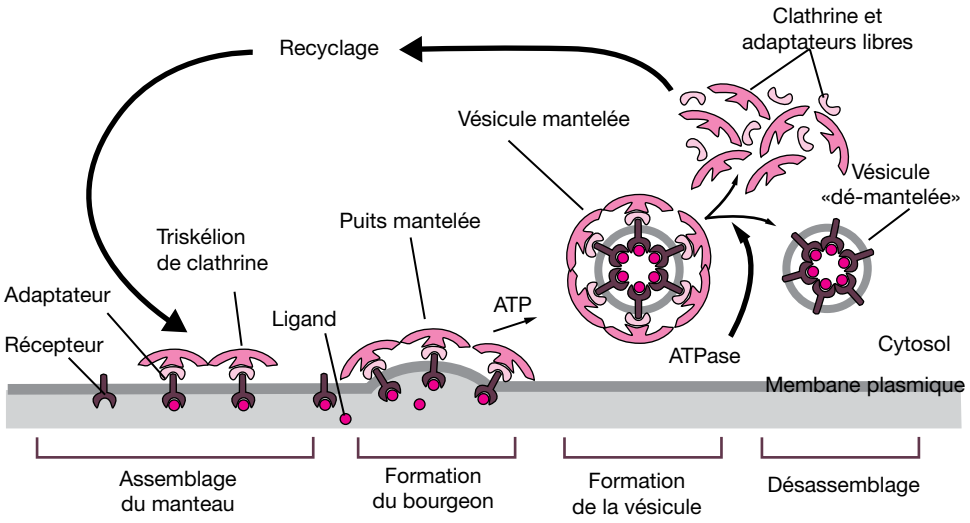


Figure 2 : Formation de vésicules à clathrine

D'après B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 4e édition, Garland Science, 2002.

3. Rôle dans la glycosylation

Au cours du trajet golgien, certaines protéines vont subir des modifications de glycosylation. Les N-glycosylations réalisées dans le RE vont en effet pouvoir être modifiées par ajout d'autres sucres (comme le galactose, l'acide sialique, etc). On peut ainsi obtenir des structures complexes comme le mannose 6 phosphate (M6P). L'appareil de Golgi est aussi le lieu de la O-glycosylation. Dans ce cas, les sucres sont ajoutés sur les fonctions -OH des sérines ou thréonines. Cette réaction est catalysée par des glycosyl transférases. La O-glycosylation est souvent effectuée sur les protéoglycanes. Les protéoglycanes sont caractérisées par leur contenu en sucre (la fraction glucidique d'un protéoglycane peut atteindre 95 % du poids moléculaire de la molécule !), et la nature des sucres. Ceux-ci sont des glucoses amino-glycanes qui sont des unités disaccharidiques composées d'un sucre aminé (glucosamine) et d'un sucre acide (avec une fonction acide) se répétant. Cette architecture conduit à des chaînes de sucres longues et non ramifiées, qui possèdent de grandes capacités de rétention d'eau. On retrouve beaucoup de protéoglycanes au niveau de la matrice extra-cellulaire des cellules animales.

Fiche 89

fiche 99

Du Golgi aux lysosomes

Au niveau du trans Golgi, il y a plusieurs possibilités. La figure 1 illustre deux de ces voies. La formation de lysosomes est donc une des fonctions de l'appareil de golgi.

1. Le lysosome

Le lysosome (ou vacuole chez la levure) est un organite servant à dégrader différents constituants cellulaires. Les lysosomes sont toujours limités par une seule membrane, leur nombre, leur taille, l'aspect de leur contenu pouvant varier selon la nature de la cellule et son état physiologique. La membrane contient des canaux ioniques (des pompes à protons) permettant l'entrée d'ions H^+ afin de maintenir un pH acide au sein de la vésicule. La dégradation lysosomale est assurée par des hydrolases dont le maximum d'efficacité est atteint à pH acide (de 3 à 5). Ces hydrolases regroupent les lipases (transforment les lipides en acides gras), les glycosides hydrolases (dégradation des sucres), les protéases, les peptidases et les nucléases.

2. Formation des lysosomes

Comme le montre la figure 1, les lysosomes sont véritablement extrudés à partir du trans Golgi.

Les enzymes lysosomales sont spécifiquement envoyées dans cette voie par un signal qui ne dépend pas de la séquence primaire de la protéine, mais de sa capacité à porter un sucre : le mannose 6 phosphate. Ce mannose-6-phosphate ou M6P n'est ajouté que sur certaines protéines identifiées par leur structure tridimensionnelle. Le M6P va être ensuite reconnu par le récepteur au M6P au niveau du réseau trans-golgien. La fixation du M6P à son récepteur va alors participer à la formation de nouvelles vésicules. Celles-ci sont identifiées par la clathrine et l'adaptateur AP1. La maturation de ces vésicules liées à la fusion aux endosomes tardifs va former les endo lysosomes qui ont un pH intra vésiculaire plus acide. Ce changement de pH va à son tour provoquer une dissociation du M6P et de son récepteur. En effet, les protéines porteuses de M6P vont être séparées de leur phosphate, de cette façon elles ne pourront plus jamais se relier au récepteur. Celui-ci est alors recyclé grâce à un transport rétrograde. L'ensemble de ce processus permet donc d'obtenir des lysosomes actifs résultant de la fusion des endosomes tardifs avec les vésicules issues du trans Golgi (figure 2).

3. Pathologies lysosomales

Les maladies lysosomales sont des maladies génétiques rares dont le phénotype et l'âge de début des symptômes dépendent du type de défaut enzymatique. Environ 40 maladies lysosomales différentes ont été identifiées à ce jour. Les maladies lysosomales touchent le plus souvent l'enfant et sont généralement graves, souvent létales. Ces pathologies sont donc très différentes dans leurs symptômes, bien qu'on puisse les regrouper en sous-catégories dont les leucodystrophies, les maladies neurodégénératives et les maladies multisystémiques (comme la maladie de Gaucher).

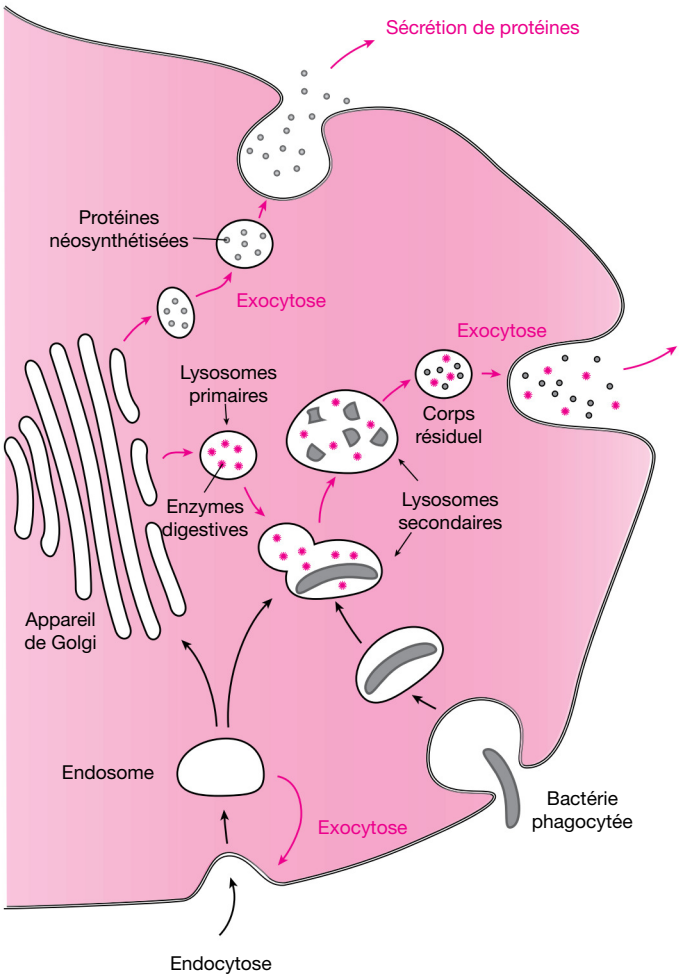


Figure 1 : Voies post golgiennes

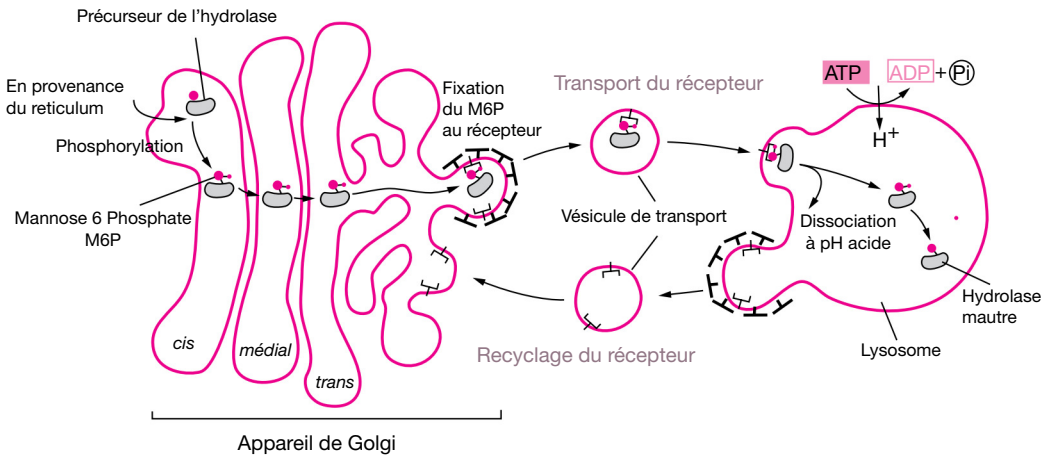


Figure 2 : Formation des vésicules lysosomales

D'après B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 4e édition, Garland Science, 2002.

fiche 100

Le transport vésiculaire et l'exocytose

L'exocytose est défini comme le processus permettant à un constituant cytoplasmique de rejoindre la membrane plasmique pour, le cas échéant, être libéré dans l'espace extracellulaire. Elle peut être constitutive ou facultative. D'un point de vue mécanistique, cela ne change pas grand-chose. L'exocytose constitutive est un phénomène touchant toutes les cellules et permettant de renouveler les lipides et protéines membranaires. L'exocytose facultative est induite par un élément déclencheur. C'est le cas typique de la libération de neuromédiateurs par les neurones.

L'exocytose utilise toutes les voies que nous avons vues dans ce chapitre. Ces voies d'adressage sont elles-mêmes dépendantes de signaux qui sont repris dans le tableau 1.

Tableau 1 : Signaux impliqués dans le transport des vésicules

Fiches 88, 97, 99

Signal reconnu	Protéines possédant ce signal	Récepteur	Type de vésicules impliqué
KDEL	Lumière du RE	KDEL récepteur dans le cis Golgi	COP I
KKXX	Membrane du RE	Sous unités de COP I	COP I
Mannose 6 Phosphate	Hydrolases lysosomales	Récepteur au M6P (trans Golgi)	Cathrine AP1
Séquence signal	Protéines transloquées	SRP	Aucune !

Il est bien évident que ce tableau n'est pas exhaustif, mais il permet de resituer chaque étape.

1. Bourgeonnement

Cette étape fait intervenir les protéines des manteaux. Dans le cas des vésicules à clathrine, le détachement de la vésicule requiert un acteur supplémentaire : la dynamine. Ces protéines, fixées au GTP polymérisent, formant un anneau entre la vésicule en formation et la membrane. L'hydrolyse du GTP conduit au changement conformationnel de l'anneau, amenant à la fission du manteau de clathrine, de l'anneau lui-même et au relargage de la vésicule.

2. Trafic vésiculaire

Fiche 122

Ce mouvement implique le déplacement de vésicules sur de courtes distances. Pour rejoindre les sites d'exocytose, les vésicules de sécrétion combinent des mouvements impliquant des moteurs moléculaires et des mouvements diffusifs. Il y a donc une participation importante du réseau de microtubules. Les moteurs moléculaires qui assurent le trafic antérograde sont les kinésines, ceux impliqués dans et le trafic rétrograde étant les dynéines (figure 1).

3. Ancrage des vésicules

Il y a deux niveaux. Le premier consiste en une association flexible de la vésicule avec sa cible. Cette première étape fait appel aux protéines Rab. Ce sont des petites GTPases qui vont permettre un arrimage approprié. À ce stade, la distance entre les membranes est trop grande pour permettre la fusion. Le tableau ci-dessous indique la localisation d'un certain nombre de Rab et donc le ciblage dans lesquelles ces protéines sont impliquées.

Tableau 2 : Localisation des protéines Rab impliquées dans le trafic vésiculaire

Nom	Localisation subcellulaire
RAB1	ER, golgi
RAB2	ER, cis-golgi
RAB3A	vésicules de sécrétion et synapse
RAB4	Endosomes précoces
RAB5A	Vésicules à clathrine, membrane plasmique
RAB5C	Endosomes précoces
RAB6	medial- et trans-golgi
RAB7	Endosomes tardifs
RAB9	Endosome tardif, trans-golgi
RAB11	Endosomes recyclés
RAB18	Golgi, RE
SEC4	Vésicules de sécrétion

L'étape suivante sera la fusion des vésicules.

4. Fusion membranaire

Celle-ci requiert les protéines SNARE qui sont à la base de la fusion des membranes. Après la dissociation des manteaux, les protéines SNARE sont accessibles. Une fois ancrés par les protéines Rab à leurs récepteurs, les domaines cytoplasmiques des t et v-SNARE sont capables de s'interpénétrer, permettant ainsi le rapprochement physique des deux membranes qui vont devoir fusionner. Cette fusion va impliquer les SNARE, mais aussi d'autres facteurs qui accélèrent cette fusion.

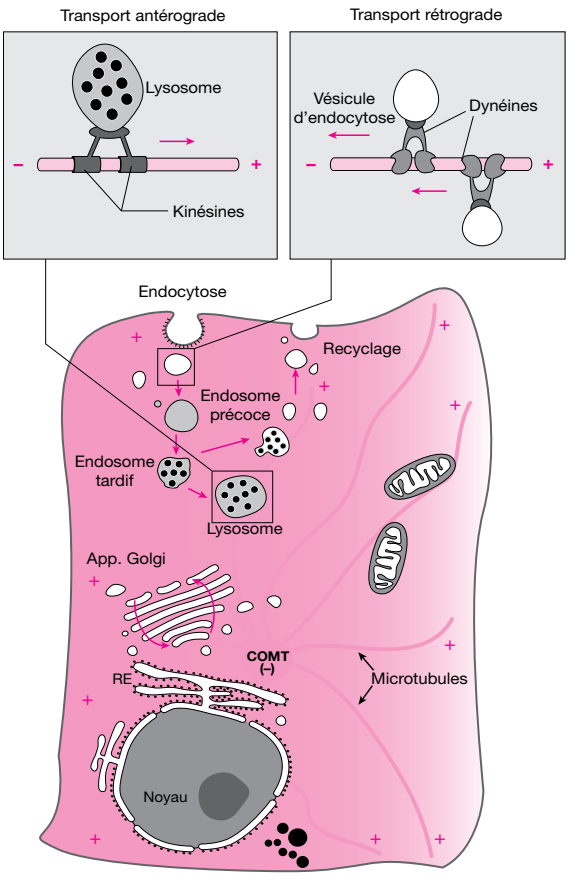


Figure 1
Le transport des vésicules

fiche 101

L'endocytose

L'endocytose représente le phénomène d'invagination de la membrane plasmique permettant aux cellules d'intérioriser une partie de l'espace extérieur. Selon la taille et la nature du matériel extra-cellulaire capturé, on peut classifier ce mécanisme en deux catégories. La pinocytose est l'incorporation de fluides ou de macromolécules au moyen de petites vésicules de diamètre inférieur ou égal à 150 nm. La phagocytose représente l'absorption de grosses particules, voire de cellules, par des vésicules de diamètre toujours supérieur à 250 nm et pouvant atteindre plusieurs micromètres : les phagosomes. Dans les deux cas, les endosomes ou phagosomes fusionnent avec les lysosomes primaires pour permettre une complète dégradation du matériel endocyté. Ces deux mécanismes sont donc littéralement l'équivalent du « boire » et « manger » !

Fiche 99

1. Les voies d'endocytose

Clathrine

La figure 1 montre l'exemple de l'endocytose dépendant de la clathrine du cholestérol.

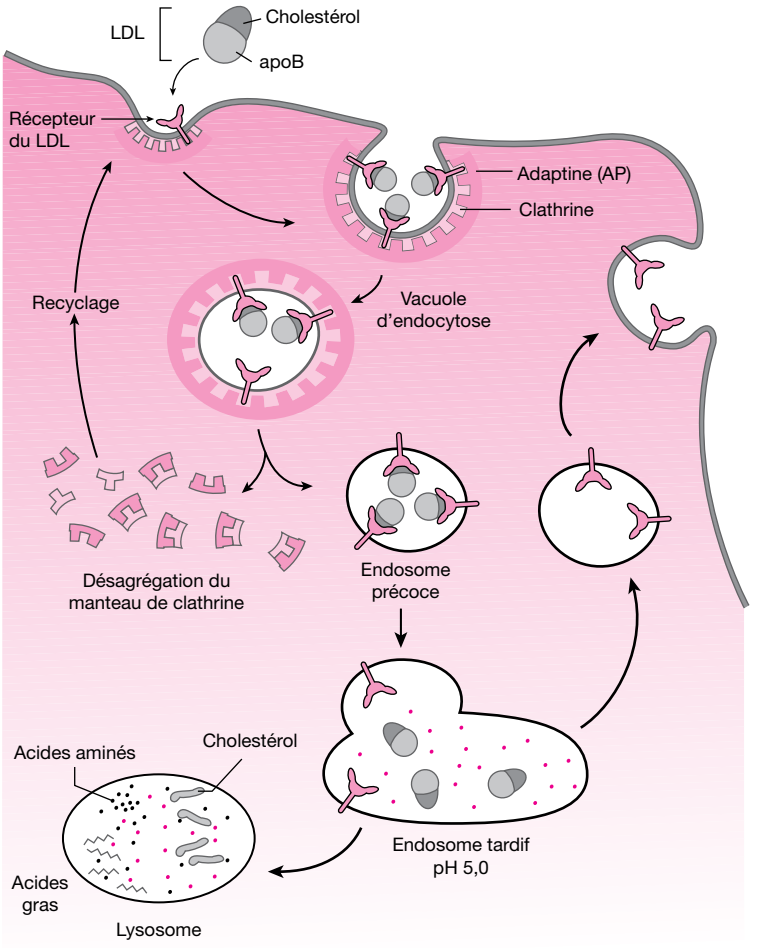


Figure 1 : Endocytose dépendant de la clathrine

Le cholestérol est transporté sous forme de LDL (*Low Density Lipoprotein*) qui intègre la protéine ApoB. Celle-ci est reconnue par les récepteurs à la surface de la membrane plasmique. Ce récepteur ne peut se lier directement à la clathrine et va nécessiter le complexe adaptateur 2 (AP2). L'adaptateur qui est soluble dans le cytoplasme peut se lier sur la face cytoplasmique des récepteurs. Les triskélions de clathrine se lient aux adaptateurs en interaction avec les récepteurs. Le puits mantelé est alors assemblé et le bourgeonnement pourra avoir lieu afin de former des endosomes.

Cavéoles

Les cavéoles sont des petites invaginations membranaires à la surface de la cellule. Ces structures peuvent être nombreuses chez certains types de cellules. Elles se caractérisent par la présence d'une protéine particulière : la cavéoline. Cette molécule de 22 kDa possède un segment transmembranaire formant une boucle en U. Cette boucle permet la présence des extrémités N- et C-terminales dans la face cytoplasmique de la membrane. Les cavéolines sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et transportées dans l'appareil de Golgi sous forme d'oligomères. Ceux-ci s'associent avec des domaines membranaires riches en cholestérol et en sphingomyéline. La fusion à la membrane plasmique (dépendant des SNARE) va former les radeaux lipidiques où sont concentrés les récepteurs spécifiques de certaines hormones et cytokines. La cavéoline joue un rôle de manteau équivalent à ce que nous connaissons pour la clathrine.

Fiche 69

Phagocytose

C'est une forme particulière d'endocytose qui consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant. Dans le cadre principal qui est celui relié au système immunitaire, ce mécanisme implique différents récepteurs. Un de ces récepteurs CR1 fixe le C3b qui est un composant de la cascade du complément. Un autre, FcR se lie à la fraction Fc des immunoglobulines (anticorps). Par l'intermédiaire des immunoglobulines et/ou de C3b, les monocytes, macrophages et granulocytes peuvent ainsi adsorber les particules étrangères comme les bactéries et déclencher un mouvement phagocytique aboutissant in fine à la dégradation par les lysosomes.

Fiche 183

2. Les endosomes

Les endosomes précoces

Ce sont les premières vésicules formées. Ils sont acidifiés par une pompe à proton. Cette acidification entraîne la dissociation de la plupart des ligands endocytés encore fixés à leurs récepteurs. Ces récepteurs peuvent alors être recyclés vers la membrane plasmique.

Les endosomes tardifs

L'acidification est accentuée (pH 5) et la teneur en hydrolases est très importante. Les endosomes tardifs fusionnent aussi avec d'autres endosomes et le surplus membranaire qui en résulte est utilisé pour la formation de vésicules intra-endosomales, conduisant à des corps multivésiculaires (MVB). C'est le dernier état où la récupération des protéines à recycler est encore possible, après quoi l'endosome tardif conduit à un lysosome (secondaire) et finalement à un corps résiduel.

Fiche 99

fiche 102

Les vésicules extracellulaires

Ces vésicules, libérées par presque tous les types cellulaires, aussi bien eucaryotes que procaryotes, ont été initialement considérées comme de banals empaquetages de déchets. Leur étude récente a pourtant révélé qu'il faut plutôt les considérer comme un nouveau mode de communication intercellulaire, local ou à distance, dans des contextes d'homéostasie ou au contraire de stress cellulaire.

1. Classification des vésicules extracellulaires (VE)

Ces structures subcellulaires sont des sphères entourées d'une bicouche protéolipidique, hétérogènes en taille et en contenu. On distingue habituellement :

Fiche 102

- Les exosomes, produites de manière constitutive par toutes les cellules sous forme de vésicules intra-endosomales (voir biogenèse). Leur diamètre est de 40 à 100 nm.
- Les microvésicules (ou microparticules, ectosomes, prostasomes, oncosomes) ont des formes irrégulières et des tailles de 100 nm à 1 µm. Elles sont produites de manière régulée par le calcium par bourgeonnement de la membrane plasmique.

Fiche 139

- Les corps apoptotiques, de taille jusqu'à 2 µm, produits par bourgeonnement direct de la membrane plasmique lors de l'apoptose et contenant des résidus du noyau.

Leur isolement est possible grâce à des ultracentrifugations différentielles, ou des séparations d'affinité selon des molécules de surface comme les tétraspanines ou le C1q.

2. Biogénèse et contenu

Fiche 69

Les exosomes sont formées lorsque la membrane d'un endosome tardif s'invagine et forme des vésicules intraluminales ; l'ensodome s'appelle alors corps multivésiculaire (MVB). Cette biogénèse implique des complexes protéiques ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), ou des domaines de radeaux lipidiques (rafts), ou encore des protéines tétraspanines, qui permettent non seulement le bourgeonnement membranaire, mais aussi l'adressage des molécules associées à cet exosome. Lorsque le MVB fusionne avec la membrane plasmique plutôt qu'avec un lysosome, les exosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire.

Les microvésicules proviennent de la déformation de la membrane plasmique remodelée par le cytosquelette après une signalisation calcium. Le calcium active également les scramblases qui permettent d'externaliser les phosphatidylsérines sur le feuillet externe et contribuent ainsi à accentuer la courbure membranaire et à libérer les microvésicules. Certaines protéines des complexes ESCRT contribuent également à l'adressage des molécules associées.

Fiche 70

Les VE sont constituées d'une bicouche lipidique qui a perdu son asymétrie (présence de phosphatidylsérines en surface), et qui peut être riche en céramide et en cholestérol. La membrane porte des antigènes de surface et des protéines transmembranaires reflétant l'origine cellulaire, y compris des molécules du CMH. L'intérieur de la vésicule contient un contenu varié en protéines (du cytosquelette, de signalisation, etc.), en métabolites et en acides nucléiques fonctionnels (ADN, ARN messagers et ARN régulateurs). Ce sont donc des paquets d'informations transmis de cellules à cellules.

Fiche 187

Fiche 44

3. Mode d'action et rôles biologiques

Après libération dans l'espace extracellulaire, certaines VE vont se décomposer dans les fluides biologiques, mais la majorité va diffuser à plus ou moins grande échelle vers des cellules cibles. Celles-ci sont déterminées par les molécules de surface qui permettront un ancrage. Des voies de signalisation pourront parfois être activées par engagement d'un récepteur, sans que la VE entre dans la cellule cible. Le plus souvent, les VE apporteront leur contenu à la membrane et au cytosol de la cellule cible après fusion directe avec la membrane plasmique ou internalisation par phagocytose ou endocytose à clathrine.

Les protéines et le matériel génétique transmis *via* les VE contribuent à coordonner les réponses physiologiques en condition modifiées. Elles sont importantes dans la communication entre cellules immunitaires, mais également comme marqueurs de stress cellulaire et dans différentes pathologies, y compris cancéreuses. Libérées dans les fluides biologiques et capturées par certaines cellules cibles, elles présentent un intérêt à la fois comme outil diagnostic et thérapeutique.

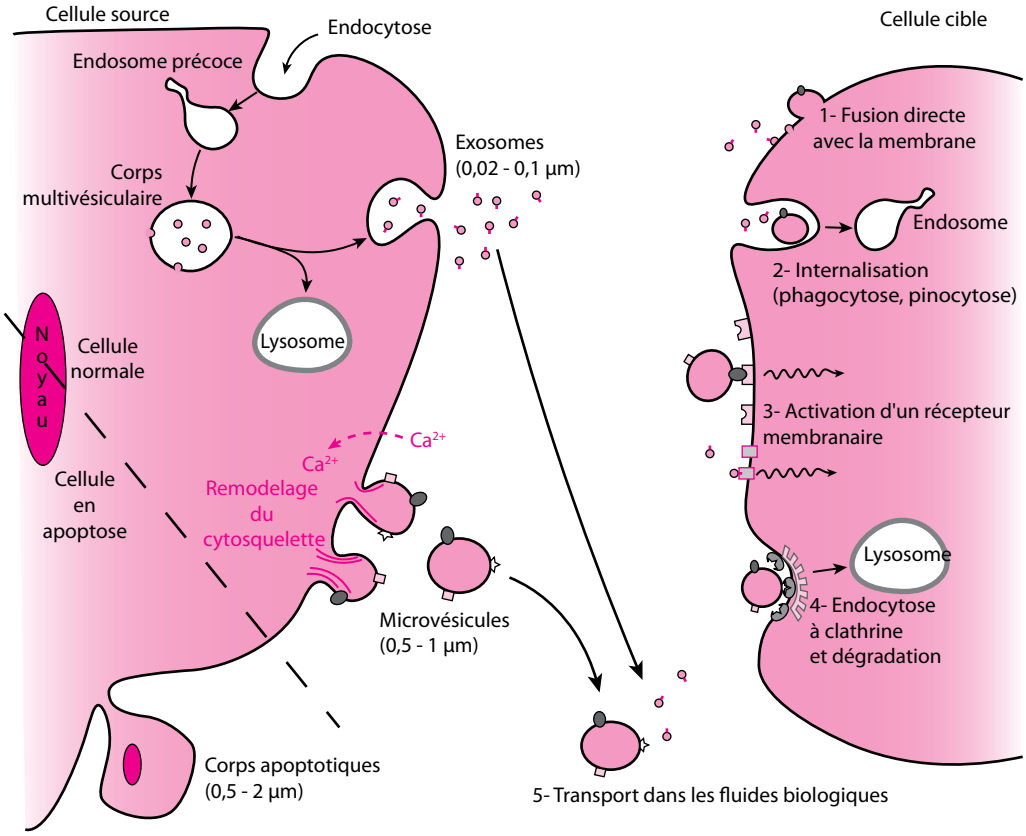


Figure 1 : Formation et modes d'action des vésicules extracellulaires

fiche 103

L'autophagie et la mitophagie

Ces deux phénomènes sont rassemblés car ils présentent des caractéristiques communes.

La macroautophagie, souvent réduite au terme « autophagie », est un mécanisme aboutissant à la digestion de constituants intracellulaires au niveau du lysosome chez les mammifères (à la vacuole chez la levure). La différence avec la formation du lysosome telle que nous l'avons vu provient de « l'empaquetage » du matériel à dégrader.

L'autophagie s'initie par la formation d'une structure multi-membranaire appelée phagophore, puis cette structure s'allonge pour emprisonner le contenu cytoplasmique formant une vésicule nommée autophagosome. Cette vésicule va ensuite fusionner avec le lysosome. Les hydrolases lysosomiales permettront alors la dégradation des molécules séquestrées : il s'agit de l'autophagolysosome.

L'ensemble de ce processus consiste donc à une auto digestion d'une partie des constituants cellulaires. Ce phénomène qui est très conservé (des levures à l'homme) permet chez les unicellulaires comme la levure *S. cerevisiae* de survivre en recyclant une partie de ses composants. Chez les mammifères, ce mécanisme apparaît plutôt comme une voie majeure de destruction de composants cellulaires endommagés.

1. Mise en place des autophagosomes

C'est la levure *S. cerevisiae* qui a permis de comprendre les mécanismes de mise en place de ce phénomène. Les gènes ATG (*Autophagy Related Genes*) qui sont au nombre de 31 dans la levure participent aux différentes étapes de l'autophagie.

Induction

L'induction est initiée par l'activation du complexe ATG1. Dans la levure, ce complexe est formé par 5 protéines ATG. Chez l'homme ce complexe est appelé le complexe ULK.

Nucléation des vésicules (formation de l'autophagophore)

Cette étape va impliquer des protéines, mais aussi des lipides qui vont participer à la formation des phagophores (structures multi-membranaires d'origine indéterminée car pouvant provenir du RE, des endosomes...). La nucléation est initiée par le recrutement des protéines ATG au site d'assemblage du phagophore (PAS).

Expansion des vésicules (formation de l'autophagosome)

L'autophagophore s'étend pour former l'autophagosome qui séquestre du matériel cytoplasmique. La formation de l'autophagosome nécessite aussi la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) par la phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) localisée probablement sur la membrane du réseau trans-golgien où elle interagit avec la protéine bécline 1 (Atg6). Le complexe bécline 1-PI(3)K de classe III permet le recrutement du premier système de conjugaison Atg12-Atg5 (la conjugaison

signifie que la protéine Atg12 est liée à la protéine Atg5 dans un mécanisme analogue à celui de l'ubiquitination). Ce dernier permet, à son tour, la conjugaison de la phosphatidyl éthanolamine (PE) à la protéine Atg8 (LC3 chez les mammifères) pour former le conjugué LC3-PE, qui est alors recruté à la membrane autophagosomale. Après formation de l'autophagosme, la plupart des protéines Atg sont recyclées vers le cytosol, à l'exception notable d'une fraction Atg8-phosphatidyléthanolamine, qui est un marqueur de l'autophagosome, insensible à la déconjugaison réalisée par Atg4 du fait de sa topologie membranaire.

Formation de l'autolysosome

Après fusion avec des endosomes (précoces et/ou tardifs), le matériel séquestré dans l'autophagosome est digéré dans le lysosome.

2. La mitophagie

L'autophagie joue également un rôle important dans le recyclage des mitochondries. Ce mécanisme connu sous le nom de « mitophagie » permet l'élimination des mitochondries déficientes de la cellule (figure 1). La mitophagie est donc une application particulière du mécanisme autophagique.

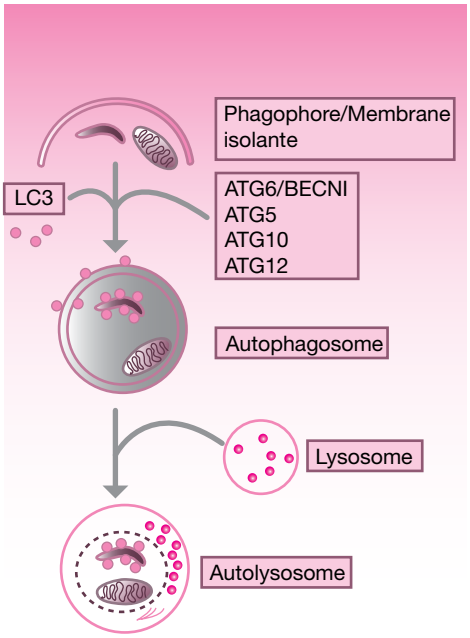


Figure 1 : Les grandes étapes de l'autophagie

fiche 104

La levure pour l'étude du transport

La levure *Saccahomyces cerevisiae* est un modèle d'étude de beaucoup de fonctions de « ménage » conservées chez les eucaryotes et donc retrouvées chez l'homme. Dans l'étude du transport vésiculaire, l'analyse génétique puis biochimique et cellulaire a permis de poser les bases mécanistiques tant de la sécrétion que de l'autophagie. Le transport vésiculaire est un mécanisme conservé dans l'ensemble du monde vivant, et bien évidemment l'obtention de mutants dans ce processus conduit à la mort cellulaire. L'astuce a donc constituée en l'obtention de mutants conditionnels. Ces mutants sont affectés dans une fonction, mais la mutation ne peut s'observer que dans des conditions particulières.

Dans l'étude de la voie de sécrétion, les premiers mutants *Sec* obtenus étaient des mutants thermosensibles. La mutation affectait la stabilité d'une protéine essentielle impliquée dans la sécrétion. À basse température, la protéine est suffisamment stable et la levure vit « normalement », alors qu'à haute température, la protéine va s'inactiver et la levure va mourir. Grâce au cycle de reproduction haplodiplobiotique de la levure (figure 1), différents mutants ont pu être caractérisés génétiquement par des approches de génétique classique qui ne seront pas développées ici.

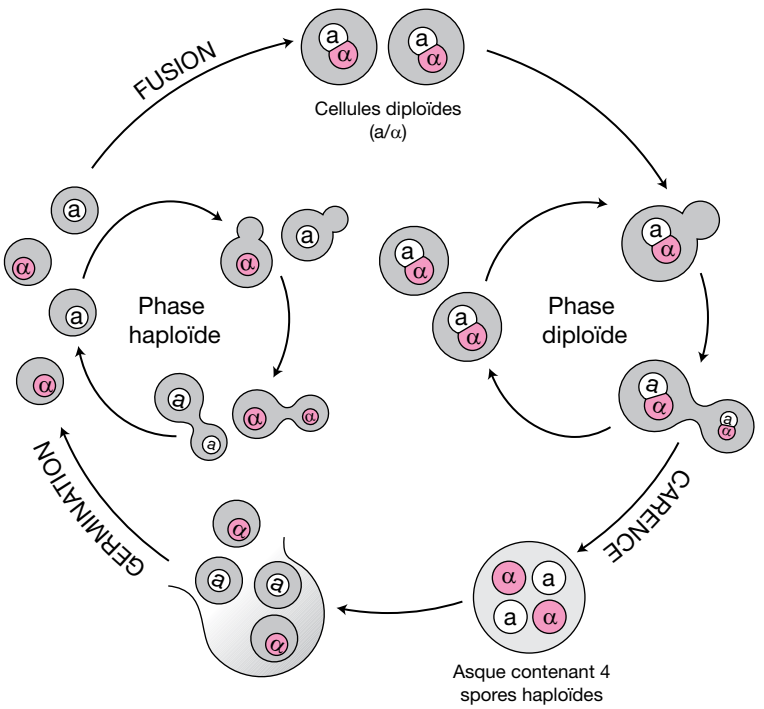


Figure 1 : Cycle haplodiplobiontique de la levure

En analysant ensuite chaque catégorie de mutants par des approches cellulaires et biochimiques (voire le fractionnement), il a été possible de regrouper tous les mutants dans cinq catégories majeures (figure 2).

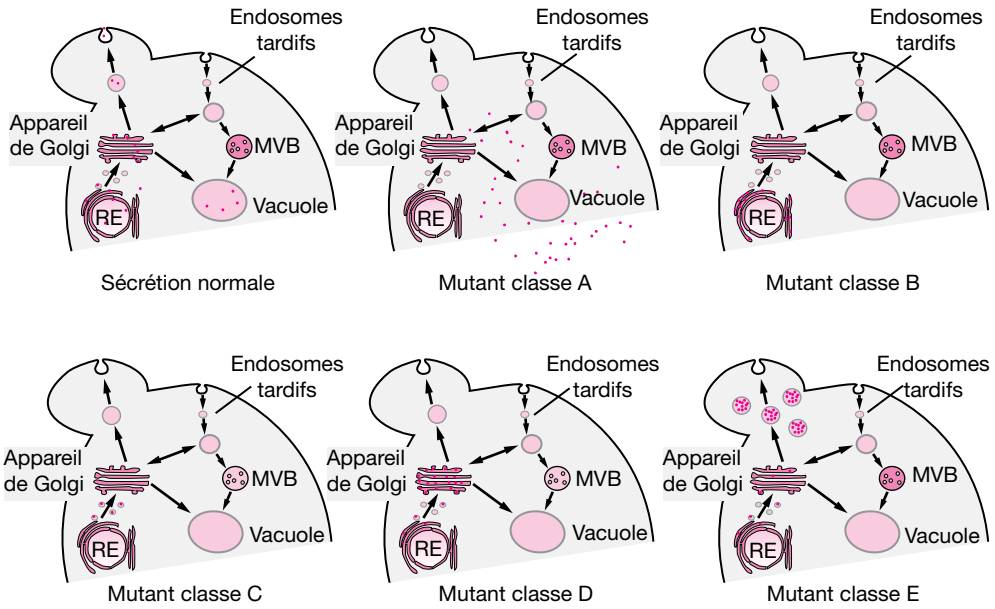


Figure 2 : les mutants de la voie de sécrétion

Ces expériences sont réalisées tout d'abord à basse température (la croissance de la levure est normale et la voie de sécrétion équivalente à celle des levures non mutées). Il est alors possible de réaliser un marquage radioactif. Après lavage (pour arrêter l'incorporation de marqueurs radioactifs), les levures sont placées à température non permissive. Dans ces conditions de plus haute température, les levures vont mourir, mais dans le laps de temps entre l'élévation de température et la mort, il est possible de déterminer la localisation des protéines. Chaque point rouge de la figure représente le site où les protéines néosynthétisées sont accumulées dans les conditions restrictives (haute température). On constate donc un blocage dans la translocation vers le réticulum (classe A), l'incapacité de bourgeonnement des vésicules en provenance du réticulum (classe B), la non-fusion des vésicules à l'appareil de Golgi (classe C), le blocage du transport entre le Golgi et les vésicules de sécrétion (classe D) ou l'incapacité de fusionner ces vésicules à la membrane (classe E). Toutes ces étapes se retrouvent dans les cellules de mammifères.

L'analyse génétique des mutants a permis d'ordonner la suite des événements dans la voie de sécrétion. Un autre atout du modèle eucaryotique *S. cerevisiae* provient de sa capacité à être transformé par des plasmides permettant l'expression de protéines de mammifères. Ainsi, en ayant caractérisé le gène dans la levure, il devient aisé, le cas échéant, de trouver son équivalent chez l'homme et d'étudier son rôle dans un contexte hétérologue.

FOCUS Endocytose, exocytose, synapse et botox

Les synapses sont des zones de contacts spécialisées dans la transmission des informations. Parmi les différents types de synapses, on trouve les synapses chimiques qui se caractérisent par un espace synaptique entre cellules connectées. C'est une molécule chimique, le neurotransmetteur, qui transmet les informations. Ce neurotransmetteur est lui-même secrété par le neurone « donneur ». La fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique n'est pas constitutive, mais intervient en présence d'un stimulus. Celui-ci est lié à la concentration en ions Ca^{2+}.

Une fois réalisée, cette fusion entraîne la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. Il faut alors que la membrane des vésicules de sécrétion soit recyclée par endocytose (sinon, la surface membranaire augmenterait… et il n'y aurait plus assez de membranes pour apporter les neurotransmetteurs utilisés au prochain influx). Ce recyclage est réalisé par l'intermédiaire des vésicules recouvertes de clathrine et des endosomes, puis de la reconstitution de nouvelles vésicules synaptiques. Ce cycle exo-endocytose des vésicules synaptiques et des granules de sécrétion assure ainsi le bon fonctionnement de la sécrétion neuro-endocrine dans l'ensemble de l'organisme.

Certaines molécules ciblent spécifiquement ce cycle. C'est le cas des toxines produites dans des cas de botulisme. Le botulisme est une maladie grave, mais relativement rare, provoquée par une toxine extrêmement puissante synthétisée dans les aliments par une bactérie, *Clostridium botulinum*. Cette neurotoxine est une protéine formée d'une chaîne lourde de 100 kDa et d'une chaîne légère de 50 kDa. Les neurotoxines botuliques sont définies comme des neurotoxines du fait de leur action restreinte au seul système nerveux.

Ces toxines ne franchissent pas la barrière hémato encéphalique et n'agissent que sur le système nerveux périphérique pour provoquer une action paralysante. Dans le cadre pathologique, celle-ci conduit à des troubles moteurs, visuels, à une sécheresse buccale. On peut ensuite observer des troubles de l'élocution et de la déglutition, des vomissements, de la diarrhée, etc.

Les neurotoxines botuliques peuvent se lier à des récepteurs (synaptotagmines) localisés dans les neurones. Elles entrent par endocytose dans le neurone. L'acidification des endosomes modifie la structure de la toxine. La chaîne lourde se dissocie et s'insère dans la membrane de la vésicule, permettant à la chaîne légère de traverser la bicouche lipidique. La chaîne légère se retrouve alors dans le cytoplasme.

La toxine botulique est une protéase qui cible trois protéines impliquées dans l'exocytose contrôlée par le calcium. Ces protéines sont la VAMP/synaptobrévine, la SNAP25 et la syntaxine qui sont… les trois SNARE impliquées dans la fusion membranaire lors de l'exocytose au niveau synaptique. L'action paralysante du botox vient donc de sa capacité à empêcher l'exocytose à la synapse et donc au blocage musculaire qui en découle.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

8.1 Les coatomères sont des protéines impliquées :

- ☐ a. dans le transport rétrograde
- ☐ b. dans le transport antérograde
- ☐ c. dans l'endocytose
- ☐ e. dans l'exocytose

8.2 Le bourgeonnement est un mécanisme nécessitant :

- ☐ a. la formation d'un manteau protéique
- ☐ b. l'hydrolyse du GTP
- ☐ c. la formation de radeau lipidique

8.3 La séquence KDEL :

- ☐ a. est une séquence signal permettant la translocation dans le RE
- ☐ b. est un site de glycosylation atypique
- ☐ c. permet la liaison à la protéine COP I
- ☐ d. permet le maintien de protéines dans le RE
- ☐ e. permet la liaison à la protéine ERGIC

8.4 La clathrine :

- ☐ a. forme un dimère de 215 kDa
- ☐ b. forme un manteau
- ☐ c. reconnaît directement les protéines membranaires comme les récepteurs

8.5 La phosphorylation du mannose en position 6 permet :

- ☐ a. de dégrader la protéine cible
- ☐ b. d'activer un récepteur qui se lie à un adaptateur et forme un complexe avec la clathrine

8.6 Un mutant classe A de la voie de sécrétion :

- ☐ a. est affecté dans le mécanisme d'autophagie
- ☐ b. accumule les précurseurs dans les vésicules de sécrétion
- ☐ c. provoque une délocalisation de protéines secrétées dans le cytosol.

8.7 L'endocytose peut impliquer :

- ☐ a. la clathrine
- ☐ b. la calvéoline
- ☐ c. l'adapatateur AP2
- ☐ d. l'adaptateur AP

Réponses

8.1 **a**, **b** et **d**. Les complexes COP (*Coat Protein Complex* ou Coatomère) sont des complexes jouant un rôle de manteau. Ces complexes n'interviennent pas dans l'endocytose.

8.2 **a** et **b**. Dans le bourgeonnement, le point clef est la déformation sphérique des membranes. Celle-ci est réalisée par des « manteaux », l'initiation du processus dépendant d'un « interrupteur » GTPactif/GDPinactif

8.3 **c** et **d**. Cette séquence est une séquence de rétention des protéines dans le RE. Cette rétention implique la reconnaissance par la protéine ERGIC

8.4 **a** et **b**. Il faut la présence de protéines adaptatrices pour assurer la liaison entre la clathrine et la protéine membranaire dictant le bourgeonnement. Bien que sa structure et celle du réseau qu'elle forme sugère son implication dans la déformation, la clathrine apparaît aujourd'hui dépendante de protéines « accessoires » pour effectuer la déformation de la membrane.

8.5 **b**. La phosphorylation du mannose est un signal d'envoi vers le lysosome qui nécessite une reconnaissance par un récepteur qui va être reconnu par un adaptateur permettant la fixation de la clathrine.

8.6 **c**. Les différentes classes de mutants correspondent à des mutations interrompant la voie de sécrétion à des étapes distinctes. Le mutant classe A est ainsi bloqué dans l'étape précoce de translocation des protéines dans le RE. La conséquence en est la présence des protéines sécrétées dans le cytoplasme cellulaire.

8.7 **a**, **b** et **c**. AP1 est impliqué dans le trafic membranaire dépendant de la clathrine entre l'appareil de Golgi et les lysosomes. L'endocytose est un mécanisme basé non seulement sur la formation de vésicules recouvertes de clathrine, mais aussi de calvéoline.

Chapitre 9

La bioénergétique cellulaire

Objectifs

Les cellules travaillent. Elles élaborent des molécules complexes : travail chimique ; elles se déplacent, se déforment : travail mécanique ; elles gèrent des flux transmembranaires complexes et entretiennent des contrastes de concentration : travail osmotique ; elles reçoivent, émettent, manipulent de l'information : travail cybernétique.

Tout ce travail, tous ces travaux, se font au prix de dépenses énergétiques. Les cellules récupèrent de l'énergie chimique essentiellement par oxydation (fermentations, respiration) ou de l'énergie lumineuse (photosynthèse des cellules chlorophylliennes). Mais surtout, les cellules gèrent très finement les transferts et les transformations d'énergie (énergie d'hydrolyse, d'oxydo-réduction, de gradient, énergie lumineuse, énergie mécanique, chaleur…) au moyen de couplages (assurés par des enzymes) et de vecteurs spécifiques d'énergie, de monnaies d'énergie : les coenzymes.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 105 Les oxydations et phosphorylations sur le substrat

L'oxydation des substrats organiques est le moyen de libérer de l'énergie par une cellule et se fait toujours en deux temps : dans un premier temps une oxydation directe des groupements réducteurs des substrats, avec production de coenzymes à l'état réduit qui sont réoxydés dans un second temps.

1. La glycolyse

La glycolyse s'effectue en trois temps : une activation du substrat, une oxydation de ce substrat, puis deux phosphorylations d'ADP en ATP.

L'activation (réactions 1 à 3) est endergonique et consiste en deux phosphorylations d'hexose consommatrices d'ATP. Cette première étape aboutit au Fructose 1,6 BisP qui est alors aisément scindé en deux triose-P (réaction 4).

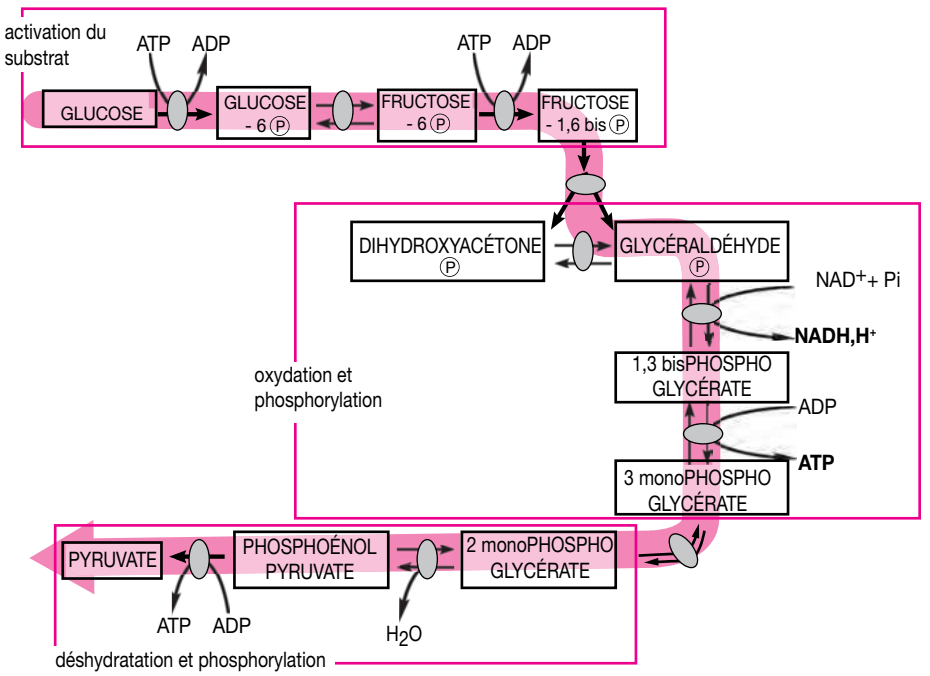


Figure 1 : Les étapes de la glycolyse

D'un point de vue énergétique, l'étape d'oxydation (réaction 5) est l'étape clé de la glycolyse. Elle est réalisée grâce au NAD^+ (accepteur d'électron) et s'effectue sur le premier carbone du triose (fonction aldéhyde). Cette oxydation libère suffisamment d'énergie pour former une liaison à haut potentiel d'hydrolyse avec un phosphate prélevé sur le milieu.

La dernière étape (réactions 6 et suivantes) permet de convertir les énergies d'hydrolyse ainsi constituées en «monnaie ATP». En dernier lieu, les substrats sont réorganisés, ce qui aboutit à une formation de PEP, molécule à très haut potentiel d'hydrolyse. Une nouvelle molécule d'ATP peut alors être constituée par transfert du phosphate de la molécule de PEP sur un ADP.

Au total, l'activation consomme deux molécules d'ATP pour produire deux molécules de Glycéraldéhyde-3-P. Chaque molécule de Glycéraldéhyde-3-P est à l'origine d'une oxydation (gain : une molécule NADH) et de deux phosphorylations (gain : deux molécules d'ATP).

Le bilan final est donc de deux ATP produits et de deux NADH produits.

2. Le cycle de Krebs

Dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé (gain d'un NADH) et décarboxylé (libération d'un CO_2), donnant de l'Acétyl-CoA, molécule d'acétate liée à une coenzyme A. L'entrée dans le cycle de Krebs consiste en la constitution d'une molécule à 6 atomes de carbone à partir d'une molécule à 4 carbones et de l'acide acétique porté par la coenzymeA. Cette étape utilise l'énergie de rupture de la liaison thio-ester de l'acétyl-coenzymeA.

Deux oxydations et deux décarboxylations sont ensuite effectuées, permettant la constitution de deux coenzymes réduites (2 NADH + $2H^+$) et donc l'obtention d'une molécule à 4 carbones tandis que deux molécules de CO_2 sont éliminées. De plus, la seconde de ces oxydations (l'oxydation de l'α-cétoglutarate) est très exergonique et permet la constitution d'une liaison à haut potentiel entre le succinate obtenu et la coenzymeA, sous forme donc de Succinyl-coenzymeA.

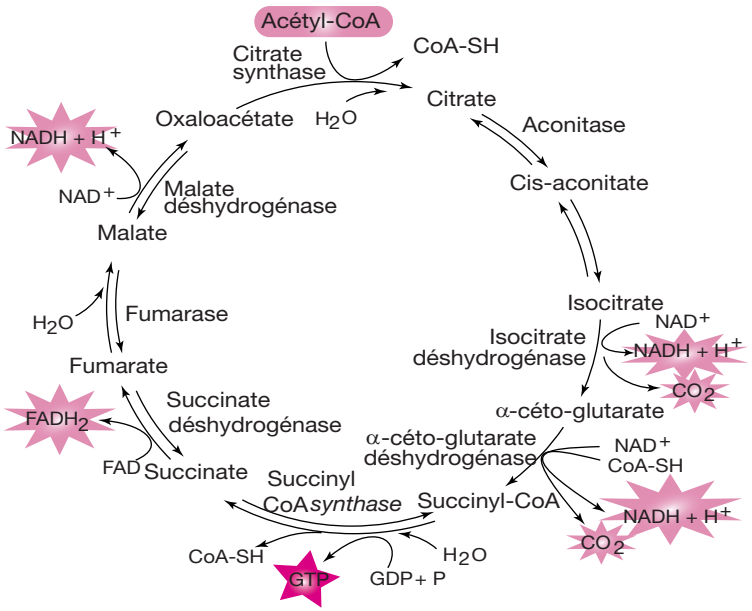


Figure 2 : Un cycle de décarboxylations et oxydations successives

L'hydrolyse du Succinyl-coenzymeA permet alors par couplage de récupérer cette énergie chimique sous forme d'une molécule de GTP à partir de GDP et Pi.

Le cycle est clos par la régénération de l'oxalo-acétate grâce à deux nouvelles oxydations (l'une produisant un NADH, H^+ et l'autre un $FADH_2$) et à une hydratation. Au total, à partir d'un pyruvate, on obtient trois molécules de CO_2, quatre molécules de NADH, une de $FADH_2$ et il y a production d'un GTP.

Après Glycolyse et cycle de Krebs, le glucose a été totalement oxydé en CO_2.

fiche 106

La chaîne respiratoire aérobie

L'oxydation totale du glucose grâce à la glycolyse et au cycle de Krebs a permis la synthèse d'un peu d'ATP et a produit de nombreuses coenzymes réduites. La ré-oxydation de ces coenzymes peut être exploitée de façon à en tirer une énergie importante : c'est le principe de la respiration cellulaire.

1. La chaîne de transfert d'électrons et l'entretien d'un gradient de protons

Les électrons à faible potentiel redox des coenzymes NADH (0,32 V) et FADH2 (–0,6 V) entrent dans la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale interne. Il s'agit d'une chaîne de couples redox qui achemine les électrons jusqu'à un accepteur final : le dioxygène, qui est alors réduit en molécule d'eau (-0,82 V). Ces transferts sont couplés à une translocation de protons vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Le pouvoir réducteur initialement contenu dans les substrats organiques a donc finalement été converti en une énergie osmotique : un gradient électrochimique de protons. Il s'agit donc d'un couplage chimio-osmotique.

Fiche 23

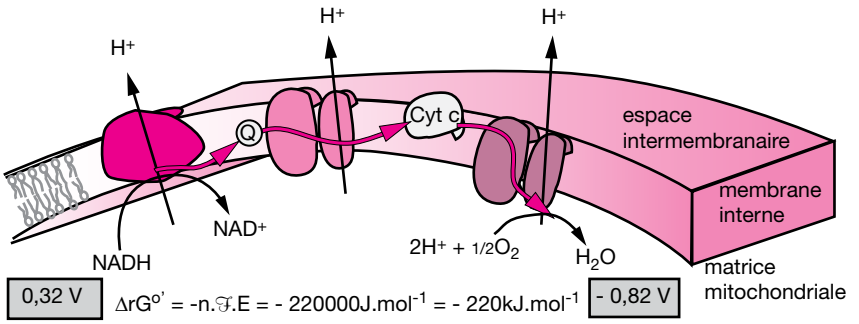


Figure 1 : Réactions d'oxydoréduction dans la membrane interne de la mitochondrie
Flux de protons (en noir) et flux d'électrons (en rose)

2. La production d'ATP

La dernière phase de la respiration cellulaire fait intervenir l'exploitation de l'énergie électrochimique des protons à des fins de production d'ATP. Pour ce faire, la cellule utilise un complexe protéique, seule voie de passage possible pour les protons et par ailleurs apte à catalyser la synthèse d'ATP : le complexe F0/F1, appelé aussi ATPsynthase. Les protons retournent inéluctablement vers la matrice mitochondriale en empruntant cette voie. La dissipation du gradient est ici couplée à la synthèse d'ATP. Il s'agit bien entendu d'un couplage osmo-chimique.

Au total, l'ensemble de l'oxydation du glucose permet la synthèse d'une trentaine de molécules d'ATP. La stœchiométrie n'en est pas fixe, car il n'y a pas de lien stœchiométrique net entre les coenzymes d'oxydoréduction et les ATP formés par les complexes F0/F1.

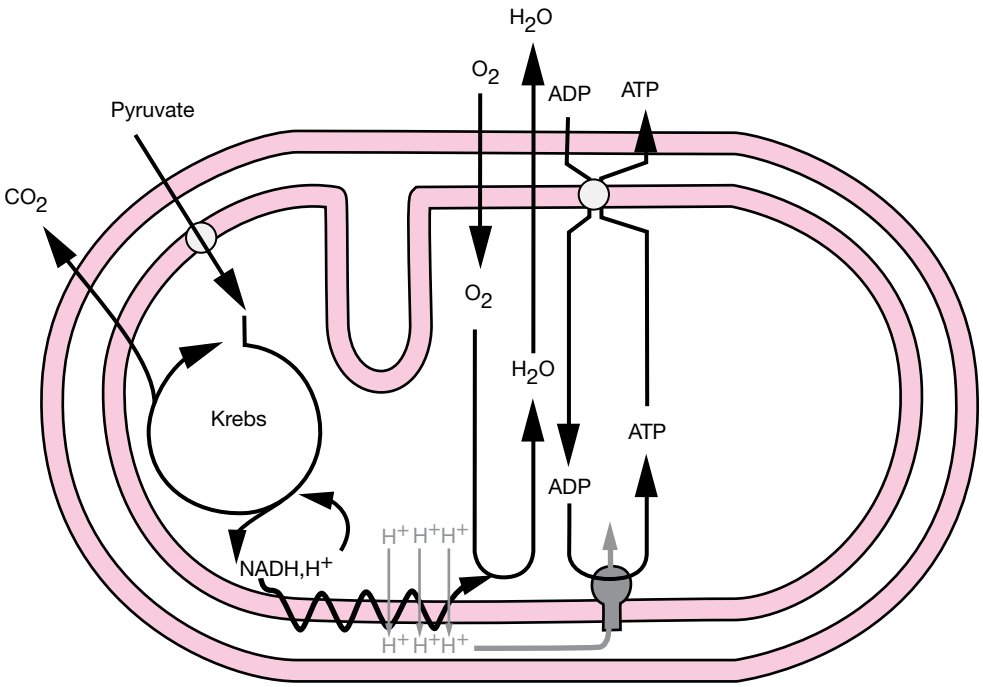


Figure 2 : D'une énergie de type « pouvoir réducteur » à une énergie « ATP »

3. Les échanges entre mitochondrie et cytoplasme

L'ATP est produit par l'ATPsynthase dans la matrice mitochondriale. Il est ensuite transporté vers le cytoplasme grâce à un antiport avec ADP. Compte tenu du fait que la charge négative de l'ATP excède celle de l'ADP, ce transport dissipe le gradient électrique entre la matrice et le cytoplasme.

Fiche 73

La mitochondrie échange également les formes réduites et oxydées des coenzymes du cytoplasme. Ces molécules ne passent pas la barrière membranaire de la mitochondrie, mais leur pouvoir réducteur (respectivement oxydant) est transmis à des petites molécules qui, elles, traversent la membrane. On pourra ainsi citer une navette qui fonctionne sur une balance entre glycérol (forme réduite) et dihydroxyacétone (forme oxydée).

Cette navette permet de transférer le pouvoir réducteur du NADH côté cytoplasme sur un $FADH_2$ côté matrice mitochondriale. Du côté du cytoplasme, le NADH est utilisé pour réduire (avec production de NAD^+) du dihydroxyacétone-P en glycérol-P. Ce glycérol-P pénètre alors dans la mitochondrie et, côté matrice, cette molécule est oxydée par FAD en dihydroxyacétone-P, avec production de $FADH_2$. Le dihydroxyacétone-P peut alors sortir de la mitochondrie et retourner au cytoplasme.

fiche 107 Les métabolismes oxydatifs anaérobies

En anaérobiose, il demeure possible d'assurer un métabolisme oxydatif : en utilisant un autre accepteur d'électrons que l'oxygène. C'est le cas des fermentations, observées aussi bien chez des eucaryotes que des bactéries ou des archées, mais sous des formes très diverses. La respiration anaérobie n'est pas pratiquée dans le monde eucaryote.

1. La respiration anaérobie

Ce type de métabolisme concerne certaines bactéries qui y ont recours lorsqu'elles manquent de dioxygène pour accepter *in fine* les électrons arrachés à la matière organique. *Escherichia coli*, par exemple, est capable d'utiliser des nitrates comme accepteurs finaux d'électrons. Hormis cette différence, le déroulement de cette respiration est en tout point identique à la respiration aérobie : oxydation des substrats lors de la glycolyse et du cycle de Krebs, production de coenzymes NADH et $FADH_2$, réoxydation des coenzymes par la chaîne respiratoire membranaire, avec bien entendu constitution d'un gradient de protons puis production d'ATP.

Fiche 106

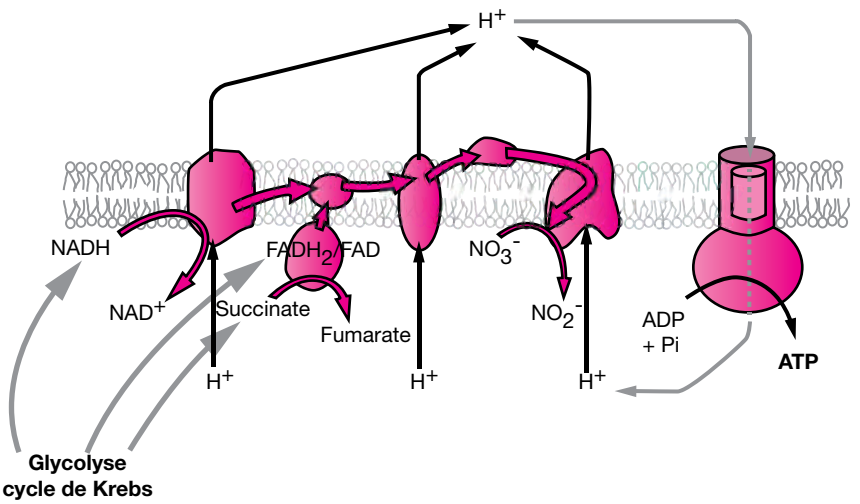


Figure 1 : Une respiration sur nitrates

2. Les fermentations

Les fermentations sont un moyen de pourvoir aux besoins en ATP au moyen de la seule glycolyse, en l'absence de dioxygène. L'objet de ce procédé est d'entretenir les coenzymes NAD^+ nécessaires à la poursuite de la glycolyse. Le rendement est faible, puisqu'il n'y a pas récupération de l'énergie réductrice des coenzymes.

Exemple de la fermentation lactique

Lors de cette fermentation, assurée par certaines bactéries et par les cellules musculaires striées squelettiques, le pyruvate sert lui-même d'accepteur final. Les électrons du NADH lui sont transmis et il se trouve réduit en lactate tandis que le NAD^+ est régénéré.

Le lactate est donc un déchet du métabolisme fermentaire, alors qu'il renferme un pouvoir réducteur résiduel important. Ce déchet est éliminé des cellules de manière à poursuivre les oxydations cellulaires. Dans le cas de la cellule musculaire squelettique, le recours à cette fermentation permet de produire une énergie modérée, mais en un temps très court lors d'un effort violent de courte durée.

Fiche 124

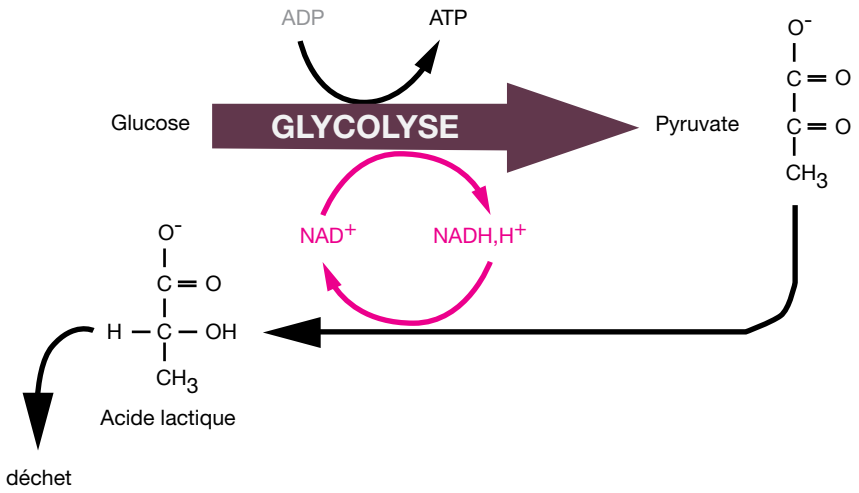


Figure 2 : Réduction du pyruvate

Exemple de la fermentation éthylique

C'est la fermentation de la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae*. Le principe est ici le même, mais la fermentation est effectuée en deux temps : il y a d'abord décarboxylation du pyruvate, qui produit de l'éthanal. Cet éthanal est alors réduit en éthanol par le NADH, ce qui régénère donc le NAD^+. Cette fermentation produit donc deux déchets : l'éthanol (l'alcool éthylique) et le CO_2.

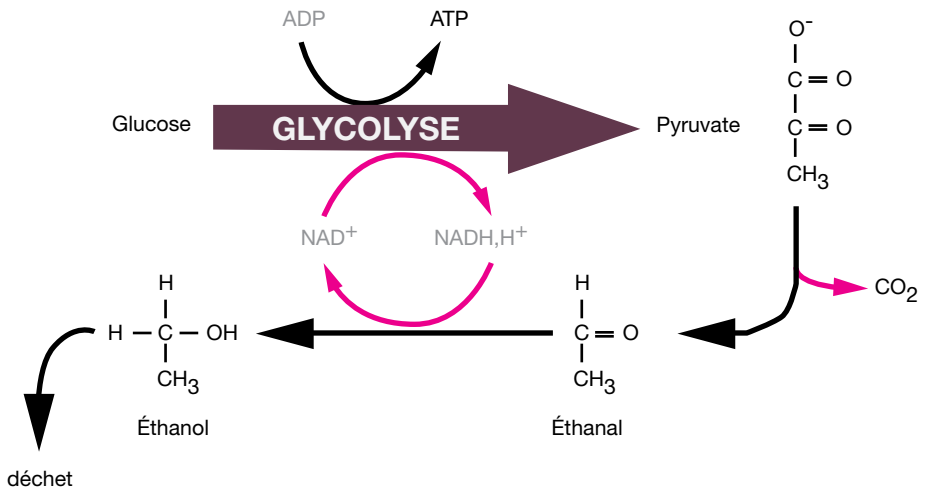


Figure 3 : Décarboxylation du pyruvate suivie d'une réduction

fiche 108 La production d'ATP par les ATPsynthases

Fiche 23

Les ATPsynthases des membranes mitochondriales internes sont des pièces essentielles du métabolisme cellulaire. Elles assurent le couplage entre la dissipation d'un gradient électrochimique de protons et la synthèse d'ATP. Ce couplage met en jeu une forme intermédiaire d'énergie : l'énergie mécanique d'une rotation, à l'image d'une turbine.

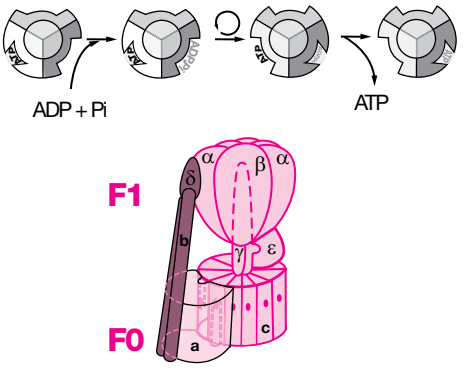
1. La catalyse de la synthèse d'ATP

Les complexes F0/F1 sont des enzymes ATPasiques

La sphère hydrophile F1 est constituée d'une région principale à symétrie axiale d'ordre 3 de type $\alpha 3\beta 3$ (trois sites catalytiques) et d'une région centrale asymétrique de type $\gamma\varepsilon$.

Dans ce modèle, donc, les trois sites catalytiques sont dans trois états différents, l'un dit « ouvert » (état O) ayant peu d'affinité pour les substrats et le produit, l'autre lié à ADP et Pi (état L) et le troisième fermement lié à l'ATP (état T). La rotation de l'axe asymétrique provoque une permutation circulaire de l'état des trois sites. Le premier site passe de l'état O à l'état L (il est toujours libre mais a maintenant une forte affinité pour ADP et Pi), le second de l'état L à l'état T (il contient ADP et Pi mais favorise fermement la synthèse de l'ATP) et le troisième de l'état T à l'état O (il contient ATP, mais est maintenant ouvert et favorise le départ de cet ATP).

Ainsi, le sens de la réaction (synthèse ou hydrolyse d'ATP) est indissociablement lié au sens de la rotation de l'axe asymétrique.



Le sens de la catalyse (hydrolyse ou synthèse d'ATP) est déterminé par le sens de rotation de l'unité F1

Figure 1 : Catalyse, rotation et sens de réaction

La dissipation du gradient de protons

L'unité hydrophobe F0 est constituée d'un assemblage de trois types de chaînes (a, b et c) dans un rapport molaire de 1, 2, et 12 : ab_2c_{12}. L'ensemble des chaînes c permet le passage de protons d'un compartiment à l'autre.

Le transit des protons par cette voie est, grâce à un dispositif en baïonnette, directement lié à la rotation du rotor c12-$\gamma\varepsilon$ par rapport au stator ab2-δ-$\alpha 3\beta 3$.

Ainsi, *via* cette rotation, le transit des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice est indissociablement lié à la permutation des sites catalytiques : L, puis T, puis O, et ainsi de suite.

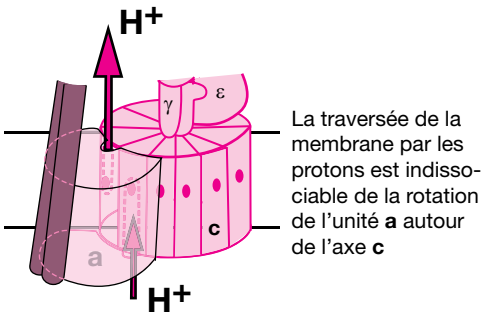


Figure 2 : Flux de protons et sens de rotation

2. Le principe du couplage

Le principe du couplage est que l'état T a une plus forte affinité pour ATP que pour ADP, ce qui favorise la synthèse d'ATP. Cette forte affinité est préjudiciable à la libération de l'ATP, mais le changement d'état provoqué par le flux de protons permet le passage à la forme O qui laisse alors échapper l'ATP. C'est parce que l'axe avec lequel ils interagissent est asymétrique que les trois sites sont à tout moment dans des états différents.

Le couplage énergétique réside dans le fait que les deux processus « flux de protons » et « rotation de la sous-unité F1 » sont indissociablement liés.

Le sens de réalisation de l'un est déterminé par le sens de réalisation de l'autre. Si la sphère tourne « au hasard » dans l'un ou l'autre sens, elle ne réalise aucune activité remarquable ; dans un sens, elle synthétise de l'ATP ; dans l'autre sens, elle hydrolyse de l'ATP et fonctionne comme une pompe.

Et comme le sens du flux de protons est déterminé par la chaîne respiratoire…

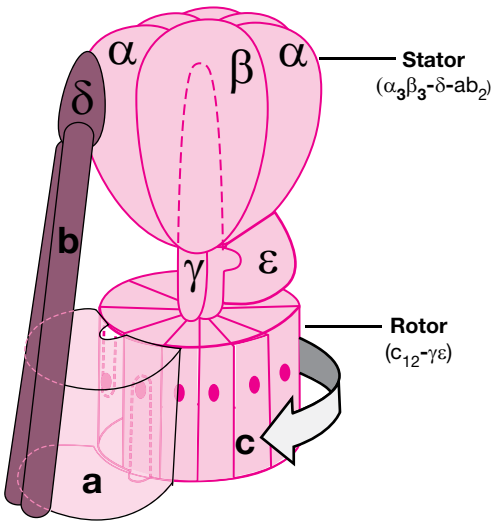


Figure 3 : Indissociabilité des deux rotations

fiche 109 Les métabolismes d'autotrophie au carbone

Comme la couverture des besoins énergétiques du monde vivant est assurée par oxydation de la matière organique en CO_2, la vie n'est possible qu'à la condition de l'existence de phénomènes inverses, producteurs de matière organique réduite à partir de CO_2. C'est bien le cas pour les organismes photosynthétiques et chimiosynthétiques.

1. Le cycle de Calvin

Le cycle de Calvin est la voie métabolique par laquelle une cellule autotrophe au carbone incorpore de nouveaux atomes de carbone à la matière organique.

Assimilation de carbone grâce à la RubisCO

L'entrée dans le cycle de Calvin consiste en la carboxylation d'une molécule de ribulose-1,5 bis phosphate (RubisP). Il en résulte la production d'une molécule à six carbones instable qui est hydratée puis clivée en deux molécules d'acide phosphoglycérique (APG). L'enzyme responsable de cette carboxylation est la RubisCO (ribulose bis phosphate carboxylase oxydase). C'est une des enzymes les plus abondantes de la biosphère. Il faut bien comprendre que chaque atome de carbone de la biomasse a probablement été un atome de carbone de CO_2 assimilé grâce à la RubisCO, dans un cycle de Calvin.

Réduction du groupe carboxylique

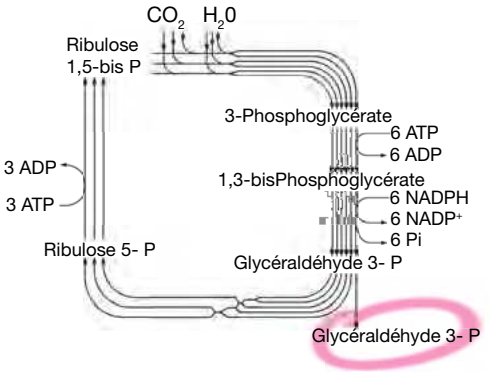


Figure 1 : Le cycle de Calvin

Les groupes carboxyliques des APG produits représentent cependant du carbone oxydé. Or, la matière organique est essentiellement constituée de matière plutôt réduite (fonctions alcool, entre autres, ou aldéhydes et cétones).

L'étape absolument essentielle, d'un point de vue thermodynamique est donc la réduction de ce carboxyle en un groupe aldéhydique.

Cette réduction est faite en deux temps : tout d'abord, activation de la fonction par phosphorylation (grâce à un ATP) et création d'un groupe à haut potentiel d'hydrolyse. Ensuite, réduction proprement dite, avec libération du phosphate et intervention du coenzyme NADPH (comme réducteur).

Bénéfice du cycle : un glycéraldéhyde

L'aldéhyde obtenu est un triose : le glycéraldéhyde phosphate. Il s'agit là d'une molécule centrale, véritable plaque tournante du métabolisme, à l'origine des précurseurs de quasiment toutes les molécules organiques. Encore une fois, pratiquement chacun de nos atomes de carbone a été un jour le carbone n°1 d'un glycéraldéhyde dans un cycle de Calvin.

Fiche 13

Régénération des précurseurs

Cependant, le cycle se poursuit : seule une faible part des glycéraldéhydes constitués est exploitée par la cellule : le reste est utilisé pour régénérer le Ru-bisP nécessaire à la poursuite du cycle. Cela suppose un réarrangement des molécules ainsi qu'une consommation d'ATP.

Au total, donc, la réalisation du cycle de Calvin exige, d'un point de vue thermodynamique, de l'ATP et du NADPH. Cela représente le coût énergétique de la réduction du carbone minéral.

2. Les voies de production de coenzymes réductrices

La production d'un bon pouvoir réducteur exige (i) des électrons et (ii) une forme d'énergie pour porter ces électrons au bon potentiel red-ox. La source d'électrons des organismes autotrophes est toujours une source minérale (H_2O, H_2S, ammoniaque, nitrite…) et la source d'énergie est variable. Ce peut-être de l'énergie lumineuse (cas de la photosynthèse) ou bien directement une énergie chimique disponible dans le milieu minéral (cas de la chimiosynthèse).

La voie de la photosynthèse

Le principe de la photosynthèse, eucaryote comme procaryote dans les cas les plus simples, est de prélever des électrons à des molécules d'eau (en les oxydant, donc) et d'ensuite produire des réducteurs forts en exploitant l'aptitude des pigments à capter l'énergie lumineuse.

Les voies de la chimiosynthèse

Les organismes chimiosynthétiques utilisent des réducteurs minéraux suffisamment forts pour en récupérer aussi bien les électrons que l'énergie pour produire, *in fine*, des réducteurs organiques.

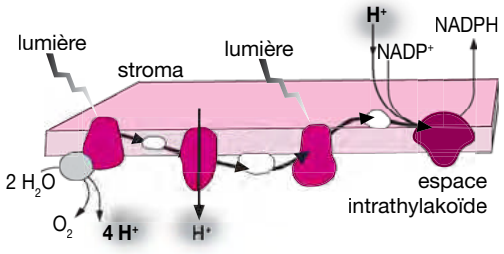


Figure 2 : Production de pouvoir réducteur sous forme de NADPH

fiche 110 L'exploitation de la lumière dans le chloroplaste

Fiche 109

Fiche 3

Les chloroplastes des végétaux de la lignée verte sont des organites semi-autonomes réalisant la photosynthèse. La capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique y sont le préalable à la réalisation du cycle de Calvin

Cette capture est le fait des molécules spécifiques de la membrane des thylacoïdes de ces chloroplastes. Le même fonctionnement s'observe chez les cyanobactéries ; rappelons-nous que la théorie endosymbiotique énonce que les chloroplastes proviennent de cyanobactéries symbiotiques.

1. L'antenne collectrice et l'exploitation du spectre solaire

Pigments et captation de lumière

Lorsque l'on éclaire vivement une solution de chlorophylle brute, on observe nettement une émission de lumière rouge : une fluorescence. Les radiations lumineuses sont absorbées par les pigments, ce qui délocalise certains de leurs électrons vers des orbitales de plus haute énergie. Ces électrons retournent alors à leur état fondamental en émettant à leur tour de la lumière (légèrement moins énergétique).

Dans une feuille verte, on n'observe pas une telle fluorescence rouge. C'est qu'il se produit *in vivo* d'autres transferts d'énergie.

Les pigments de l'antenne collectrice

Dans la membrane du thylacoïde du chloroplaste, de nombreux pigments différents sont associés en un ensemble nommé antenne collectrice. Ces pigments y captent la lumière et reviennent à leur état fondamental, non pas en émettant de la lumière, mais en excitant à leur tour, par résonance, un pigment voisin. Ainsi, de proche en proche, l'énergie est canalisée vers le pigment de plus basse énergie : une chlorophylle a dite chlorophylle du centre réactionnel, associée (voir plus bas) à d'autres couples red-ox. L'intérêt de ce dispositif est d'exploiter l'ensemble du spectre solaire, chaque pigment étant spécialisé dans l'absorption de certaines longueurs d'onde.

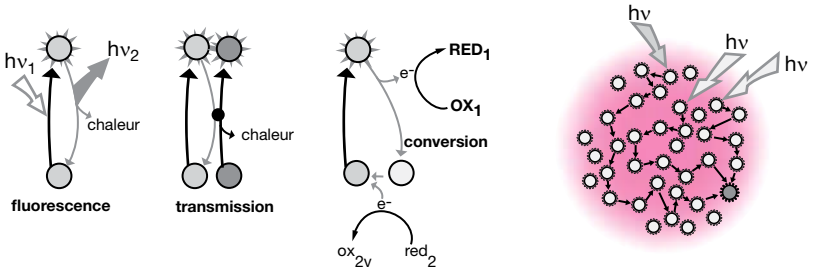


Figure 1 : Organisation d'un photosystème

Une fois excité, un pigment peut revenir à son état fondamental de trois manières : la fluorescence qui peut être observée *in vitro*, la transmission par résonance à un autre pigment dans l'antenne collectrice, et la conversion qui permet de constituer un pouvoir réducteur dans le centre réactionnel.

2. Les centres réactionnels : un couple improbable

La chlorophylle est un réducteur faible. Mais dans un centre réactionnel, la chlorophylle excitée ne revient pas à son état fondamental directement : elle se comporte comme un réducteur très fort et cède son électron à un accepteur : la cellule vient d'obtenir une forme d'énergie chimique : une molécule très réductrice.

Fiche 23

Néanmoins, la chlorophylle est maintenant à l'état oxydé Chl^+… et elle est un oxydant très fort !

Ainsi, alors que la chlorophylle forme un couple réducteur faible/oxydant fort, elle est transformée par la lumière et se comporte comme un couple impossible : un couple réducteur fort/oxydant fort.

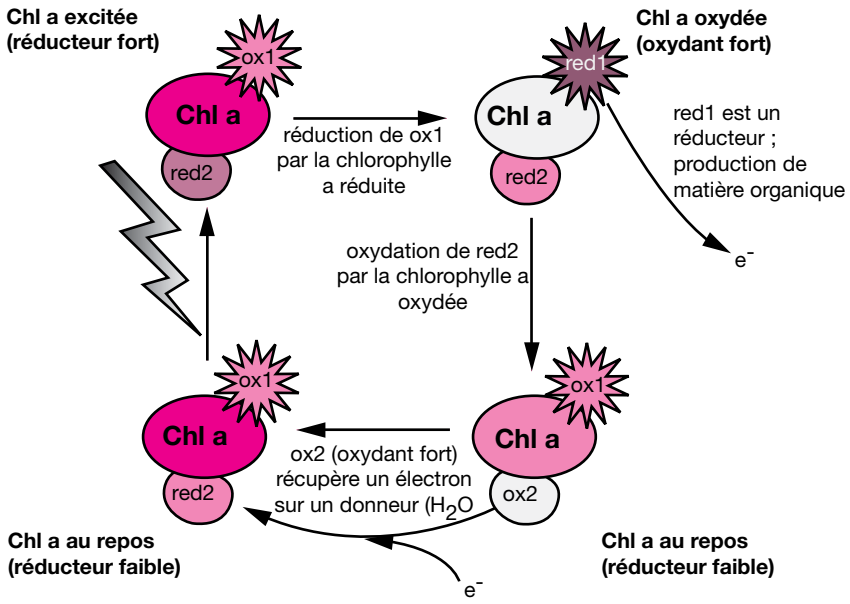


Figure 2 : Fonctionnement d'un centre réactionnel

3. L'oxydation des molécules d'eau

La chlorophylle oxydée Chl^+ récupère finalement un électron en oxydant une molécule annexe du centre réactionnel. Cette molécule devient alors un oxydant fort. Au total, un électron est finalement récupéré sur une molécule d'eau. Ainsi, des électrons sont fournis par l'eau (réducteur faible) et la chlorophylle assistée par la lumière porte ces électrons jusqu'à un réducteur fort.

fiche 111 Photosystèmes, pouvoir réducteur et énergie chimique

Fiche 109

Suite à la conversion photochimique par les centres réactionnels des photosystèmes, les membranes des thylacoïdes réalisent la production des coenzymes nécessaires à la réalisation du cycle de Calvin.

1. Le transfert des électrons fournis par l'eau jusqu'au NADPH

Complémentarité de deux photosystèmes

Fiche 110

Le saut énergétique réalisé par une chlorophylle est en réalité insuffisant pour porter des électrons du niveau de l'eau jusqu'au niveau du NADPH. C'est donc en deux étapes, par le recours à deux photosystèmes, que l'acte photochimique est finalement réalisé. Un photosystème I qui capte principalement dans la gamme 680 nm et le photosystème II qui capte dans la gamme 700 nm.

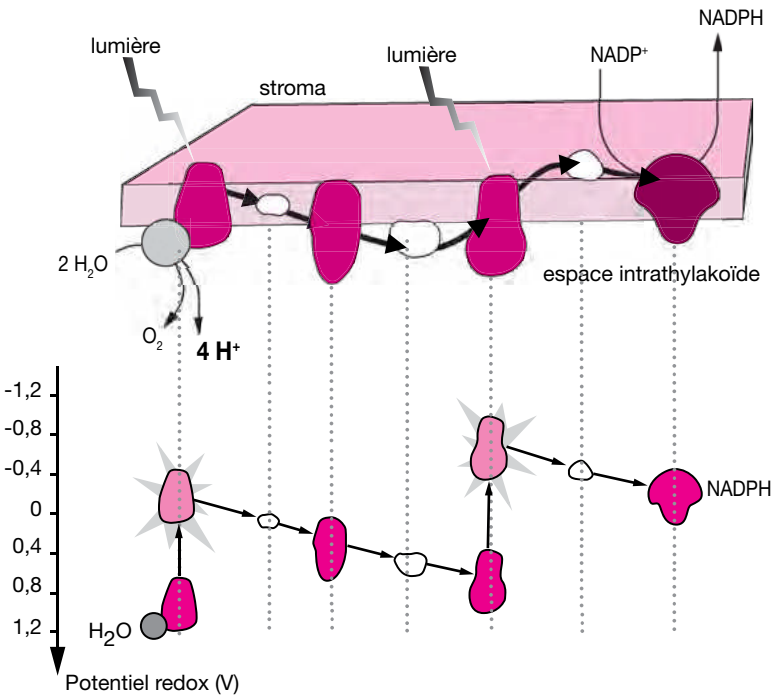


Figure 1 : La chaîne de transfert d'électrons

Le transfert d'électrons

Les électrons fournis par l'eau sont pris en charge par le photosystème II et transférés à une chaîne de transfert utilisant la plastoquinone, un complexe b6-f et enfin une plastocyanine. Ils accèdent alors au photosystème I qui assure une nouvelle conversion et réduit une ferrédoxine qui permet enfin de réduire un $NADP^+$ en NADPH.

2. La voie cyclique

En même temps que ce trajet est effectué, certains électrons suivent une voie cyclique, plus simple : seul le photosystème I est impliqué. Les électrons transitent de la ferrédoxine au complexe b6-f et reviennent au même photosystème. Il n'y a pas de production de NADPH et pas de consommation d'eau. Mais cette voie revêt une grande importance comme nous allons le voir.

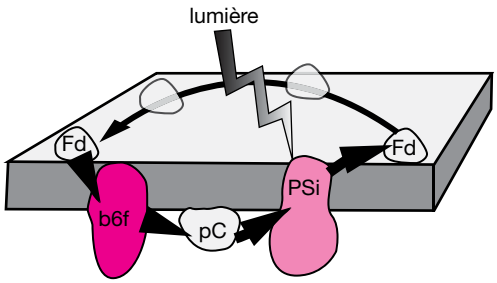


Figure 2 : Transfert cyclique d'électrons

3. L'installation d'un gradient de protons et son exploitation

Le complexe b6-f, à l'image de ce qui se produit dans la chaîne respiratoire, réalise une translocation de protons lors du transfert des électrons de la plastoquinone à la plastocyanine. Le transfert d'électrons est donc également exploité dans la constitution d'un gradient transmembranaire de protons ; et des ATPsynthases vont exploiter la dissipation de ce gradient en formant de l'ATP.

Ainsi, la cellule dispose de deux schémas : le schéma en Z qui permet de produire ATP et NADPH, en proportions constantes, et le schéma cyclique qui ne produit que de l'ATP. Le recours à ces deux schémas permet au chloroplaste d'ajuster au mieux la balance entre ATP et NADPH selon les besoins de l'assimilation.

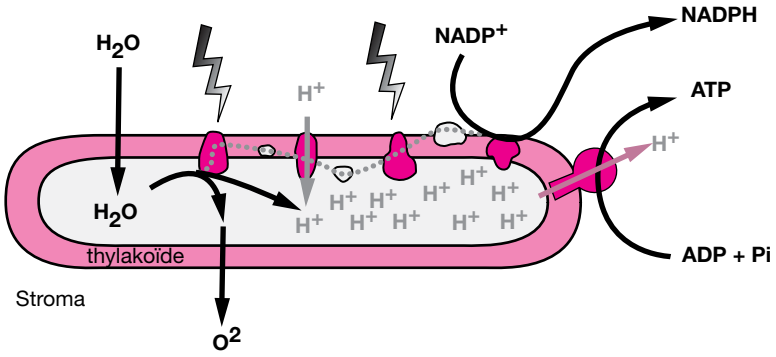


Figure 3 : Translocation de protons et ATPsynthase

fiche 112

La production de glucides

Les trioses obtenus au cours du cycle de Calvin sont les précurseurs de tous les composés organiques de la cellule.

1. Des trioses aux hexoses

Formation d'hexoses

Fiche 13

Le glycéraldéhyde est un triose qui s'isomérise facilement en dihydroxyacétone, l'autre triose ; une aldolisation entre ces deux trioses forme du fructose. Il s'agit là des mêmes réactions, inversées, que celles de la glycolyse. Il est ensuite aisé pour la cellule d'isomériser le fructose en glucose ou en d'autres hexoses.

Fiche 109

Les voies de régénération du cycle de Calvin font également apparaître des pentoses. Il en est de même de la voie des pentoses phosphates où une décarboxylation de glucose permet de produire les principaux pentoses.

Les oses sont tous de la forme D

Tous les oses semblent donc dériver du glycéraldéhyde. Et le mode de dérivation de ces oses est tel que leur avant-dernier carbone est toujours l'ancien avant-dernier carbone du glycéraldéhyde dont ils dérivent. Ainsi, comme le cycle de Calvin ne produit que des Glycéraldéhyde de forme D, tous les oses sont de forme D.

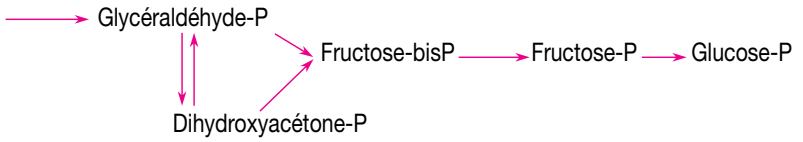


Figure 1 : Du glycéraldéhyde au glucose

2. La production de pentoses

Par le cycle de Calvin

Les voies de régénération du cycle de Calvin font également apparaître des pentoses. Ces pentoses peuvent être détournés du cycle de Calvin à des fins d'anabolisme.

Par la voie des pentoses phosphates

Cette voie, nommée également voie des hexoses monophosphates, permet à la cellule de nombreuses synthèses. Elle présente une oxydation et une décarboxylation suivies de réorganisations. C'est une voie qui est branchée sur la glycolyse et sur la néoglucogenèse et qui peut fonctionner de façon cyclique.

La cellule peut ainsi assurer une production de NADPH, de pentoses (ribose, ribulose, xylose et xylulose) ou même d'oses à sept carbones (des heptoses), comme le sédoheptulose ou à quatre carbones comme l'érythrose. L'importance, entre autres, du ribose tient à ce que c'est un constituant des acides nucléiques (ADN et ARN).

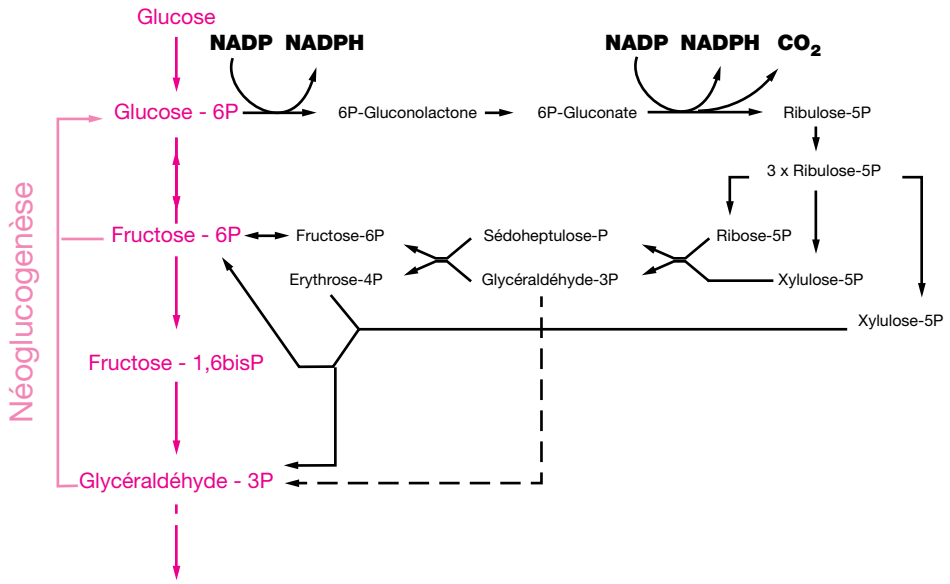


Figure 2 : La voie des pentoses phosphates

3. L'entretien d'une exportation continue par une cellule chlorophyllienne

Une cellule de parenchyme chlorophyllien, dans une feuille d'Angiosperme, exporte de la matière organique sous forme de saccharose, ce qui alimente toutes les cellules non-chlorophylliennes de la plante, et ceci même la nuit. Le principe est simple : pendant le jour, le chloroplaste stocke de l'amidon synthétisé à partir des excédents de la photosynthèse ; et la nuit, il y a résorption de ces stocks, ce qui permet à la cellule d'être exportatrice de jour comme de nuit.

Le saccharose est un dimère (de glucose et de fructose) non réducteur particulièrement utilisé par les plantes comme forme circulante de matière organique. L'amidon est un gros polymère de glucose, non réducteur également, forme privilégiée de stockage dans des organes de réserve (graines, tubercules).

Le glucide le plus abondant de la biosphère est sans conteste la cellulose, polymère linéaire de βD-glucose, essentiellement extracellulaire. Cette molécule est synthétisée par des complexes enzymatiques cellulose-synthase membranaires qui circulent dans la membrane et « tissent » en quelque sorte les microfibrilles de cellulose constituant la matrice extracellulaire des cellules végétales.

fiche 113

La diversification des assimilats

Les molécules fournies par le cycle de Calvin sont en définitive des glucides. Mais bien entendu, ce sont tous les types de molécules organiques dont la cellule a besoin, et en particulier des molécules azotées. Il existe de nombreuses voies métaboliques qui utilisent les glucides où leurs produits de dégradation pour synthétiser et diversifier d'autres petites molécules organiques.

1. Produire des lipides à partir de glucides

Production de glycérol

Une simple réduction du groupe cétone du Dihydroxyacétone produit un tri-alcool : le glycérol. Ce glycérol fournit l'un des principaux squelettes des lipides membranaires.

Production d'acides gras

Fiche 12

Les acides gras sont formés par élongation progressive, par ajout progressif de fragments dicarbonés. Ces modules sont des acétates fournis sous forme d'Acétyl-CoA, produit de la décarboxylation oxydative du pyruvate.

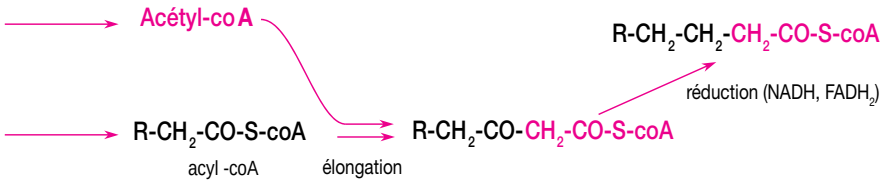


Figure 1 : Origine des lipides

2. Produire des acides aminés à partir de glucides

Les acides alpha-cétoniques

Le catabolisme du glucose fournit bon nombre d'acides alpha-cétoniques : le pyruvate (à l'issue de la glycolyse), l'alpha-céto-glutarate et l'oxalo-acétate (dans le cycle de Krebs). Ce sont des précurseurs d'acides aminés.

Aminations réductrices

L'amination d'un acide cétonique donne un acide aminé. De nombreuses bactéries et cellules végétales sont capables de réaliser ces aminations grâce à l'intervention d'un réducteur : le NADPH. Ainsi, l'amination du pyruvate fournit de l'alanine, tandis que celle de l'alpha-céto-glutarate donne de l'acide glutamique

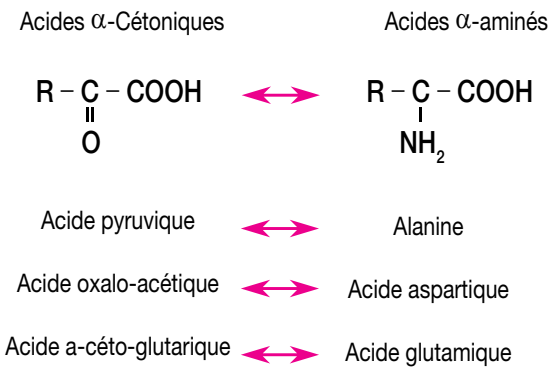


Figure 2 : Correspondances entre acides cétoniques et acides aminés

Transaminations

Les cellules animales ne réalisent pas d'amination réductrice : cela les contraint à se procurer des acides aminés dans leur alimentation.

En revanche, elles savent diversifier leurs acides aminés en transférant l'amine d'un acide aminé (qui perd alors l'amine) vers un acide alpha-cétonique (qui devient donc acide aminé). De la sorte, tous les acides aminés ne sont pas indispensables dans l'alimentation ; seuls quelques-uns sont « essentiels ».

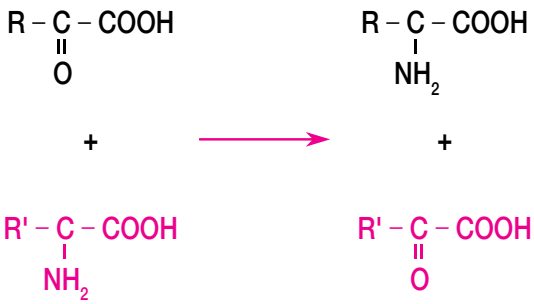


Figure 3 : Transamination

fiche 114

La photorespiration

La photorespiration est un processus surprenant qui fait intervenir le peroxysome et qui contribue à faire chuter le rendement de la photosynthèse. Cela repose sur la double fonctionnalité de la RubisCO et une compétition entre le dioxyde de carbone et le dioxygène.

1. Une oxydation par la RubisCO

Fiche 109

Comme son nom l'indique, la RubisCO a aussi une activité Oxydase. En présence de CO_2 et de peu d'O_2 ($O_2/CO_2 < 2$ %), l'activité carboxylase l'emporte (cycle de Calvin), mais en présence d'une forte quantité d'O_2 ($O_2/CO_2 > 20$ %), l'activité oxydase est enclenchée, détournant une partie du ribulose bisphosphate du chloroplaste. Cette oxydation produit de l'APG, comme dans le cycle de Calvin, mais aussi du phosphoglycolate. Il y a donc production de deux fois moins d'APG et aucune incorporation de carbone.

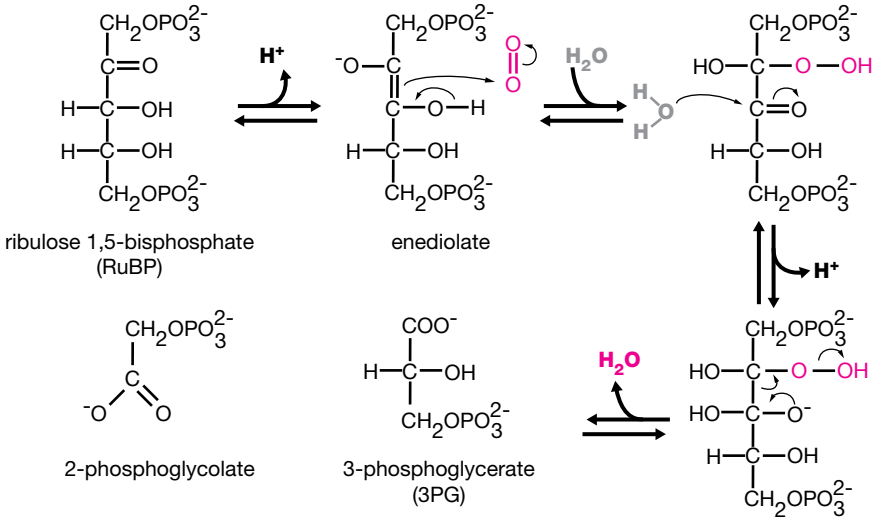


Figure 1 : L'activité oxydase de la RubisCo

2. Intervention du peroxysome et de la mitochondrie

Fiche 86

Le phosphoglycolate est rapidement déphosphorylé en glycolate, lequel transite alors facilement vers le peroxysome. Le peroxysome est un petit organite à une seule membrane. Il est spécialisé dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène, toxique pour la cellule. Il réalise des oxydations par consommation de dioxygène et c'est cette activité oxydante qui est utilisée dans la photorespiration.

Oxydation du glycolate et synthèse d'acides aminés

Dans le cadre de la photorespiration, le peroxysome oxyde le glycolate en glyoxylate qu'il pourra ensuite aminer en glycine. Parallèlement, il produit également du glycérate à partir de sérine.

La mitochondrie ferme le cycle de la photorespiration

On peut représenter la photorespiration comme un cycle si l'on considère maintenant la mitochondrie : elle importe des glycines produites par le peroxysome et les combine pour produire de la sérine qu'elle exporte vers ce même peroxysome.

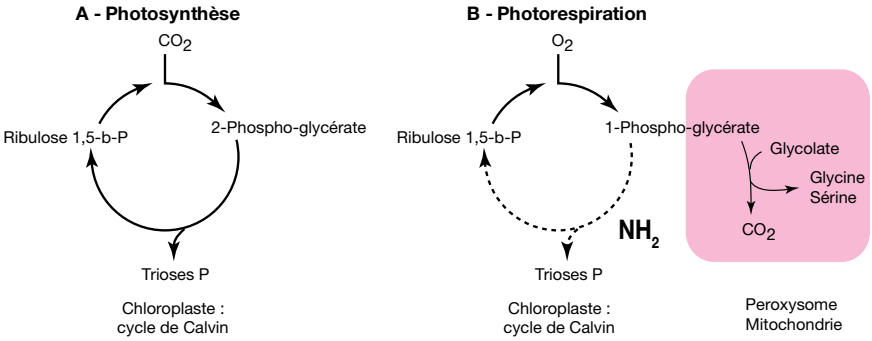


Figure 2 : La double fonction de la RubisCo

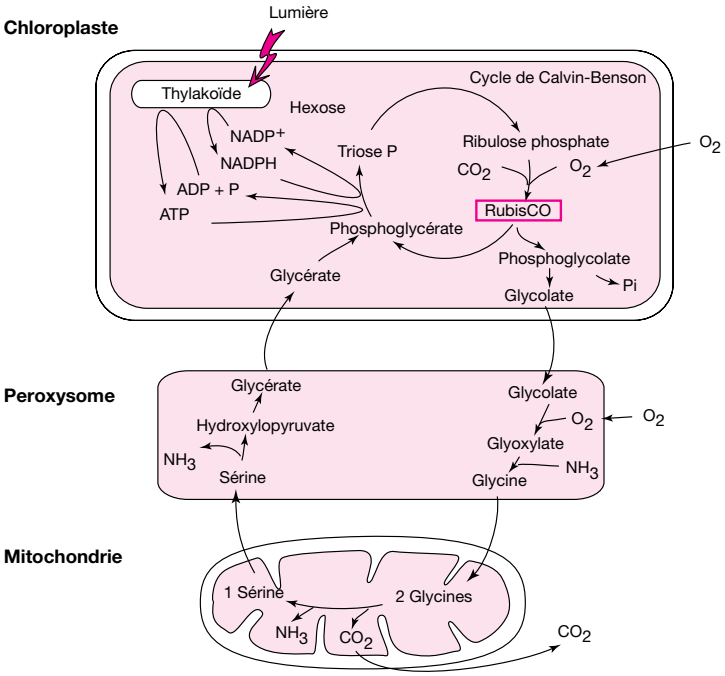


Figure 3 : Les voies de la photorespiration

3. Signification biologique de la photorespiration

La photorespiration peut sembler un gaspillage énergétique : il y a consommation de dioxygène, mais pas production d'énergie ; il y a fonctionnement du chloroplaste, mais pas incorporation de carbone.

Métabolisme intermédiaire

Une première importance de la photorespiration semble tenir à la synthèse d'acides aminés par la cellule. L'ensemble des transferts entre chloroplaste, peroxysome et mitochondrie permet, à chaque passage, la production d'un nouvel acide aminé : glycine, puis sérine, puis également glutamate dans le chloroplaste. La photorespiration est donc l'une des clés de la diversification des assimilats par la cellule chlorophyllienne.

Les plantes en C4 évitent la photorespiration

Les plantes dites en C4 effectuent une disjonction très nette entre l'assimilation du Carbone (cycle de Calvin) et acte photochimique (chaîne photosynthétique). Cela leur permet de fournir systématiquement une forte concentration en CO_2 à la RubisCO. Et, de fait, les plantes en C4 ne pratiquent pas la photorespiration. Leur rendement photosynthétique en est alors nettement amélioré.

fiche 115 Le génome des mitochondries et des plastes

Du fait de leur origine endosymbiotique, les mitochondries et les chloroplastes sont des organites tout à fait originaux, et en particulier pour ce qui concerne leur génome. Celui-ci a été l'objet d'une évolution particulière depuis les premières endosymbioses.

1. Origine des mitochondries et plastes

Phylogénie

Fiche 3

La phylogénie moléculaire permet d'établir des parentés entre génomes. Et il a été ainsi clairement montré que les chloroplastes sont de proches parents des cyanobactéries, tandis que les mitochondries seraient apparentées aux alpha-protéobactéries. Le parent bactérien actuel le plus proche des mitochondries est Rickettsia prowazekii, qui est un parasite obligatoirement intracellulaire responsable du typhus.

Un génome fortement réduit

Le génome d'une mitochondrie est cependant très différent de celui d'un *Rickettsia*. Le génome de *Rickettsia* présente un million de bases, là où une mitochondrie de la plante *Arabidopsis thaliana* n'en a que 400 000 et où une mitochondrie humaine n'en a que 16 000. Cette réduction revêt en fait deux aspects : une perte de gènes et une « délégation » au noyau de l'hôte. Les contrôles de nombreuses fonctions mitochondriales ont été reprises par le noyau cellulaire, ce qui renforce la dépendance vis-à-vis de l'hôte.

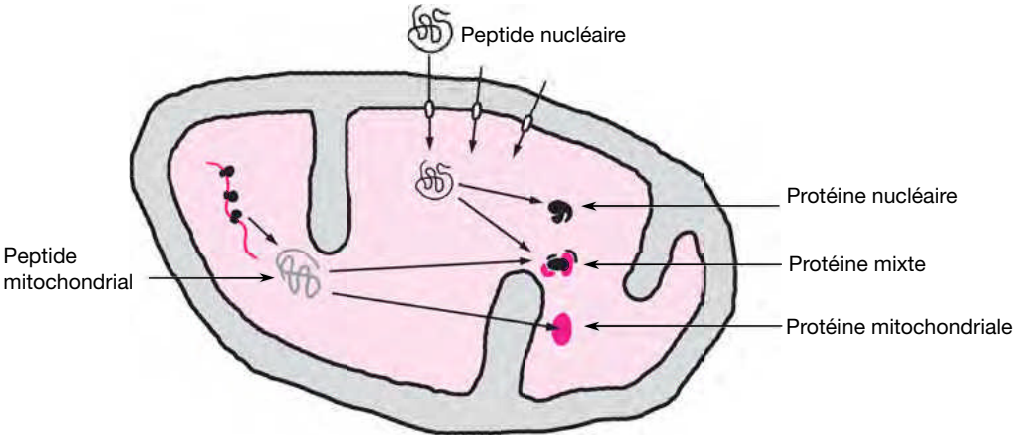


Figure 1 : Le statut des protéines mitochondriales

2. Le protéome des mitochondries et des chloroplastes

Les protéines que l'on rencontre dans les mitochondries et les chloroplastes ont ainsi des statuts différents. Certaines sont strictement synthétisées par l'organite, d'autres sont franchement nucléaires, d'autres sont mixtes (plusieurs sous-unités, les unes d'origine nucléaires, les autres synthétisées par l'organite). On pourra citer, comme exemple

de protéine mixe : la RubisCO dans le chloroplaste et l'ATPsynthase chez les mitochondries.

Fiches 111, 114

3. Le génome mitochondrial humain

Organisation

Il s'agit d'un ADN circulaire, parfois copié de multiples fois. On y a dénombré 37 gènes : 22 gènes d'ARNt, 2 gènes d'ARNr (12S et 16S) et 13 gènes de polypeptides membranaires, sous-unités de protéines essentielles à la production d'énergie : Cytochrome oxydase, ATP synthase et NADH déshydrogénase.

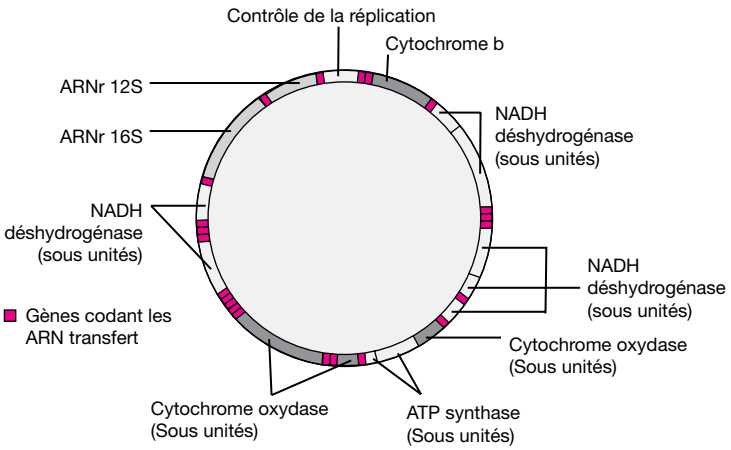


Figure 2 : Le génome mitochondrial humain

Les maladies mitochondriales : une transmission maternelle

Les mutations affectant les gènes mitochondriaux peuvent avoir des conséquences graves : ce sont des maladies génétiques rares dont la transmission est complexe. Il s'agit d'une transmission maternelle exclusivement, puisque lors de la fécondation, les spermatozoïdes ne transmettent aucune mitochondrie à la cellule œuf. Toutes les mitochondries d'un individu proviennent donc des mitochondries fournies par sa mère. On pourra trouver dans ces maladies des myopathies mitochondriales comme le syndrome de Kearns-Sayre

Évolution et recherche de l'Ève mitochondriale

Du fait de cette transmission maternelle, on a pu faire une phylogénie sur l'ADN mitochondrial et remonter à un ancêtre maternel. Ceci est à l'origine de la théorie de l'Ève mitochondriale, plus récente ancêtre commun à l'humanité, par lignée maternelle. Elle aurait vécu sur le continent Africain il y a environ 150 000 ans.

fiche 116 Dynamique mitochondriale : entre fusion et fission

Les mitochondries sont des organites impliqués dans de nombreuses voies métaboliques et fournissent, par phosphorylation oxydative, la majorité de l'ATP cellulaire. En microscopie optique, les mitochondries apparaissent sous forme de granules, de bâtonnets ou de filaments de longueur variable, d'où leur appellation, introduite en 1898, bâtie avec les mots grecs *mitos* (filament) et *chondros* (granule). Les études basées sur la microscopie électronique de coupes fines de cellules ont défini les mitochondries comme des objets cylindriques, refermées sur eux-mêmes (figure 1). L'analyse de ces coupes a permis de constater la présence de nombreuses « mitochondries » par cellule. Ces mitochondries ne semblent pas reliées entre elles et sont ainsi plus souvent considérées comme autant de reliquats de la bactérie ancestrale à l'origine de la théorie endosymbiotique. Il a donc été considéré pendant longtemps que les mitochondries étaient des entités indépendantes baignant dans le cytoplasme. Cette vision est également conforme avec les résultats de biochimie cellulaire. En effet, le fractionnement du contenu cellulaire conduit à l'observation de mitochondries fragmentées et actives dans les mécanismes métaboliques testés (aussi bien dans la respiration que dans des fonctions autres).

Fiche 6

Fiche 3

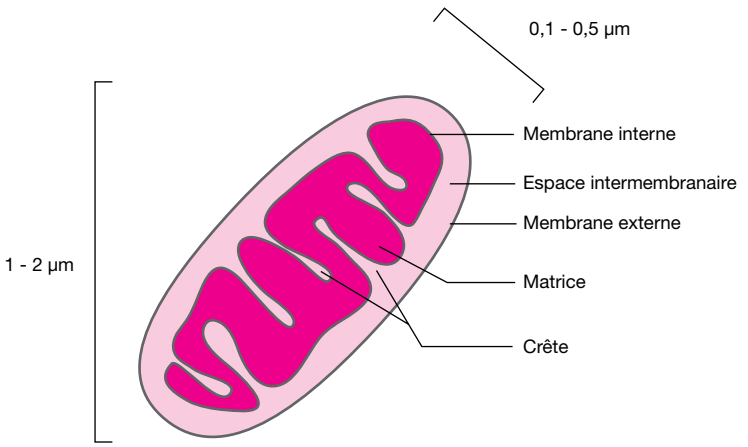


Figure 1 : Ultrastructure de la mitochondrie

Cependant, l'analyse de coupes épaisses en microscopie électronique ainsi que la microscopie photonique montrent que les mitochondries forment des filaments longs et branchés. Par ailleurs, des études sur cellules vivantes (grâce notamment à des outils dérivés de la *Green Fluorescent Protein* (GFP)) montrent que les filaments mitochondriaux modifient continuellement leur position et leur morphologie, se divisent et fusionnent entre eux. Il est donc maintenant admis que les mitochondries sont capables de former un réseau. Ce réseau est en remodelage constant. Cette capacité de « casser » le réseau (mécanisme de fission) est par exemple requise lors de la division cellulaire. Au cours de cette division, des fragments de la mitochondrie de la cellule mère sont transportés dans la cellule fille assurant ainsi son équipement mitochondrial.

Fiche 137

Cette dynamique est donc requise pour la biogenèse, mais aussi pour la dégradation mitochondriale (figure 2).

Fiche 103

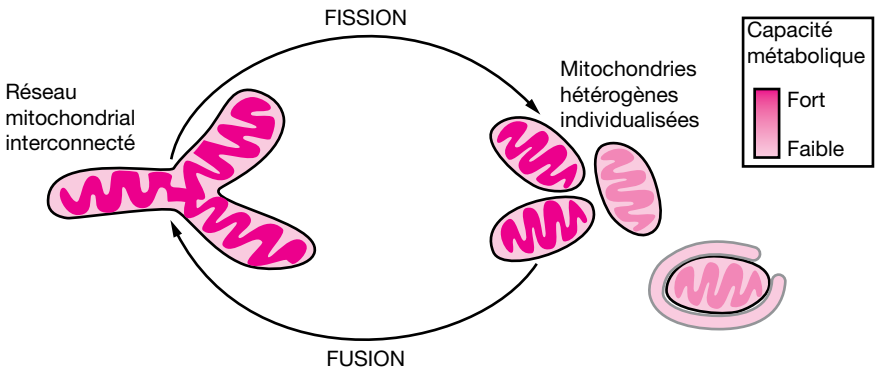


Figure 2 : La dynamique mitochondriale
D'après B. Westermann, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, décembre 2010.

1. Fusion de la membrane

La fusion membranaire est plus complexe que celle retrouvée dans l'endocytose et l'exocytose. En effet, la mitochondrie a la particularité de posséder deux membranes séparant l'espace inter-membranaire. La fusion va donc se réaliser en plusieurs étapes. Ces étapes impliquent la présence de différentes protéines qui sont des GTPases.

Fusion de la membrane externe

Cette fusion requiert la présence de deux mitofusines (Mfn1 et Mfn2). Ces protéines sont insérées dans la membrane, cette insertion provoquant une courbure de la bi-couche lipidique. Cette courbure va aider à la déformation de la membrane qui va ainsi favoriser la fusion. Les mitofusines ont un rôle analogue aux SNAREs dans le trafic vésiculaire.

Fusion de la membrane interne

La troisième GTPase impliquée dans la dynamique mitochondriale est un autre homologue de la dynamine, nommée OPA1 chez l'homme.

2. Rôle de la dynamique

Si un défaut apparaît dans une « mitochondrie » (protéine défectueuse, perte de l'ADN), la fusion permettra d'y remédier et de redonner un organite fonctionnel. Ce mécanisme est à la base de l'hétéroplasmie. La plasticité mitochondriale peut aussi être un avantage majeur dans les cellules où la demande d'énergie est très forte (comme les neurones). Les défauts de fusion ou fission sont létaux ou conduisent à de graves pathologies (neuropathies périphériques comme la maladie de Charcot, Marie, Tooth, etc.).

FOCUS Pathologies mitochondriales

Les pathologies mitochondriales regroupent des maladies impliquant un dysfonctionnement de ces organelles. Ce sont donc des pathologies métaboliques pour la plupart dues à des déficiences génétiques. Ce sont les plus fréquentes des maladies métaboliques et elles touchent 5 personnes sur 20 000. La caractéristique d'une partie de ces pathologies est un dysfonctionnement de la chaîne de transfert des électrons qui aboutit donc à un déficit énergétique. Bien que touchant le même organite, ces maladies sont très diverses. Elles peuvent affecter différents tissus et être à la base d'encéphalopathies, de cardiomyopathies, de troubles de la déglutition, de troubles gastro-intestinaux, de déficit hépatiques, mais aussi de cécité et cette liste n'est pas limitative. Ces pathologies peuvent être observées à des âges différents et le dysfonctionnement mitochondrial peut donc être variable dans l'espace (différentes cellules touchées) et dans le temps. La mitochondrie étant indispensable à la vie cellulaire chez les mammifères, ces pertes de fonctions ne sont pas totales.

Bien que les mitochondries soient pour l'essentiel assimilées à des « centrales énergétiques », ces organelles sont impliquées dans beaucoup d'autres fonctions dont l'altération peut aboutir à des pathologies. Ainsi, on considère que plus de 95 % des 3 000 gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale a une fonction autre que la production d'ATP. Toutes les fonctions autres que cette production sont liées à différents chainons métaboliques retrouvés dans l'anabolisme et le catabolisme des bases azotées, du cholestérol, des neurotransmetteurs, etc.

Le génome mitochondrial abrite 37 gènes et l'on retrouve des anomalies de cet ADN mitochondrial chez 10 à 15 % des patients atteints de maladie mitochondriale. Il est fondamental de comprendre qu'une lignée clonale cellulaire peut montrer une hétérogénéité mitochondriale. En d'autres termes, au sein d'une cellule on peut fréquemment observer plusieurs types de mitochondries ayant des génomes différents. Ce phénomène d'hétéroplasmie permet donc la « co-existence » de mitochondries fonctionnelles et non fonctionnelles. Cette perte de fonction pourra donc être quantitative (diminution du nombre de copies de l'ADN mitochondrial) ou qualitative (mutation aboutissant à une perte de fonction d'une protéine particulière).

Les pathologies mitochondriales sont difficiles à identifier de par leur grande variété. L'identification de la maladie implique donc le croisement de l'analyse des symptômes et le constat de désordres métaboliques. Les analyses moléculaires de l'ADN mitochondrial peuvent alors être réalisées sur l'ADN du tissu atteint. Cette analyse sera qualitative (séquençage ou recherche de mutation déjà répertoriée) mais aussi quantitative (mesure de la quantité d'ADN par PCR quantitative). À l'heure actuelle, le traitement des pathologies mitochondriales est essentiellement symptomatique.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

9.1 Les phosphorylations sur le substrat :
- ☐ a. sont réalisées sur le glucose
- ☐ b. sont des réductions
- ☐ c. sont couplées à une réaction exergonique

9.2 La chaîne respiratoire :
- ☐ a. transfère des électrons à potentiel redox croissant
- ☐ b. prélève des électrons sur l'oxygène
- ☐ c. se déroule dans l'espace intermembranaire mitochondrial

9.3 La respiration anaérobie :
- ☐ a. ne dégage pas de CO_2
- ☐ b. ne consomme pas d'O_2
- ☐ c. est une fermentation

9.4 Le cycle de Calvin :
- ☐ a. est une oxydation globale de pentoses
- ☐ b. permet de réduire du carbone assimilé
- ☐ c. ne fonctionne qu'à l'obscurité

9.5 Les pigments chloroplastiques :
- ☐ a. délocalisent des électrons sous l'effet de la lumière
- ☐ b. arrachent des électrons aux molécules d'eau
- ☐ c. sont verts

9.6 La photophosphorylation cyclique :
- ☐ a. ne produit pas d'ATP
- ☐ b. ne consomme pas d'eau
- ☐ c. ne produit pas de NADPH

9.7 La voie des pentoses phosphates :
- ☐ a. débute par une oxydation du glucose
- ☐ b. inhibe la glycolyse
- ☐ c. permet la production de NADPH

9.8 Les acides alpha-cétoniques :
- ☐ a. peuvent être obtenus en désaminant un acide aminé
- ☐ b. servent de substrat à la production d'acides aminés
- ☐ c. sont des poisons du métabolisme

9.9 La photorespiration :
- ☐ a. permet aux végétaux de respirer à la lumière
- ☐ b. est due aux propriétés mixtes de la RubisCo
- ☐ c. est liée à la production d'acides aminés.

9.10 Les gènes mitochondriaux :
- ☐ a. ne peuvent pas s'exprimer
- ☐ b. s'expriment à condition de migrer vers le noyau
- ☐ c. s'expriment dans la mitochondrie

Réponses

9.1 **c**. On nomme phosphorylation sur le substrat une production d'ATP à partir d'ADP et Pi, lorsque cette production est réalisée grâce à un couplage « sur le substrat », c'est-à-dire couplage avec une réaction spontanée du substrat.

9.2 **a**. La chaîne respiratoire est une chaîne spontanée de transfert d'électrons depuis les coenzymes réduites **vers** le dioxygène qui est l'**accepteur** final d'électrons. Ces transferts sont spontanés puisqu'ils se font à potentiel redox croissant. Et ils se déroulent dans l'épaisseur de la membrane interne.

9.3 **b**. Cette respiration caractérise une chaîne respiratoire où l'accepteur final, minéral, n'est pas le dioxygène (le nitrate, par exemple) et qui donc ne consomme pas O_2. En revanche, elle est couplée à un cycle de Krebs qui, lui, dégage bien du CO_2. C'est bien une respiration et en aucun cas une fermentation.

9.4 **b**. Le cycle de Calvin consiste en une assimilation de carbone (par la RubisCo) suivie d'une réduction des carbones fixés. Si le cycle n'exige pas directement la lumière, il est couplé aux réactions photochimiques qui fournissent les coenzymes nécessaires au cycle. Mais en aucun cas il n'exige l'obscurité.

9.5 **a**. L'activité d'un pigment repose sur l'absorption de lumière par des électrons qui changent alors d'orbitale en absorbant de l'énergie. Ils restituent cette énergie sous des formes variables lorsque l'électrons revient à son orbitale fondamentale. Si l'ensemble des pigments d'une feuille donne une couleur verte, certains ont des teintes jaunes ou orangées. Dans un photosystème II, le fonctionnement du centre réactionnel aboutit à l'arrachage d'un électron à une molécule d'eau, mais uniquement dans ce cas.

9.6 **b** et **c**. La photorespiration cyclique lors de la photosynthèse permet d'ajuster les proportions d'ATP et de NADPH produits. Cette voie n'oxyde pas, ne consomme pas, d'eau . Elle ne produit pas non plus de NADPH, mais permet de constituer un gradient de protons et permet de produire de l'ATP seul.

9.7 **a** et **c**. La voie des pentoses phosphates est une voie complexe qui détourne le glucose de la voie glycolytique en l'oxydant directement à l'aide de $NADP^+$, ce qui permet la production de pouvoir réducteur NADPH. C'est une voie complémentaire de la glycolyse.

9.8 **a** et **b**. Les acides alpha-cétoniques sont obtenus par désamination des acides alpha-aminés. Et la réaction inverse est une amination qui permet de produire un acide aminé. Ces acides sont très fréquents dans le métabolisme intermédiaire : l'acide pyruvique, produit de la glycolyse est un acide alpha-cétonique. Ce ne sont pas du tout des poisons.

9.9 **b** et **c**. Malgré son nom, la photorespiration n'implique pas la lumière. La photorespiration est une voie complexe qui fait intervenir trois organites cellulaires : les mitochondries, les peroxysomes et les chloroplastes. Elle débute par le fonctionnement en oxydase de la RubisCo (au lieu de l'activité carboxylase). Elle contribue à baisser le rendement de la photosynthèse, mais permet, *via* le peroxysome et la mitochondrie de produire des acides aminés.

9.10 **c**. Héritage de leur ancêtre procaryote, les mitochondries hébergent un matériel génétique dont l'expression participe au fonctionnement de l'organite. Cette expression n'est pas suffisante et exige la participation de produits de l'expression de gènes du noyau, mais l'expression des gènes mitochondriaux reste autonome.

Chapitre 10

Le cytosquelette des eucaryotes

Objectifs

Le cytosquelette s'observe dans presque toutes les cellules où il sert à la fois de charpente, de rails, d'organe de locomotion...

Chez les eucaryotes, les filaments du cytosquelette peuvent être fins, intermédiaires ou épais selon l'unité de base de ces assemblages protéiques supramoléculaires.

L'assemblage et les propriétés de chaque fibre permettent de comprendre la diversité des structures du cytosquelette. Les fonctions de déplacement (moteurs moléculaires, contraction musculaire, motilité) du cytosquelette eucaryote seront principalement développées.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 117 Différents filaments pour structurer la cellule

Toutes les cellules, aussi bien archées, eubactéries, eucaryotes, contiennent des fibres, parfois rigides, parfois résistantes qui affectent la forme et l'organisation intracellulaire. Ces éléments du cytosquelette peuvent être des assemblages de sous-unité globulaires, ou des protéines filamenteuses. Mieux décrits chez les eucaryotes, ils sont également découverts chez les bactéries et les archées depuis les années 1990. Les fonctions conservées du cytosquelette eucaryote ou procaryote sont d'intervenir dans la morphologie cellulaire, la division cellulaire et la ségrégation du matériel génétique.

1. Natures des fibres du cytosquelette eucaryote

Il existe trois types de fibres qui forment des réseaux interconnectés. Toutes ces fibres proviennent de l'association de sous-unités par des liaisons non covalentes. La longueur des fibres augmente par polymérisation des sous-unités, mais elle peut également diminuer par dépolymérisation. En effet les structures formées par le cytosquelette peuvent être stables ou bien dynamiques, et elles sont finement régulées par la cellule. Les éléments rigides servent de charpente pour les cellules dépourvues de paroi ou encore de squelette permettant les mouvements internes et les déplacements.

Les microtubules sont des tubes creux de 25 nm de diamètre constitués de tubuline, majoritairement consacrés au transport interne. Les microfilaments d'actine sont des tubes pleins qui peuvent former des réseaux ramifiés. Les filaments intermédiaires sont des « cordes » tressées à partir de protéines filamenteuses variables selon le type cellulaire.

Tableau I : Comparaison des fibres du cytosquelette

	Microtubules	Microfilaments	Filaments intermédiaires
Abréviation	MT	MF	FI
Diamètre	24 nm	5-9 nm	8-10 nm
Monomère	Tubuline α et β	Actine	Vimentine, desmine, kératine, lamine
Forme du monomère	Globulaire	Globulaire	Filamenteux
Nucléotide associé	GTP	ATP	-
Énergie pour la polymérisation	Oui	Oui	Non
Extrémité polarisée	Oui	Oui	Non
Structure	Stable ou dynamique	Stable ou dynamique	Stable
Homologue procaryote	FtsZ (anneau Z), TubZ	MreB, ParM, FtsA	Crescentine, CdvABC

La constitution de ces fibres à partir de sous-unités en fait des structures résistantes et adaptables. *In vitro*, la polymérisation dépend de la concentration en monomère qui doit dépasser un seuil pour qu'une nucléation soit possible. La dépolymérisation *in vitro* est obtenue en diminuant la concentration du monomère (par dilution par exemple), il y a donc un équilibre entre la forme soluble et la forme fibreuse. *In vivo*, la croissance ou la décroissance des fibres sont contrôlées par des protéines associées. Ces protéines régulent la stabilité, l'agencement ou les interactions des fibres du cytosquelette et déterminent ainsi sa fonction.

2. Localisation et types de fonction des fibres du cytosquelette

Les fibres du cytosquelette servent d'ossature dynamique et déterminent l'architecture et la forme de la cellule. Le réseau d'actine du cortex cellulaire notamment est une charpente sur laquelle repose la membrane plasmique, alors que les filaments intermédiaires de lamine soutiennent l'enveloppe nucléaire. Le cytosquelette permet les mouvements de la membrane plasmique associés à l'endocytose, la phagocytose ou à la motilité cellulaire.

Fiches 101, 183

Le cytosquelette constitue également un réseau de rails internes, en particulier avec les microtubules qui permettent le positionnement et le transport des organites. Il est fortement impliqué dans la division cellulaire, autant pour la séparation des chromosomes que la séparation en deux cellules.

Fiches 100, 137

Enfin, il assure la cohésion avec les cellules voisines *via* des jonctions étanches et avec la matrice extracellulaire *via* des jonctions d'ancrage. Il permet ainsi la résistance aux agressions mécaniques.

Fiche 145

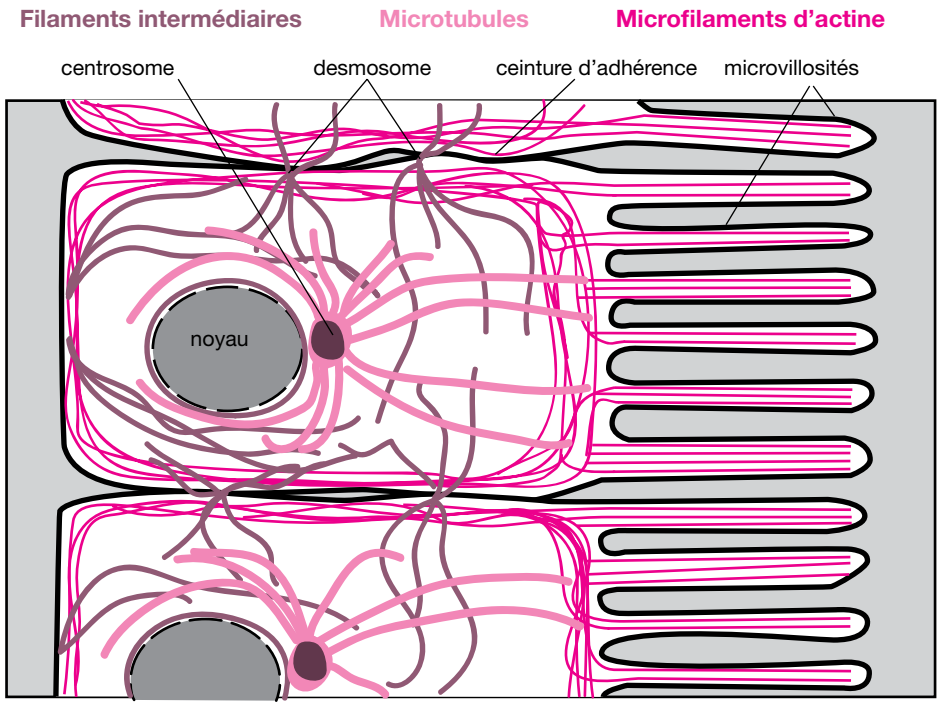


Figure 1 : Aperçu du cytosquelette d'une cellule épithéliale

fiche 118

Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FI) sont typiques des cellules animales, notamment des cellules différenciées subissant des contraintes physiques. Ce sont des assemblages de protéines fibreuses dont la nature dépend du type cellulaire. Il est par exemple possible de déduire l'origine d'une métastase tumorale selon le type de FI exprimées.

D'un diamètre moyen de 10 nm, ces fibres sont très résistantes et permettent la stabilisation mécanique des cellules ou des édifices intracellulaires. Elles forment un réseau qui entoure le noyau et s'étend jusqu'aux membranes. Leur localisation est parfois superposable à celle des microtubules mais ce sont des fibres plutôt stables et peu sensibles aux agents chimiques.

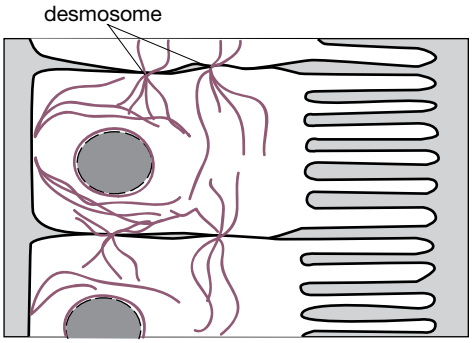


Figure 1 : Localisation des filaments intermédiaires

1. Les protéines des filaments intermédiaires

Plus de 65 gènes codent pour des protéines des filaments intermédiaires regroupées en 5 groupes.

Groupe I et II : les kératines

Il s'agit d'une grande famille de protéines de structure des cellules épithéliales. On distingue les kératines alpha chez les mammifères et beta chez les reptiles et les oiseaux. Chez les mammifères, les exokératines sont produites par les kératinocytes et les follicules pileux et produisent la couche cornée et les poils. La cytokératine est présente dans tous les épithéliums et participe aux jonctions de type desmosomes ou hémidesmosomes qui assurent la cohésion des cellules entre elles et avec la lame basale. Les kératines acides forment le groupe I et les kératines neutres ou basiques forment le groupe II.

Fiches 145, 148, 168

Groupe III : un groupe diversifié

Le groupe III est plus diversifié. Par exemple la vimentine est exprimée dans les cellules conjonctives où elle maintient la position des organites. La desmine est présente dans les cellules musculaires lisses et striées. Dans ces dernières, elle participe avec d'autres FI aux stries Z qui permettent de coordonner les contractions des myofibrilles.

Fiche 124

Groupe IV : protéines des neurofilaments

Les protéines L, M et H des neurofilaments sont spécifiques des neurones. Elles participent à la rigidité des prolongements neuronaux et à leur architecture filiforme. D'autres protéines des FI sont présentes dans le système nerveux : la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) dans les astrocytes et les cellules gliales, la nestine dans les cellules souches nerveuses.

Groupe V : Lamines

Les lamines A, B et C sont présentes dans toutes les cellules animales et forment un nucléosquelette qui soutient l'enveloppe nucléaire.

2. L'auto-assemblage des filaments intermédiaires

Toutes les protéines des FI sont constituées d'extrémités globulaires et d'une partie centrale hélicoïdale en bâtonnet. Les monomères s'associent en dimères parallèles, enroulés l'un autour de l'autre (N et C du même côté), puis en tétramères anti-parallèles de 70 nm légèrement décalés. Une succession de tétramères forme un protofilament, il en faut huit pour constituer un filament intermédiaire. L'élongation des FI se fait par ajouts de tétramères.

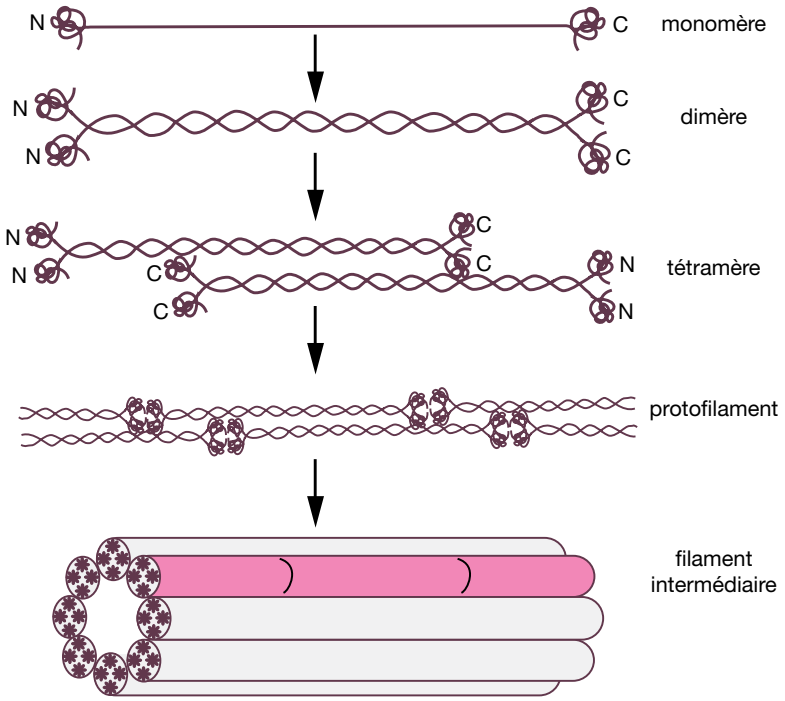


Figure 2 : Organisation moléculaire des filaments intermédiaires

Tous ces assemblages se font par des liaisons faibles et ne nécessitent pas de conversion d'énergie. Les monomères sont tressés ensemble comme une corde ce qui donne à l'ensemble une très grande résistance à l'étirement.

fiche 119 Les tubulines et l'assemblage dynamique des microtubules

Les tubulines sont des protéines d'environ 50 kDa constituées de deux domaines reliés par une hélice α. Les dimères de tubuline sont l'unité de base des microtubules (MT).

1. Assemblage de tubuline en microtubules

La famille des tubulines comprend cinq types de protéines très similaires dont les tubulines α et β, majoritaires, qui polymérisent pour former des tubes rigides appelés microtubules (MT). Les tubulines α et β sont associées en hétérodimères et chacune peut se lier au GTP. Les hétérodimères αβ liés au GTP s'accrochent par leurs extrémités en protofilaments. Plusieurs protofilaments s'associent latéralement en feuillet. Celui-ci se referme en tube creux de 13 protofilaments.

Le GTP des α-tubulines est alors tourné vers l'intérieur non accessible, alors que celui des β-tubulines est exposé à l'extérieur et peut être hydrolysé après l'incorporation. Le GDP reste alors associé tant que l'hétérodimère est inclus dans un MT. En cas de dépolymérisation, les hétérodimères libèrent le GDP et se rechargent en GTP.

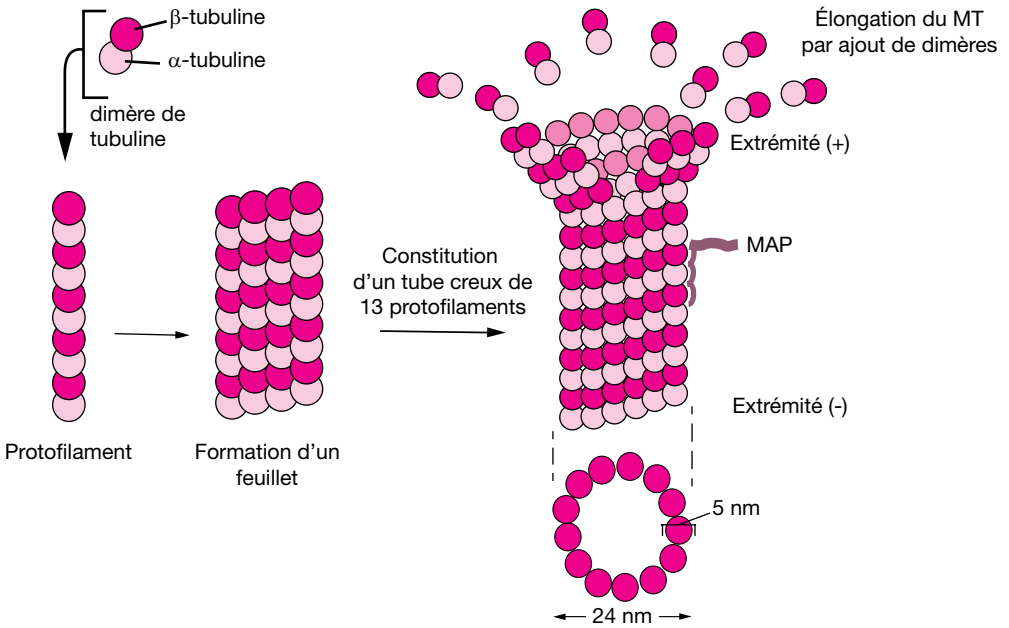


Figure 1 : Assemblage des microtubules

Le filament est polarisé, l'extrémité (-) du MT se termine par une rangée d'α-tubuline et l'extrémité (+) se termine par une rangée de β-tubulines. Le MT s'allonge par ajout d'hétérodimères αβ.

2. Nucléation et élongation des microtubules

L'étape limitante pour la formation des MT est la nucléation. *In vitro*, elle se produit seulement au-delà d'une concentration critique et requiert du Mg^{2+}. *In vivo*, elle a lieu au niveau de centres organisateurs des MT (COMT). On y trouve la γ-tubuline faisant partie d'un complexe (γ*Tubulin Ring Complex*, γTuRC) dont la conformation sert de gabarit au microtubule en construction.

Fiche 120

L'élongation des MT dépend de la concentration en tubuline. La présence de GTP accessible sur les sous-unités β à l'extrémité (+) accélère la vitesse de croissance. C'est pourquoi l'extrémité (+) s'allonge bien plus rapidement que l'extrémité (-). Lorsqu'il y a abondance de tubuline soluble, la polymérisation est rapide et l'hydrolyse du GTP est plus lente que l'ajout des hétérodimères αβ. Une coiffe de GTP se forme alors à l'extrémité (+). Cette coiffe favorise l'élongation du MT. Lorsque la concentration en d'hétérodimères de tubuline diminue, la vitesse de polymérisation diminue et tous les GTP sont hydrolysés en GDP.

Les sous-unités GDP-tubuline à l'extrémité du MT sont instables et favorisent une dépolymérisation rapide appelée « catastrophe ». Il peut ensuite y avoir « sauvetage », c'est-à-dire à nouveau polymérisation du même MT, par incorporation d'hétérodimères rechargés en GTP. Ces cycles de polymérisation / dépolymérisation contribuent à l'instabilité dynamique des MT. L'instabilité dynamique permet aux MT d'explorer l'espace à la recherche de sites de fixation, et permet à la cellule d'adapter très rapidement son cytosquelette.

3. Protéines de régulation des microtubules

In vivo, de nombreuses protéines régulent la vitesse de polymérisation ou de dépolymérisation des MT, ou encore la fréquence des catastrophes.

Les MAP (*Microtubule Associated Proteins*) sont des protéines de stabilisation ou d'accroissement de la vitesse de polymérisation. MAP2 et Tau, par exemple, sont spécifiques des neurones. Elles possèdent une partie C-terminale d'attachement aux MT, et une partie N-terminale qui peut interagir avec d'autres partenaires. Leur association aux MT est modulée par des phosphorylations. Des hyperphosphorylations de Tau sont responsables de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, d'où le terme de « Tauopathies ».

Au contraire des MAP, les facteurs de catastrophe comme la stathmine déstabilisent les MT et augmentent l'instabilité dynamique.

Des drogues peuvent également être administrées. Certaines piègent les hétérodimères de tubuline et empêchent ainsi la polymérisation des MT (colchicine, vinblastine). Le taxol au contraire forme un manchon autour du MT, ce qui empêche sa dépolymérisation et fige notamment le fuseau mitotique. Ces drogues sont donc anti-mitotiques et sont utilisées comme médicaments anti-cancéreux.

Fiche 207

fiche 120 Les structures associées aux microtubules

En fonction de leur association ou non avec des protéines stabilisatrices comme les MAP (*Microtubule Associated Protein*), les microtubules (MT) sont des structures labiles et hyperdynamiques, ou au contraire stables. Ils peuvent atteindre la longueur de la cellule et constituent une armature rigide servant de rails de transport ou de charpente cellulaire.

1. Structures labiles

Dans la cellule en interphase, les MT labiles sont répartis dans tout le cytoplasme et rayonnent à partir du centre organisateur des microtubules (COMT). Les extrémités (-) des MT sont enchâssés dans le COMT et les extrémités (+) s'allongent vers la membrane plasmique. Dans les cellules nerveuses, ils contribuent à l'architecture filiforme de l'axone, en collaboration avec les filaments intermédiaires. Ces structures servent de rails de transport pour les vésicules et les organites.

Fiche 100

Les MT sont aussi l'un des éléments du fuseau mitotique. Les MT du kinetochore assurent la traction des chromosomes. Les MT astraux et polaires permettent la mise en place du fuseau puis la séparation des cellules filles.

Fiche 137

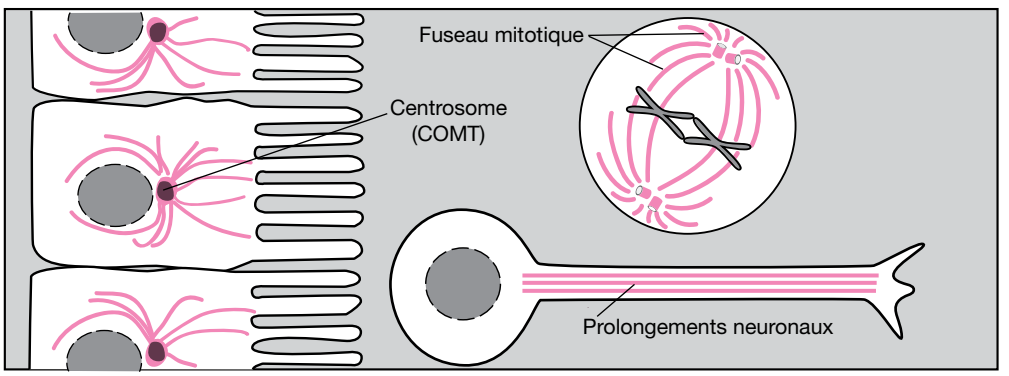


Figure 1 : Les structures cellulaires labiles de microtubules

2. Structures stables

Ces structures complexes contiennent un grand nombre de MAP qui créent ou renforcent les liens entre les MT.

Centre organisateur des microtubules (COMT)

Présent dans toutes les cellules eucaryotes, il est mal défini pour les cellules végétales. Pour les cellules animales, il s'agit du centrosome qui est positionné près du noyau au centre de la cellule. Le centrosome contient une ou deux paires de centrioles selon les phases du cycle cellulaire et il est entouré d'un nuage de matières péricentriolaires. Des anneaux de γ-tubuline associés à d'autres protéines (γTuRC, γ-*Tubuline Ring Complex*) permettent la nucléation des MT qui s'y accrochent par leurs extrémités (-). Les centrioles sont composés de neuf triplets de MT, disposés en roue de charrette et reliés par des fibres encore mal identifiées.

Fiche 136

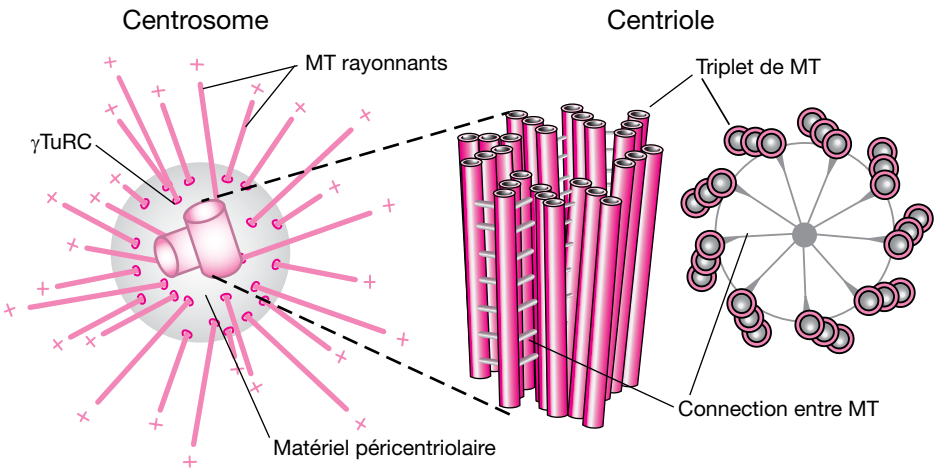


Figure 2 : Organisation d'un centrosome et d'un centriole

Le corpuscule basal à la base des cils et flagelles est aussi un COMT. Sa structure est proche d'un centriole, l'un pouvant évoluer en l'autre et réciproquement.

Cils et flagelles

Les cils, courts et très nombreux, et les flagelles, longs et isolés, ont des structures similaires à la surface des cellules. Leur base est constituée d'un corpuscule basal où prennent naissance neuf doublets de MT périphériques et un doublet de MT centraux, l'ensemble constituant l'axonème ciliaire.

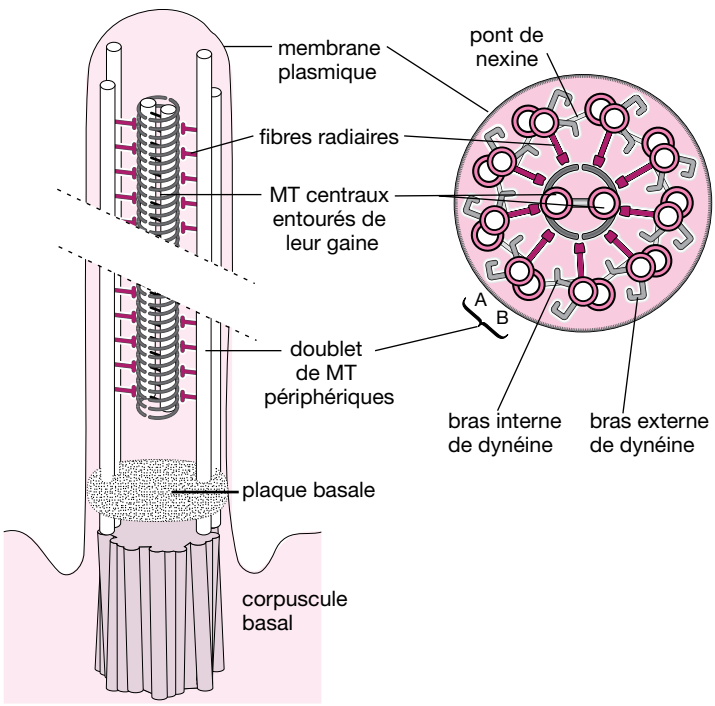


Figure 3 : Schéma d'un cil et de son axonème

D'après M.-C. Descamps, *Biologie cellulaire-UE2*, Dunod, 2010.

Les doublets de MT périphériques voisins sont reliés par des moteurs associés aux MT, les dynéines. Le glissement relatif des MT permettra le mouvement de ces cils et flagelles.

Fiche 122

fiche 121

Les microfilaments d'actine

Fiche 123

Fiche 136

Les microfilaments d'actine (MF) sont les éléments les plus fins du cytosquelette avec un diamètre de 5 à 9 nm. Ce sont des fibres pleines, flexibles et dynamiques qui sont abondantes dans les cellules, et en particulier les myocytes où elles constituent l'appareil contractile. En dehors du muscle, les MF sont présents sous forme de structure stable dans les microvillosités et sous forme de structures labiles dans le cortex cellulaire, les extensions de la membrane plasmique tels que les lamellipodes, ou encore l'anneau contractile lors de la mitose. Leur agencement est régulé par des protéines associées qui déterminent donc le rôle de ces microfilaments, le plus souvent en lien avec les déplacements ou la forme de la cellule.

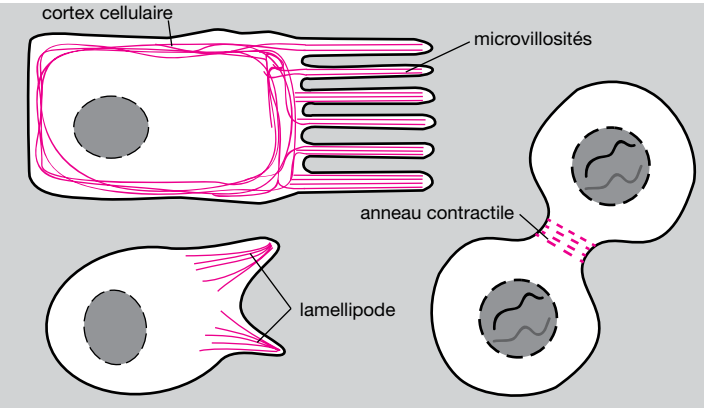


Figure 1 : Structures cellulaires impliquant les microfilaments d'actine

1. L'assemblage des microfilaments d'actine

L'actine représente 1 à 5 % des protéines cellulaires (jusqu'à 10 % dans les muscles). Il existe des actines alpha, beta et gamma qui ont plus de 90 % d'identité de séquence, l'α-actine étant celle de l'appareil contractile du muscle. L'actine globulaire (actine G) polymérise en présence d'ATP et de Mg^{2+} pour former des microfilaments ou actine F. Ce filament est polarisé, avec une extrémité (+) parfois appelée « barbelée » et une extrémité (-) dite « pointue ».

La nucléation est l'étape limitante pour la formation d'un MF. Lorsque la concentration en actine G liée à l'ATP est suffisante, un noyau se forme. L'élongation est ensuite très rapide à l'extrémité (+) et beaucoup plus lente à l'extrémité (-). Elle dépend de la concentration en actine G disponible. *In vivo*, des complexes de nucléation comme Arp2/3 (*Actine related protein*) facilitent l'étape initiale.

Après leur incorporation au filament, les monomères hydrolysent leur ATP. L'ADP reste associé tant que le monomère est inséré dans le MF. Les monomères d'ADP-actine ont tendance à se détacher des extrémités, ce qui conduit à une instabilité dynamique. Les sous-unités d'ADP-actine libérées par la dépolymérisation de l'extrémité (-) sont rechargées en ATP dans le cytosol et peuvent être ré-incorporées. Pour une concentration optimale d'ATP-actine soluble de l'ordre de 0,1 µM, les sous-unités s'ajoutent à

l'extrémité (+) et se détachent à l'extrémité (-) à la même vitesse. Le MF avance à la façon d'un tapis roulant tout en conservant une longueur totale fixe.

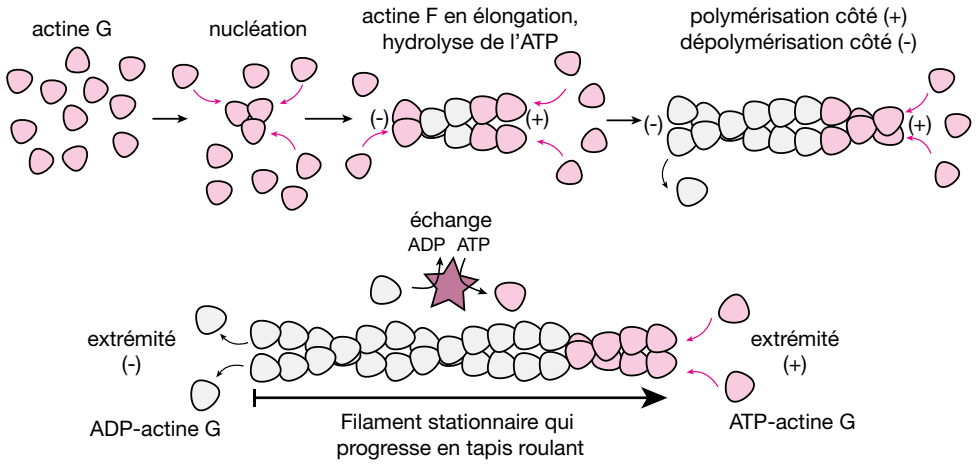


Figure 2 : Assemblage des microfilaments d'actine

2. Les protéines associées à l'actine

De très nombreuses drogues agissent sur les MF. Par exemple la cytochalasine D empêche sa polymérisation alors que la phalloïdine empêche la dépolymérisation. *In vivo*, plusieurs centaines de partenaires sont connus et classés par type de fonctions.

Les protéines de réticulation ou de pontage

Elles sont responsables de l'agencement des fibres d'actine F. Dans les microvillosités, la fimbrine permet d'espacer les MF en faisceaux parallèles. Dans les lamellipodes ou le réseau du cortex cellulaire, l'actine F forme un maillage lâche interconnecté par la filamine. Dans les faisceaux contractiles des sarcomères, de l'anneau mitotique, des fibres de tension ou des ceintures d'adhérence, c'est l'α-actinine qui permet l'alternance de filaments de polarité opposée.

Les protéines d'ancrage à la membrane

Elles relient le cytosquelette d'actine aux jonctions étanches (protéines 70), aux jonctions d'ancrage (taline, vinculine, caténine) ou participent à la résistance de la membrane (spectrine).

Fiche 145

Les protéines de coiffe, de stabilisation et de fragmentation

Les protéines de coiffe (CapZ ou tropomoduline) se fixent aux extrémités et empêchent l'ajout ou le retrait de sous-unités alors que les protéines de stabilisation (tropomyosine) protègent et consolident le MF en se fixant tout autour. D'autres comme la gelsoline fragmentent au contraire le MF.

Les protéines qui modifient la vitesse d'élongation

En agissant sur l'accessibilité des sous-unités, la profiline accélère l'élongation alors que la thymosine la ralentit.

fiche 122 Moteurs protéiques et mouvements intracellulaires

Les moteurs moléculaires sont des enzymes qui transforment l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique induisant un changement de conformation, ce qui permet un déplacement sur des rails. Les rails peuvent être des microtubules (MT) ou des microfilaments d'actine (MF).

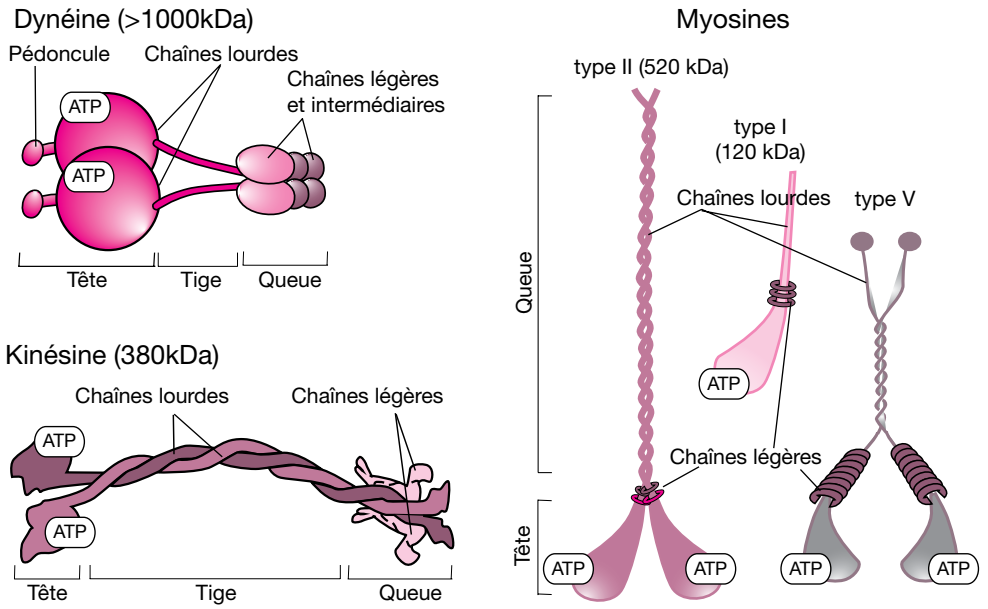


Figure 1 : Les principaux moteurs moléculaires

1. Les moteurs associés à l'actine

Ce sont les myosines, dont il existe 17 familles chez les eucaryotes. Une chaîne lourde contribue à former une queue et une tête qui est le domaine moteur. La tête possède un site de fixation à l'actine et à l'ATP. Plusieurs chaînes légères se lient au niveau de la transition tête/queue et participent à réguler la myosine. Par exemple, dans les cellules non musculaires, une chaîne de calmoduline détecte le calcium et permet la fixation à l'actine. Selon les classes, la queue peut s'associer à des vésicules pour les tracter le long des MF. Toutes les myosines sauf la VI vont vers l'extrémité (+) du MF.

La myosine II, ou myosine conventionnelle, est un dimère, elle a donc 2 têtes et peut s'associer par sa queue en filament bipolaire. Elle est présente dans l'appareil contractile des cellules musculaires, mais aussi dans d'autres cellules où elle participe à des faisceaux contractiles transitoires. Le mécanisme moléculaire du déplacement des myosines sur le MF sera illustré plus loin.

Fiche 124

2. Les moteurs associés aux microtubules

Deux moteurs permettent de tracter des organites et des vésicules le long des MT. Les kinésines sont spécialisées dans le transport antérograde, vers l'extrémité (+), alors que

les dynéines permettent le transport rétrograde, vers l'extrémité (–) des MT, généralement à proximité du centre organisateur des MT (COMT).

Les kinésines sont composées de deux chaînes lourdes constituant la tête et la tige, et de deux chaînes légères formant la queue. La tête contient les sites de liaison à l'ATP et au MT, la queue permet l'accrochage aux vésicules. Les dynéines sont des complexes macromoléculaires de plus de 10^3 kDa composés de deux chaînes lourdes et de plusieurs chaînes légères et intermédiaires. La chaîne lourde forme un pédoncule permettant l'accrochage au MT, la tête permet la fixation de l'ATP et la queue s'accroche aux vésicules par l'intermédiaire de la dynactine.

Ces protéines fonctionnent de façon similaire en « marchant » grâce à leurs deux têtes sur les β-tubulines des MT. L'hydrolyse de l'ATP induit une semi-rotation qui fait progresser le moteur de 8 nm.

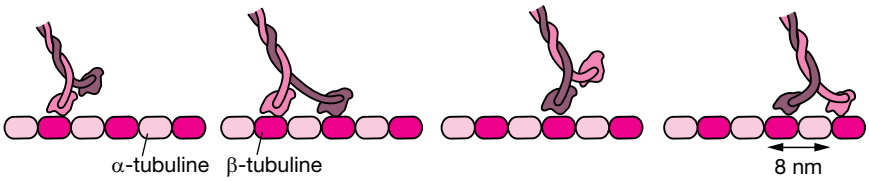


Figure 2 : Modèle de kinésine « marchant » sur un microtubule, en vue latérale

3. Mouvements intracellulaires

En dehors de la contraction musculaire, les faisceaux contractiles d'actine permettent la résistance aux agressions mécaniques *via* les ceintures d'adhérence et la traction sur la matrice extra-cellulaire *via* les fibres de tension. Au cours de la mitose, les MT permettent la séparation des chromosomes alors que les filaments d'actine permettent la cytodiérèse. Les moteurs moléculaires permettent enfin le positionnement des organites et le transport des vésicules et des molécules dans la cellule. Les vésicules peuvent être équipées de plusieurs moteurs pour se déplacer dans le sens rétrograde ou antérograde, sur des rails de MT ou de MF.

Fiche 136

Fiche 100

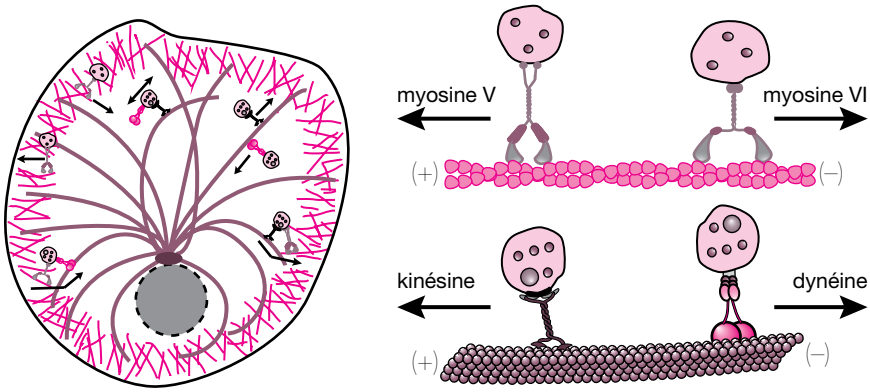


Figure 3 : Le transport des vésicules par les moteurs moléculaires

fiche 123 Le cytosquelette des cellules musculaires squelettiques

Les cellules musculaires (ou myocytes) squelettiques ont un cytosquelette hyperdéveloppé. Observées au microscope, elles présentent des alternances de bandes sombres et claires liées à la présence de l'appareil contractile organisé en myofibrilles parallèles sur toute la longueur de la cellule. D'où leur nom de cellules musculaires striées.

1. Les cellules musculaires striées

Les muscles squelettiques sont responsables des mouvements volontaires et de la posture de l'organisme. Ils sont reliés aux os par des tendons. Chaque muscle est organisé en plusieurs faisceaux musculaires, eux-mêmes constitués d'une cinquantaine de fibres musculaires, ou myocytes. Les fibres musculaires striées sont des syncytia résultant de la fusion de plusieurs cellules et contiennent donc plusieurs noyaux placés en périphérie. La formation des muscles et la transformation des myoblastes en myocytes ont lieu au cours du développement embryonnaire. La capacité de régénération des fibres musculaires est ensuite limitée au cours de la vie.

Fiches 167, 173

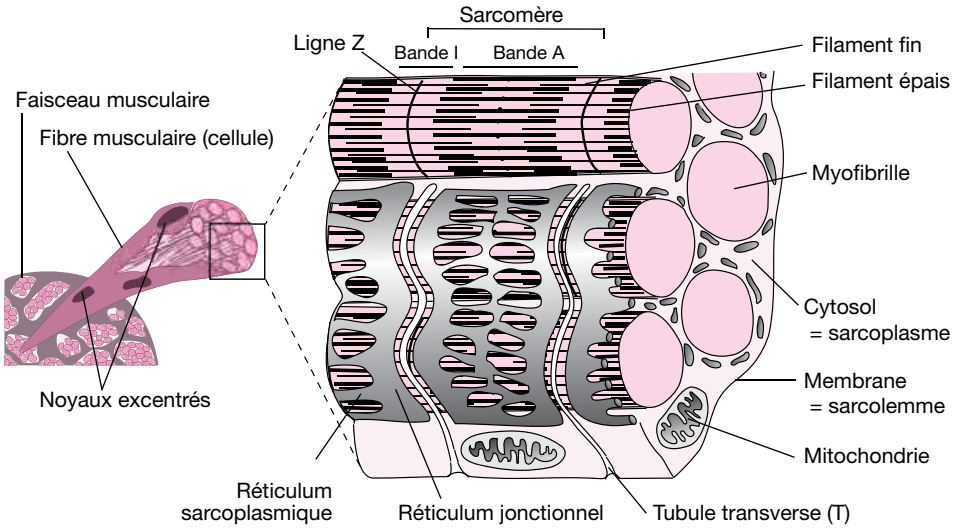


Figure 1 : Schéma de l'organisation d'une fibre musculaire striée

2. Organisation du cytosquelette dans le myocyte strié

Chaque fibre musculaire striée contient des milliers de myofibrilles, alignées longitudinalement dans la cellule. Ces myofibrilles sont les fibres contractiles constituées de répétitions de sarcomères, l'unité de base. L'agencement particulier en sarcomère est responsable de l'aspect strié de ces cellules au microscope. Les cellules musculaires lisses n'ont pas de sarcomères. Le sarcomère est constitué de filaments épais, de filaments fins et de fibres de structure. Il est délimité par deux lignes Z.

Les filaments épais sont des assemblages tête-bêche de 300 à 400 myosines II. Les têtes des myosines étant aux deux extrémités, ce filament est bipolaire. Une ligne M se

situe au centre, elle permet de relier les filaments épais entre eux et ainsi de structurer le sarcomère.

Les filaments fins sont des microfilaments d'α-actine associée à la tropomyosine, une protéine de stabilisation, et à la troponine. L'extrémité (+) des microfilaments est accrochée à un disque ou ligne Z *via* CapZ, protéine de coiffe. La ligne Z contient d'autres protéines associées à l'actine comme l'α-actinine, une protéine de réticulation, ou encore des filaments intermédiaires de desmine qui permettent de coupler les myofibrilles adjacentes.

Les filaments fins et épais sont maintenus en place par des protéines géantes : la nébuline (775 kDa) pour les filaments d'actine et la titine (3 817 kDa) pour les filaments de myosine. Ces protéines géantes sont ancrées dans un réseau de fibres de filaments intermédiaires et de protéines associées.

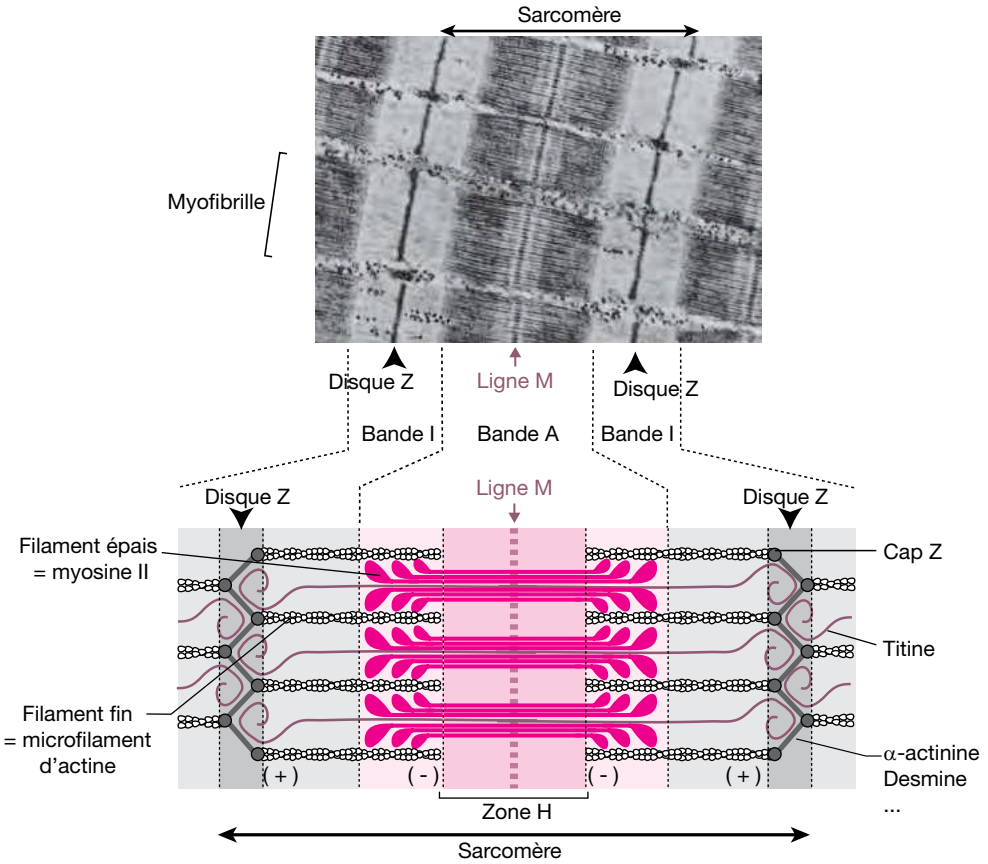


Figure 2 : Organisation d'un sarcomère

La γ-actine du cytosquelette sous-membranaire relie les myofibrilles au sarcolemme et à la matrice extra-cellulaire par des ponts entre les disques Z et les costamères. Ces derniers incluent des protéines cytosoliques et membranaires telles que le complexe associé à la dystrophine (DAG) et jouent un rôle important dans la stabilité mécanique des myocytes durant la contraction musculaire.

fiche 124 Le mécanisme de la contraction des cellules musculaires squelettiques

Les cellules musculaires squelettiques sont organisées en myofibrilles qui sont des répétitions de sarcomères. La contraction musculaire est la somme du raccourcissement de chacun des sarcomères. Sur une fibre musculaire de 50 cm contenant 100 000 sarcomères, le raccourcissement total peut atteindre 10 cm.

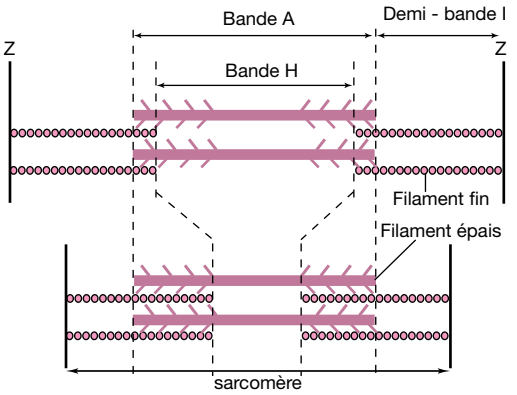


Figure 1 : Schéma du raccourcissement d'un sarcomère

La contraction d'un sarcomère a lieu par le glissement des filaments épais de myosine le long des filaments fins d'actine. Cela se produit après que la cellule musculaire ait reçu un signal d'un motoneurone.

Fiche 152

1. Couplage excitation –contraction

Chaque myocyte est innervé par un motoneurone au niveau d'une jonction neuromusculaire, ou plaque motrice. L'arrivée d'un potentiel d'action musculaire provoque une dépolarisation du sarcolemme qui se propage le long des tubules T et conduit à l'ouverture de canaux calcium potentiel-dépendant. Cette petite entrée de calcium provoque l'ouverture des canaux du réticulum sarcoplasmique et une libération massive dans le cytosol du calcium qui y était séquestré.

Fiche 123

Le calcium agit sur la troponine liée aux microfilaments d'actine (MF) et provoque ainsi un changement de conformation de la tropomyosine logée dans le sillon du MF. Le site de fixation de la myosine sur le MF devient accessible, des ponts d'acto-myosine se forment pour déclencher le glissement relatif des filaments. Le processus dure tant qu'il y a du calcium dans le cytosol. Le calcium est progressivement recapturé dans le réticulum sarcoplasmique par transport actif grâce à une pompe à calcium (calcium-ATPase).

Fiche 75

2. Mécanisme du glissement des ponts d'acto-myosine

La myosine est initialement liée à l'actine car le calcium a permis de dévoiler le site de liaison. Une molécule d'ATP se fixe sur la tête de myosine et la détache de l'actine.

Chaque cycle mécano-chimique consomme alors une molécule d'ATP :

- étape 1 : l'hydrolyse de l'ATP libère de l'énergie, emmagasinée par la myosine à la façon d'un ressort. L'ADP et le phosphate restent associés au site actif ;
- étape 2 : la tête de myosine forme un pont avec l'actine (pont transversal d'acto-myosine) ;
- étape 3 : l'énergie emmagasinée par la myosine est libérée par un changement d'orientation de la tête qui permet un glissement relatif de 10 nm des filaments. L'ADP et le phosphate sont alors libérés ;
- étape 4 : l'arrivée d'une autre molécule d'ATP rompt le pont d'acto-myosine et permet le début d'un nouveau cycle, tant qu'il y a du calcium dans le cytosol.

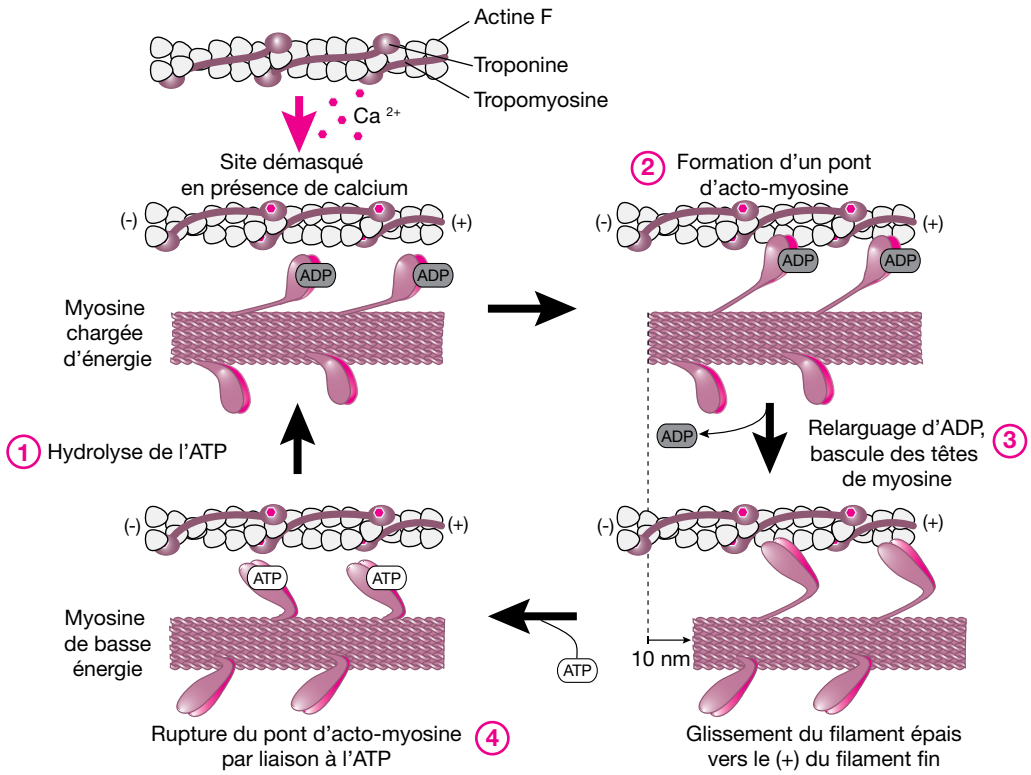


Figure 2 : Cycle de contraction actine-myosine

3. Production d'ATP dans les cellules musculaires striées

Toutes les fibres musculaires n'ont pas le même métabolisme. Les fibres rapides ont des isoformes de myosines qui hydrolysent très vite l'ATP (50 msec), la force développée est élevée. Si l'ATP y est produit par glycolyse, la fibre se « fatigue » rapidement lorsque le stock de glycogène est épuisé. Ce sont les fibres blanches responsables de mouvements brefs et intenses. Si l'ATP est produit par phosphorylation oxydative dans les mitochondries, les fibres sont appelées fibres rouges et se « fatiguent » lentement. Ces fibres rouges peuvent être des fibres rapides (endurance) ou des fibres lentes avec des isoformes de myosines hydrolysant plus lentement l'ATP (110 msec) et développant une force plus réduite (mouvements fins ou posture).

Fiches 106, 108

fiche 125 Cytosquelette et motilité cellulaire

Les différentes fibres dynamiques du cytosquelette permettent des modifications de la forme de la cellule et permettent ainsi la motilité cellulaire.

Il ne faut pas confondre motilité et mobilité. La motilité est la faculté, la possibilité de se déplacer. La mobilité est le fait, ou la facilité à se déplacer.

Ainsi bien que doué de motilité grâce à vos deux jambes, vous pouvez être immobile, en train de dormir par exemple… Pour les cellules, hormis le mécanisme de la contraction musculaire vu précédemment, deux stratégies sont principalement adoptées : nager ou ramper.

1. La nage grâce aux cils ou flagelles

Fiche 120

Les cils et les flagelles sont des structures à bases de doublets de microtubules (MT) formant l'architecture rigide de ces prolongements. La dynéine, moteur associé aux MT, est présente sur toute la longueur de ces MT. Si les doublets de MT étaient libres, l'action des dynéines serait de les faire coulisser les uns par rapport aux autres. Comme tous les doublets sont fixés par leur extrémité (-) au corpuscule basal, le glissement est transformé en courbure.

Fiche 122

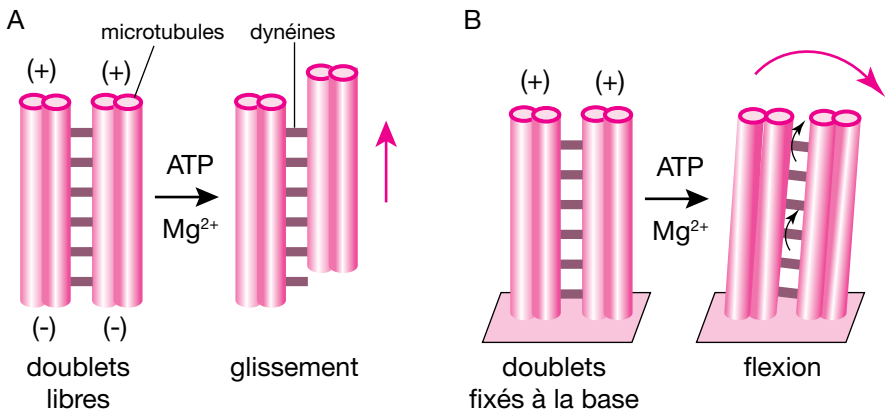


Figure 1 : Principe de la courbure des flagelles

La nage est donc provoquée par les mouvements ordonnés en deux dimensions des axonèmes des cils et des flagelles. Pour les cils qui sont très courts, le mouvement est un « coup de force » propulsant le liquide vers l'arrière avec un retour à la position initiale sans résistance au milieu. Pour le flagelle, le mouvement est une ondulation sinusoïde, plus semblable au battement d'un fouet.

Ces mécanismes permettent la motilité de cellules libres, mais les cils sont également présents sur des cellules immobiles, comme les épithéliums et servent alors à déplacer les liquides (mucus…).

2. La reptation grâce à la polymérisation d'actine

D'autres cellules adhérentes ou pas, dépourvues d'organites spécialisés pour la locomotion, privilégient une progression par adhérence et traction sur un support. Le support peut être la matrice extracellulaire, ou bien d'autres cellules.

La cellule qui perçoit un signal d'attraction (étape 1, figure 2) ré-arrange son cytosquelette d'actine sous-membranaire de façon à émettre une excroissance (étape 2). Selon la forme, il s'agit d'un filipode (pic en une dimension), un lamellipode (large extension plate, en deux dimensions) ou d'un pseudopode (en trois dimensions). La forme de cette protrusion dépend de l'organisation du réseau d'actine, qui est sous le contrôle de GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42). Le filipode correspond à des fibres d'actine en faisceaux parallèles (activation de Cdc42), le lamellipode ou le pseudopode à un maillage en treillis (activation de Rac). L'excroissance établit ensuite le contact avec un support et crée une jonction d'ancrage (étape 3). Grâce aux fibres de tension, des faisceaux contractiles labiles induits par Rho, une traction s'exerce sur le support (étape 4).

Fiche 132

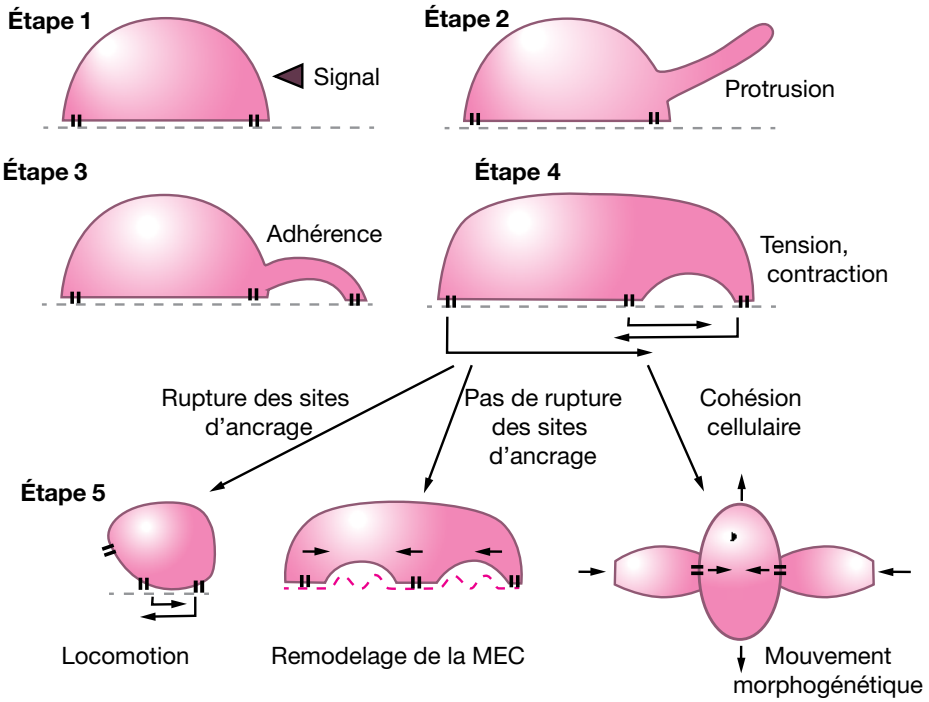


Figure 2 : Le cycle de reptation cellulaire

À la dernière étape du cycle, la queue de la cellule peut se détacher du support, ce qui lui permet de ramper. Si l'ancrage se maintient, c'est la matrice extracellulaire qui peut être remodelée, comme dans la cicatrisation. Enfin, si la cellule continue d'adhérer à ses voisines, il se produit des mouvements cellulaires d'ensemble, tels que ceux nécessaires pendant l'embryogenèse.

Fiche 160

fiche 126

La cryomicroscopie électronique

Pour être observé en microscopie électronique à transmission conventionnelle, un échantillon biologique doit subir de nombreux traitements. La fixation des échantillons par des produits chimiques provoque des réarrangements moléculaires. La déshydratation induit l'agrégation du matériel. De plus, pour augmenter le contraste de l'image, il est d'usage d'utiliser des sels de métaux lourds. Il en résulte que ce que l'on observe est le dépôt d'agents contrastants sur du matériel déshydraté et agrégé.

Dès les années 1960, des tentatives sont faites pour immobiliser les échantillons par le froid. Ces essais se sont cependant longtemps avérés infructueux, la formation de cristaux de glace pendant la congélation de l'échantillon se traduisant par une dégradation de l'ultrastructure des cellules.

1. Formation d'eau vitreuse par congélation rapide

En congelant très rapidement un échantillon (1/10 000 de seconde !) il s'est avéré dans les années 1980, sous l'impulsion de J. Dubochet, chercheur Suisse au sein du laboratoire Européen de biologie moléculaire basé à Heidelberg, qu'il était possible de solidifier un échantillon avant que la glace ne se forme. Mais cette possibilité d'obtenir de l'eau vitreuse n'est possible que pour des échantillons de petite taille (inférieur à 0,2 µm). Elle permet néanmoins d'étudier maintenant des virus ou des complexes macromoléculaires sous leur forme native avec une résolution proche de la résolution atomique.

Pour pallier cet inconvénient, des instruments ont été développés qui autorisent la congélation sous haute pression. Ainsi, avec une pression de 2 000 bars, il est possible de congeler des échantillons sous forme vitreuse jusqu'à 200 µm d'épaisseur. La figure montre ainsi les images obtenues sur des sections de cellules réalisées de la sorte et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission équipé d'un système permettant de maintenir l'échantillon congelé.

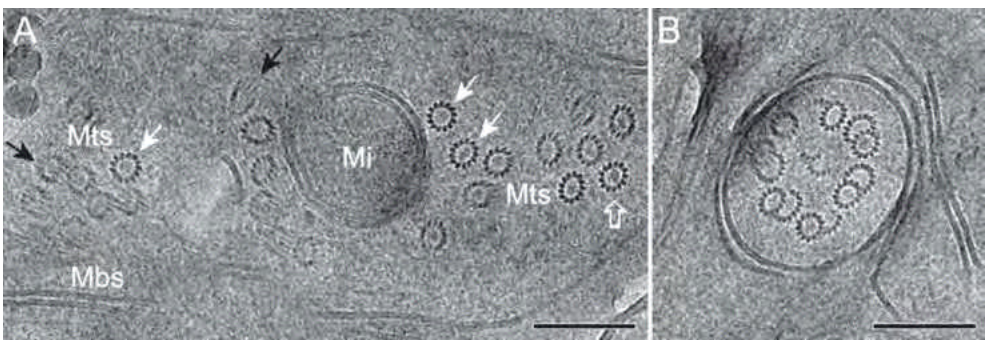


Figure 1 : Microtubules observées dans des sections vitrifiées de neurones d'hippocampe de rat. In *Biology of the Cell*, 2007, vol. 99 pp. 45-53

2. La microscopie corrélative

L'observation d'échantillons hydratés en microscopie électronique offre la possibilité de créer un continuum avec la microscopie photonique (optique).

Réussir à appliquer sur un même échantillon ces deux technologies est un nouveau développement appelé microscopie corrélative ou CLEM (pour *Correlative Light and Electron Microscopy*). Elle permet de mettre en relation une fonction (microscopie photonique) et une structure (microscopie électronique).

Elle fait appel à des technologies permettant le transfert des échantillons d'une modalité d'imagerie à l'autre et des outils informatiques adaptés au traitement des informations issues des microscopes.

3. La tomographie en cryomicroscopie électronique

La tomographie consiste à reconstruire un volume 3D à partir des images de projection 2D enregistrées sous différents angles. Il s'agit maintenant d'une méthode classique de biologie structurale qui nécessite néanmoins de nombreux traitements mathématiques. Il est en effet nécessaire de multiplier les échantillons pour avoir la vision globale de l'organite ou du complexe macromoléculaire que l'on étudie. C'est Joachim Frank, à l'université de Columbia (USA) qui développe les méthodes de traitement des images permettant de compiler des images 2D afin d'obtenir une image 3D de haute résolution. Ce travail permet à Richard Henderson, au Medical Research Center de Cambridge, de publier en 1990 la structure d'une protéine à l'échelle atomique. Ces deux chercheurs recevront, avec Jacques Dubochet, le prix Nobel de chimie en 2017.

4. La cryosubstitution permet de réaliser des immunomarquages

Les échantillons obtenus par congélation peuvent être observés directement pour étudier leur structure. Il est cependant nécessaire de travailler en permanence à basse température. De plus, il n'est pas possible dans ces conditions de réaliser des immunomarquages.

Fiche 198

Actuellement la cryosubstitution est considérée comme un bon compromis pour étudier un échantillon bien préservé à température ambiante.

Brièvement, cette technique consiste à substituer l'eau de l'échantillon vitrifié maintenu à -90 °C par de l'acétone puis de l'acétone mélangée à une résine qui polymérise à basse température sans provoquer de redistribution de matériel.

FOCUS Les myopathies, des pathologies du cytosquelette

Les myopathies sont des maladies neuromusculaires dans lesquelles les muscles sont atrophiés. Ce sont des maladies dégénératives, c'est-à-dire qui s'aggravent progressivement. Parmi les très nombreuses formes de myopathies, la majorité sont génétiques et touchent des éléments du cytosquelette. Trois familles de maladies peuvent être prises en exemple : les desminopathies, les laminopathies et les dystrophinopathies.

Les maladies qui touchent la desmine, ou desminopathies, peuvent être liées à des mutations de cette protéine ou bien de l'une de ses protéines associées comme l'α-B-crystalline. Ces maladies ont été décrites depuis 1994 et font parties du groupe des myopathies myofibrillaires. La desmine est la principale fibre de filament intermédiaire présente dans les muscles de tous types. Elle interagit avec de nombreux partenaires, notamment au niveau des disques Z, pour constituer un réseau entre l'appareil contractile et les autres éléments structuraux de la cellule. Les desminopathies touchent surtout des adultes. Elles se manifestent par une désorganisation des myofibrilles et la formation d'agrégats insolubles, cela conduisant à une faiblesse des muscles squelettiques et cardiaques.

Les lamines sont également des protéines des filaments intermédiaires. Elles sont présentes au niveau de la partie interne de l'enveloppe nucléaire de toutes les cellules et sont associées entre autres aux complexes des pores nucléaires et à la chromatine. Depuis 1999, une douzaine de syndromes ont été reliés à des mutations de la lamine A (LMNA), comme des dystrophies musculaires, des cardiomyopathies, des lipodystrophies ou certaines formes de progéria (vieillissement accéléré). Dans le cas des cardiomyopathies, les mutations de LMNA ou de protéines associées comme l'émerine conduisent à une activation de la voie de signalisation des MAP kinases, par un mécanisme qui reste encore totalement à explorer.

Les dystrophinopathies sont les plus fréquentes des dystrophies musculaires chez l'enfant. Elles regroupent les myopathies de Duchenne (DMD, létale autour de l'âge de 20 ans) et de Becker (BMD, moins sévère) et des cardiomyopathies liées à l'X (XL-DCM) qui ont toutes pour point commun des mutations du gène de la dystrophine, identifié en 1986. Cette énorme protéine du cytosquelette membranaire (427 kDa) permet de relier la matrice extracellulaire, les lipides du sarcolemme et le réseau de γ-actine. Elle joue un rôle dans la résistance mécanique des fibres musculaires aux cycles successifs de contraction et d'élongation. La myopathie de Duchenne touche 1 garçon sur 3 500. Elle fait l'objet de recherches intenses qui ont conduit à des essais de thérapies cellulaires et de thérapies géniques. Néanmoins la compréhension du mécanisme d'action de la dystrophine à l'échelle moléculaire est encore très imcomplète.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

10.1 À propos du cytosquelette, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il s'assemble spontanément par polymérisation spontanée d'éléments monomériques
- ☐ b. Il s'assemble grâce à l'énergie de l'ATP
- ☐ c. Il s'assemble grâce à l'énergie d'un nucléotide
- ☐ d. Il est constitué de polymères protéiques

10.2 À propos du cytosquelette, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il est abondant dans la matrice extracellulaire
- ☐ b. Il forme un squelette statique dans le cytoplasme cellulaire
- ☐ c. Il est indispensable à la prolifération cellulaire

10.3 À propos des filaments intermédiaires, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Les monomères varient selon le type cellulaire
- ☐ b. Ce sont des structures dynamiques
- ☐ c. Ils ont un rôle essentiellement mécanique grâce à leur rigidité

10.4 À propos de la tubuline, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il existe plusieurs sortes de tubulines communes à toutes les cellules
- ☐ b. Elle s'assemble en protofilaments en présence d'ATP
- ☐ c. Elle s'assemble en fibres pleines

10.5 Quelles affirmations sont correctes ? Les microtubules sont impliqués dans :

- ☐ a. Le mouvement des cils et des flagelles
- ☐ b. La ségrégation des chromosomes au moment de la mitose
- ☐ c. Le déplacement de vésicules à l'intérieur de la cellule
- ☐ d. La contraction musculaire

10.6 À propos des microtubules, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Ils sont générés à partir du centrosome
- ☐ b. Ils possèdent une charge positive à une extrémité
- ☐ c. Ils présentent *in vivo* une instabilité dynamique à leur extrémité (–)

10.7 À propos des protéines motrices (ou moteurs moléculaires), quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Elles possèdent une activité ATPasique
- ☐ b. Elles convertissent de l'énergie mécanique en énergie chimique
- ☐ c. Elles avancent dans les deux sens sur les fibres du cytosquelette

10.8 À propos des filaments d'actine, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il est composé de l'assemblage de dimères d'actine G et d'actine F
- ☐ b. *In vivo*, les deux extrémités peuvent s'allonger
- ☐ c. Dans les cellules musculaires, toute l'actine est organisée en myofibrilles

Réponses

10.1 **d**. Les filaments intermédiaires ne sont pas liés à des nucléotides, et les dimères de tubulines sont liés au GTP/GDP.

10.2 **c**. Le cytosquelette est une structure dynamique à l'intérieur de la cellule. Les microtubules sont indispensables à la mitose, ainsi que les filaments d'actine pour les cellules animales.

10.3 **a**. Les filaments intermédiaires sont des assemblages stables, non polarisés, résistants mais flexibles.

10.4 **a**. Il existe des isoformes alpha, beta et gamma retrouvées dans toutes les cellules animales. Les deux premières forment des dimères qui sont les sous-unités du polymère, la tubuline gamma contribue à la nucléation des microtubules.

10.5 **a**, **b** et **c**. Ce sont les filaments d'actines dans les sarcomères qui permettent la contraction musculaire.

10.6 **a**. Les extrémités (+) et (–) sont ainsi nommées pour leur rapidité de croissance. *In vivo*, l'extrémité (–) est ancrée au niveau du centrosome et ne dépolymérise pas.

10.7 **a**. Chaque type de moteurs n'avance que dans une seule direction sur l'actine ou les microtubules. Les moteurs convertissent bien sûr l'ATP en énergie mécanique, qui permet le déplacement.

10.8 **b**. Ce sont des monomères d'actine globulaire (G) qui s'assemblent en filament (F). A forte concentration d'actine libre, le filament peut polymériser à l'extrémité (+) et (–). Même dans les cellules musculaires, il existe en plus de l'appareil contractile un réseau d'actine corticale qui contribue à la forme de la cellule. La dystrophine s'y associe pour renforcer la résistance de la membrane.

Chapitre 11

La communication cellulaire

Objectifs

Les cellules communiquent. Cela signifie qu'elles sont capables d'émettre des signaux, ce qui est essentiellement réalisé au moyen d'exocytoses de molécules à rôle de messager. Mais surtout, cela suppose pour chaque cellule une aptitude à détecter spécifiquement des signaux au sein du brouhaha chimique qui l'environne. Et cela suppose également l'aptitude à élaborer une réponse (ou une non-réponse) à ces signaux. Cette élaboration de réponse consiste tout d'abord à construire un signal intracellulaire significatif à partir d'un signal extracellulaire : c'est ce que l'on nomme la transduction. De tels signaux intracellulaires initient ensuite des voies d'activation de réponse biologique, voies dans lesquelles les phosphorylations et déphosphorylations de protéines jouent un rôle essentiel.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 127

Les récepteurs à protéine G

De nombreux signaux intercellulaires agissent sur des récepteurs membranaires couplés à une protéine G. L'activation de ces récepteurs recrute une protéine G qui est à l'origine d'un signal intracellulaire.

1. Un lien entre récepteur et production du second messager

Exemple du glucagon

Le glucagon est une hormone hyperglycémiante qui agit sur les cellules hépatiques en stimulant la phosphorolyse du glycogène. E. W. Sutherland (prix Nobel 1971) a pu montrer que la communication supposait nécessairement l'intervention d'un second messager produit par la membrane cellulaire sur sa face cytoplasmique. Ce second messager fut identifié comme étant l'AMPc, élaboré à partir d'ATP par une enzyme membranaire : l'adénylyl cyclase (AC).

Il fut ensuite montré que l'AC était activée par une protéine à activité GTPasique nommée protéine G, qui assure le lien entre le récepteur activé et l'AC.

Diversité des récepteurs couplés à une protéine G

Ces récepteurs sont des protéines à sept hélices alpha transmembranaires.

Diversité des protéines G et des seconds messagers

On a depuis pu identifier d'autres mécanismes de transduction faisant intervenir des protéines G. Certaines activent leur cible comme dans l'exemple du glucagon, d'autres l'inhibent. Les cibles des protéines G sont également diverses et mènent à plusieurs seconds messagers différents. Ainsi, la guanylyl cyclase produit du GMPc et la phospholipase C (PLC) produit du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3) à partir de phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP2). D'autres protéines G enfin, stimulent des canaux calcium membranaire. Le calcium est un second messager intracellulaire très fréquent.

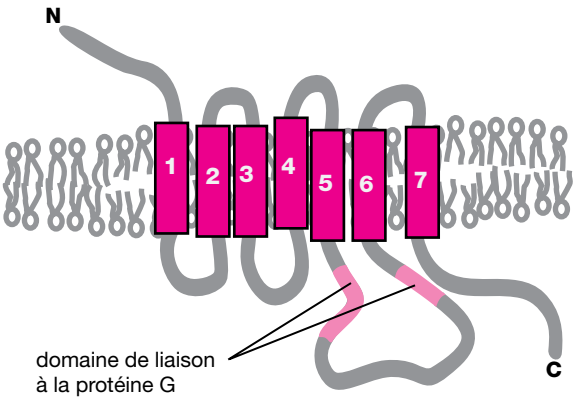


Figure 1 : Un récepteur à 7 hélices transmembranaires

2. Le cycle des protéines G

Une molécule mobile dans la membrane

Lors de la transduction, la protéine (plus précisément la sous-unité Gα de cette protéine) réalise un cycle au cours duquel elle hydrolyse une molécule de GTP en GDP (et Pi) et ou elle effectue un échange GDP contre GTP.

La forme Gα-GDP détecte le complexe hormone-récepteur et réalise à la suite l'échange GTP/GDP. La forme Gα-GTP stimule l'adénylyl cyclasse et hydrolyse ensuite le GTP.

Signification biologique de l'hydrolyse de GTP

L'hydrolyse du GTP représente une dépense énergétique dont la signification est importante. On peut schématiser ce processus de deux manières (qui reviennent au même) :

- Grâce à l'hydrolyse de GTP, l'une des étapes du cycle de la protéine G est fortement irréversible, et ainsi ce cycle est lui-même irréversible. De la sorte, le second messager est bien produit après la reconnaissance hormone-récepteur et non pas aléatoirement.
- On peut également exprimer que l'hydrolyse très spontanée du GTP représente un moyen d'éteindre le signal. La sous-unité alpha liée au GTP représente un signal activateur de l'adénylyl cyclase, l'hydrolyse du GTP éteint ce signal. Et l'extinction des signaux est essentielle à la bonne transmission d'une information.

Ainsi, quelle que soit la manière de l'exprimer, la transmission correcte, non aléatoire, de l'information représente bien une dépense énergétique, comme le prévoit la théorie de l'information.

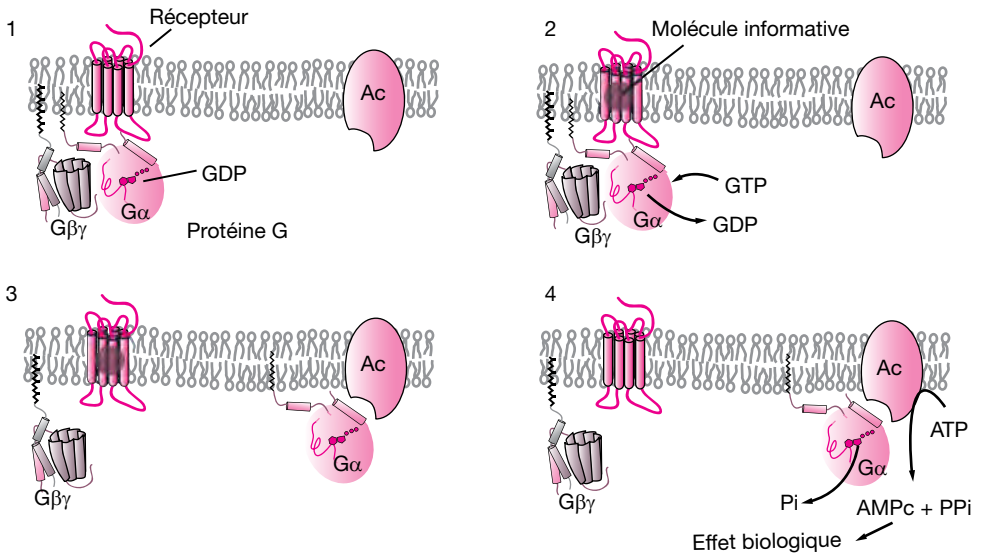


Figure 2 : Le cycle d'une protéine G

L'hydrolyse du GTP n'est pas représentée ; elle se déroule entre l'étape 4 et l'étape 1.

fiche 128

Les récepteurs à activité kinasique

Un deuxième type de récepteurs cellulaires membranaires agit en stimulant une activité de kinase sur leur face intracellulaire.

1. Des récepteurs couplés à une kinase

Fiche 184

On pourra citer l'exemple des récepteurs à l'interféron, une cytokine sécrétée en réponse à une infection virale. Ces récepteurs à une seule hélice transmembranaire s'associent en dimères ; sur leur face cytoplasmique, ils se lient à une protéine Jak (pour *Janus Kinase*) qui peut phosphoryler un ensemble de protéines agissant sur le génome : les STAT (pour *Signal Transducer and Activator of Transcription*). En présence d'interféron le récepteur se dimérise, grâce à la fluidité membranaire et cette dimérisation provoque l'activation des Jak. Dans un premier temps, il y a autophosphorylation de ces Jak. Puis les Jak phosphorylées phosphorylent l'extrémité cytoplasmique du récepteur. La conséquence est alors un recrutement des protéines STAT qui sont à leur tour phosphorylées.

Les STATS ainsi activées contribuent à contrôler des réponses nucléaires.

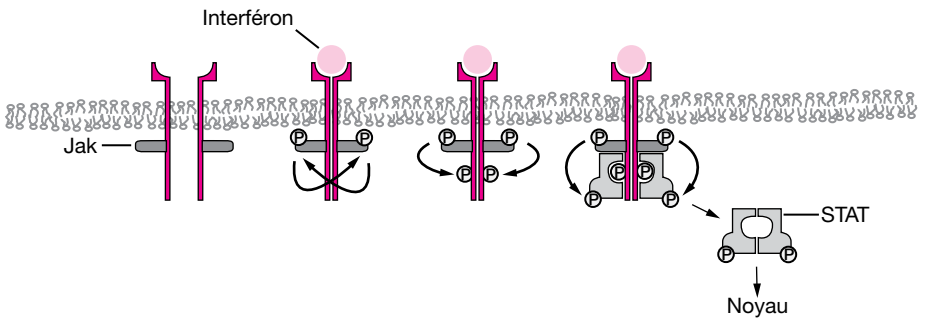


Figure 1 : La voie Jak-STAT

2. Des récepteurs enzymes

L'exemple type est le récepteur de l'insuline, mais cette famille de récepteurs est très vaste. Il s'agit d'un récepteur dimérique dont chaque sous-unité possède un seul domaine transmembranaire et dont la face intracellulaire a directement une activité tyrosine kinase, lorsque la face extracellulaire fixe de l'insuline. La première activité du récepteur enzyme est une auto-phosphorylation. Chaque sous-unité du récepteur phosphoryle une tyrosine de l'autre sous-unité. La conséquence est une activité accrue du récepteur enzyme. Dans de très nombreux cas, cette activité consiste simplement en un recrutement de protéines cytoplasmiques, à l'origine de voies de signalisation intracellulaires. Parfois, l'activité kinase du récepteur activé permet de phosphoryler les protéines recrutées.

On pourra citer dans la même catégorie des récepteurs enzymes, le récepteur de l'EGF qui active une protéine Ras qui est une « petite protéine G ». Le mode de fonctionnement

de Ras est tout à fait comparable à une protéine G, mais c'est une petite protéine monomérique et non pas une protéine G trimérique. Ras intervient dans la transduction de nombreux signaux avec récepteurs à activité tyrosine kinase.

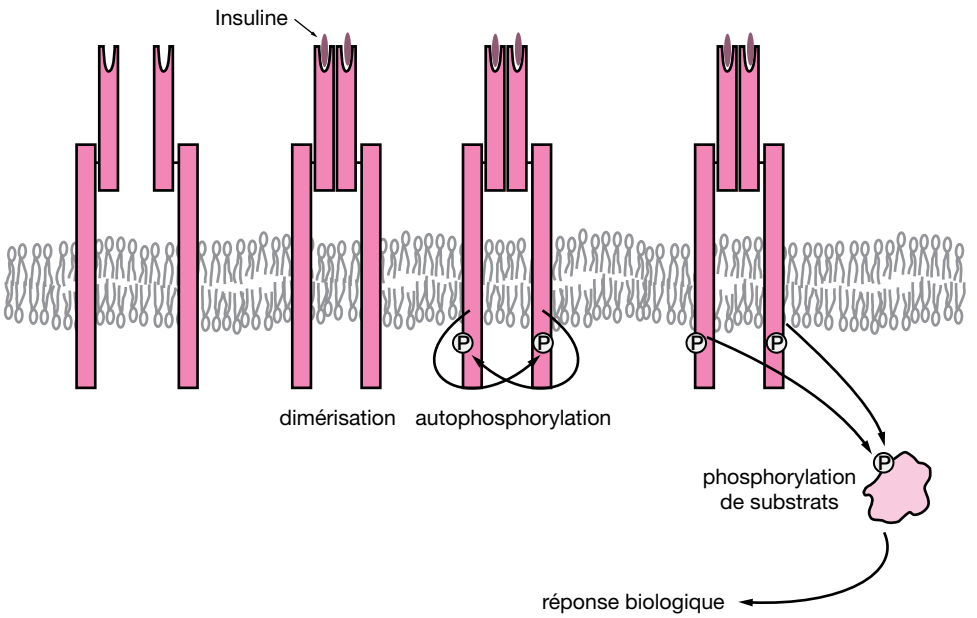


Figure 2 : Le récepteur de l'insuline

L'activation du récepteur enzyme à l'insuline permet de recruter des protéines cytoplasmiques à l'origine d'une réponse biologique. Ce recrutement ne fait pas toujours intervenir une phosphorylation de la protéine recrutée.

3. Diversité des récepteurs kinasiques

De très nombreux récepteurs peuvent être rangés dans cette catégorie. Aux deux types cités ci-dessus (qui ont une activité tyrosine kinase) on peut rajouter des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase ou à activité histidine kinase. Tous ces récepteurs ont en commun d'avoir une seule hélice transmembranaire, et ils ont de plus de nombreuses similitudes de séquences. Les récepteurs au TGFß ont ainsi une activité sérine/thréonine kinase dont une conséquence peut être l'activation par phosphorylation du facteur de transcription SMAD.

Les récepteurs à activité histidine kinase ne sont pas connus chez les animaux : on les rencontre chez les bactéries, chez les levures ainsi que chez les plantes supérieures.

Fiche 129

fiche 129

Les cascades de kinase dans la cellule

Le mode d'action des messagers intercellulaire mène bien souvent, à l'intérieur des cellules à des activations en cascade faisant intervenir des activités de kinase. Ce procédé simple exploite la possibilité d'activer réversiblement des protéines.

L'organisation en cascade permet l'amplification des réponses.

1. Le glucagon et la phosphorolyse du glycogène

Les phosphorylations d'enzymes

L'action cellulaire du glucagon sur la cellule hépatique conduit à l'activation de la phosphorylase a, qui phosphorolyse le glycogène. Une forme inactive, la phosphorylase b, est phosphorylée à l'aide d'ATP en une forme active, la phosphorylase a. Cette transformation est catalysée par une enzyme phosphorylase kinase. Cette enzyme cependant, n'est active que lorsqu'elle est phosphorylée : il en existe une forme b inactive et une forme a phosphorylée et active. La phosphorylation en est assurée par une autre enzyme, une protéine kinase A (PKA) qui est activée par l'AMPc. C'est donc toute une cascade d'activation qui est mobilisée, reposant systématiquement sur des phosphorylations.

La cascade amplificatrice

Cette cascade présente un intérêt essentiel : l'amplification de la réponse depuis le récepteur à protéine G jusqu'au glucose. Car le propre d'un message, c'est d'être produit à bas niveau thermodynamique, tandis que la réponse à ce message peut exiger un niveau très supérieur. Il a pu être montré qu'une molécule de glucagon peut, *via* cette cascade, libérer 100 millions de molécules de glucose. En effet, chaque enzyme activée active plusieurs molécules du niveau suivant, lesquelles, à leur tour, activent chacune plusieurs enzymes, etc.

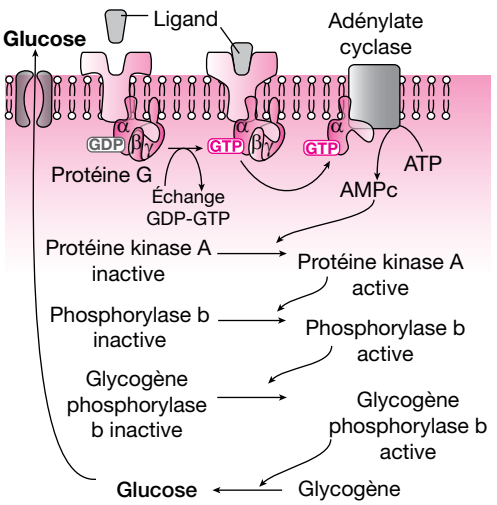


Figure 1 : Mode d'action du glucagon

L'extinction des signaux

L'autre intérêt des phosphorylations est de permettre une activation réversible. C'est-à-dire que chaque molécule activée peut s'inactiver assez spontanément par déphosphorylation catalysée par une phosphatase.

2. Le mode d'action de l'insuline

Un récepteur enzyme

L'insuline et un certain nombre de facteurs de croissance agissent en se liant à un récepteur membranaire.

Fiche 128

Ce récepteur traverse toute la membrane et a un comportement allostérique. La fixation de l'hormone sur la face extracellulaire, cela provoque l'activation de la partie intracellulaire du récepteur.

Ce domaine est un dimère présentant une activité tyrosine kinase. Chaque monomère provoque la phosphorylation d'une tyrosine de l'autre monomère ; c'est ce que l'on nomme une autophosphorylation. Les phosphotyrosines ainsi produites constituent alors un signal cytoplasmique.

Ce récepteur de l'insuline est nommé un récepteur enzyme. C'est en effet une protéine présentant les deux activités : récepteur sur la face externe, et enzyme sur la face interne de la membrane.

Activation de voies de transduction

La reconnaissance des tyrosines phosphorylées par diverses protéines cytoplasmiques enclenche des réponses enzymatiques diverses. On y trouvera alors fréquemment des activations en cascades impliquant les protéines MAP, MAPKinases, MAPKinase Kinases, etc. qui agissent sur le contrôle des mitoses.

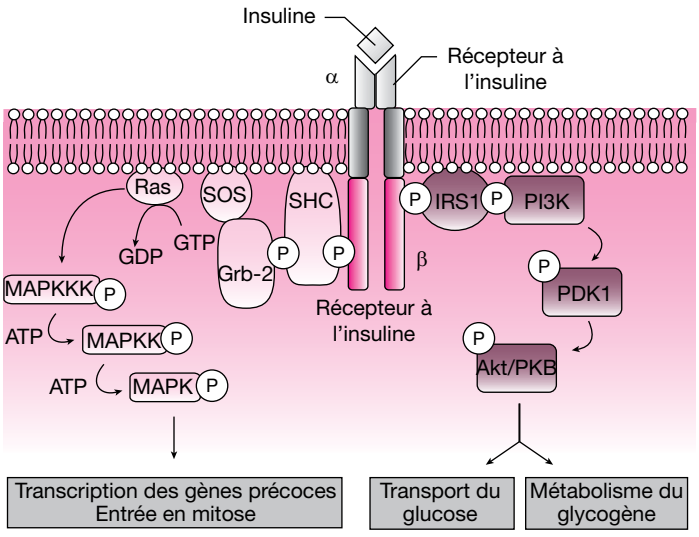


Figure 2 : Mode d'action de l'insuline et voie des MAP-Kinases

fiche 130

Protéolyse et transduction

1. La voie Notch : libération d'un fragment signal

La voie Notch se rencontre dans les phénomènes d'inhibition entre cellules par exemple lors de la différenciation nerveuse chez la drosophile. Les cellules cibles possèdent un récepteur Notch et les cellules adjacentes jouent le rôle de signal extracellulaire *via* une protéine membranaire Delta.

La protéine Notch est préalablement clivée

Fiche 52

Lors de la maturation de la protéine Notch, dans l'appareil de Golgi, un clivage de la chaîne du côté extracellulaire est opéré. C'est sous cette forme que Notch peut interagir avec Delta.

L'interaction avec Delta active Notch par un second clivage

L'interaction entre Notch et Delta provoque un clivage de la chaîne peptidique à proximité du domaine transmembranaire.

Un troisième clivage libère un signal intracellulaire

La véritable action de Delta consiste en ce troisième clivage qui est stimulé du côté intracellulaire, et qui libère un fragment cytoplasmique de Notch. Ce fragment peut alors avoir une action sur le noyau et l'expression génétique.

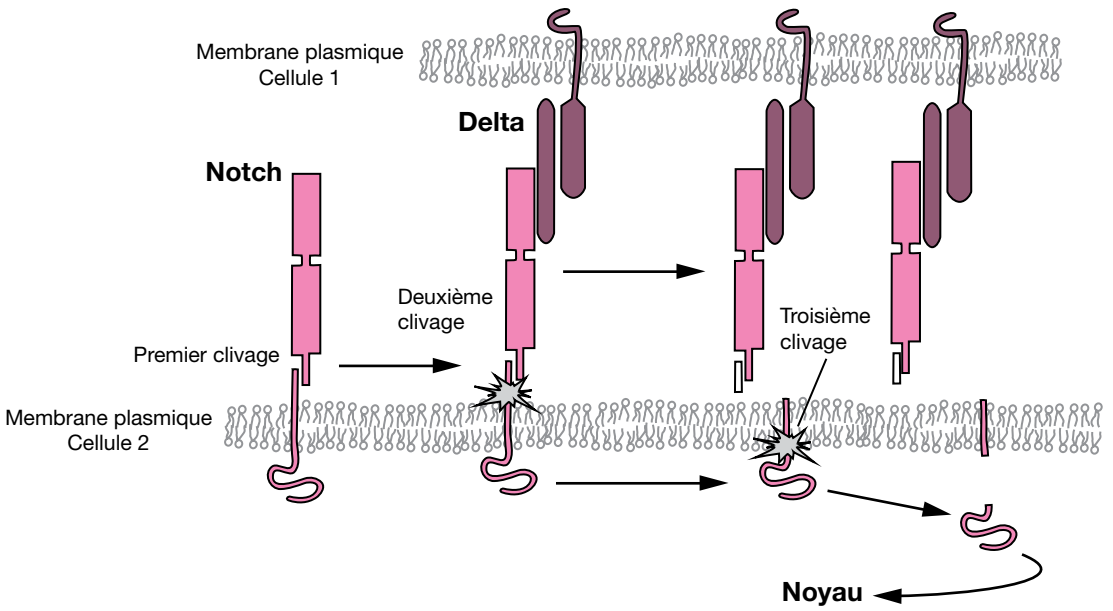


Figure 1 : Activation de la voie Notch

2. La voie Wnt, la β-caténine et l'ubiquitinylation

Rôles de la β-caténine

La β-caténine est une protéine aux rôles multiples. Elle est à la fois un acteur du cytosquelette faisant lien entre les cadhérines et l'actine, et elle est également un facteur de transcription lorsqu'elle s'accumule dans la cellule.

Ubiquitinylation et lyse de la β-caténine

La β-caténine ne s'accumule cependant pas facilement dans la cellule car sa quantité est contrôlée par ubiquitinylation. Ce marquage à l'ubiquitine est à l'origine de sa dégradation par le protéasome. La protéine GSK-3 phosphoryle la ß-caténine qui peut alors être ubiquitinylée, puis dégradée.

Fiche 93

Un contrôle du protéasome

L'activation de la voie Wnt, par l'intermédiaire de la protéine Dishevelled mène à l'inhibition de GSK-3. De ce fait, la ß-caténine n'est pas phosphorylée, échappe à l'ubiquitinylation et à la protéolyse et s'accumule dans le cytosol. Elle gagne alors le noyau et contribue à l'activation de gènes cibles.

Une activation lors du développement

En l'absence de Wnt, cette voie peut être activée, lors du développement embryonnaire du xénope et de la spécialisation du centre de Nieuwkoop. Une accumulation de Dishevelled et de β-caténine, héritées du cytoplasme de l'œuf, contribue à activer la voie et à spécifier le centre de Nieuwkoop. Il demeure toutefois possible qu'une accumulation de protéine Wnt se produise également.

Fiche 157

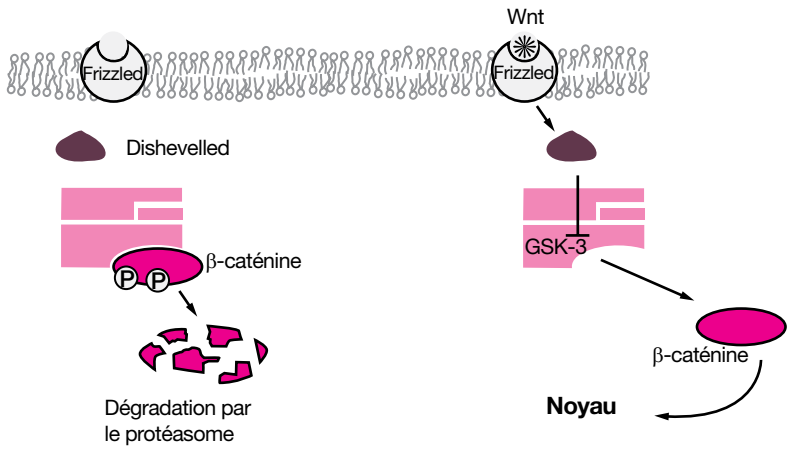


Figure 2 : Activation de la voie Wnt

fiche 131

Des voies très conservées

Si l'on considère la multiplicité des messagers extracellulaires et donc des récepteurs à ces messagers, on est frappé par le faible nombre de grands types d'interactions. Au final, les voies de signalisation sont étonnamment semblables.

1. Les motifs des récepteurs enzymes

Les récepteurs à activité tyrosine kinase ont de nombreux points communs dans leur séquence. Ces ressemblances se retrouvent entre différentes classes de récepteurs d'un même organisme de la même manière qu'entre les récepteurs d'organismes très distincts. Ces points communs ont trait aux trois grandes fonctions des récepteurs enzymes : la liaison à un ligand, l'intégration à la membrane, et l'activité tyrosine kinase intracellulaire. Les mêmes motifs peptidiques se retrouvent d'un récepteur à un autre.

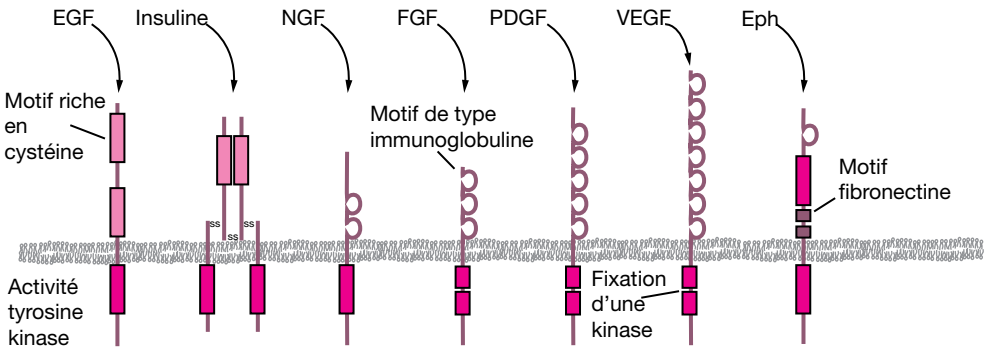


Figure 1 : Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Ce sont ces types de ressemblance qui permettent également d'établir des phylogénies. C'est le cas, sur la figure ci-après, avec les récepteurs à l'EGF dont on retrouve de multiples variantes

2. Les motifs protéines G

De la même manière que pour les récepteurs, les protéines G sont à la fois l'objet d'une importante diversité et d'une remarquable unité d'organisation. À travers tous les organismes animaux ainsi que chez les levures, on retrouve des protéines G. En faisant s'exprimer un gène de récepteur de la somatostatine humaine à des levures, on a observé, en réponse à la somatostatine, une activation d'une réponse cellulaire, avec recrutement de protéines G hétérotrimérique.

Les petites protéines G, quant à elles présentent de nombreuses homologies avec les sous-unités alpha des protéines G hétérotrimériques.

3. De grandes différences entre les animaux et les plantes

Fiche 133

Lorsque l'on considère une comparaison entre les animaux métazoaires et les plantes de la lignée verte, force est de constater qu'il y a extrêmement peu de points de comparaison dans les voies de signalisation. Ces voies étant essentiellement liées au caractère

pluricellulaire des organismes, on pense pouvoir en déduire que les deux lignées ont « inventé » séparément la pluricellularité. Des lignées d'unicellulaires se sont séparées, puis la lignée végétale a « inventé » le chloroplaste par endosymbiose et engendré la lignée verte au sein de laquelle la pluricellularité s'est développée.

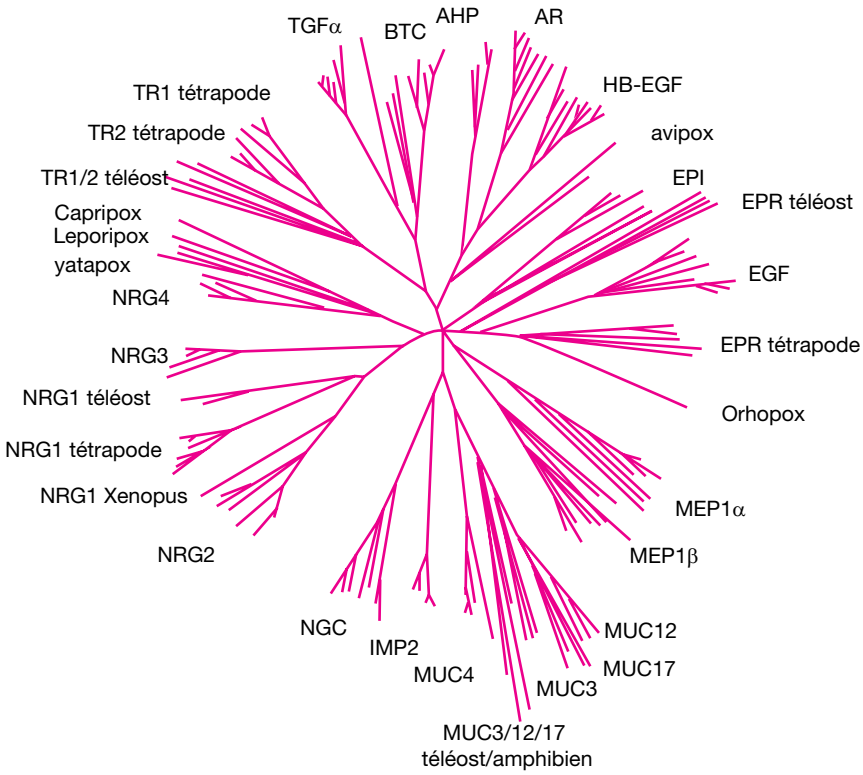


Figure 2 : Arbre phylogénétique des récepteurs ErbB

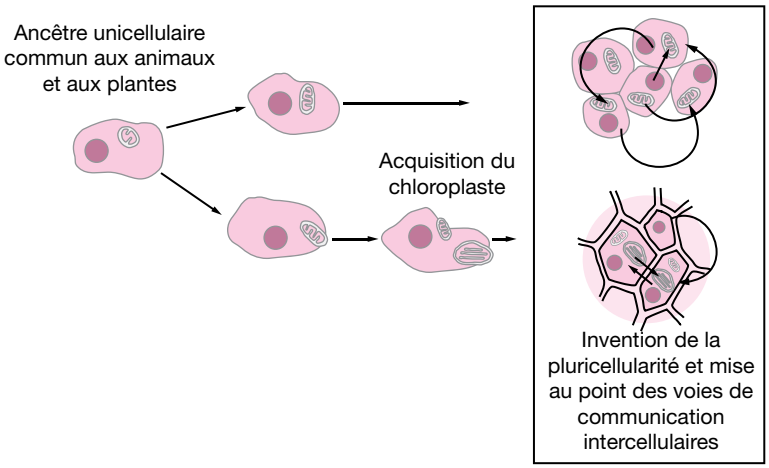


Figure 3 : Séparation des lignées animales et végétales

fiche 132 Cytosquelette et voies de signalisation

La dynamique du cytosquelette étant un moyen essentiel de la réactivité des cellules à leur environnement, il est clair que les voies de signalisation intracellulaires ont un effet sur lui. Les petites protéines G de type Rho sont des acteurs importants de cette signalisation.

1. Réorganisation du squelette d'actine et protéines Rho

Fiche 121

Fiche 125

La dynamique du cytosquelette d'actine est clairement sensible à des voies de signalisation. La protéine Rho est une petite protéine G proche de Ras (Rho = *Ras Homologue*), qui donne son nom à la petite famille des protéines Rho (Rho, Rac, Cdc42). En injectant à une cellule des variants constitutivement actif de ces protéines, on observe une immédiate réorganisation du squelette d'actine. La protéine Rho intervient dans la création des contacts focaux, la protéine Rac stimule la formation de lamellipodes et la protéine Cdc42 entraîne la formation de filipodes et de microvillosités.

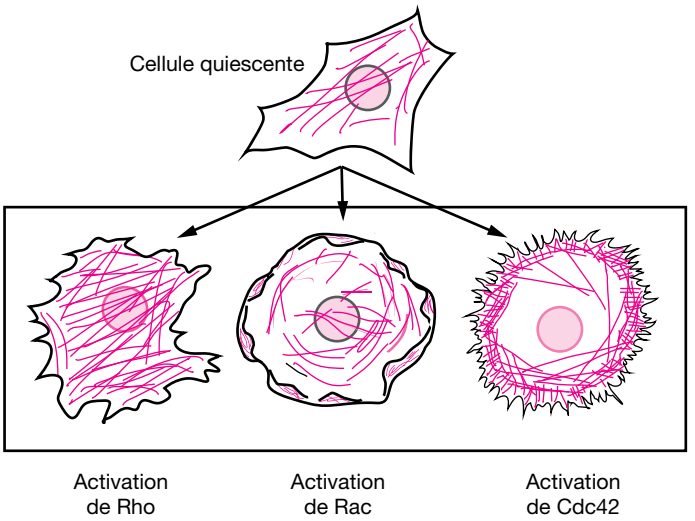


Figure 1 : Différentes réactions du cytosquelette aux protéines Rho

2. Les cibles des protéines Rho

Les protéines Rho sont des petites protéines G ; elles fonctionnent comme des commutateurs logiques (*via* l'échange GDP/GTP) : la forme liée au GTP est active (mais s'éteint facilement), la forme liée au GDP est inactive.

- Cdc 42 stimule la polymérisation de l'actine, formant des filopodes et des pointes.
- Rac a également une action sur la polymérisation de l'actine, mais non plus en faisceaux (comme pour les filipodes), mais en réseau. Ces réseaux tridimensionnels sont disposés en périphérie de la cellule et peuvent former des lames soutenant des lamellipodes.

- Rho facilite la fasciculation des filaments d'actine avec de la myosine II, formant ainsi des fibres de stress. Cette voie passe par la MLCP, (phosphatase de la chaine légère de la myosine). Rho stimule également la formation de contacts focaux en favorisant l'agrégation des intégrines et des protéines associées.

3. Mode d'action de la protéine Rho

Lors de l'action des petites protéines G comme Rho, interviennent des protéines GEF (pour facteur d'échange de nucléotides guanyliques) qui assistent l'échange GDP/GTP. Ces facteurs permettent d'optimiser la transduction du signal.

Une protéine FAK (kinase d'adhésion focale) est sensible aux signaux relayés par les intégrines. Elle stimule l'échange guanylique par Rho assisté par GEF. Rho, sous sa forme active stimule la MLCP (par l'intermédiaire de ROCK), qui déphosphoryle les chaînes légères de myosine. Or, la myosine II joue un rôle essentiel dans la formation des faisceaux d'actine constituant les fibres de stress. Et ce rôle n'est rempli que si les chaînes légères des myosines sont phosphorylées. Les MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) catalysent cette phosphorylation et les MLCP (*Myosin Light Chain Phosphatase*) catalysent la déphosphorylation. L'activation par Rho des MLCP aboutit donc à une inactivation de la myosine et par conséquent à une déstructuration des fibres de stress.

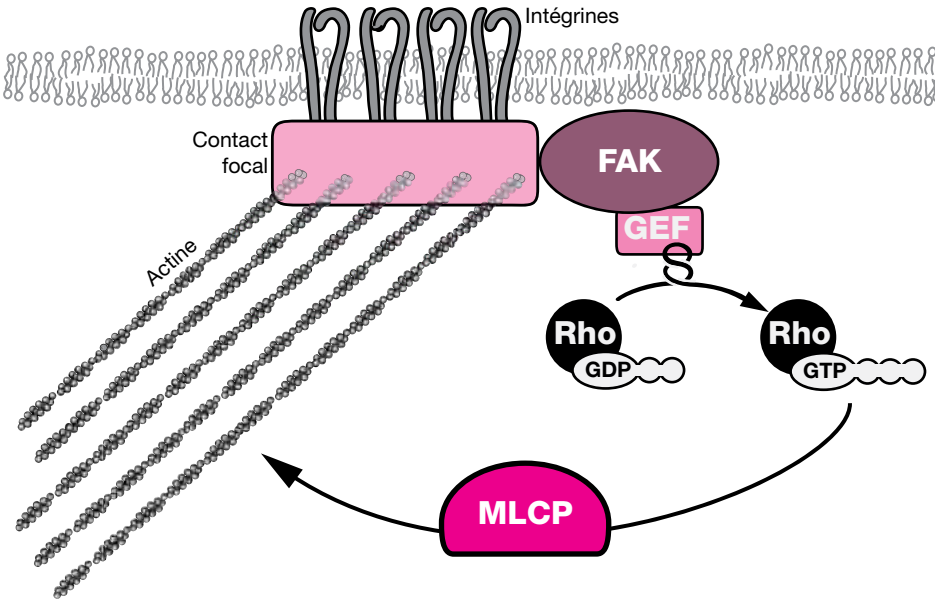


Figure 2 : Protéine Rho et fasciculation de l'actine

fiche 133 Les voies de signalisation chez les plantes

La coordination des cellules chez les plantes se fait au moyen de messagers intercellulaires que l'on nomme phytohormones.

1. Les familles de phytohormones

Ce sont généralement des molécules de petite taille. Historiquement, ce sont les auxines et les gibbérellines qui ont été les premières identifiées, puis les cytokinines, l'acide abscissique et l'éthylène.

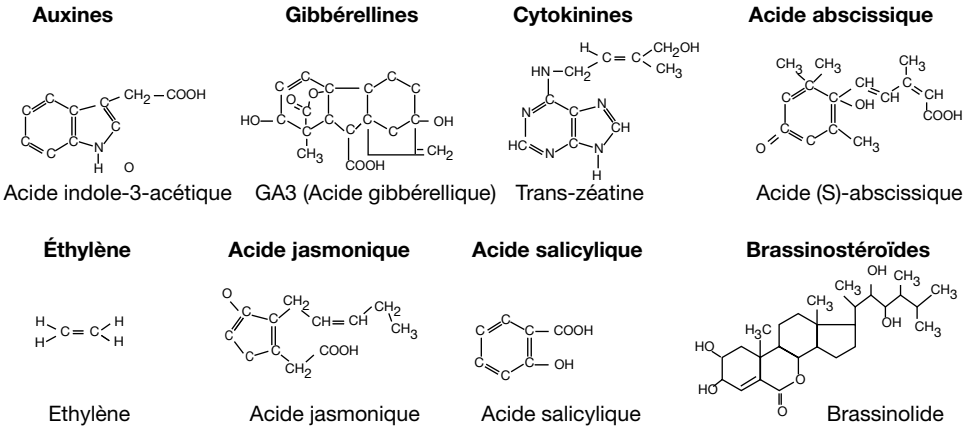


Figure 1 : Formules chimiques de quelques phytohormones

2. Cytokinines et auxines

Fiche 128

Les cytokinines et les auxines exercent un contrôle important sur la croissance des tissus, en stimulant et/ou inhibant les divisions cellulaires et la croissance cellulaire (l'auxèse).

Ces deux phytohormones se lient à des récepteurs membranaires et activent des voies différentes. Comme beaucoup de récepteurs chez les plantes, le récepteur aux cytokinines a une activité histidine kinase.

L'auxine agirait par un système AMPc-dépendant. Les effets de l'auxine sont à la fois nucléaires et cytoplasmiques. L'AMPc semble activer l'expression de gènes par une cascade MAPK et également activer des pompes membranaires à H^+ qui acidifient la paroi (effet sur la plasticité de cette paroi) et qui créent un gradient de H^+ entretenant des transports actifs secondaires de K^+, avec des effets osmotiques sur la pression de turgescence de la cellule.

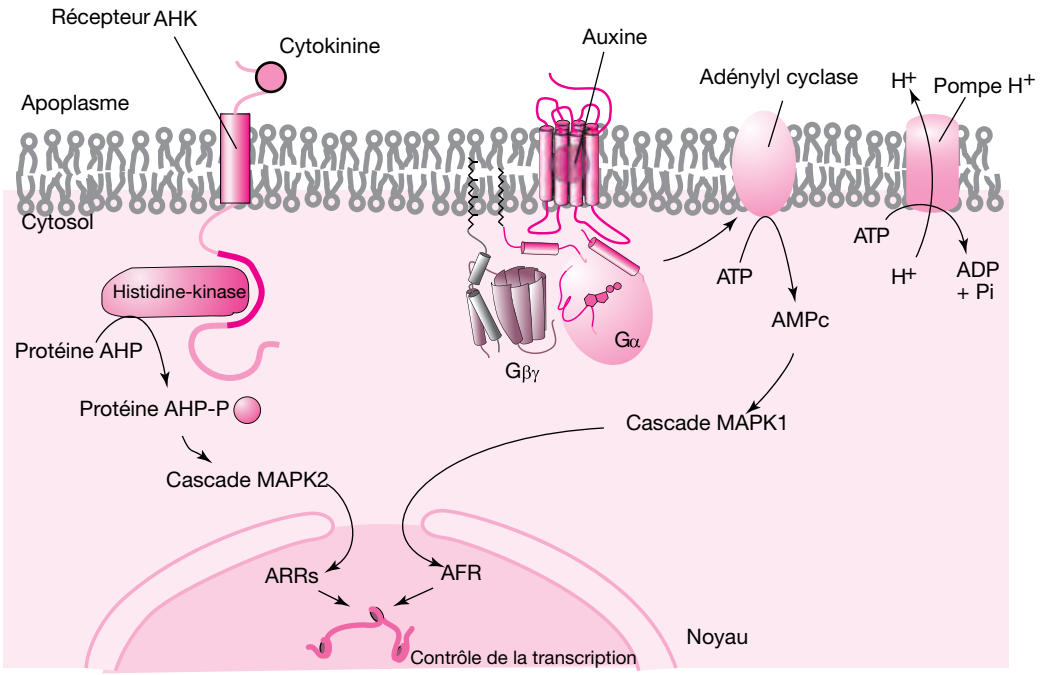


Figure 2 : Voie de signalisation des cytokinines et des auxines

3. Action de l'éthylène

Les cellules cibles de l'éthylène présentent des récepteurs dimériques transmembranaires. Chaque monomère possède un atome de cuivre. L'originalité du système est que le récepteur est actif sans éthylène, et inactivé par l'éthylène. Sous sa forme active, c'est une enzyme histidine kinase qui s'autophosphoryle avant d'activer la voie des MAPkinase. La MAPkinase active exerce une inhibition sur des protéines de contrôle de l'expression de gènes. En présence d'éthylène, le récepteur et la voie MAPK sont inactifs et cela lève l'inhibition de ces protéines de contrôle de gènes. La réponse à l'éthylène est effectuée.

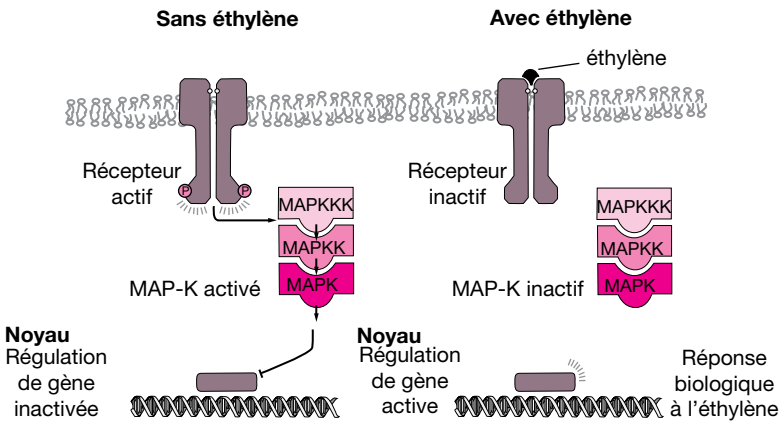


Figure 3 : Voie de signalisation de l'éthylène

fiche 134

La méthode double hybride

La méthode de double hybride est une technique puissante qui a été la première à pouvoir analyser *in vivo* des interactions entre partenaires protéiques sans nécessiter autre chose que la séquence codante des protéines d'intérêt. C'est donc une technique qui remplace des outils d'immunoprécipitation qui doivent être adaptés au cas par cas et qui sont difficilement utilisables pour des cribles à grande échelle par un clonage et une transformation de la levure *S. cerevisiae.* Cette méthode est basée sur la reconstitution de l'activateur de transcription Gal4.

L'activateur de transcription Gal4p est une protéine de 881 acides aminés. Sa fixation sur les UAS Gal va entraîner la transcription du gène en aval. La nature modulaire de Gal4p permet de séparer les deux domaines impliqués dans cette trans activation.

Fiche 25

Le domaine de fixation à l'ADN (*Binding Domain BD)* correspond à une protéine de 16 kDA. Ce domaine va avoir comme rôle de se lier à la séquence UAS. Au sein de la protéine Gal4p, le domaine activateur (*Activating Domain AD*) est un domaine de 13 kDa dont le rôle sera de recruter la machinerie de transcription. Si ces deux domaines sont exprimés séparément, l'activateur Gal4p ne peut se reconstituer. Cette reconstitution fonctionnelle va pouvoir en revanche se réaliser si chaque partenaire est lié de façon covalente à des protéines qui vont former un complexe.

Fiche 56

Le système repose donc sur l'utilisation de deux plasmides (figure 1). Chaque plasmide possède un marqueur de sélection permettant de transformer la levure *S. cerevisiae.* Celle-ci est modifiée génétiquement pour ne pas exprimer l'activateur Gal4p. Ces plasmides permettent de cloner des phases codantes en fusion avec le domaine d'activation ou de liaison. La transcription de ces protéines hybrides (d'où le nom double hybride) va alors permettre la production de deux protéines chimériques. La protéine liée au « BD » est appelée l'appât, l'« AD » étant fusionnée à la proie. Si l'appât et la proie forment un complexe, alors Gal4p se reconstitue et va activer la transcription du gène sur lequel l'UAS Gal a été positionné. La puissance de l'outil double hybride vient en partie de la capacité de modifier le génome de la levure *S. cerevisiae* pour utiliser différents systèmes rapporteurs.

Dans l'exemple de la figure 1, le gène *lacZ* permet de quantifier le nombre d'interaction par un dosage de l'activité ß-galactosidase. L'utilisation d'autres gènes permet également à cette technique d'être une approche génétique intéressante pour aller chercher au sein d'une banque des protéines en interaction avec l'appât. Dans cette démarche (figure 2), la levure est transformée par le plasmide portant l'appât et par une collection de plasmides pouvant représenter l'ensemble des phases codantes d'un génome. L'utilisation d'un marqueur comme le gène *HIS3* permet alors de rechercher au sein des colonies représentant les différentes combinaisons appât phases codantes celles qui aboutissent à l'activation de *HIS3*. Ce crible (crible positif puisque ce qui est cherché est ce qui génère des colonies) a été largement utilisé pour caractériser des complexes protéiques dans d'innombrables espèces.

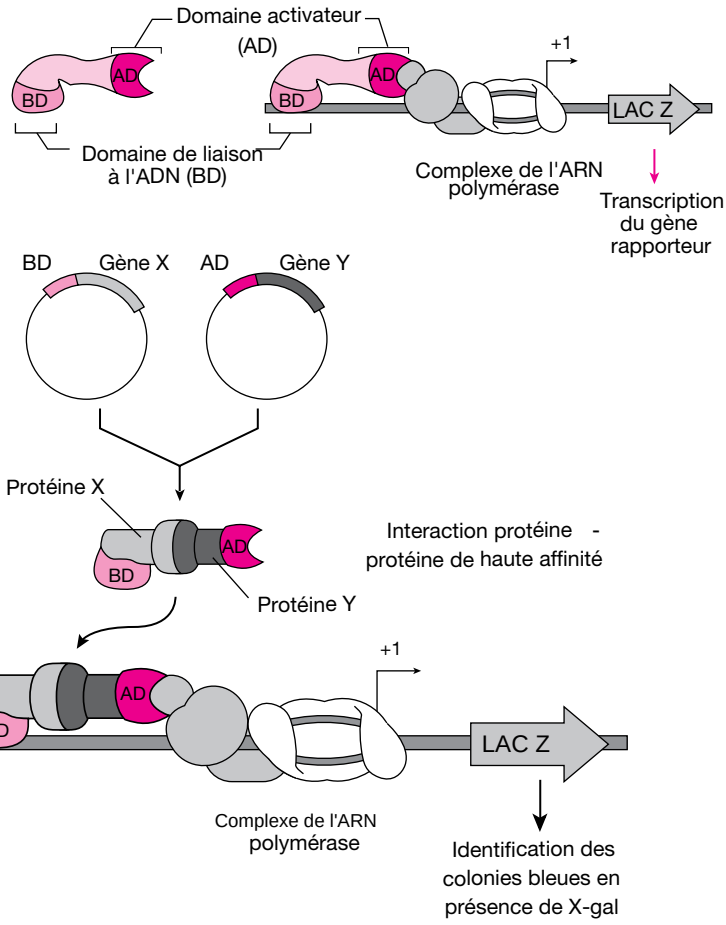


Figure 1 : Principe du double hybride

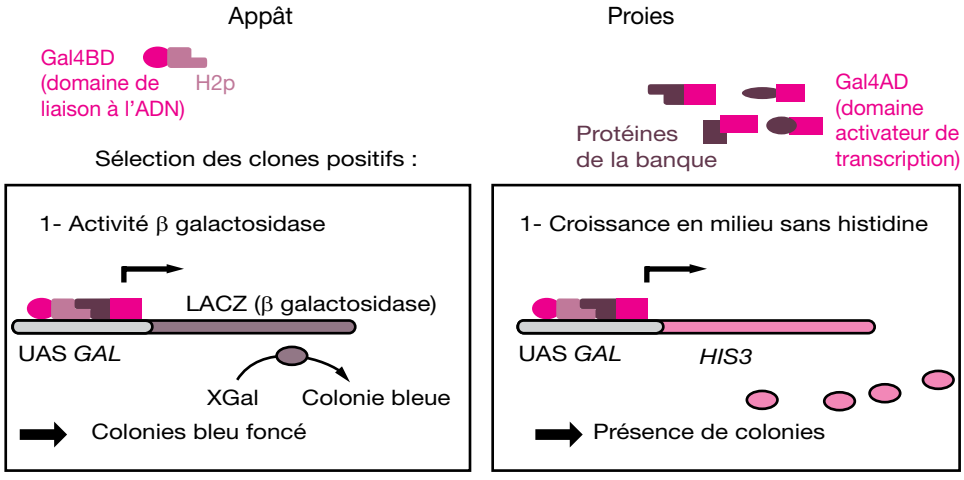


Figure 2 : Utilisation du double hybride comme crible génétique

FOCUS Les diabètes sucrés

Le terme diabète désigne plusieurs pathologies différentes mais le sens commun désigne par diabète les diabètes sucrés, pathologies du métabolisme glucidique de l'organisme. Les diabètes sucrés ont tous en commun une glycémie excessive et une polyurie (urine abondante). Dans tous, les cas, ces diabètes sont liés au système hormonal de contrôle de la glycémie, c'est-à-dire au fonctionnement de l'insuline. La glycémie est contrôlée par les cellules des îlots de Langerhans du pancréas : les cellules bêta sécrètent de l'insuline, hormone hypoglycémiante, en réponse à l'abondance de glucose et les cellules alpha sécrètent du glucagon, hormone hyperglycémiante, en réponse à un déficit en glucose dans le sang.

Le diabète de type 1

On l'appelle aussi diabète insulinodépendant (DID). La maladie se déclare de façon assez soudaine chez l'enfant ou le jeune adulte. Il s'agit d'une maladie auto-immune qui voit la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules sont les cellules sécrétrices de l'insuline. Le diabète de type 1 est donc une incapacité de l'organisme à produire de l'insuline. Chez l'individu non malade, l'insuline est secrétée fortement après les repas et stimule le stockage du glucose dans le foie, les muscles ou le tissu adipeux. Inversement, lors d'un jeûne, le taux d'insuline est très faible et le foie et les muscles libèrent du glucose et recyclent les acides gras circulants pour produire du glucose.

Chez un patient diabétique de type 1, l'absence complète d'insuline favorise une production de glucose par le foie et une production de corps cétoniques (qui s'accumulent lors de l'activité de recyclage des acides gras).

Les principaux signes du diabète insulinodépendant sont l'hyperglycémie (glycémie excessive, supérieure à 1,26 g.L-1 à jeun), la polyurie, la polydipsie (soif importante), une maigreur importante et la présence d'acétone dans les urines.

On ne sait pas guérir le diabète de type 1, mais on peut, grâce à un régime approprié et des injections d'insuline, permettre au patient diabétique de vivre normalement.

Diverses pistes thérapeutiques sont explorées, comme le pancréas artificiel, qui pallie l'absence de cellule bêta en injectant de l'insuline en fonction de la glycémie, ou bien l'autogreffe de cellules souches issues de la moelle osseuse apparemment apte à régénérer des cellules bêta.

Le diabète de type 2

On l'appelle parfois diabète de l'adulte ou encore diabète non insulinodépendant (DNID). Il représente 80 % des diabètes et frappe principalement des individus en surpoids ou obèses. Son incidence augmente avec les modifications du mode de vie (sédentarité, alimentation...).

Il est caractérisé par une inadaptation de la sécrétion d'insuline aux besoins de l'organisme principalement à cause d'une résistance à l'insuline des tissus cibles de cette hormone. Il en résulte ainsi une hyperglycémie, malgré des taux sanguins élevés d'insuline.

L'insulinorésistance survient chez le sujet obèse par suite d'une perturbation de l'activité des cellules hépatiques et musculaires en raison de la circulation de quantités importantes d'acides gras. La conséquence de cette insulinorésistance est alors une hypersécrétion d'insuline, adaptation du pancréas à la résistance des cibles de l'insuline. Cette hyperinsulinémie permet pendant plusieurs années de maintenir la glycémie. Chez le patient plus âgé cependant, l'épuisement du pancréas aboutit à la faillite de cet équilibre et au déclenchement d'un diabète, pour cause cette fois-ci de carence en insuline. Le diabète de type 2 est un important facteur de risque cardiovasculaire.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

11.1 L'hydrolyse du GTP par une protéine G :
- ☐ a. permet l'extinction du signal
- ☐ b. apporte l'énergie nécessaire à la synthèse d'AMPc
- ☐ c. n'existe pas : il s'agit d'un échange avec GDP

11.2 Le récepteur de l'insuline :
- ☐ a. est tétramérique
- ☐ b. a une activité histidine kinase
- ☐ c. est une protéine G monomérique

11.3 Les récepteurs à EGF :
- ☐ a. activent Ras, une petite protéine G
- ☐ b. sont des petites protéines G
- ☐ c. ont une activité tyrosine kinase

11.4 Les cascades de kinase :
- ☐ a. permettent d'amplifier les réponses biologiques
- ☐ b. créent des signaux réversibles
- ☐ c. permettent de contrôler la quantité de phosphate de la cellule

11.5 On connaît les MAP kinases :
- ☐ a. uniquement chez les vertébrés
- ☐ b. uniquement chez les animaux
- ☐ c. chez les animaux et les plantes

11.6 La signalisation par protéolyse :
- ☐ a. fait toujours intervenir le protéasome
- ☐ b. est strictement extra-cellulaire
- ☐ c. aboutit à l'activation de gènes

11.7 La voie Notch :
- ☐ a. concerne des interactions cellule-cellule
- ☐ b. est impliquée dans la réception des facteurs de croissance
- ☐ c. fait intervenir l'AMPc

11.8 La dynamique du cytosquelette d'actine :
- ☐ a. est indépendante des signaux intracellulaires
- ☐ b. est contrôlée par des protéines Rho
- ☐ c. contrôle le cycle cellulaire

11.9 Les animaux et les plantes :
- ☐ a. ont un ancêtre commun pluricellulaire
- ☐ b. ont un ancêtre commun unicellulaire
- ☐ c. n'ont pas d'ancêtre commun

11.10 L'éthylène :
- ☐ a. est un poison de la croissance cellulaire
- ☐ b. agit sur des récepteurs membranaires
- ☐ c. provoque une inactivation de la voie des MAPK

Réponses

11.1 **a**. Les protéines fixent et hydrolysent le GTP. Cette réaction très exergonique est très favorisée thermodynamiquement (et cinétiquement par la protéine G) rend irréversible l'extinction du signal initié par la liaison ligand-récepteur. Cette énergie n'est pas utilisée pour un travail chimique.

11.2 **a**. Le récepteur de l'insuline est un récepteur enzyme à activité tyrosine kinase. C'est un ensemble de deux unités transmembranaires et de deux unités extra-cellulaires fixant l'insuline.

11.3 **a** et **b**. Les récepteurs à EGF sont activés par autophosphorylation. Ce sont des enzymes tyrosine kinase. Une fois activés, ils stimulent la protéine Ras qui est une petite protéine G.

11.4 **a** et **b**. Par le jeu des cascades de phosphorylation, les kinases en cascades amplifient la réponse à un signal. Chaque signal active plusieurs kinase, qui chacune, active plusieurs kinases qui… L'activation d'une protéine par phosphorylation est facilement réversible par déphosphorylation de la cellule.

11.5 **c**. Les MAP kinases forment des motifs d'activation dans les cellules chez toutes les cellules eucaryotes, et donc aussi bien chez les animaux que chez les plantes.

11.6 **c**. Des protéolyses interviennent dans la voie Notch à l'extérieur de la cellule et sans protéasome ou dans la voie Wnt à l'intérieur de la cellule et avec le protéasome. Dans tous les cas ces signalisations semblent aboutir à l'activation de la transcription de gènes.

11.7 **a**. La voie Notch est activée lorsque le récepteur Notch reconnaît une protéine Delta liée à la membrane d'une cellule adjacente. C'est donc une voie liée aux interactionc cellule-cellule. En revanche, cette voie fonctionne par protéolyse et n'est pas liée à la production d'AMPc

11.8 **b**. Le cytosquelette est impliqué de façon dynamique dans de nombreuses formes cellulaires. Ainsi, il peut former des filopodes, des lamellipodes, des microvillosités, des contacts focaux… Ces différents états sont liés à l'intervention de diverses protéines Rho. Si le cytosquelette est lié à la réalisation du cycle cellulaire, ce n'est pas lui qui contrôle le cycle.

11.9 **b**. Comme ils semblent avoir développé de façon indépendante leurs systèmes de communication intercellulaire, il est très probable que les lignées menant aux plantes et aux animaux se sont séparées avant l'apparition de la pluricellularité. En revanche, les animaux et les plantes ont nécessairement un ancêtre commune, et ce doit être un unicellulaire.

11.10 **b** et **c**. L'éthylène est une phytohormone. Cette molécule est reconnue par un récepteur membranaire dimérique. Sans éthylène, ce récepteur est actif et stimule la voie des MAPK. En présence d'éthylène, le récepteur est inactivé et la voie de MAPK reste silencieuse.

Chapitre 12

Cycle cellulaire et apoptose

Objectifs

Les cellules meurent. Les cellules se reproduisent, aussi, et cette reproduction est bien entendu le moyen de compenser les morts cellulaires. La division cellulaire permet de répartir entre deux cellules filles, et de façon plus ou moins équitable, d'une part le matériel cytoplasmique et d'autre part le matériel génétique préalablement dupliqué. Au premier ordre, une cellule engendre deux cellules semblables qui, chacune, engendreront deux cellules semblables, etc. Le développement des cellules s'inscrit ainsi dans un cycle cellulaire et ce cycle est contrôlé très finement, en fonction de paramètres biologiques intracellulaires comme extracellulaires. De façon parallèle, le contrôle d'une population de cellules passe également par la mise en jeu, contrôlée elle aussi, d'une mort cellulaire programmée : l'apoptose. L'apoptose, que l'on oppose à la nécrose, est une mort cellulaire, mais est intrinsèquement une activité biologique, une activité du vivant, avec en particulier des contrôles nombreux et précis. Une sorte de sacrifice, assumé, sur l'autel de la communauté cellulaire.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 135

Les modalités de la division cellulaire

Du niveau moléculaire au niveau des populations ou même des écosystèmes, la vie est caractérisée par le renouvellement permanent des structures vieillissantes ou des structures détruites. À l'échelle des cellules, cela se manifeste par la division cellulaire. Après une phase préalable de croissance, une cellule se divise en deux cellules filles qui héritent de toutes ses caractéristiques.

1. Un partage équitable entre deux cellules filles eucaryotes

Mitose et division égale du noyau

Fiche 31

Avant toute division cellulaire a eu lieu une duplication préalable du matériel génétique, en deux copies égales et identiques. Ce matériel est alors partagé en deux noyaux distincts aux deux pôles opposés de la cellule en division. C'est ce processus que l'on nomme la mitose. Elle suppose la désorganisation du noyau, le partage et la migration des chromosomes et la reconstitution de deux noyaux.

Cytodiérèse et partage équitable du cytoplasme

Après la mitose, la cellule se cloisonne en deux cellules filles. Chacune hérite en plus d'un noyau de la moitié des organites de la cellule mère, à peu près équitablement répartis. Ce partage est donc statistiquement équitable mais pas égal.

La séparation en deux cellules distinctes est réalisée de manières différentes entre les cellules végétales et les cellules animales.

Dans une cellule animale, la séparation est assurée par un étranglement médian qui aboutit à la fusion des membranes. Cet étranglement est causé par la contraction d'un anneau de filaments d'actine associés à des molécules de myosine. Le positionnement de cet anneau d'actine à l'équateur de la cellule résulte de son interaction avec les microtubules du fuseau achromatique.

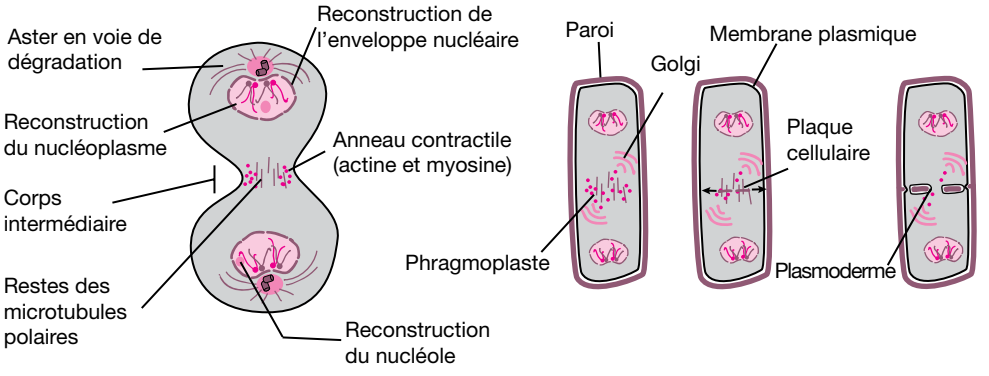


Figure 1 : Cytodiérèse d'une cellule animale et d'une cellule végétale

Dans une cellule végétale, il n'y a pas d'étranglement, mais construction progressive d'une paroi transversale. Des vésicules golgiennes convergent vers le plan médian, en suivant le réseau de microtubules. Ces vésicules élaborent une primo paroi squelettique (essentiellement pectique), puis fusionnent, cloisonnant ainsi peu à peu la cellule. Cette structure prend le nom de phragmoplaste ; le phragmoplaste finit par fusionner avec les membranes latérales de la cellule initiale, achevant ainsi le cloisonnement.

2. La division des cellules bactériennes

Les populations bactériennes croissent également par division cellulaire. Les modalités en sont beaucoup plus simples que chez les eucaryotes. La division se fait par formation d'une cloison (le septum) par invagination de la membrane, qui se recouvre rapidement de paroi. Chaque chromosome fils est entraîné vers une extrémité. Chez *E. coli*, le chromosome est lié à un mésosome.

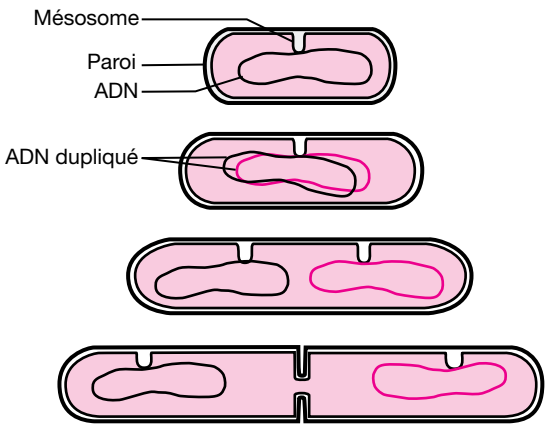


Figure 2 : Division bactérienne

La croissance d'une population bactérienne par divisions successives peut être extrêmement rapide. Chez *Escherichia coli*, le temps de doublement peut-être de 20 minutes lorsque les conditions sont optimales, mais pour d'autres espèces de bactéries, il peut être d'une à plusieurs heures.

Cette croissance, exponentielle dans les premiers temps, est exploitée au laboratoire où l'on cultive des bactéries en milieu liquide ou sur milieu solide gélosé. Une dispersion sur milieu solide gélosé permet de séparer des bactéries uniques. Une seule bactérie peut alors donner en une ou deux journées un petit amas visible à l'œil nu : une colonie bactérienne.

Les conditions physico-chimiques de culture sont déterminantes pour la croissance bactérienne. On pourra retenir que les paramètres essentiels sont le pH, la pression osmotique, la température et le dioxygène. Les conditions optimales sont très variables d'une espèce à l'autre ; certaines bactéries sont adaptées à des milieux très froids, d'autres à des conditions de très fortes salinités, etc.

fiche 136 Le chromosome mitotique et les phases de la mitose

Lors de la mitose, deux génomes identiques (résultant de la réplication du génome de la cellule mère) sont partagés et répartis entre deux cellules filles. Cette opération suppose un tri des chromosomes et une synchronisation de leurs mouvements, de sorte que les cellules filles soient « prêtes » en même temps.

1. Prophase : condensation du matériel génétique

Fiche 30

Des chromosomes dupliqués, à deux chromatides

La clé de la bonne répartition du matériel tient à ce que les deux molécules (= les deux chromatides) issues de la réplication d'un chromosome ne sont pas mécaniquement indépendantes l'une de l'autre. Elles demeurent fermement liées au niveau d'une région nommée centromère. Là sont disposées des cohésines, complexes protéiques liant les deux chromatides.

La compaction des chromosomes mitotiques

Les chromosomes mitotiques ont une dimension de l'ordre de 1 à 10 µm de long, pour une épaisseur de 1 µm. Cela représente une condensation très poussée de l'ordre de 10 000. Par comparaison, cela équivaut à peu près à la compaction d'un fil de 1 km de long (et très fin…) dans le volume d'une cigarette.

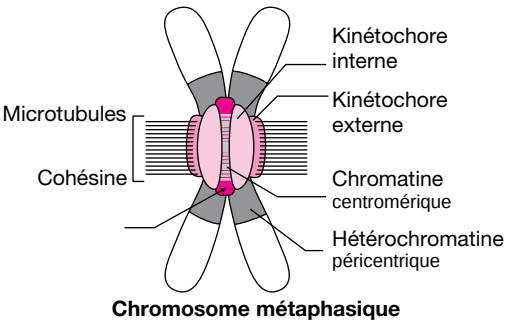


Figure 1 : Le centromère lors de la mitose

2. Prémétaphase et métaphase : vers un équilibre dynamique

La mise en mouvement des chromosomes

Fiche 32

Le mouvement des chromosomes est assuré par l'interaction entre le centromère et les microtubules du fuseau achromatique. Ce centromère, outre la cohésine, est lié à une complexe kinétochore, lui-même associé à un moteur protéique assurant une traction sur les microtubules du fuseau. Dès la désorganisation de l'enveloppe nucléaire (par phosphorylation des lamines), ces mouvements sont mis en route grâce à l'interaction chromosomes-cytosquelette.

La stabilisation en plaque équatoriale

L'issue de ces mouvements est la stabilisation à l'équateur de la cellule. Deux kinétochores et deux moteurs protéiques tractent en effet chaque centromère vers chacun des pôles. L'équilibre dynamique est atteint à l'équateur de la cellule.

3. Anaphase et télophase : séparation de deux génomes identiques

La fissuration des centromères

L'anaphase débute avec la déstructuration de la cohésine. La séparase, auparavant inhibée par la sécurine est activée par destruction de la sécurine. La séparase permet de cliver les liens au sein de la cohésine. Les chromatides sœurs, libérées, sont naturellement tirées chacune vers un pôle.

La reconstitution de l'enveloppe nucléaire

En télophase, les lamines sont déphosphorylées et il se reconstitue une enveloppe nucléaire autour de la chromatine qui commence à se mettre en place après décondensation des chromosomes.

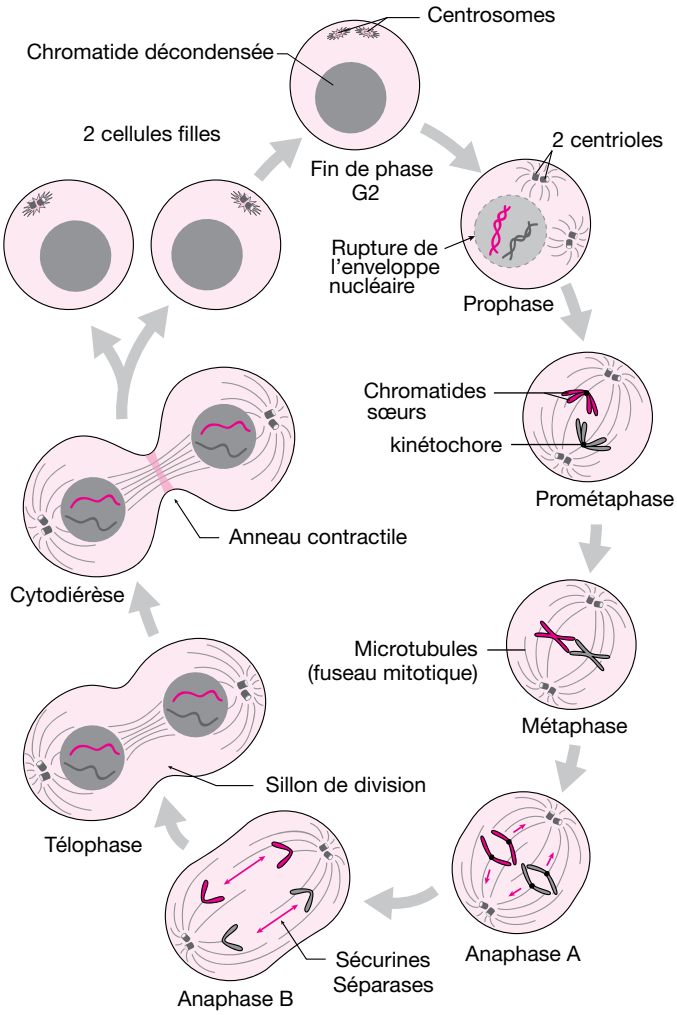


Figure 2 : Les phases de la mitose

Fiche 138

fiche 137

La mécanique mitotique

Fiche 31

La division d'une cellule recouvre deux aspects : un aspect génétique et un aspect mécanique. D'un point de vue génétique, tout repose sur la réplication de l'ADN, mécanisme extrêmement conservateur responsable d'une duplication très fidèle de l'information génétique. D'un point de vue mécanique, il s'agit de répartir équitablement ce matériel génétique, et également tout le matériel de la cellule.

1. Cytosquelette et bipolarisation de la cellule

Centrosome et microtubules

La mitose débute avec une réorganisation complète du cytosquelette microtubulaire, et donc avec une modification profonde de la polarité de la cellule. La duplication du centrosome débouche en effet sur la mise en place de deux réseaux divergents de microtubules, chacun centré sur l'un des centrosomes. De ce fait, alors qu'une cellule est classiquement polarisée, une cellule mitotique est très nettement bipolarisée, chaque centrosome définissant un pôle.

Le fuseau achromatique

Cette logique bipolaire s'exprime pleinement dans la formation du fuseau achromatique. Ce fuseau est constitué de microtubules reliés soit à un pôle soit à l'autre, et qui s'interpénètrent en opposition.

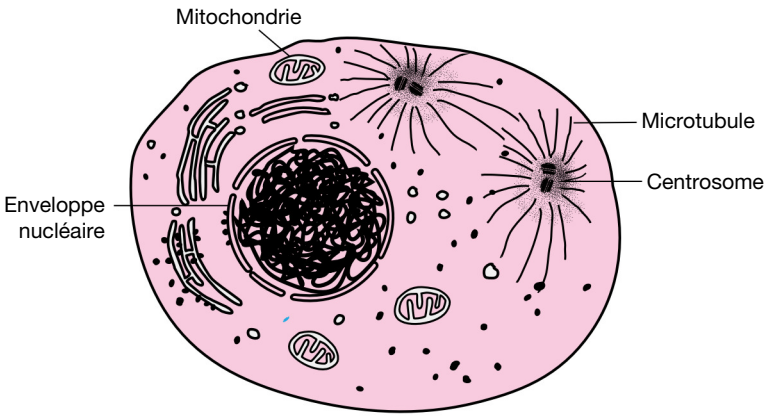


Figure 1 : Réorganisation lors de la prophase

2. Interaction entre chromosomes et cytosquelette

Déstructuration de l'enveloppe nucléaire et condensation des chromosomes

Le matériel génétique, jusqu'ici « à l'abri » du cytosquelette va alors accéder au fuseau achromatique par suite de la disparition de l'enveloppe nucléaire. Cette désorganisation est causée par le désassemblage des lamines, les protéines qui structurent la périphérie

du noyau, juste sous l'enveloppe. Ce désassemblage est provoqué par une phosphorylation de ces protéines.

Kinétochores et mouvements de chromosomes

Le chromosome mitotique est équipé d'un appareil protéique : les kinétochores. Ces structures sont liées au centromère du chromosome et sont les acteurs de l'interaction entre le chromosome et les microtubules du fuseau.

Lorsqu'un kinétochore capture un tubule, il s'établit, sur le centromère, une force de traction dirigée vers le pôle auquel est relié le microtubule. Comme deux kinétochores sont sur le centromère, placés en opposition, le chromosome se trouve pris entre deux mouvements contradictoires qui finissent par se stabiliser sur la plaque métaphasique, à mi-chemin des deux pôles. Ainsi, se définit la plaque équatoriale.

Par la suite, la fissuration des centromères permet de libérer les forces sur les deux nouveaux chromosomes obtenus : chacun est tracté vers un pôle. C'est ainsi que le partage est équitable. La disposition des kinétochores impose que les deux chromatides d'un chromosome mitotique soient tournées chacune vers un pôle différent.

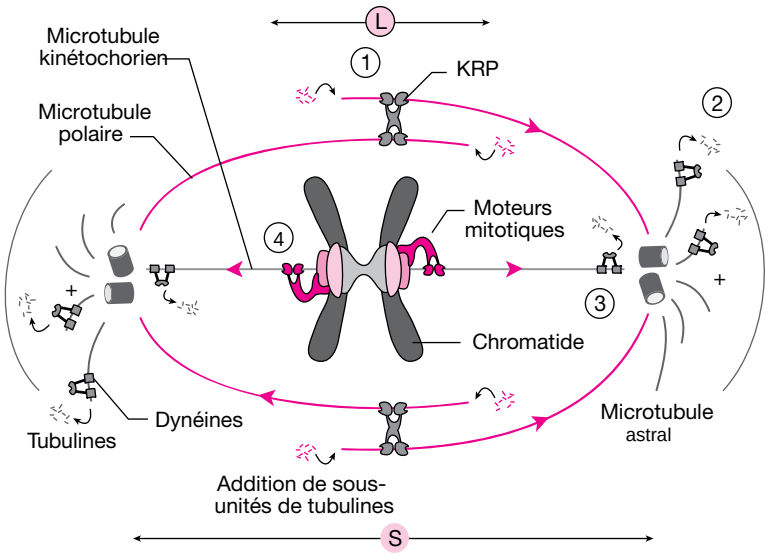


Figure 2 : Kinétochores et moteurs mitotiques

3. La formation équitable de deux cellules

Équirépartition des organites

C'est parce que la cellule est bipolarisée que, lors de la mitose, les organites sont statistiquement équirépartis entre les deux pôles de la cellule. La séparation finale en deux cellules répartit donc équitablement les organites.

Une segmentation dans le plan équatorial

La cytodiérèse prend deux modalités différentes selon que l'on a une cellule animale ou une cellule végétale. Mais dans les deux cas, c'est encore la polarité des microtubules et le caractère bipolarisé de la cellule qui oriente vers l'équateur l'anneau contractile d'actine des cellules animales ou le phragmoplaste des cellules végétales.

Fiche 135

fiche 138

Le cycle cellulaire et son contrôle

Au cours du développement, lors de la croissance, de la régénération ou de la réparation des tissus des cellules se divisent en respectant cependant le plan d'organisation de l'organisme. Cet équilibre résulte entre autre de mécanismes de contrôle très étroits du cycle cellulaire.

1. Les phases du cycle cellulaire

Disjonction entre réplication de l'ADN et mitose

Le cycle cellulaire est rythmé par deux étapes critiques : la réplication de l'ADN en vue d'une division définit la phase S ; la division cellulaire définit la phase M. Entre ces deux événements s'intercalent des phases d'activité végétative de la cellule, la phase G1 après M et avant S, et la phase G2 entre S et M. L'ensemble G1-S-G2 constitue l'interphase et représente environ 90 % de la durée d'un cycle. Au cours de la phase S se produit également la duplication du centrosome.

La « phase » G0

Fiche 170

De nombreuses cellules différenciées perdent l'aptitude à se diviser et sortent du cycle cellulaire pour entrer dans un état dit quiescent. On dit alors qu'elles sont en phase G0. La plupart enteront en apoptose sans refaire de cycle cellulaire mais il est parfois possible de les faire revenir dans le cycle cellulaire sous stimulation de facteurs de croissance, de facteurs mitogènes. C'est le cas par exemple des hépatocytes.

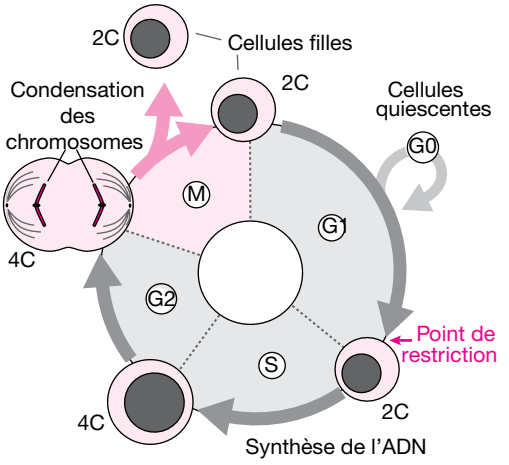


Figure 1 : Le cycle cellulaire

2. Les points de contrôles

Il a été montré que des cellules dont l'ADN a été préalablement endommagé n'entrent plus en phase S ni en mitose. Il y a un point de contrôle à l'entrée en S ou en M, ce qui évite de multiplier et propager des génomes endommagés. Les « points de contrôle » du cycle cellulaire permettent d'effectuer une sorte de check-list avant les situations

critiques. Les vérifications essentielles tiennent à quelques évidences : « tout l'ADN est-il dupliqué ? » ; « la cellule est-elle assez grande ? » ; « tous les chromosomes sont-ils stabilisés en plaque métaphasique ? », « l'ADN est-il en état ? », etc.

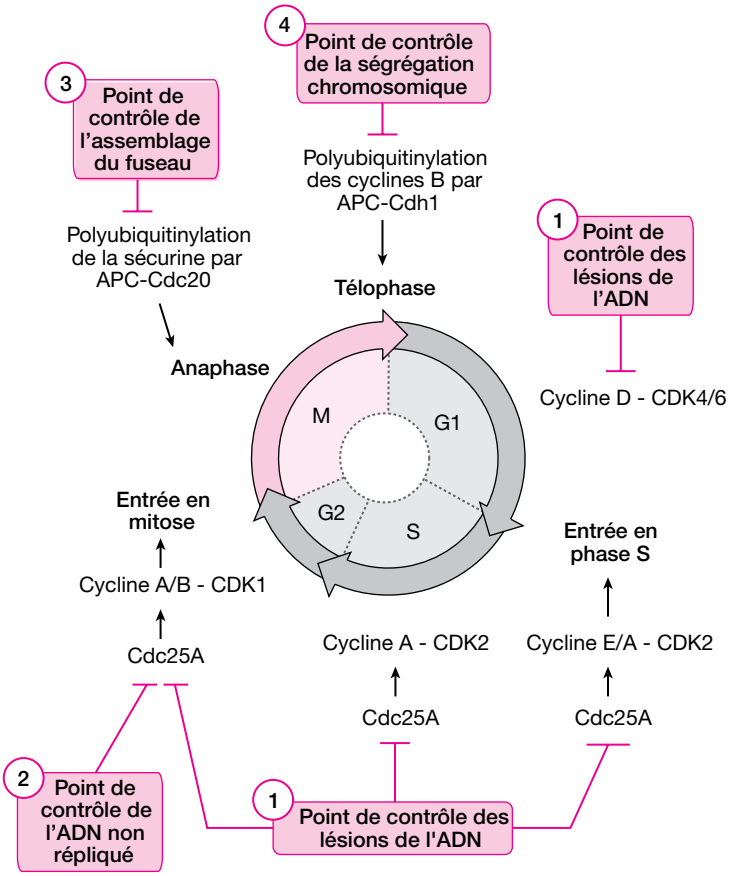


Figure 2 : Les points de contrôle du cycle cellulaire

3. Les protéines impliquées dans le contrôle

Le MPF et la mitose

Le premier acteur de contrôle du cycle cellulaire mis en évidence est le MPF (*Maturation Promoting Factor*). C'est un facteur cytoplasmique propre à déclencher la reprise de division d'un ovocyte de Xénope bloqué en métaphase. Ce test biologique a permis de mesurer une « activité MPF » dans de nombreuses cellules au cours du cycle cellulaire. Le MPF est une molécule composée de deux sous-unités : une cycline B et une molécule CDK1 (*Cyclin Dependent Kinase*) à activité kinase. L'activité de la CDK exige la liaison avec la cycline. La cycline B est produite de façon cyclique et est rapidement dégradée en début d'anaphase. Cela explique l'activité périodique du MPF.

Autres points de contrôle

Les autres points de contrôle du cycle cellulaire impliquent également des complexes cyclines (A, B, C, D, E) et des CDK (nombreuses molécules différentes). Tous ces complexes protéiques sont sous le contrôle de nombreux signaux cellulaires.

fiche 139

Les morts cellulaires

La caractéristique la plus évidente des systèmes vivants est… de pouvoir mourir. Au niveau cellulaire, cependant, la mort peut désigner deux phénomènes tout à fait distincts et de signification toute différente : la mort par nécrose et la mort cellulaire programmée.

1. La nécrose

On pourrait qualifier la nécrose de mort « involontaire ». Il s'agit d'une mort cellulaire provoquée par un dysfonctionnement. Le cas le plus fréquent est celui d'une ischémie, c'est-à-dire d'une privation de dioxygène, ou bien d'une blessure. L'exposition à de trop fortes températures tue également des cellules. Dans tous les cas, des lésions sont à l'origine de la nécrose.

Fiche 181

Suite à de telles lésions, l'intégrité membranaire qui est modifiée, ce qui altère l'équilibre osmotique de la cellule. Il en résulte un gonflement de la cellule, un éclatement et la libération dans les tissus de débris cellulaires, enzymes comprises. Cela provoque une inflammation, puis le recrutement de macrophages venant ingérer les débris.

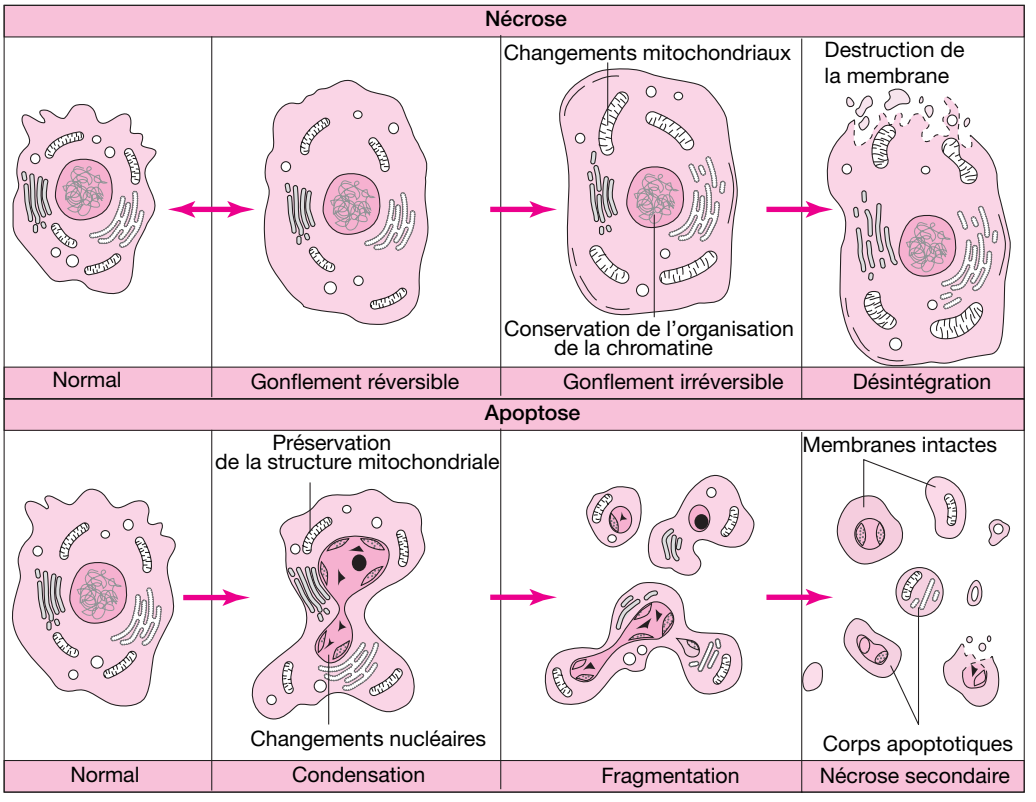


Figure 1 : Différences entre nécrose (en haut) et apoptose (en bas)

2. L'apoptose

Signification biologique

À l'inverse de la nécrose, l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est une mort « discrète » et « utile », ne provoquant pas d'inflammation.

Lors du développement, des cellules inutiles ou surnuméraires sont éliminées (le cas le plus fréquemment cité est celui de la disparition de la palmure des mains chez les Vertébrés). C'est le moyen de maturation d'organes par sélection comme dans le système nerveux ou le système immunitaire. Ce suicide peut également survenir chez des cellules mutantes ou à matériel génétique endommagé, ce qui préserve le tissu ou l'organisme.

Les manifestations de l'apoptose sont une contraction cellulaire, une condensation du matériel nucléaire, puis sa fragmentation. La cellule se segmente enfin, sans éclatement de la membrane. Cela libère des corps à membrane intacte, les corps apoptotiques qui sont finalement éliminés par des macrophages.

Voie intrinsèque de l'apoptose (voie mitochondriale)

Cette voie est activée lors, par exemple, d'une altération du génome. Le contenu de l'espace intermembranaire mitochondrial est libéré dans le cytoplasme et aboutit à l'activation de caspases par une cascade de protéolyses. Ces caspases sont responsables de la dégradation des contenus cellulaires.

Voie extrinsèque de l'apoptose (voie des signaux de mort)

Cette voie est provoquée par des signaux extracellulaires. Elle est donc plutôt typique des processus d'élimination contrôlée de la maturation de lymphocyte ou l'élimination de cellules tumorales ou virosées. Des récepteurs membranaires de mort cellulaire provoquent la cascade de protéolyse des caspases et induisent l'apoptose.

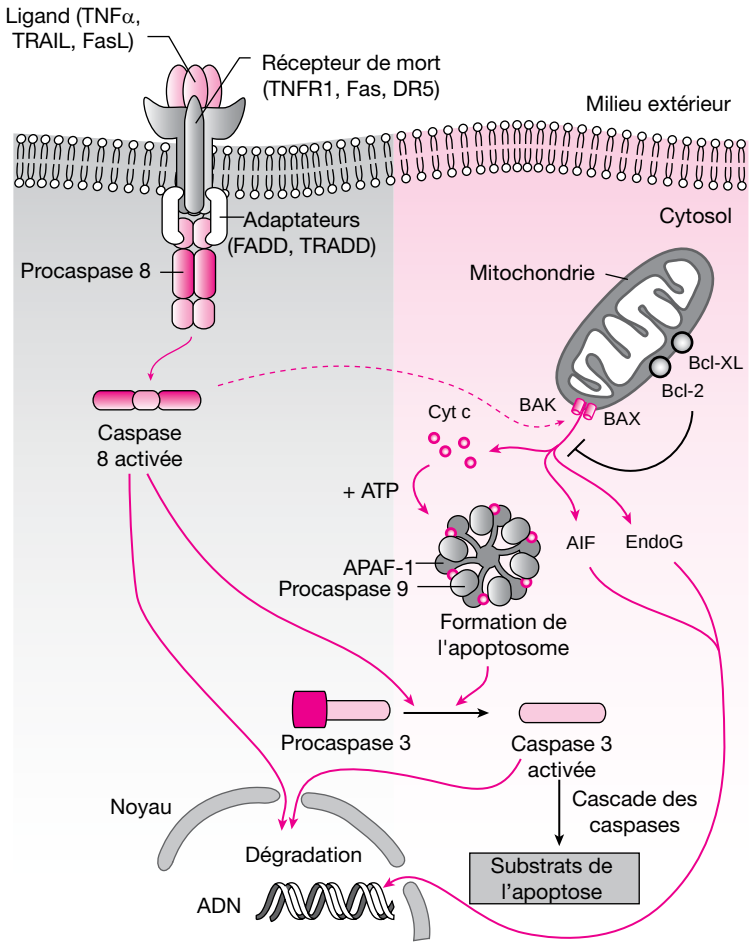


Figure 2 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

fiche 140

Division cellulaire et apoptose

En dehors d'une évolution accidentelle menant à une nécrose, une cellule en interphase a donc trois orientations possibles du point de vue de son cycle cellulaire : entrer en phase G0 et ne plus se diviser, entrer en division, ou bien entamer un processus d'apoptose.

1. Les signaux de contrôle social des cellules

Signaux mitogènes

Fiches 128, 129, 131

Les cellules d'un Mammifère sont généralement bloquées en phase G1 par inhibition constitutive des CDK. Des signaux extracellulaires, provenant par exemple des cellules voisines, peuvent lever ces inhibitions. Ce sont des facteurs de croissance mitogènes de type PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) ou EGF (*Epidermal Growth Factor*). Ces facteurs, par la voie de Ras et des MAPKinases puis de la protéine Myc, stimulent la production de cyclines et l'activation des CDK de fin de G1.

Activateurs de croissance cellulaire

D'autres signaux, parfois communs avec les mitogènes, stimulent l'activité métabolique de la cellule et ses synthèses, provoquant une augmentation de taille de la cellule. Le PDGF et la protéine Myc sont également impliqués dans cette voie.

Facteurs de survie

Les cellules d'un tissu sont généralement maintenues en état de survie par inhibition des programmes d'apoptose sous l'effet de signaux extracellulaires de survie (la voie extrinsèque).

On regroupe ces trois différents signaux de contrôle sous le terme de « facteurs de croissance ». Un facteur de croissance est donc une molécule secrétée qui agit sur la multiplication cellulaire, que ce soit sur le cycle lui-même ou sur l'accroissement de taille de la cellule. Certains facteurs de croissance peuvent à la fois être inhibiteurs de la croissance et inducteurs d'une différenciation. Un facteur de croissance peut agir sur les trois aspects présentés ci-dessus, même si au niveau d'une cellule donnée une combinaison de facteurs de croissance peut se répartir le travail.

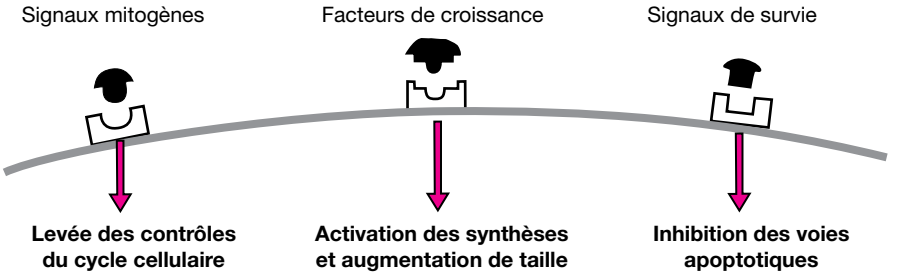


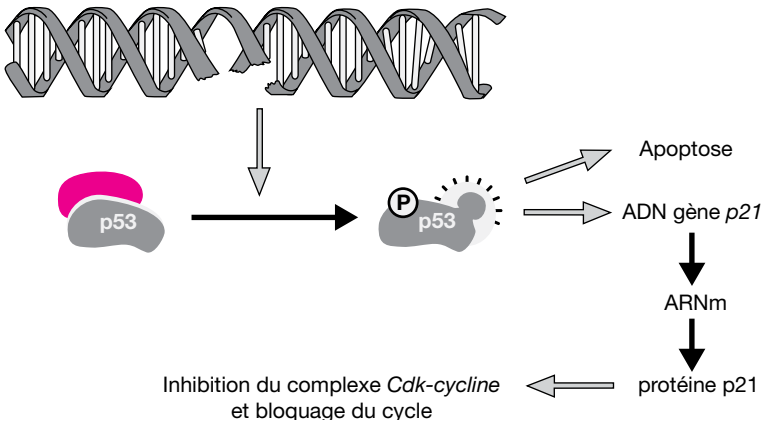
Figure 1 : Contrôle social des cellules

2. Les points de contrôle du cycle sont aussi impliqués dans l'apoptose

La protéine p53 et l'apoptose

Le gène *p53* est un gène suppresseur de tumeur, sa forme mutée favorisant les cancers. La protéine p53 intervient dans les systèmes de surveillance de l'ADN, et se trouve activée lorsque l'ADN est endommagé. En cas cependant de lésion prolongée, en l'absence de réparation de l'ADN par exemple, la protéine p53 peut aussi induire l'apoptose de la cellule.

Fiche 139



Focus chapitre 17

Figure 2 : Protéine p53 et lésions de l'ADN

La surexpression des mitogènes

Les voies mitogènes peuvent être sur-stimulées par hyperactivité de Ras ou de Myc. Mais cette hyperactivité de Myc peut également provoquer une activation durable de la protéine p53 qui stimule alors soit l'arrêt du cycle cellulaire, soit l'apoptose. Ce schéma permet à la cellule d'éviter une prolifération excessive.

Fiche 202

L'activité de Ras ou de Myc permet la production d'une protéine p19 qui lève le blocage de p53 (par la protéine mdm2).

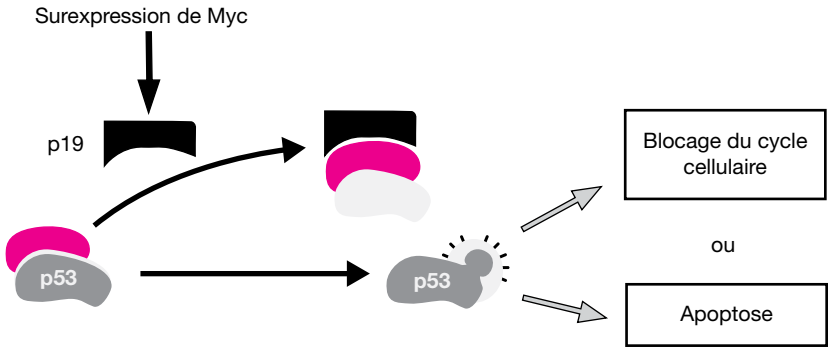


Figure 3 : Protéine p53 surexpression des mitogènes

fiche 141 Le modèle *C. elegans* et la découverte de l'apoptose

Fiche 159

L'attention que porte la communauté scientifique à l'apoptose est due à des découvertes récentes qui représentent trois avancées majeures dans le domaine. La première de ces observations est liée au nématode *Caenorhabditis elegans* qui a permis de montrer que la mort cellulaire est un processus actif sous contrôle génétique. L'ensemble de ce travail a permis l'obtention du prix Nobel de médecine en 2002 à S. Brenner, H. R. Horvitz et J. E. Sulston. Le deuxième point concerne les voies de transduction du signal d'apoptose. Ces études ont permis l'identification de molécules de signalisation spécifique de la mort comme une nouvelle famille de protéases à cystéine, les caspases. Enfin, il est maintenant devenu clair que de nombreuses pathologies sont caractérisées par une dérégulation des programmes d'apoptose.

1. Le développement de *C. elegans*

Au cours du cycle de développement de *C. elegans* (figure 1), il y a très exactement 131 cellules somatiques de l'hermaphrodite qui vont mourir par apoptose (le vers possédant 959 cellules). La plupart de ces morts cellulaires vont se réaliser au milieu du cycle embryonnaire, soit entre 4 et 8 heures après la fertilisation. Cette mort est rapide et les cellules touchées sont ensuite éliminées par les cellules voisines qui n'en laissent aucune trace résiduelle.

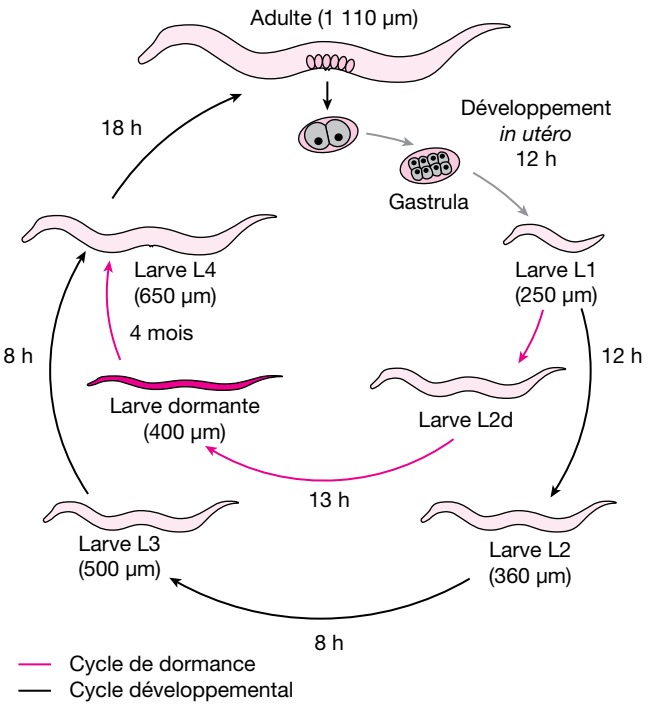


Figure 1 : Cycle vital du nématode *C. elegans*

2. La régulation de l'apoptose

Le programme de la mort cellulaire par apoptose a été découvert par une analyse génétique. Différents cribles ont ainsi permis d'identifier les gènes impliqués. Une fois obtenus, ces mutants ont été combinés entre eux. De cette manière, trois étapes distinctes ont pu être caractérisées. La première concerne le processus de mort cellulaire *stricto senso*. La deuxième concerne la reconnaissance et la digestion des cellules mortes par phagocytose, la troisième étape étant la dégradation complète de la cellule. Les gènes impliqués ont été pour certains baptisés ced (*Caenorhabditis elegans death genes*). Au sein de ces différents gènes, 4 gènes ont un rôle en amont de la mort elle-même : *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *eg1-1*.

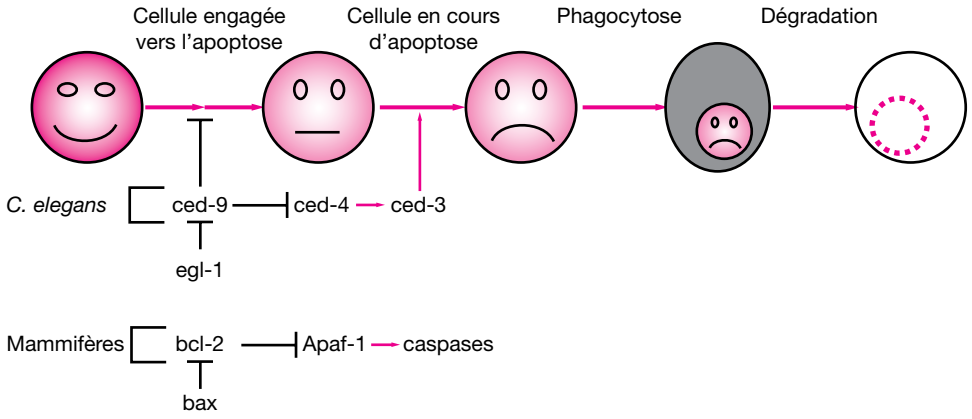


Figure 2 : Programmation génétique de la mort cellulaire chez *C. elegans*

Une perte de fonction de *ced-3*, *ced-4* et *egl-1* aboutit à la survie des 131 cellules théoriquement destinées à être éliminées. Ces gènes permettent donc l'expression de facteurs déclenchant l'apoptose (ils sont pro-apoptotiques). À l'inverse, *ced-9* possède une activité anti-apoptotique. Une mutation perte de fonction de ce gène est létale pour le nématode dans les étapes précoces de son développement. Cette létalité est due à une trop grande mort cellulaire (le facteur inhibant cette mort étant absent). Le fonctionnement de ces gènes est connu et implique une série d'interactions directes entre les quatre acteurs principaux. CED-4 peut former un dimère. Celui-ci est séquestré par CED-9 à la surface de la mitochondrie. Dans cette conformation, CED-4 est inactif. Les cellules destinées à mourir par apoptose vont exprimer la protéine EGL-1. Cette protéine va venir se fixer sur CED-9 et provoquer un changement de conformation. Cette variation va à son tour entraîner le relargage de CED-4. Deux dimères de CED-4 « libre » peuvent alors s'associer pour former un tétramère. Celui-ci va finalement interagir avec CED-3 pour former un apoptosome actif qui va conduire la cellule dans la voie irréversible de l'apoptose. Celle-ci sera initiée par l'interaction de plusieurs molécules de CED3 qui se convertissent par un effet de proximité en protéases fonctionnelles de type caspase.

Beaucoup de ces gènes ont des homologues chez les mammifères qui régulent l'apoptose dans des mécanismes du même ordre (figure 2).

fiche 142 La culture cellulaire animale

Les premières cultures de cellules animales ont eu lieu avec l'isolement des leucocytes qui étaient conservés dans du sérum. Vers 1910, le pionnier de la transplantation, Carrel, généralise le processus en conservant des cellules de biopsies dans des milieux stériles contenant des facteurs de croissance.

Fiche 165

Pour A. Carrel (prix Nobel en 1912) « Une cellule bien hydratée, bien nourrie, bien débarrassée de ses déchets se renouvelle perpétuellement » ... mais c'était avant la découverte de la sénescence.

La possibilité de cultiver les cellules en dehors de l'organisme, d'en disposer en abondance, de pouvoir les transformer, a permis notre compréhension actuelle du fonctionnement des cellules.

1. Différentes sortes de lignées cellulaires

Fiche 151

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules qui prolifèrent en culture et qui maintiennent les mêmes caractéristiques que leur cellule d'origine. La lignée est généralement dérivée d'une culture primaire de cellules saines ou cancéreuses. Lorsque la population a une capacité illimitée de division, il s'agit d'une lignée continue alors que les lignées finies deviennent sénescentes après un nombre limité de divisions.

Fiche 203

Pour établir une lignée continue à partir de cellules saines, il faut les immortaliser en leur incorporant des gènes empêchant leur vieillissement (gène de la télomérase par exemple) ou les transformer par des oncogènes, des virus ou des substances chimiques qui leur donneront des propriétés tumorales (lignées immortalisées *vs* transformées).

La nature des lignées étudiées (saines, immortalisées, transformées ou malignes) a bien sûr une influence sur les conclusions qu'on pourra tirer de leur observation.

2. Maintenir les cellules en culture

La culture de cellules animales nécessite de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* :

- La température, l'humidité, le taux de CO_2 doivent être régulés dans l'incubateur alors que le pH et la force ionique doivent être ajustés dans le milieu de culture.
- Le milieu doit être riche en nutriments : source de carbone, acides aminés essentiels, vitamines mais aussi facteurs de croissance adaptés à chaque lignée. Les milieux les plus couramment utilisés sont des milieux synthétiques complémentés par du sérum de jeune animal (car moins d'anticorps, exemple sérum de veau fœtal, SVF) mais des milieux « sans sérum » chimiquement définis existent aujourd'hui. Les milieux sont généralement renouvelés au moins tous les quatre jours, avant d'être épuisés.
- Les milieux de culture étant très riches et en général non sélectifs, il convient de travailler en conditions d'asepsie mais l'utilisation d'antibiotiques à large spectre est très fréquente (pénicilline + streptomycine le plus souvent).

Contrairement aux bactéries ou aux levures qui poussent en suspension dans leur milieu de culture, beaucoup de cellules animales ont besoin d'un support solide, elles sont adhérentes. Le plastique des flacons de culture est traité spécialement pour permettre l'adhérence de ces lignées et si nécessaire un composant plus physiologique est ajouté (collagène, laminine, etc.).

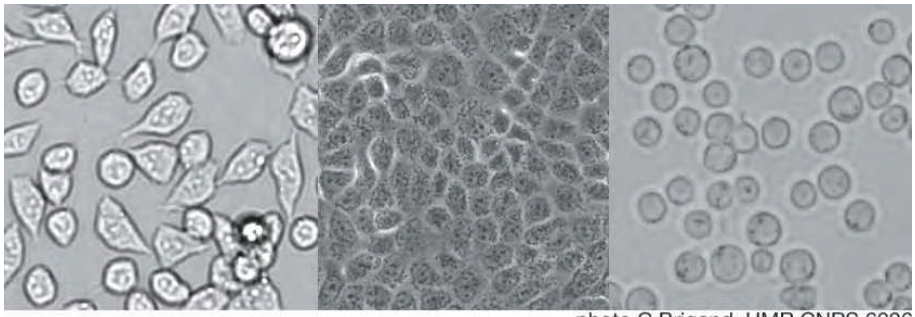


Figure 1 : Cellules en culture. De gauche à droite : Hela, MDCK à confluence, KE-37
Avec l'aimable autorisation de C. Brigand, UMR CNRS 6026.

Lorsque les cellules remplissent le fond de la boîte, elles sont à confluence et arrêtent de proliférer. Beaucoup de lignées (adhérentes ou non) sont sensibles à la densité de population et ne doivent être ni trop diluées, ni trop confluentes. Il faut donc procéder régulièrement à des passages des cellules, soit en diluant la suspension de cellules non adhérentes, soit en détachant les cellules adhérentes de leur support (souvent avec de la trypsine) et en ensemençant de nouveaux flacons.

Pour la conservation à long terme des lignées cellulaires, il est possible de les congeler en présence de cryoprotecteur et de les conserver dans l'azote liquide à -196 °C.

3. Modifier les cellules en culture

Les biologistes cellulaires tirent leurs connaissances de l'observation et de la physiologie de cellules en culture mais ils ont également besoin d'expérimenter pour tester leurs hypothèses.

Il maintenant facile de procéder en laboratoire à :

- La différenciation de cellules souches, qu'il s'agisse de cellules souches ou de progéniteurs adultes, de cellules souches embryonnaires (cellules ES), de cellules pluripotentes induites (iPS) différenciées par des cocktails de facteurs de croissance appropriés.
- L'expression d'un gène dans une lignée cellulaire. Le transgène placé sur un vecteur d'expression approprié est introduit par transfection. Celle-ci est transitoire sauf si des transfectants stables sont sélectionnés.
- L'extinction d'un gène. La technique des ARN interférents (ARNsi) est depuis peu le premier choix pour invalider un gène dans une lignée. Des siRNA d'environ 20 bases ciblant le gène d'intérêt sont transfectés dans les cellules. Ils forment des complexes d'ARN double brins avec les ARNm ciblés ce qui conduit à leur destruction.
- La technique CrisPR-Cas permet ainsi des invalidations ou mutations de gènes.

Fiche 162
Fiches 44 et 59
Fiche 42

FOCUS La découverte du MPF

Le MPF et son action ont été découverts à l'occasion d'études de la reprise de la maturation méiotique d'ovocytes d'amphibiens et d'étoiles de mer. L'étude de la maturation méiotique offre un modèle de choix, car tous les ovocytes en maturation sont préalablement bloqués en phase G2 et que l'on peut lever ce blocage par un traitement à la progestérone (chez l'amphibien), c'est-à-dire qu'une population d'ovocytes ainsi bloqués puis relancés est synchronisée.
Une première expérience permet de montrer que l'injection à une cellule bloquée en G2 du contenu cytoplasmique d'une cellule en phase M provoque une entrée en phase M. Il semble donc bien exister un facteur cytoplasmique, induit par la progestérone, qui provoque l'entrée en division. La même expérience avec une cellule en G2, non traitée par la progestérone aboutit toujours à un échec.

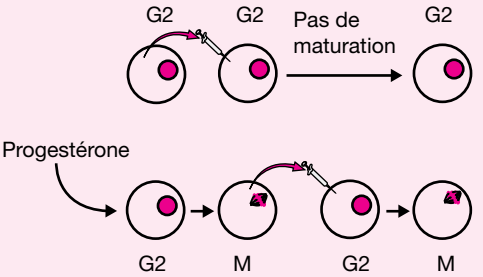


Figure 1 : Mise en évidence d'un facteur MPF

Une seconde série d'expériences montre qu'il est possible de mesurer l'activité du MPF. Un contenu cytoplasmique d'une cellule A peut être maintenant testé sur des ovocytes bloqués en G2. L'intensité de la réponse (par exemple le pourcentage d'ovocytes répondant positivement à l'injection) est alors évaluée, ce qui nous donne l'activité MPF de la cellule A au moment du prélèvement. On a ainsi pu suivre l'activité MPF dans un embryon d'amphibien, jusqu'à des stades de plusieurs cellules.

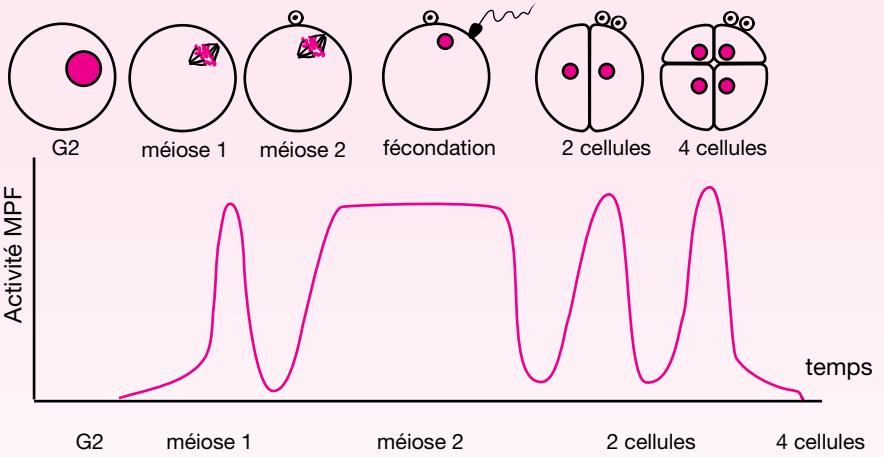


Figure 2 : Activité MPF au début du développement embryonnaire d'amphibien

On constate donc une activité cyclique du MPF. Les tentatives pour le purifier ont été longues et difficiles. C'est finalement en recherchant des protéines produites cycliquement que l'on a identifié les cyclines, puis leur implication dans la formation du MPF.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

12.1 Au sujet de la division cellulaire, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Un cycle cellulaire correspond à une interphase suivie d'une division
- ☐ b. La division cellulaire est toujours égale et symétrique entre les cellules filles
- ☐ c. Le cytosquelette d'actine est indispensable pour la ségrégation du matériel cellulaire

12.2 Au sujet des chromosomes, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. En prophase, ils sont constitués d'une chromatide
- ☐ b. Les chromosomes sont alignés en plaque équatoriale lors de la métaphase
- ☐ c. En télophase, Ils sont constitués de molécules d'ADN bicaténaires

12.3 Au sujet du fuseau mitotique animal, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il assure la répartition des chromosomes au cours de la mitose
- ☐ b. Les centrosomes constituent les pôles du fuseau
- ☐ c. C'est une structure bipolaire

12.4 Au sujet du cycle cellulaire des eucaryotes, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Le point START ou point de restriction est situé à la fin de la phase G1
- ☐ b. Les cellules peuvent entrer en phase G0 à la fin de la phase G2
- ☐ c. La mitose correspond au partage en 2 de la cellule

12.5 Pour les cellules végétales, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Les phénomènes essentiels de la mitose végétale sont les mêmes que pour la mitose des cellules animales
- ☐ b. Leur division est impossible après la synthèse de leur paroi
- ☐ c. Leur division nécessite le cytosquelette d'actine

12.6 Au sujet du MPF, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Il déclenche la division mitotique et méiotique
- ☐ b. Il présente une activité kinase
- ☐ c. Il s'agit d'une cycline

12.7 Au sujet de la nécrose, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. C'est une mort cellulaire accidentelle
- ☐ b. Elle est déclenchée suite à des dommages de l'ADN
- ☐ c. Elle provoque une réaction inflammatoire

12.8 Au sujet de l'apoptose, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Elle provoque une réaction inflammatoire
- ☐ b. Elle conduit à une fragmentation nucléosomique
- ☐ c. Elle s'accompagne d'une augmentation du volume cellulaire

12.9 Au sujet des caspases, quelles affirmations sont correctes ?

- ☐ a. Elles sont présentes mais inactives dans les cellules vivantes
- ☐ b. Ce sont des DNases activées spécifiquement lors de l'apoptose des cellules
- ☐ c. Elles sont activées par des récepteurs membranaires

Réponses

12.1 **a**. Le partage en cellules filles est équitable mais pas toujours égal, il peut même être asymétrique lors de l'embryogenèse. Ce sont les microtubules qui permettent le partage des chromosomes et des organites.

12.2 **b** et **c**. En prophase après la réplication, les chromosomes ont 2 chromatides, et l'ADN est toujours bicaténaire.

12.3 **Toutes**.

12.4 **a**. C'est en fin de mitose que les cellules peuvent entrer en quiescence. *Stricto sensu*, la mitose est le partage du matériel nucléaire. Il peut y avoir des mitoses sans cytodiérèse, qui conduisent à des cellules polyploïdes.

12.5 **a**. La division est bien sûr possible pour les cellules végétales qui ont toutes une paroi, mais la cytodiérèse n'implique pas l'actine, il y a mise en place d'un phragmoplaste.

12.6 **Toutes**. Le MPF est constitué de deux sous-unités : CDK1 avec activité kinase et la cycline B.

12.7 **a** et **c**. Les dommages à l'ADN induisent généralement un arrêt du cyle qui permet la réparation ou qui conduit à l'apoptose.

12.8 **b**. Les corps apoptotiques sont éliminés par une phagocytose particulière, l'efférocytose, sans libération du contenu cytosolique et donc sans inflammation.

12.9 **a** et **c**. Comme leur nom l'indique, les C-Asp-Pases sont des protéases à cystéines, stockées sous forme de précurseur et activées soit par la voie des récepteurs de mort, soit par la voie mitochondriale.

Chapitre 13

Jonctions cellulaires et matrice extracellulaire

Objectifs

Les cellules ne sont pas isolées ; elles ont un milieu de vie. Dans un organisme pluricellulaire, cet environnement est constitué d'autres cellules, d'une lymphe (ou liquide extracellulaire), et d'une matrice extracellulaire, réseau essentiellement fibrillaire et protéique élaboré par les cellules elles-mêmes. Les interactions entre une cellule et son environnement reposent ainsi sur des liens mécaniques étroits entre cellules ou entre cellule et matrice ainsi que sur un dialogue moléculaire permanent entre cellules adjacentes de même qu'entre cellule et matrice.

Aux premières loges de ces interactions, nous trouvons bien entendu la membrane plasmique, mais surtout les protéines transmembranaires, tant le fonctionnement de ces systèmes repose sur un lien et un dialogue permanent entre milieu intérieur et extérieur.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 143

Les matrices extracellulaires animales

Les milieux extracellulaires des organismes pluricellulaires sont hautement organisés en une structure biphasée : un réseau tridimensionnel de macromolécules dans une phase aqueuse. L'architecture et la densité des réseaux fibrillaires protéiques des matrices animales déterminent nombre de propriétés mécaniques des tissus.

1. Le collagène et ses propriétés mécaniques

Structure fibrillaire

Le collagène est une protéine fibrillaire qui forme dans la matrice un dense réseau de câbles résistants à la traction. Le premier niveau de structure est le tropocollagène : il s'agit d'une torsade de trois brins protéiques, à l'image de nombreux cordages. Ces filaments de tropocollagène sont à leur tour regroupés en édifices plus complexes, variables selon les types de collagène.

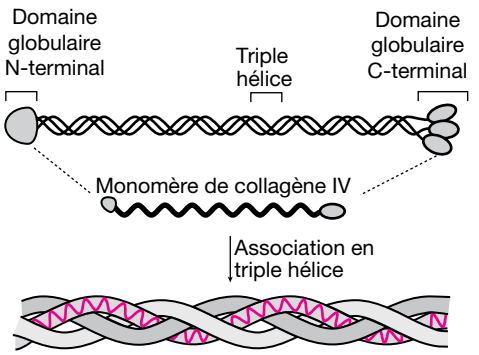


Figure 1 : Structure en torsade du tropocollagène

Une torsade serrée

La résistance à la traction du tropocollagène repose sur la qualité du serrage de la torsade à trois brins. Or, chacun des brins est hérissé de radicaux et un radical sur trois est tourné vers le centre de la torsade, ce qui pourrait nuire au serrage. Il est alors intéressant de constater que la structure primaire du collagène fait apparaître une glycine précisément tous les trois radicaux. La glycine est le plus petit des acides aminés, son radical étant limité à un atome d'hydrogène.

2. Édifices supra-moléculaires et gels

Les protéoglycanes

Ce sont des molécules ramifiées, parfois gigantesques. Elles contiennent de nombreux oses et acides uroniques, ce qui les rend très hydrophiles. Elles jouent un rôle de rétention d'eau et de liant entre les fibrilles de collagène.

Les consistances de gel

Un gel est un édifice tridimensionnel de macromolécules emprisonnant une phase fluide (ici, l'eau). La densité de cet édifice définit la consistance du gel. Une analogie simple

permet de comprendre cet aspect : dans un plat de spaghettis qui vient d'être cuit, si l'on ajoute une matière grasse, les pâtes coulissent très bien les unes sur les autres et l'on peut « verser » les pâtes d'un récipient à un autre, à la manière d'un liquide. En revanche, si l'on laisse refroidir les pâtes sans gras ni sauce, il s'établit une multitude de petits liens faibles entre les pâtes ; et l'édifice prend la consistance d'un gel, d'une masse plus ou moins rigide qui ne s'écoule plus. C'est la même dynamique au niveau moléculaire.

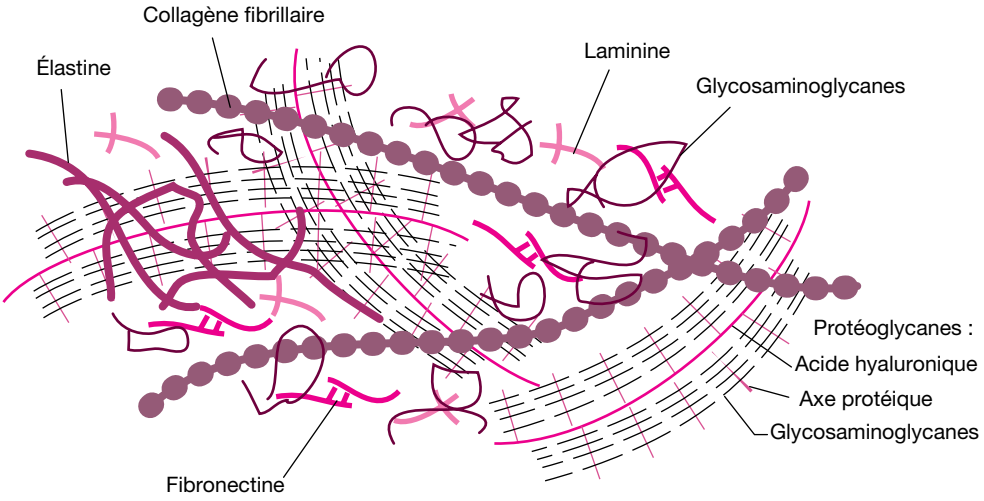


Figure 2 : Exemple d'architecture de matrice

3. Organisation et diversité des matrices

Les lames basales

Les lames basales doublent systématiquement les épithéliums. C'est une matrice mince (quelques fractions de micromètres). Très hydrophile, elle est très permissive pour les nombreux échanges qu'établissent les cellules épithéliales avec le milieu intérieur. On y trouve du collagène IV qui ne forme pas de longues fibrilles, mais de petites unités organisées en un réseau dense, associé à de la laminine.

Fiches 168, 169

Les conjonctifs

Ce sont des tissus riches en collagène I et en glycanes ; on y trouve également des fibres à propriétés élastiques. Les densités des réseaux supramoléculaires sont très diverses.

Les tissus osseux et cartilagineux : tissus conjonctifs particuliers

Ce sont des tissus à matrice très abondante. Les cellules y sont dispersées mais toujours en contact, parfois par de fins bras cytoplasmiques.

Les cartilages sont particulièrement riches en glycanes : glycosaminoglycanes et protéoglycanes. Le collagène y est de type II.

Le tissu osseux présente du collagène de type I en grande abondance. La caractéristique essentielle de cette matrice est sa minéralisation. On y trouve de l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$ et du carbonate de calcium $CaCO_3$. Cette minéralisation est responsable des propriétés de résistance à la compression du tissu osseux. Ce tissu représente également la principale réserve de calcium de l'organisme vertébré.

fiche 144

Les matrices extracellulaires végétales

Les matrices extracellulaires végétales forment ce que l'on nomme les parois squelettiques. Ces parois sont classiquement bien plus épaisses que celles des cellules animales, et sont facilement observables en microscopie optique. Elles sont constituées essentiellement de macromolécules glucidiques.

1. La cellulose et ses propriétés mécaniques

Un polymère stable et linéaire

Fiche 17

La cellulose est un polymère non ramifié de glucose β. La liaison osidique qui lie le carbone ß1 d'un monomère au carbone 4 de l'autre est très stable confère une assez bonne résistance à l'étirement à la molécule. Le pont osidique forme un angle entre deux monomères, mais cet angle alterne d'un monomère au suivant. Cela induit une structure très linéaire qui forme de longues molécules de plusieurs centaines ou milliers de monomères.

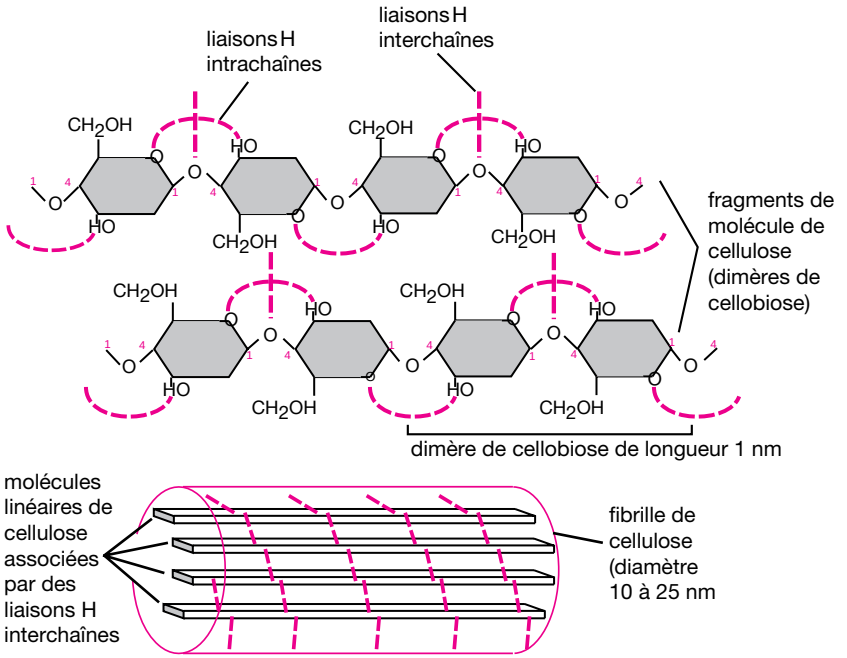


Figure 1 : Microfibrilles de cellulose

Des microfibrilles résistant à la traction

Plusieurs molécules de cellulose peuvent s'assembler en microfibrilles. Les molécules de cellulose y sont disposées en parallèle et établissent des liaisons hydrogènes interchaînes. L'ensemble renforce la résistance à la traction de l'ensemble (de l'ordre de 40 kg par mm^2).

2. L'hémicellulose et les pectines : la paroi primaire

Un réseau tridimensionnel hydrophile

Les molécules d'hémicellulose présentent un axe identique à la cellulose sur lequel sont branchées des ramifications osidiques de quelques monomères. Ces molécules sont disposées le long des microfibrilles et donc les dotent de branchements latéraux.

Les pectines sont aussi des polymères glucidiques. Ce sont de petits polymères très ramifiés, riches en acides uroniques et donc très hydrophiles. Ce caractère ramifié contribue à la consistance de gel de ce ciment (consistance spécifique des confitures).

Des liaisons ioniques entre polymères

Les charges négatives (acides uroniques) des pectines sont stabilisées par des ions Ca^{2+} qui réalisent donc des ponts entre les molécules. Cela densifie et rigidifie le réseau tridimensionnel des pectines qui forment ainsi un gel qui emprisonne les microfibrilles de cellulose. Selon cette densité, le gel pectique sera plus ou moins fluide.

Cette architecture définit la paroi primaire, typique des cellules méristématiques.

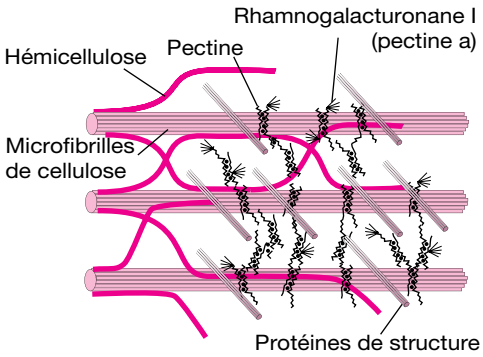


Figure 2
Architecture de la paroi primaire

3. Diversité des parois végétales

La différenciation des cellules végétales passe, entre autres, par la mise en place d'une paroi squelettique complexe spécifique de chaque tissu.

Épaississement

Les cellules différenciées ont une paroi plus épaisse que les méristèmes. Cet épaississement se fait par apposition de couches successives de fibrilles de cellulose. La cohésion mécanique de l'ensemble est renforcée par le fait que, d'une couche à l'autre, les fibrilles adoptent une orientation différente.

Imprégnation de lignine

Les cellules des éléments conducteurs du xylème, mais aussi les fibres de sclérenchyme élaborent une paroi lignifiée. Cela confère deux propriétés fondamentales à ces parois : imperméabilité et résistance à la compression. La lignine est un réseau complexe de petits monomères aromatiques, liés dans un réseau tridimensionnel complexe. Le plus remarquable est que cette lignine se dépose en imprégnant la matrice existante, remplissant les espaces entre microfibrilles, et éliminant l'eau de ces espaces. C'est là ce qui explique les deux propriétés de ces parois.

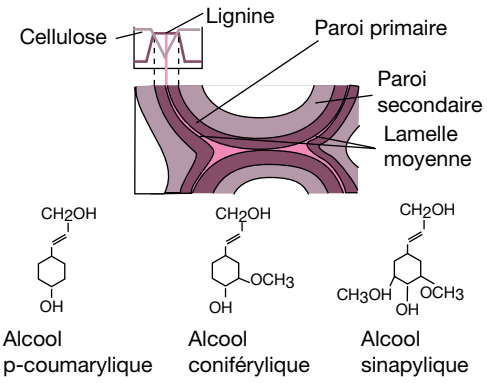


Figure 3
Imprégnation de lignine

fiche 145

L'adhérence des cellules

La cohésion mécanique, mais aussi la cohérence physiologique des tissus reposent sur les interactions entre cellules. Ces interactions permettent des dialogues moléculaires, des communications à très faible distance, mais aussi participent aux propriétés mécaniques des tissus (étanchéité, consistance…).

1. Les dispositifs de jonction cellulaire

La cohésion mécanique des tissus

Fiches 148, 149

C'est là le rôle des desmosomes et des ceintures d'adhérence. Ces jonctions permettent de faire adhérer des cellules mais aussi et surtout de lier mécaniquement les cytosquelettes de deux cellules.

Des protéines transmembranaires, les cadhérines, assurent la jonction. Côté intercellulaire (extérieur, donc) les cadhérines adhèrent les unes aux autres par l'intermédiaire de Ca^{2+}. Côté intracellulaire, elles sont liées à des protéines qui les relient au cytosquelette.

Fiche 121

Les ceintures d'adhérence, dans les épithéliums, sont reliées à des ceintures d'actine. Ces ceintures, éventuellement contractiles, et liées entre elles par les cadhérines confèrent une résistance à l'étirement à l'épithélium.

Fiche 118

Les desmosomes sont liés, eux, aux filaments intermédiaires du cytosquelette (kératine, dans les épithéliums). Ils forment des adhérences ponctuelles

L'arrimage des cellules à une matrice

Les hémidesmosomes sont organisés sur le même principe que les desmosomes, avec une liaison aux filaments intermédiaires. Cependant, ce ne sont pas des cadhérines qui traversent la membrane, mais des intégrines qui se lient directement à des molécules de la matrice extracellulaire.

L'étanchéité des épithéliums

Fiche 168

Les jonctions serrées n'ont pas d'efficacité mécanique ; elles sont fort peu résistantes. En revanche, elles assurent, grâce à un rapprochement très intime des membranes de deux cellules, l'étanchéité d'un épithélium. C'est le moyen d'entretenir des contrastes et de contrôler des flux entre différents compartiments des organismes (épithélium intestinal, rénal, endothélium sanguin…)

2. Les dispositifs d'adhérence

Ces dispositifs jouent autant un rôle physique (mécanique, étanchéité) que biologique. Ce sont des acteurs d'un dialogue moléculaire entre structures voisines.

De cellule à cellule

Les *Cell Adhesion Molecules* (CAM) sont des glycoprotéines transmembranaires. Liées au cytosquelette, elles sont le support de reconnaissances et de liaisons entre cellules, reconnaissance souvent homophile (liaison entre deux CAM identiques) parfois hétérophiles (une CAM qui se lie à une molécule différente).

Des cadhérines participent également (avec l'aide du Ca^{2+}) à des liens entre cellules. Ces liens sont spécifiques, et l'on rencontre ainsi des N-CAM et des N-Cadhérines (tissu nerveux), des E-CAM et des E-Cadhérines (tissus épithéliaux).

Lors du développement embryonnaire, ces molécules jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance entre types cellulaires, entre territoires, en établissant des liens parfois transitoires.

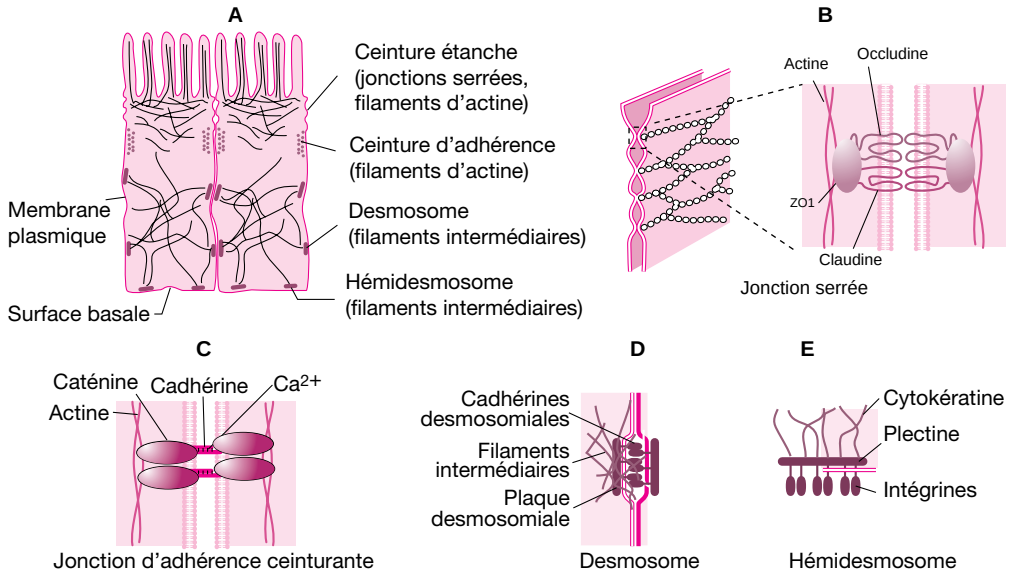


Figure 1 : Les jonctions cellulaires

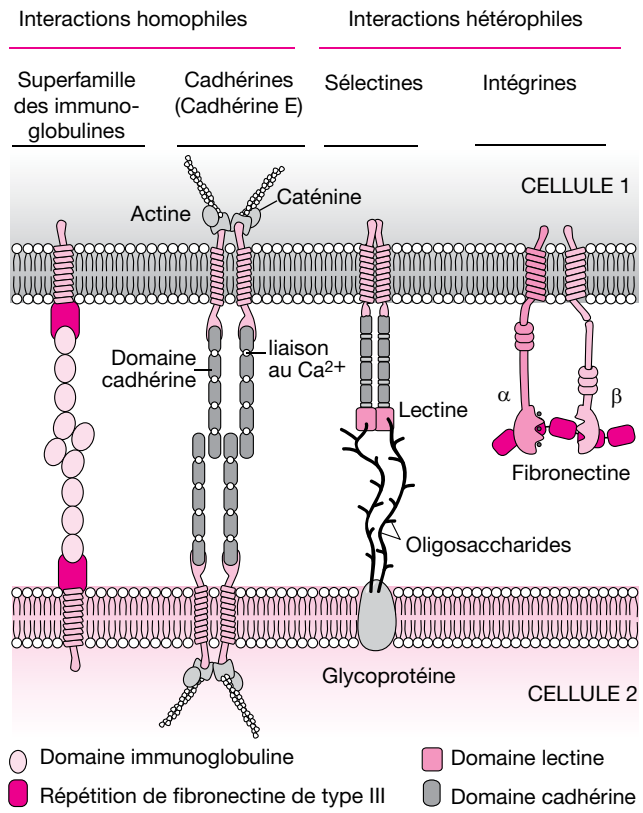


Figure 2 : Molécules d'adhérence, CAM et cadhérines

De cellule à matrice

De nombreux contacts d'adhérence ont également lieu entre cellules et matrices : ce sont les contacts focaux. Ces contacts sont reliés à un réseau contractile d'actine et interagissent avec des molécules de la matrice telles que la fibronectine (*via* les intégrines). Ces dispositifs permettent, lors du développement embryonnaire ou lors de métastases, des déplacements de cellules par rapport à une matrice.

Fiche 206

fiche 146 Jonctions cellulaires – Communications entre cytoplasmes

Deux cellules adjacentes sont en communication biochimique par diverses molécules d'adhérence, par divers messagers chimiques. Mais il existe également des moyens de mettre en communication directe l'intérieur des cellules. Ces dispositifs diffèrent très nettement entre cellules animales et végétales.

1. Les plasmodesmes des tissus des plantes

Chez les végétaux de la lignée verte, on rencontre très fréquemment une mutualisation des cytoplasmes dans un tissu : de véritables ponts cytoplasmiques, les plasmodesmes, sont établis entre cellules. Cela suppose l'existence de perforations dans les parois squelettiques, laissant passer la structure. Ces voies de communication sont très amples ; un tube de réticulum endoplasmique (d'un diamètre environ 15 nm) occupe le centre du canal ; de nombreuses molécules peuvent donc transiter dans ce pore.

Les cellules ainsi connectées forment donc une communauté particulière, comme une vaste cellule à plusieurs noyaux. Cette association étroite entre cellule forme ce que l'on nomme un syncytium. La plupart des tissus végétaux sont ainsi des syncytiums. En revanche la plupart des tissus sont disjoints les uns des autres, ce qui permet d'entretenir des contrastes.

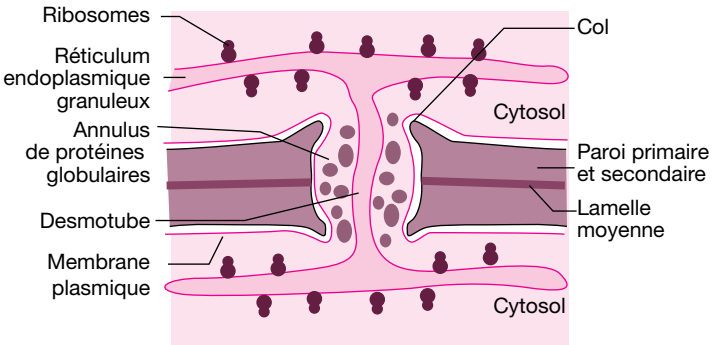


Figure 1 : Structure d'un plasmodesme

2. Les jonctions lacunaires

Ce type de contact entre cellules se rencontre dans les tissus animaux. On les nomme également jonctions gap. Elles consistent en la mise en place de deux complexes protéiques membranaires en vis-à-vis dans deux cellules jointives.

Les connexons

Un connexon est un complexe protéique en rosette (une rosette est formée de six protomères) inséré dans la membrane plasmique. Il forme ainsi un pore qui permet la communication avec le cytoplasme de la cellule voisine, équipée elle aussi d'un connexon. Le pore est de faible calibre, ce qui en fait une voie d'échange sélective. Ce diamètre de 1,5 nm laisse passer les petites molécules organiques (glucose, acides aminés…)

les ions minéraux, l'eau. Les connexons sont souvent organisés en plaques où les deux membranes impliquées sont rapprochées de façon très étroite. L'espace intermembranaire n'y est large que de 2 à 3 nm, c'est-à-dire la moitié de l'épaisseur de la membrane.

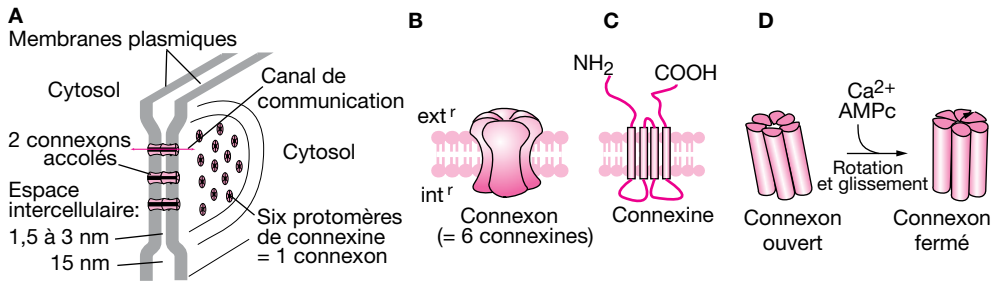


Figure 2 : Organisation des jonctions lacunaires

Un couplage physiologique des cellules

Les jonctions gap interviennent dans plusieurs types de relations qui ont pour point commun de coupler des cellules, de coordonner des activités.

Ainsi, elles permettent la propagation d'influx excitateur dans le tissu cardiaque ; ces jonctions forment de véritables synapses électriques. Les cellules contractiles cardiaques sont toutes connectées entre elles par de telles jonctions ; comme les ions minéraux (Na^+, Ca^{2+}, K^+, essentiellement) passent librement ces jonctions, l'état électrophysiologique des membranes est continu, d'une cellule à l'autre. Ainsi, l'excitation du myocarde se propage à la manière d'une onde dans tout le muscle, à partir des sites *pacemaker* localisés dans l'oreillette droite.

Elles assurent la coordination de cellules embryonnaires lors du développement.

Elles coordonnent également les réponses des cellules d'un tissu cible d'une hormone, en « mutualisant » les seconds messagers intracellulaires (du type AMPc par exemple, ou encore Ca^{2+}).

Une sélectivité modulable

Il est important de retenir que les connexons présentent un diamètre d'échange environ 10 fois inférieur à celui des plasmodesmes des tissus végétaux. Ce sont donc des structures biologiquement très différentes, même s'il y a dans les deux cas communication entre deux cytoplasmes. Les connexons sont donc beaucoup plus sélectifs que les plasmodesmes.

Le diamètre du pore du connexon est variable et peut être modulé sous l'effet de différents signaux ; un changement de forme des connexines modifie leur agencement et affecte le diamètre du pore.

Les connexines varient en fonction des tissus. Cette diversité facilite l'accrochage des cellules de même nature et évite le contact entre cellules différentes au sein d'un même tissu. La présence de l'ARN messager d'un seul type de connexine, par PCR, est un critère utilisé pour contrôler la qualité de la purification d'une catégorie de cellule.

fiche 147 Jonctions serrées et polarité cellulaire

Les jonctions serrées jouent un rôle capital dans les tissus dont l'étanchéité est essentielle (endothélium, épithélium…). En permettant un rapprochement très poussé des membranes, elles interdisent la diffusion dans cet espace intermembranaire aux trop grosses molécules.

Fiche 168

1. La polarité des épithéliums

Un épithélium est un tissu qui est disposé à l'interface entre deux milieux différents (milieu intérieur et milieu extérieur, ou bien lymphe et plasma…). Par définition, donc, un épithélium est un tissu hautement polarisé, ce qui se retrouve tant dans son ultrastructure que dans son fonctionnement.

Flux transcellulaires et paracellulaires

Un épithélium est constitué d'un feuillet de cellules qui forment autant de pavés jointifs. Ainsi, le trajet d'un soluté à travers cet épithélium ne peut se faire théoriquement que selon deux voies : une voie transcellulaire qui exige le franchissement de la membrane par deux fois, et une voie paracellulaire qui consiste en un trajet libre entre les cellules. Le rôle des jonctions serrées est d'empêcher cette voie paracellulaire.

Fiche 75

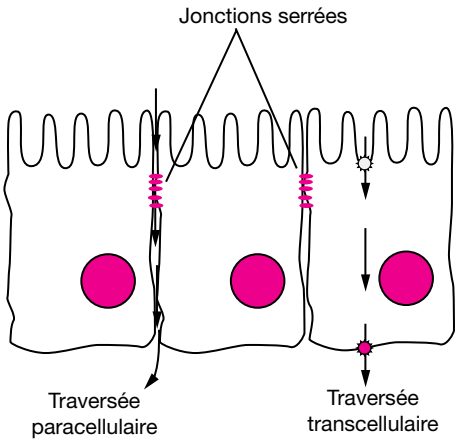


Figure 1 : Traversée d'un épithélium

Transports assistés par des protéines membranaires

Le flux de glucose dans un entérocyte montre bien l'organisation polarisée de la cellule. La première traversée de membrane (au pôle apical) est un transport actif secondaire (symport glucose-Na^+) : la cellule concentre donc le glucose ; la force sodium-motrice est entretenue par des Na-K ATPases réparties dans toute la membrane. La seconde traversée (au pôle basal) est une diffusion. Le flux est en effet passif : il est assuré par des transporteurs GLUT répartis dans la membrane basale de la cellule. Ainsi, le flux est globalement actif, au total, de la lumière du tube vers le milieu intérieur.

2. Les jonctions serrées et l'étanchéité de l'épithélium

Organisation de la jonction

Les jonctions serrées forment de longs bourrelets qui cheminent tout autour de la cellule. Ces bourrelets sont identiques dans la cellule adjacente. Ce sont des points d'ancrage de deux types de protéines qui assurent un rapprochement très étroit entre les deux membranes.

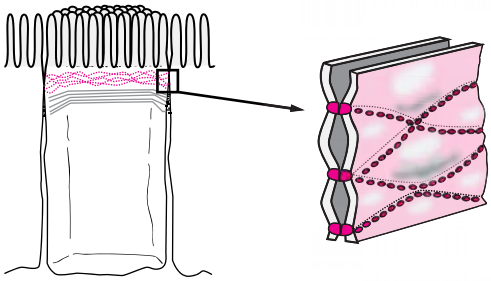


Figure 2 : Organisation d'une jonction serrée

Claudine et occludine

La claudine et l'occludine sont les deux molécules impliquées dans une jonction serrée. Ce sont des molécules qui traversent quatre fois la membrane et présentent deux boucles extracellulaires (les deux extrémités sont intracellulaires). On connaît 24 claudines différentes chez l'homme. Les claudines et les occludines se lient entre elles d'une cellule à l'autre, probablement en établissant des ponts disulfure. Elles sont par ailleurs liées à de nombreuses protéines intracellulaires.

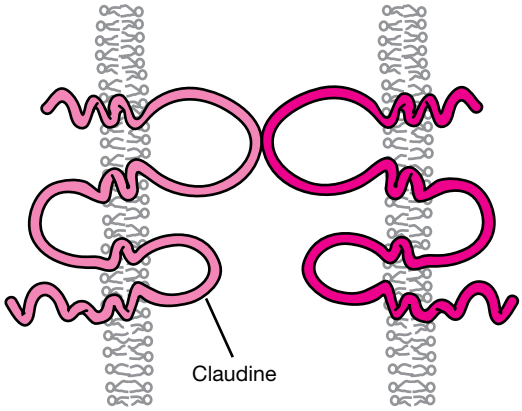


Figure 3 : Architecture d'une jonction serrée

3. Les jonctions serrées et la répartition des protéines

Au-delà de la seule étanchéité d'un épithélium, les jonctions serrées contribuent aussi à la polarité des cellules en séparant nettement les membranes en un domaine membranaire apical et un domaine latéral et basal. Les migrations de protéines membranaires d'un domaine à l'autre ne sont pas possibles à cause de la barrière imposée par les jonctions serrées.

fiche 148

Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines membranaires impliquées dans l'adhérence et la reconnaissance entre les cellules. Ces interactions sont dépendantes du calcium.

1. Liaisons entre molécules homologues : reconnaissance

Glycoprotéines transmembranaires, les cadhérines établissent des liens homophiles. Cela signifie qu'une cadhérine ancrée dans la membrane d'une cellule se lie à une cadhérine de même type d'une autre cellule. Ces liens sont des liaisons ioniques faisant intervenir des ions Ca^{2+}. Ce type de liaison et sa spécificité jouent un rôle important dans la reconnaissance entre cellules lors par exemple du développement embryonnaire.

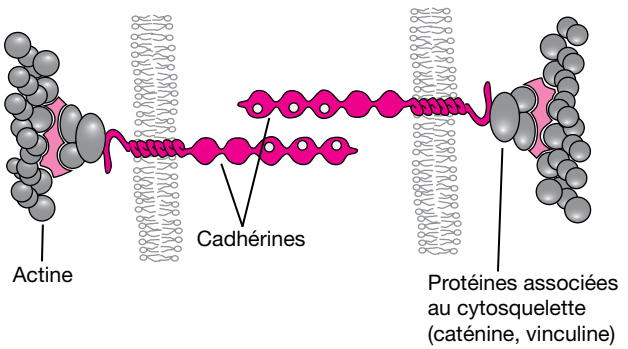


Figure 1 : Interactions entre cadhérines

2. Ceintures d'adhérence : liens avec l'actine

Dans une ceinture d'adhérence, la propriété mécanique essentielle est la résistance à l'étirement d'un épithélium et le changement de forme des cellules. Cela est réalisé côté intercellulaire par des cadhérines et côté intracellulaire par une ceinture d'actine. La cohésion de l'ensemble tient aux liens entre les cadhérines et l'actine. Ces liens sont assurés par des molécules de β-caténine, α-caténine, vinculine et α-actinine.

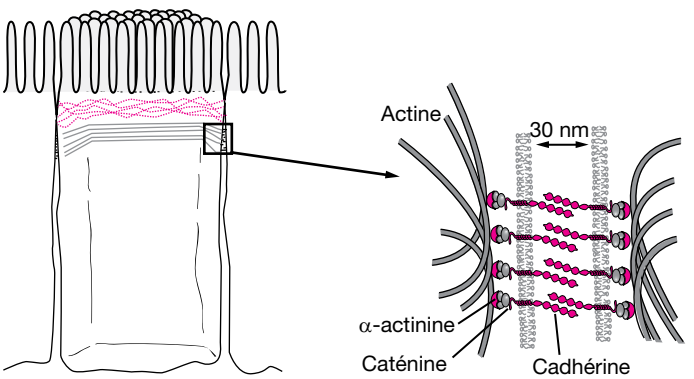


Figure 2 : Organisation d'une ceinture d'adhérence

3. Desmosomes : liens avec les filaments intermédiaires

Les desmosomes sont des points de jonction entre cellules ; on les nomme *macula adherens*. Ce sont des jonctions qui permettent de coupler mécaniquement les réseaux de filaments intermédiaires de deux cellules. Dans chaque cellule, les filaments intermédiaires (de kératine par exemple) sont ancrés dans une plaque protéique intracytoplasmique localisée juste sous la membrane. À cette plaque, sont associées des cadhérines qui, elles, traversent la membrane. La jonction entre les cadhérines de deux cellules assure le lien.

Avec les ceintures d'adhérence, les desmosomes contribuent donc à la cohésion mécanique des tissus, en retenant les cellules entre elles. C'est particulièrement important dans le tissu cardiaque : les cytosquelettes des cellules se raccourcissent, mais tous ces cytosquelettes sont liés mécaniquement les uns aux autres grâce aux nombreux desmosomes qui s'établissent entre les cellules. De cette manière, la contraction est effective à travers l'ensemble du muscle cardiaque.

Par la spécificité de la reconnaissance entre les cadhérines, les desmosomes interviennent également lors du développement embryonnaire au moment de la mise en place des feuillets. Les cellules stabilisent leurs mouvements à la suite de migrations par la reconnaissance entre ces molécules, puis par l'installation de desmosomes.

Fiche 160

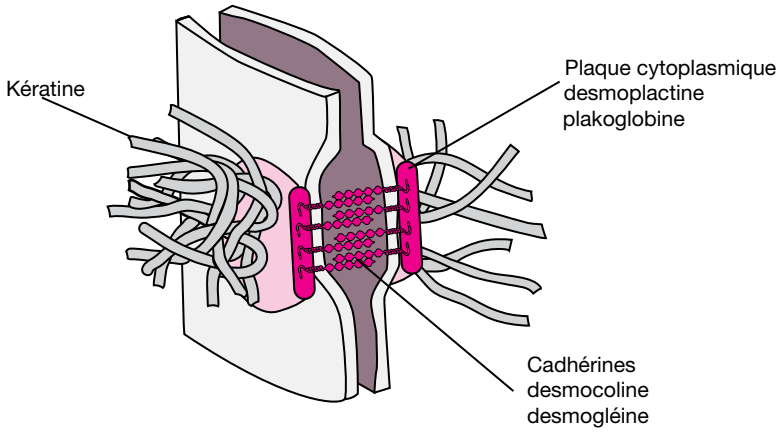


Figure 3 : Organisation d'un desmosome

fiche 149

Les intégrines

Les intégrines sont des molécules d'ancrage des cellules à leur matrice extracellulaire. Elles contribuent à la cohérence mécanique d'un tissu en couplant mécaniquement les filaments du cytosquelette et les filaments des matrices extracellulaires. Elles ont cependant également un rôle de transducteur de signaux.

Fiche 143

1. Une logique de type récepteur

Les intégrines sont constituées de deux sous-unités, α et β. On y reconnaît trois domaines : extracellulaire (extrémité N-terminale), transmembranaire et intracellulaire (extrémité C-terminale).

Ces sous-unités présentent une grande diversité et les différentes combinaisons de couples αβ définissent une spécificité de liaison à un ligand.

Les intégrines sont des récepteurs et contribuent à transduire des signaux vers le cytoplasme. Le mécanisme le plus connu fait intervenir une protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) à activité tyrosine kinase qui active une protéine Rho.

Fiche 132

2. Intégrines et matrice extracellulaire

Les intégrines sont des acteurs importants des liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elles s'y lient à des fibronectines ou à des laminines. De la sorte, elles permettent d'établir un lien mécanique entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire.

Les liens entre une cellule épithéliale et une lame basale, par exemple, font intervenir des intégrines et sont nommés hémidesmosomes. Leur organisation est en effet similaire à un demi desmosome, à la différence qu'il n'y a pas ici de liaison homophile : les intégrines y remplacent les cadhérines et assurent des liens avec les laminines. À la différence des desmosomes, les hémidesmosomes sont des structures dynamiques et transitoires. Ce sont les filaments intermédiaires du cytosquelette qui sont impliqués dans les hémidesmosomes.

Fiche 125

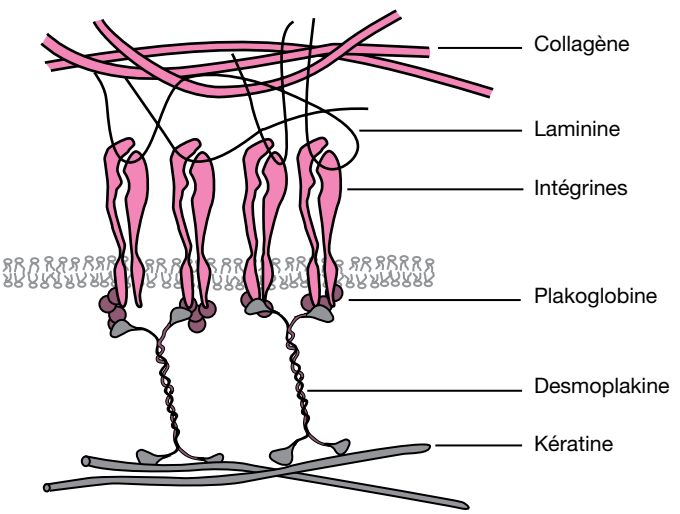


Figure 1 : Hémidesmosome

3. Les contacts focaux

Lorsque des fibroblastes s'étalent au fond d'une boîte de culture, leur face inférieure n'est au contact du fond qu'en certains points : les contacts focaux. On y trouve des amas d'intégrines ($\alpha 5\beta 1$ le plus souvent), qui relient les éléments de matrice du milieu de culture aux filaments d'actine du cytosquelette. Le nombre de ces contacts focaux est inversement proportionnel à l'aptitude de la cellule à migrer sur son substrat.

Lors de la reptation d'une cellule sur le fond, elle établit des contacts focaux transitoires selon un modèle de tapis roulant qui fait intervenir le cytosquelette d'actine.

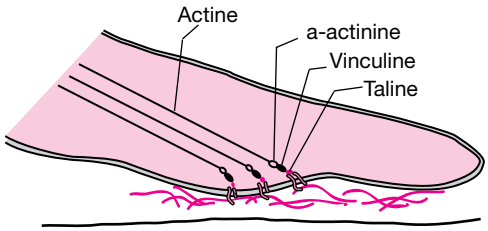


Figure 2 : Ancrage d'une cellule sur un tapis de fibronectine

Cette migration par reptation repose sur trois points clés :

- Polarisation de la cellule : cette polarité fait intervenir le cytosquelette de microtubules et donc le centre organisateur des microtubules (MTOC). Ce centre, ainsi que l'appareil de Golgi, est disposé vers « l'avant » de la cellule. La région arrière est riche en myosine II.
- Protrusion et adhésion : par polymérisation d'actine, des lamellipodes sont formés (protrusion) vers l'avant de la cellule. Ces lamellipodes peuvent ensuite se lier au substrat en formant (en interaction avec les faisceaux d'actine) des contacts focaux. L'intégrine se lie alors à la fibronectine.
- Rétraction de la région arrière : cette dernière étape tient à la désagrégation des contacts focaux, d'une part, et à la contraction du réseau d'actine sous l'effet des molécules de myosine II d'autre part.

Fiche 125

fiche 150

Les CAM

Les CAM (*Cell Adhesion Molecules*) sont des protéines membranaires impliquées dans les reconnaissances et interactions entre cellules. Les mécanismes de ces interactions sont indépendants du calcium. Ces protéines font partie de la super-famille des immunoglobulines. Les plus connues sont les N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), exprimées par la plupart des cellules nerveuses mais aussi par de nombreux autres types cellulaires.

1. Diversité des N-CAM

Fiche 58

Les N-CAM sont codées par un seul gène, mais elles présentent toute de même une grande diversité qui repose sur des épissages alternatifs. On en connaît finalement plus d'une vingtaine de formes. Elles présentent un gros domaine extracellulaire qui comporte, à l'extrémité N-terminale cinq domaines de type Ig. Il s'agit de boucles maintenues par des ponts disulfures.

Ces domaines Ig sont les responsables de l'adhésion que l'on suppose être essentiellement homophile (lien entre deux N-CAM identiques).

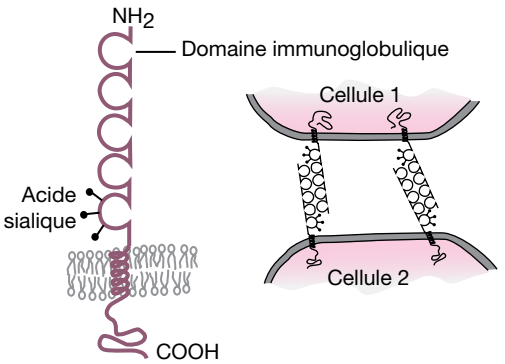


Figure 1 : Les protéines N-CAM

2. Des possibilités variables d'adhésion

Les N-CAM portent de nombreux radicaux additionnels d'acide sialique en nombre variable. Ces radicaux fortement chargés négativement sont des obstacles aux liaisons homophiliques. Plus le nombre de radicaux sialiques est grand, moins l'adhésion est bonne ou durable. Cela permet la mise en place de liens transitoires, comme lors du développement embryonnaire au cours duquel les N-CAM semblent plus riches en acide sialique.

Pour cette même raison, les N-CAM pourraient avoir peu d'importance dans la solidité des liens intercellulaires ; bien moindre que les cadhérines. Elles pourraient en revanche intervenir dans le contrôle ou la modulation des interactions entre cellules.

L'abondance de l'acide sialique, enfin, pourrait parfois donner aux N-CAM un rôle anti-adhésion.

3. Les I-CAM et la migration transendothéliale : une interaction hétérophile

Lors d'une inflammation, des leucocytes sont recrutés dans les tissus. Ces cellules sanguines gagnent les tissus en rampant sur l'endothelium, puis en s'immobilisant sur les cellules endothéliales au site de l'inflammation et en migrant enfin à travers l'endothélium.

Au site de l'inflammation, les cellules endothéliales libèrent des chémokines et expriment fortement des molécules ICAM-1. Les chémokines stimulent les leucocytes en reptation sur l'endothelium et cette stimulation aboutit à l'activation d'intégrines (αLß2) qui peuvent alors se lier aux ICAM-1, provoquant ainsi l'immobilisation du leucocyte.

Fiche 181

Ce mode d'interaction des ICAM avec des intégrines est donc une interaction hétérophile, à la différence des NCAM.

L'intérêt de l'intervention de ces molécules ICAM tient peut-être à leur indépendance vis-à-vis du calcium. En effet, la « perméabilisation » de l'endothélium suppose entre autre la rupture de liens entre les cellules. Et ces liens sont, pour beaucoup, des liens dépendant du calcium (intervention des cadhérines) qui sont rompus entre autres par piégeage du calcium. La stabilisation de la cellule en cours de migration ne peut plus, dès lors, se faire qu'avec des mécanismes indépendants du calcium.

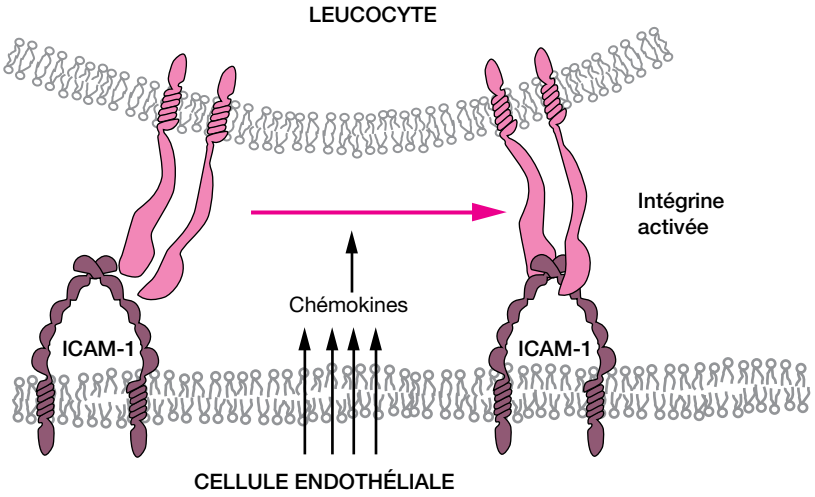


Figure 2 : Interactions Leucocyte-Endothélium

fiche 151

La culture primaire

On nomme culture primaire une culture de cellules telles qu'elles ont été prélevées à partir d'un tissu : il s'agit de la première étape de toute culture cellulaire. Classiquement donc, une culture primaire suppose de pouvoir prélever des cellules pour les mettre en culture et de pouvoir les maintenir en vie et les faire se diviser.

1. Constitution d'une culture primaire

Dissocier les cellules

Il est plutôt aisé de prélever puis cultiver des cellules sanguines ou des cellules de moelle osseuse, car elles n'établissent que peu ou pas de lien avec leur matrice.

En revanche, prélever des cellules intégrées à un tissu exige tout d'abord de déstructurer suffisamment ce tissu pour en isoler des cellules. Le principe en est assez simple, il s'agit de détruire la cohérence de la matrice extracellulaire et des liens entre les cellules. Une première approche consiste en une action enzymatique : l'emploi de trypsine ou de collagénase permet d'hydrolyser les protéines de la matrice. Une seconde approche consiste à piéger les ions Ca^{2+} au moyen d'EDTA, et ainsi d'annihiler les liaisons intercellulaires dépendantes du calcium (cadhérines…).

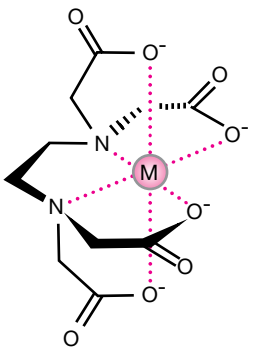


Figure 1 : EDTA et piégeage du calcium

Trier les cellules

Obtenir une culture primaire d'un seul type cellulaire donné n'est pas toujours chose aisée. Les fibroblastes, par exemple, ont une nette tendance à proliférer dans une culture primaire et à supplanter les autres populations de cellules : il est difficile de s'en débarrasser.

Une technique de tri remarquable est fournie par la cytométrie de flux avec le FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*). Des cellules sont marquées par fluorescence ; le FACS fait alors circuler les cellules une par une devant un laser qui analyse chaque cellule, et provoque son marquage par une charge électrique positive ou négative. Un champ électrique trie alors les cellules selon leur charge.

2. Sénescence et durabilité des cultures

La caractéristique essentielle d'une culture primaire est sa faible durée de vie. Si la culture prend et que les cellules se divisent, ces divisions ne durent qu'un temps et la culture finit par végéter puis vieillir et péricliter. C'est ce que l'on nomme la sénescence cellulaire.

Fiche 165

Cellules humaines

Prélevées sur un adulte, des cellules humaines semblent ne pouvoir se diviser qu'une quarantaine de fois environ. Prélevées sur un fœtus, le maximum est de 50-52 cycles de divisions. Au-delà, les cultures périclitent. Cette limite est liée à la longueur des télomères et à l'activité de la télomérase. En période de croissance, le nombre de cellule croît de façon exponentielle : le log du nombre de cellule en fonction du temps décrit donc une droite. La sénescence commence lorsque la courbe s'infléchit.

Fiche 37

On pourrait penser que 52 est un petit nombre de divisions, mais il faut bien comprendre que 52 cycles de divisions à partir d'une seule cellule engendrent 2^{52} cellules, ce qui correspond approximativement à la masse d'une dizaine d'êtres humains !

Des cultures secondaires ne sont alors envisageables que si des cellules deviennent « immortelles », échappant aux contrôles du nombre de cycle, et donnant ainsi naissance à des lignées cellulaires. Ce peut être provoqué en rétablissant l'activité de la télomérase pour certaines cellules, ou bien par mutation de cellules acquérant un caractère « cancéreux ».

Cellules de rongeurs

Chez les rongeurs, on n'observe pas un contrôle aussi rigoureux du nombre de cellules. Il n'est pas rare de voir des cellules engendrer des lignées immortelles après une légère phase de sénescence.

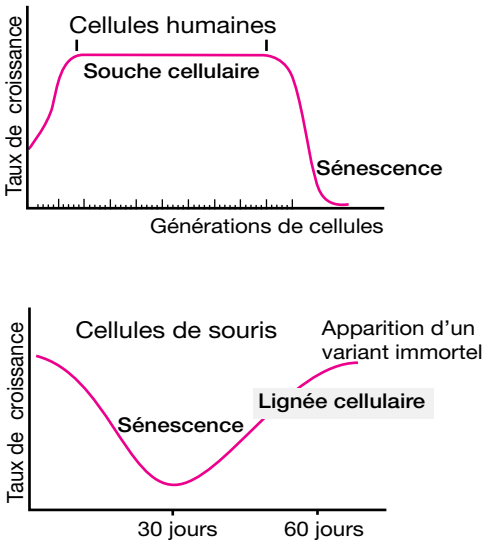


Figure 2 : Évolution d'une culture primaire

fiche 152

Les synapses

La synapse est la structure qui permet à un neurone de transmettre une excitation à une cellule cible. La synapse la mieux connue est la synapse neuro-musculaire où un neurone stimule une cellule musculaire striée squelettique. La disjonction entre les deux cellules, même si la distance est très faible, impose un relais de nature chimique entre les excitations de nature électrique des deux cellules

1. La plaque motrice

Unité motrice

Fiche 123

On nomme unité motrice l'ensemble formé par un motoneurone et le groupe de cellules musculaires qui sont sous son contrôle. L'arborisation terminale du neurone est en effet en connexion avec plusieurs cellules musculaires. Chaque cellule musculaire est connectée avec une terminaison nerveuse complexe formée de plusieurs extrémités ramifiées du neurone ; cet ensemble forme une plaque motrice. Chacune des extrémités de cette plaque motrice forme un renflement que l'on nomme bouton synaptique.

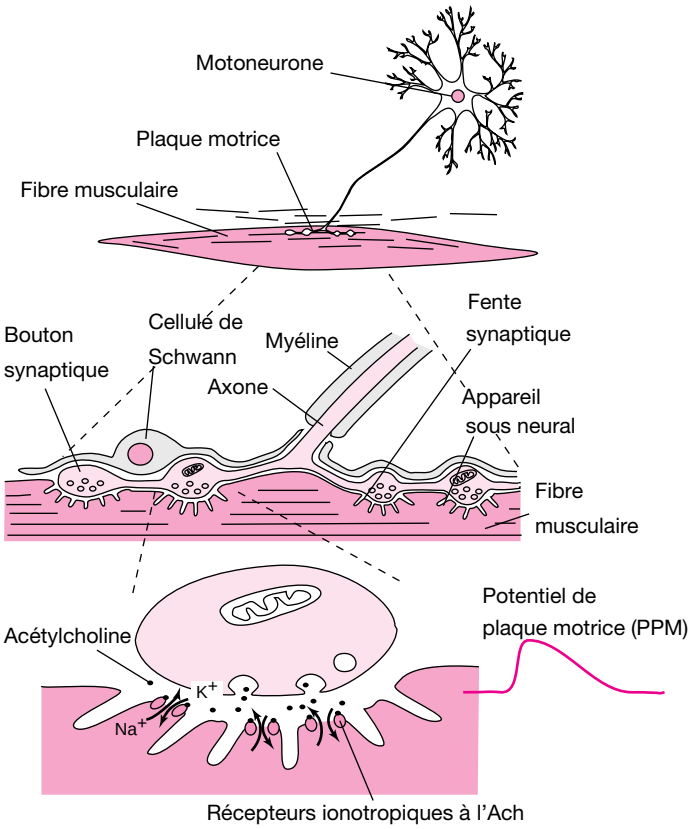


Figure 1 : Organisation d'une unité motrice

Boutons synaptiques et synapses

Le bouton synaptique est placé à très faible distance (20 nm) de la membrane de la cellule musculaire. Ce bouton contient, outre quelques mitochondries, de très nombreuses vésicules : les vésicules synaptiques. Côté cellule musculaire, la membrane en vis-à-vis du bouton est très repliée formant une nette augmentation de surface.

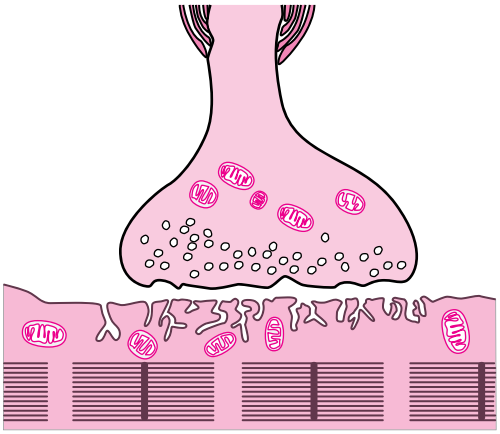


Figure 2 : **Organisation schématique d'une synapse**

La transmission d'information

Une stimulation électrique sur le neurone moteur provoque bien évidemment un potentiel d'action nerveux. L'enregistrement de la cellule musculaire montre qu'elle aussi présente un potentiel d'action, provoqué par la stimulation nerveuse, avec cependant un léger délai de quelques millisecondes : le délai synaptique.

Fiche 79

2. Le fonctionnement synaptique

Exocytose d'un neurotransmetteur : l'Acétyl-Choline

L'arrivée d'un potentiel d'action dans le bouton synaptique provoque l'ouverture de canaux Ca^{2+} sensibles à la tension. Il en résulte une entrée importante de Ca^{2+} dans le bouton, qui provoque une exocytose massive des vésicules synaptiques. Ces vésicules contiennent une molécule à rôle de messager : l'acétylcholine.

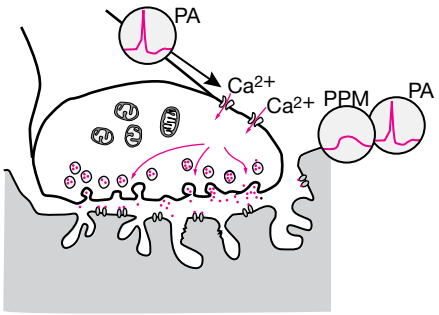


Figure 3 : **Exocytose de neurotransmetteur**

Du potentiel de plaque motrice au potentiel d'action

Le récepteur de l'acétylcholine (récepteur nicotinique) est une protéine membranaire de la cellule musculaire. C'est un canal ionique à ouverture contrôlée par un ligand : en effet, c'est la fixation de l'acétylcholine sur ce récepteur qui ouvre le canal. Il s'en suit une nette dépolarisation de la membrane : le potentiel de plaque motrice (PPM)

Le PPM provoque alors l'ouverture de canaux Na^+, ce qui initie un potentiel d'action qui peut alors se propager le long de la membrane.

fiche 153

L'intégration nerveuse par les neurones

Les synapses entre neurones présentent une réelle diversité. Si elles fonctionnent sur le même principe qu'une synapse neuro-musculaire, elles en diffèrent par de nombreux points.

1. Synapses excitatrices et synapses inhibitrices

Le mode d'interaction entre neurotransmetteur et récepteur spécifique peut aboutir à des mouvements ioniques de natures très diverses, suivant la nature du canal activé. Certaines synapses provoquent une hausse de potentiel : ce sont des synapses excitatrices ; d'autres provoquent une hyperpolarisation : ce sont des synapses dites inhibitrices. Ces variations de potentiel provoquées par la synapse sont nommées PPSE (Potentiel Post Synaptique Excitateur) et PPSI (Potentiel Post Synaptique Inhibiteur).

Fiche 78

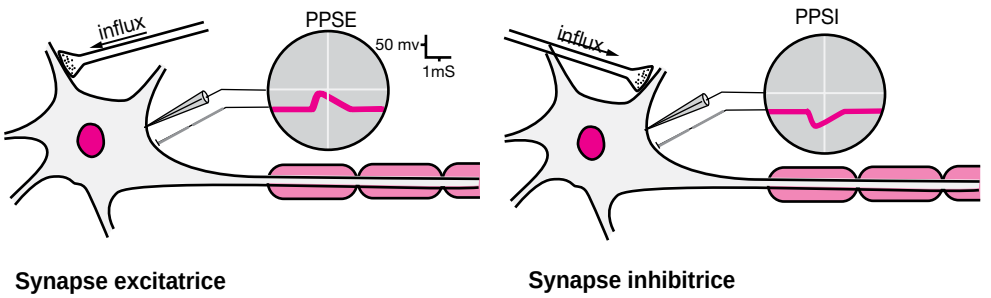


Figure 1 : PPSE et PPSI

2. Le corps cellulaire et l'intégration nerveuse

Insuffisance d'une seule excitation

La perturbation provoquée par une synapse excitatrice sur un corps cellulaire ne provoque jamais l'apparition d'un potentiel d'action. C'est là une différence nette avec les cellules musculaires. Cela est dû à l'absence de canaux Na^+ mécanosensibles. Par conséquent, en l'absence de régénération, cette perturbation se propage de façon décrémentielle (avec perte d'amplitude).

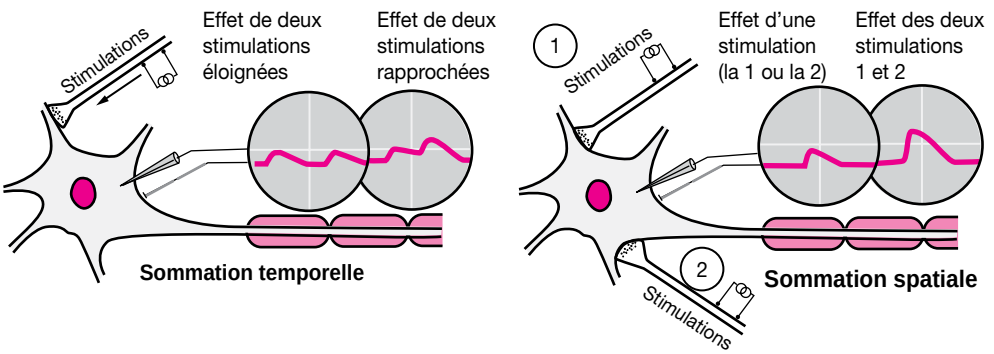


Figure 2 : Codage en amplitude dans le corps cellulaire

Les phénomènes de sommation : codage en amplitude de l'information

En revanche, plusieurs stimulations sur le corps cellulaire peuvent s'additionner et produire une perturbation plus ample (ou moins ample). Deux stimulations très rapprochées issues de la même synapse peuvent ainsi être sommées (sommation temporelle) ; ainsi, une information présynaptique codée en fréquence peut-elle être traduite en une nouvelle information codée en amplitude. De la même manière, deux stimulations issues de deux synapses mais synchrones peuvent également être sommées (sommation spatiale). Il en résulte un signal très modifié, dont l'intensité est maintenant codée en amplitude de potentiel et qui se propage sur le corps cellulaire de façon décrémentielle. Ce signal est le résultat de la confrontation par sommation de tout l'ensemble des signaux qui parviennent à la cellule : on dit que le corps cellulaire a effectué une intégration nerveuse.

3. Le cône d'implantation et les potentiels d'action

Abondance de canaux Na^+

Parvenu au cône d'implantation, le signal électrique codé en amplitude peut alors provoquer la formation de potentiels d'action : cette zone est en effet très riche en canaux sodium sensibles à la tension.

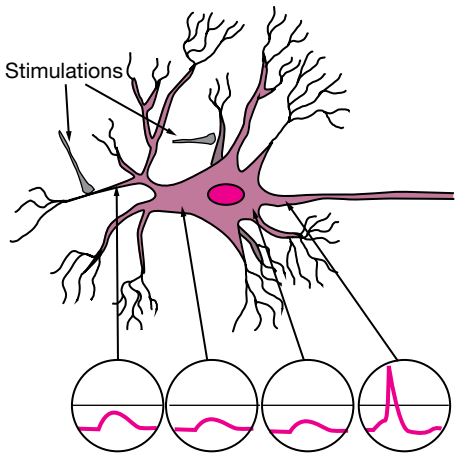


Figure 3 : Genèse de potentiels d'action

Codage en fréquence de l'information

Une forte amplitude de stimulation provoque dans ce cône d'implantation un train de potentiels à forte fréquence. Une stimulation plus faible donne une faible fréquence. C'est ainsi que le signal codé en amplitude est maintenant codé en fréquence.

La dysplasie arythmogène du ventricule droit

La dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) est une cardiomyopathie évolutive caractérisée par une disparition de cardiomyocytes au bénéfice de tissu fibro-adipeux. Ce remplacement progressif finit par perturber fortement l'activité électrique cardiaque. En effet, les cardiomyocytes sont non seulement contractiles, mais aussi conducteurs de l'influx électrique qui traverse le myocarde lors de chaque contraction.

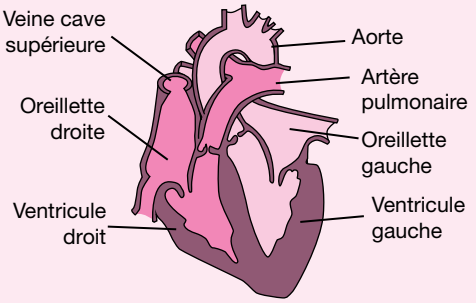
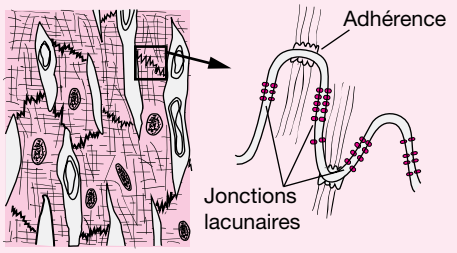


Figure 1
Organisation du cœur

À l'extrémité de chaque cardiomyocyte, les liaisons sont assurées d'une part par des desmosomes, assurant la cohésion mécanique du tissu et d'autre part par des jonctions lacunaires (*gap junctions*) assurant la conduction électrique de l'influx.
C'est une maladie grave responsable d'insuffisance cardiaque et pouvant même être à l'origine d'arrêt cardiaque par arythmie ventriculaire. Initialement, la maladie touche le ventricule droit mais elle peut ensuite atteindre le ventricule gauche.

Figure 2
Les jonctions entre cellules cardiaques



La cause de la maladie semble être une atteinte des desmosomes, avec une origine familiale très fréquente. On a pu identifier quelques gènes associés à la pathologie, comme le Récepteur Cardiaque à la ryanodine (essentiel au couplage excitation-contraction) et surtout deux gènes codant des protéines impliquées dans le desmosome (desmoplakine et plakophiline 2). Le dysfonctionnement du desmosome entraînerait une dissociation des cellules, rompant ainsi la connexion électrique du myocarde. Les cellules cardiaques finissent par mourir et être remplacées par du tissu adipeux ou adipo-fibreux.

Le pemphigus vulgaire

Les pemphigus sont des maladies auto-immunes de la peau (et aussi des muqueuses). Ce sont des dermatoses bulleuses : les lésions de la peau désolidarisent les cellules et provoquent des soulèvements de l'épiderme en forme de bulles.
Dans le pemphigus vulgaire, les auto-anticorps sont produits contre la desmogléine, l'une des cadhérines intervenant dans les desmosomes. Le défaut de cette cadhérine entraîne la rupture des jonctions intercellulaires, d'où la formation de bulles.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

13.1 Le collagène :
- ☐ a. est une macromolécule extra-cellulaire
- ☐ b. est ancré dans les membranes plasmiques des cellules
- ☐ c. est un polyholoside complexe

13.2 La matrice extracellulaire du tissu osseux :
- ☐ a. doit sa rigidité à la densité des fibres de collagène
- ☐ b. ne contient pas de protéines.
- ☐ c. est minéralisée par des phosphates de calcium

13.3 La paroi squelettique des cellules végétales :
- ☐ a. est rigide et responsable de la forme géométrique des cellules
- ☐ b. est fluide
- ☐ c. offre une bonne résistance à l'étirement

13.4 La cellulose :
- ☐ a. est une glycoprotéine ramifiée
- ☐ b. est un polymère linéaire de glucose
- ☐ c. forme des microfibrilles résistantes à la traction

13.5 Dans un epithelium :
- ☐ a. la cohésion mécanique est assurée par les ceintures d'adhérence
- ☐ b. les desmosomes assurent l'étanchéité du feuillet
- ☐ c. les jonctions serrées lient le feuillet à la lame basale

13.6 Les plasmodesmes :
- ☐ a. permettent la synchronisation du tissu cardiaque
- ☐ b. forment des canaux transmembranaires de grande taille
- ☐ c. forment des ponts cytoplasmiques

13.7 Les jonctions serrées :
- ☐ a. permettent la fusion de deux membranes adjacentes
- ☐ b. sont formées par des liens covalents entre protéines transmembranaires
- ☐ c. sont des jonctions dépendantes du calcium

13.8 Les cadhérines :
- ☐ a. assurent la cohésion des jonctions serrées
- ☐ b. forment des jonctions dépendantes du calcium
- ☐ c. interagissent, dans les desmosomes, avec les filaments intermédiaires

13.9 Les synapses neuromusculaires :
- ☐ a. permettent de transmettre des potentiels d'action
- ☐ b. sont toujours excitatrices
- ☐ c. utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur

13.10 L'intégration nerveuse neuronique :
- ☐ a. est assurée par la membrane du corps cellulaire du neurone
- ☐ b. confronte les potentiels d'action provenant des synapses
- ☐ c. aboutit à une réponse biologique au cône d'implantation

Réponses

13.1 **a**. Le collagène est la principale protéine des matrices extracellulaires animales. Elle forme des édifices complexes de nature assez variée. C'est une protéine secrétée par les cellules.

13.2 **c**. Comme toutes les matrices extracellulaires animales, la matrice osseuse est essentiellement constituée de protéines. Mais elle est aussi minéralisée, majoritairement par de l'hydroxy-apatite, qui est un phosphate de calcium. Sans cette minéralisation, cette matrice reste souple (comme dans le cas du rachitisme).

13.3 **c**. La paroi squelettique des végétaux offre une excellente résistance à l'étirement. C'est cette propriété qui autorise le développement de pressions de turgescence importantes chez les végétaux. Cela confère de la rigidité aux tissus, à l'image d'un ballon très gonflé. La forme géométrique des cellules résulte pour l'essentiel des pressions qu'elles exercent les unes sur les autres.

13.4 **b** et **c**. La cellulose est un polymère de β-glucopyrannose. Cette forme présente une assez bonne résistance à la traction, renforcée par l'organisation en fibrilles où de très nombreuses liaisons hydrogènes intra- comme inter-moléculaires viennent stabiliser les édifices.

13.5 **a**. Les ceintures d'adhérence permettent de lier les « pavés » d'un épithélium en un feuillet cohérent dont les propriétés mécaniques sont données par une ceinture d'actine sous membranaire. Les jonctions serrées et non-pas les desmosomes assurent l'étanchéité des jonctions latérales entre cellules.

13.6 **c**. Les plasmodesmes assurent la communication des cytoplasmes de deux cellules végétales. Ce sont des ponts cytoplasmiques qui forment un tube limité par une membrane traversant un pore de la paroi squelettique.

13.7 **b**. L'étanchéité des jonctions serrées est due à la forte proximité entre membranes adjacentes. La cohésion en est assurée par des protéines (claudines, occludines) qui se lient de façon indépendante du calcium.

13.8 **b** et **c**. On rencontre les cadhérines dans les desmosomes et non dans les jonctions serrées. Leur liaison est dépendante du calcium et elles se lient au cytosquelette de filaments intermédiaires sur la face cytosolique de la membrane.

13.9 **b** et **c**. Les synapses ne transmettent pas de potentiel d'action, mais un signal moléculaire sous forme de neurotransmetteur : acétylcholine dans le cas de la synapse neuromusculaire. Ces synapses particulières sont toujours excitatrices.

13.10 **b**. L'intégration nerveuse consiste en la sommation spatiale ou temporelle d'excitations diverses provenant des synapses, mais qui ne sont pas des potentiels d'action. Le résultat de ces sommations peut ensuite donner lieu à une réponse (potentiel d'action, ou modification de fréquence) dans le cône d'implantation du neurone.

Chapitre 14

Vie et mort des organismes multicellulaires

Objectifs

Les cellules meurent et se reproduisent. Les organismes également. La reproduction sexuée des individus repose sur plusieurs propriétés fondamentales des cellules. La sexualité elle-même peut se résumer au diptyque méiose-fécondation, moyen de brassage des gènes des populations et de la production de futurs organismes originaux sous forme d'une cellule-œuf totipotente.

Par la suite, au cours du développement embryonnaire, les programmes cellulaires sont peu à peu ajustés. Les cellules initialement pluripotentes s'engagent dans des voies de différenciation de plus en plus spécialisées et perdent peu à peu leur aptitude à proliférer.

Si les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes, ce que ne sont pas les cellules différenciées d'un organisme, il est toutefois possible maintenant de reprogrammer des cellules et de les rendre pluripotentes et donc théoriquement aptes à générer tout type de cellule.

Enfin avant de mourir de nombreux organismes subissent une sénescence dont on commence à comprendre les mécanismes.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 154 La méiose et la recombinaison génétique

La méiose est le mécanisme de base de la sexualité chez les organismes Eucaryote. Elle est le pendant de la fécondation pour ce qui concerne le caryotype des cellules : la méiose produit des cellules haploïdes tandis que la fécondation réunit deux cellules haploïdes et produit une cellule diploïde. Mais surtout, la méiose brasse les gènes de la cellule mère et confectionne ainsi des associations originales de gènes par brassage intrachromosomique et interchromosomique.

1. La Prophase I de méiose

La méiose consiste en un ensemble de deux divisions particulières. L'une des étapes cruciales de la méiose est la Prophase I, c'est-à-dire la prophase de la première division de méiose. Au début de cette phase, les chromosomes sont dupliqués et constitués de deux chromatides identiques.

Leptotène et Zygotène : réunion des homologues

Les premiers stades de la Prophase voient les chromosomes se condenser légèrement. Mais surtout, leurs extrémités, ancrées dans la lamina du noyau, finissent par s'unir entre chromosomes homologues. Cet ancrage dans la lamina augmente la probabilité de rencontre entre régions homologues. Le résultat est la rencontre et l'association des homologues, essentielle pour la suite.

Du Pachytène à la Diacinèse : production de paires solidaires d'homologues et recombinaison

Fiche 35

Au cours du stade pachytène, un complexe protéique, le complexe synaptonémal, lie fermement les chromosomes homologues. C'est là que se forment les *crossing-over*, échanges de segments d'ADN entre chromatides : c'est le brassage intrachromosomique. Par la suite, les chromosomes sont libérés (diplotène puis diacinèse), toujours en couples d'homologues reliés en quelques points nommés chiasmas.

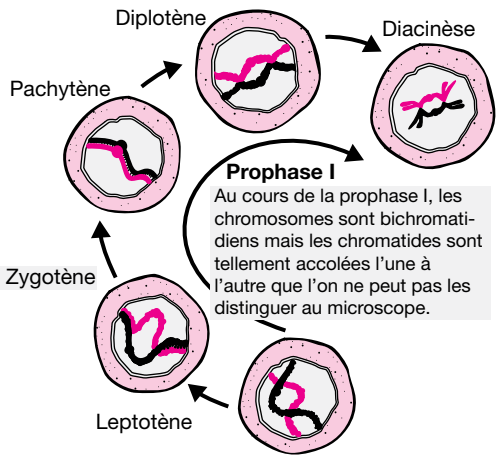


Figure 1 : Prophase I

2. La mécanique de la méiose

Positionnement des kinétochores

Seconde différence avec la mitose, les kinétochores, au lieu de se disposer en opposition, ont tendance à fusionner de telle sorte qu'ils sont tournés deux à deux dans la même direction. Chaque centromère est donc tourné vers un seul pôle à la suite de l'interaction des kinétochores avec les microtubules. Et comme chaque chromosome est lié à son homologue, ce sont les paires d'homologues qui viennent se positionner à l'équateur de la cellule.

Fiche 32

Disjonction des homologues et brassage interchromosomique

L'anaphase I permet d'achever le travail. À la rupture des chiasmas, les chromosomes homologues se séparent. On obtient donc des cellules haploïdes, mais surtout, du fait de l'orientation aléatoire des paires vis-à-vis des pôles de la cellule, les chromosomes sont brassés : chaque cellule obtenue contient un mélange de chromosomes, les uns d'origine paternelle, les autres d'origine maternelle.

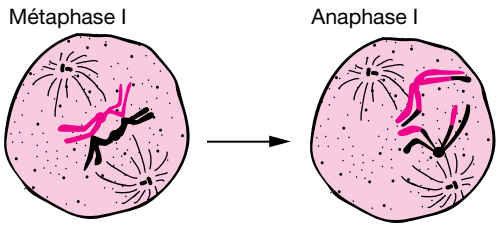


Figure 2 : Métaphase I et Anaphase I

Séparation des chromatides

Par la suite, les chromosomes à deux chromatides vont subir une seconde division qui est, mécaniquement, très comparable à une mitose. On obtient à la fin quatre cellules haploïdes avec quatre contenus chromosomiques différents.

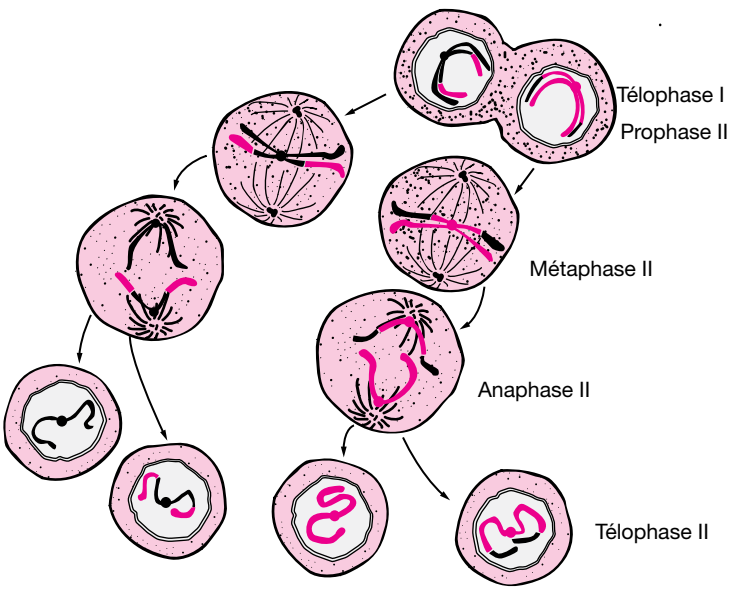


Figure 3 : Terminaison de la méiose

fiche 155

La détermination du sexe

Le déterminisme chromosomique du sexe chez les Mammifères est bien connu : les femelles ont deux chromosomes X, alors que les mâles ont un chromosome X et un chromosome Y. La façon dont le sexe est déterminé par le chromosome Y commence à être élucidée. D'un point de vue embryologique, le développement femelle semble être le développement par défaut. C'est la formation de testicules (et ses conséquences hormonales) qui détournerait le développement dans une direction masculine.

1. Rôle des chromosomes sexuels

Le chromosome Y et le sexe mâle

Le chromosome Y compte environ 110 fois moins de gènes que le chromosome X chez l'homme (32 contre 3 500). On y trouve cependant des gènes essentiels au déterminisme du sexe mâle :

- le gène *tdf (testicule determining factor)* : c'est un gène responsable de la différenciation des testicules qui s'exprime dans les futures cellules de Sertoli.
- Le gène *sry (sex determining région of Y)* : responsable, au cours des premières semaines du développement de l'engagement des voies génitales dans la voie de différenciation mâle.

Quelques rares recombinaisons se produisant entre le chromosome X et le chromosome Y ont pu provoquer des inversions sexuelles qui s'expliquent par l'expression du gène *sry*. La présence de *sry* détermine le sexe mâle, indépendamment de l'équipement chromosomique (XX ou XY).

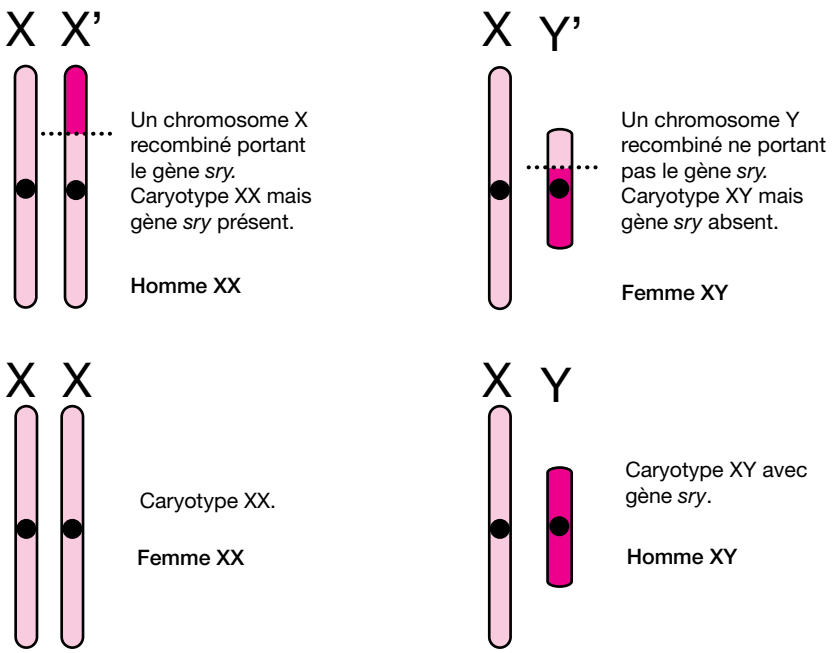


Figure 1 : Inversion sexuelle par recombinaison

Rôle du chromosome X

Le gène *dax* sur le chromosome X serait responsable d'une inhibition du développement mâle, lorsqu'il est présent à l'état homozygote. Cela suggérerait que les gonades ont un développement mâle par défaut.

2. Le gène *sry*

Une liaison à l'ADN

Chez les individus de sexe mâle, la protéine SRY contrôle d'autres gènes permettant le développement masculin. Cette protéine de 204 acides aminés possède un domaine dit HMG (*High Mobility Group*) capable de se lier à l'ADN.

La géométrie de cette liaison est particulière, puisqu'elle provoque une courbure nette de l'ADN, de l'ordre de 70 à 80°.

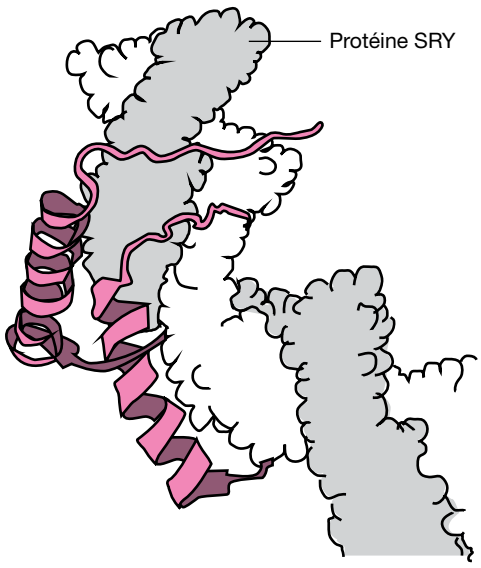


Figure 2 : Liaison de SRY à la molécule d'ADN

Mode d'action

Le gène *sry* est présent chez tous les mammifères mais avec de fortes différences de séquence et de longueur. En revanche, la boîte HMG semble très conservée, ce qui suggère un rôle fort dans le déterminisme du sexe mâle.

On considère que la liaison à l'ADN et la courbure qui en résulte auraient pour conséquence d'autoriser l'action de facteurs de transcription contrôlant la différenciation des gonades en testicules.

fiche 156

La fécondation

La fécondation réunit deux cellules très différentes : le spermatozoïde et l'ovocyte. Elle réunit surtout deux génomes différents et est donc, avec la méiose, un responsable de la variabilité génétique des populations. Les gamètes, spermatozoïde et ovocyte sont des cellules très spécialisées qui permettent d'une part la fécondation, d'autre part le bon déroulement des premières étapes du développement.

1. La rencontre des gamètes

Mobilité et orientation du spermatozoïde

Cellule ultraspécialisée, le spermatozoïde est avant tout une cellule mobile. Son flagelle, grâce à l'énergie fournie par les nombreuses mitochondries de la pièce intermédiaire, assure sa propulsion dans les voies génitales femelles (comme chez les mammifères) ou dans l'eau (comme chez de nombreuses espèces aquatiques dont l'oursin).

Chez les mammifères, il ne semble pas y avoir de chimiotactisme. Les spermatozoïdes sont simplement guidés dans les voies génitales. Chez l'oursin, on a pu identifier un chimiotactisme faisant intervenir des oligopeptides libérés par l'ovocyte. La détection de ces signaux modifie la vigueur de la nage des spermatozoïdes.

Réaction acrosomiale et rapprochement des membranes

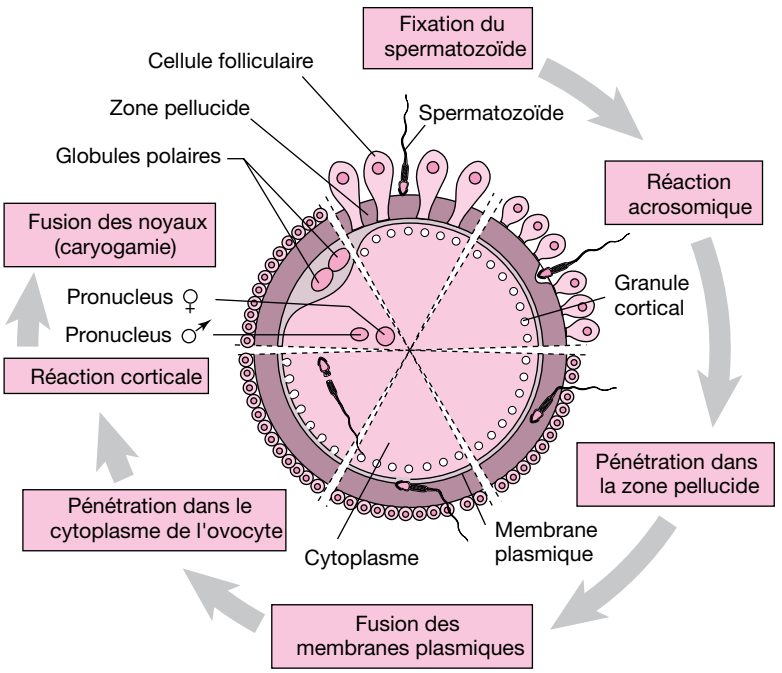


Figure 1 : Les étapes de la fécondation chez un mammifère

Chez un mammifère, le spermatozoïde doit franchir une première barrière, à proximité de l'ovocyte : la masse de cellules folliculaires entourant ce dernier et la zone pellucide.

Des hyaluronidases qu'il secrète contribuent à fluidifier les matrices et facilitent sa progression jusqu'à la zone pellucide. Ici, le spermatozoïde se lie à la protéine ZP3 de la zone pellucide, ce qui déclenche sa réaction acrosomiale : libération du contenu de l'acrosome (vaste vésicule golgienne). Les enzymes ainsi libérées contribuent à hydrolyser la zone pellucide et facilitent la progression de la cellule jusqu'à la membrane de l'ovocyte.

2. Plasmogamie et caryogamie

Fusion des membranes

Parvenu contre l'ovocyte, le spermatozoïde se présente par le flanc, et les membranes fusionnent. Ceci permet à l'ovocyte d'incorporer le noyau mâle ainsi que le centriole proximal du spermatozoïde. Les mitochondries du spermatozoïde ne sont pas intégrées à l'ovocyte. Le noyau mâle se transforme en se décondensant. Il est alors nommé pronucleus mâle et il progresse vers le centre de l'ovocyte.

Reprise d'une activité mitotique

Parvenus au centre de la cellule, les deux noyaux entament alors une prophase de mitose (le noyau femelle a, entre-temps, achevé sa méiose et émis le second globule polaire). Grâce au centriole mâle fourni par le spermatozoïde, un fuseau achromatique se forme, et la métaphase est amorcée. À ce moment, du fait de la rupture des enveloppes nucléaires, les deux génomes sont mélangés en une seule plaque métaphasique : il y a eu caryogamie (« fusion » des noyaux).

3. La reprise d'activité de l'ovocyte chez l'oursin

Le rôle de l'ovocyte est plus tourné vers la réalisation du développement. L'étude de la fécondation chez l'oursin permet d'exposer ce point. À compter de la piqûre spermatique, cette cellule auparavant en vie ralentie reprend son activité que l'on peut résumer en trois points.

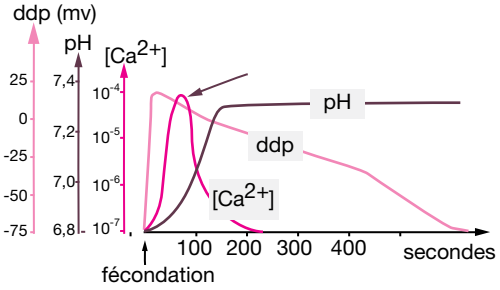


Figure 2 : Le réveil de l'ovocyte chez les échinodermes

- Une dépolarisation membranaire transitoire qui empêche toute nouvelle plasmogamie avec un autre spermatozoïde.
- Une entrée de calcium dans la cellule qui débute au point de piqûre et s'étend à toute la membrane. Il en résulte l'exocytose des granules corticaux qui bloque définitivement toute nouvelle fécondation en modifiant et soulevant la zone vitelline, équivalent de la zone pellucide.
- Une augmentation de pH qui contribue à la réactivation du métabolisme cellulaire et à la reprise des divisions cellulaires.

fiche 157

Organisation des axes embryonnaires

Lors du développement d'un tétrapode (un amphibien comme le xénope ou un mammifère comme la souris), les symétries évoluent. Depuis la cellule ovogonie qui formera un ovocyte prêt à la fécondation jusqu'à un embryon complexe, de profonds changements ont lieu. L'ovocyte n'a ni avant ni arrière, ni dos ni ventre, ni droite ni gauche. Des événements essentiels doivent donc se produire pour produire la symétrie bilatérale (droite-gauche) et ces axes de polarité (avant-arrière et dos-ventre).

1. D'une symétrie sphérique à une symétrie cylindrique

L'ovogonie

Lors de l'ovogenèse, le point de départ est une cellule à symétrie sphérique : l'ovogonie. Le recrutement d'une ovogonie dans la voie de l'ovogenèse débute par une différenciation notable qui met en place tous les éléments cytoplasmiques du futur ovule. La première conséquence est une très forte augmentation de taille.

L'ovocyte du xénope

À l'engagement dans la méiose, la cellule est un ovocyte I profondément modifié. Le noyau a maintenant migré vers la périphérie de la cellule définissant un pôle dit animal (PA) et un pôle dit végétatif (PV). La cellule présente maintenant une symétrie cylindrique principalement marquée par une répartition inhomogène des réserves cytoplasmiques et des ARNm, selon un gradient parallèle à l'axe PA-PV.

2. La piqure spermatique et la symétrie bilatérale

La réactivation de l'ovule suite à la piqûre spermatique aboutit à une modification des symétries de la cellule. Il se produit en effet une rotation dite de symétrisation. Il s'agit de la rotation de la partie périphérique du cytoplasme par rapport au reste de la cellule. Cette rotation d'une trentaine de degrés se fait autour d'un axe orthogonal au plan défini par l'axe PA-PV et le point de piqûre spermatique. Chez les espèces dont la calotte animale

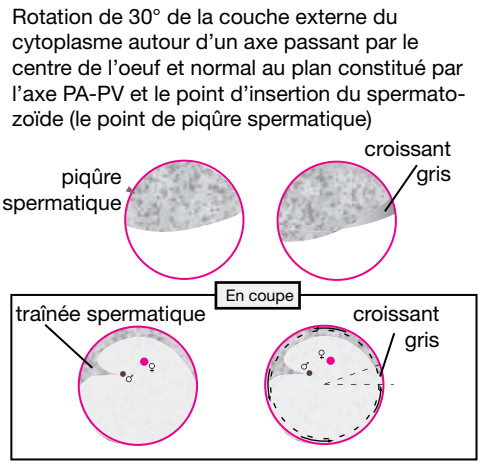


Figure 1 : La rotation de symétrisation et le croissant gris

est pigmentée, cette rotation se manifeste par l'apparition d'un « croissant » légèrement dépigmenté : le croissant gris. Dès lors, la symétrie de l'embryon est bilatérale et non plus cylindrique. Cela permet de définir une future région dorsale (le croissant) et une future région ventrale.

3. L'axe dorso-ventral

Le centre de Nieuwkoop

Lorsqu'un œuf fécondé est irradié aux UV, son évolution donne un embryon dépourvu de toute structure dorsale ; on qualifie cet embryon de « ventralisé ». Si, au stade 32 cellules, on greffe à un tel embryon un blastomère végétatif dorsal prélevé sur un embryon normal, on constate le rétablissement d'un développement normal. Ce blastomère végétatif dorsal est responsable de l'installation de l'axe dorso ventral de l'animal, et constitue le centre de Nieuwkoop.

Une conséquence de la rotation de symétrisation

Le centre de Nieuwkoop est un centre inducteur qui émet des signaux vers les cellules sus-jacentes et qui les induit en mésoblaste dorsal. Les autres blastomères végétatifs ont également un effet inducteur, mais ils induisent du mésoblaste ventral. Ce comportement particulier du centre de Nieuwkoop résulte d'un héritage cytoplasmique ; la rotation de symétrisation permet de concentrer dans le futur centre de Nieuwkoop des déterminants comme les protéines β-caténine, Dishevelled et Wnt 11. La conjonction de ces déterminants aux protéines VegT et Vg1 (spécifiques du pôle végétatif) détermine le centre de Nieuwkoop. L'activation de ce centre aboutit à l'expression et la sécrétion de protéines Xnr (*Xenopus nodal related*) qui induisent alors les cellules sus-jacentes sur la voie mésodermique. Cette induction est régionalisée : le centre de Nieuwkoop induit du mésoderme dorsal, les zones plus ventrales induisent du mésoderme ventral.

Par la suite, les mouvements de gastrulation établiront l'axe antéro-postérieur de l'embryon, qui se superpose à l'axe PA-PV.

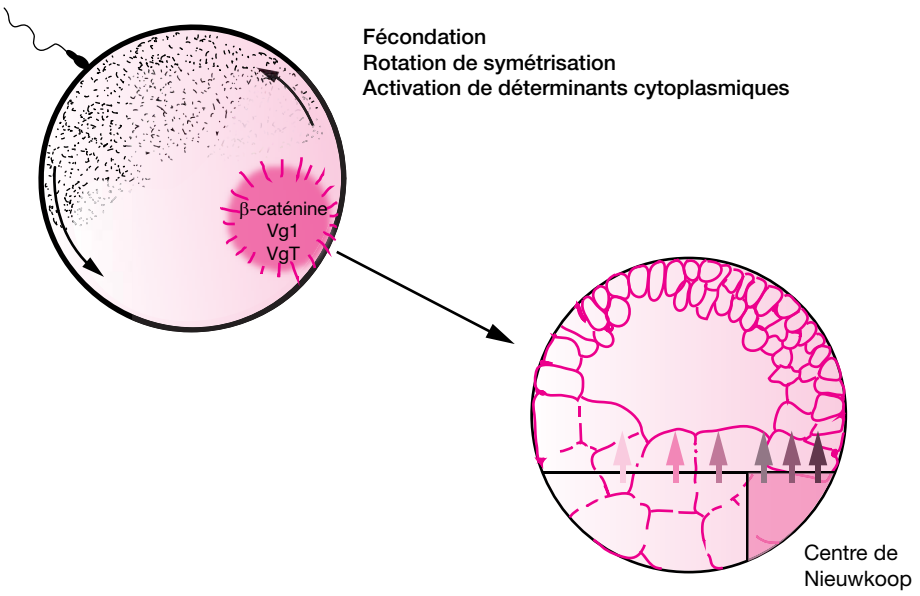


Figure 2 : La formation de l'axe dorsal par activation du centre de Nieuwkoop

fiche 158

Les gènes homéotiques

La découverte des gènes homéotiques chez la drosophile a considérablement aidé la compréhension de la génétique du développement. Cette découverte a été récompensée par le prix Nobel de physiologie-médecine attribué en 1995 à E. B. Lewis, C. Nüsslein-Volhard et E. Wieschaus. De plus, le fait que ces gènes soient très conservés a permis de « dénicher » de nombreux autres gènes homéotiques chez l'ensemble des êtres vivants.

1. Les mutations homéotiques

Mise en évidence

Fiche 33

Le plan d'organisation des insectes, très segmenté, a permis de découvrir chez la drosophile des mutations étonnantes affectant le développement. L'une des plus spectaculaire est la mutation *antennapedia*, dans laquelle l'animal présente une paire de patte à la place des antennes. Il ne s'agit pas d'une paire de patte supplémentaire, mais bien d'un remplacement des antennes par des pattes. Tout se passe comme si le premier segment de l'animal (portant normalement les antennes) ne « savait » plus qui il était. La mutation *ultrabithorax* est comparable : le troisième segment thoracique se différencie identiquement à un deuxième segment. Cela est spectaculaire puisqu'il y a alors mise en place d'une seconde paire d'aile en lieu et place d'haltères.
On a nommé ces transformations mutations homéotiques. L'un des points très surprenant est que l'étude classique de ces mutations montre qu'elles n'impliquent qu'un seul gène. De tels gènes sont des gènes homéotiques.

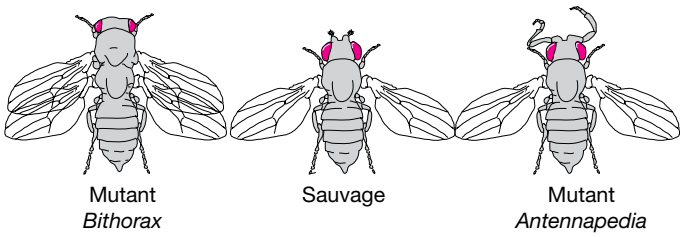


Figure 1 : Mutations homéotiques chez la drosophile
Dans la mutation *Bithorax*, une paire d'haltères est remplacée par une paire d'ailes ; dans la mutation *Antennapedia*, une paire d'antennes est remplacée par une paire de pattes.

Des séquences très conservées

Fiche 57

Le séquençage de ces gènes homéotiques a révélé une séquence de 180 nucléotides hautement conservée entre eux. Cette séquence (baptisée « homeobox ») code pour un domaine de 60 acides aminés : l'homéodomaine. L'utilisation de l'homeobox comme sonde a alors permis de découvrir de très nombreux gènes homéotiques depuis les cnidaires jusqu'aux mammifères. Cet homéodomaine est un site de liaison à l'ADN ; les gènes homéotiques sont des facteurs de transcription.

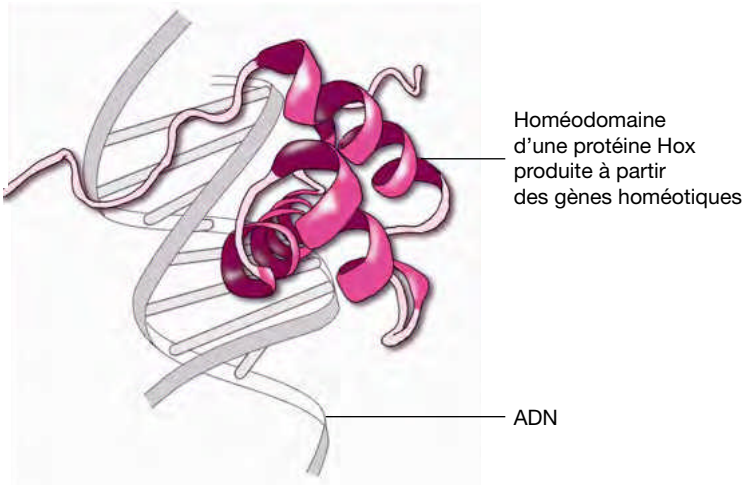


Figure 2 : Liaison de l'homéodomaine à l'ADN

2. Des gènes d'identité de position

Identité de position et axes de polarité

Les gènes de la famille de *bithorax* et *antennapedia* ont ainsi, chez la drosophile, un rôle capital dans la définition de l'identité de position de chaque segment le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal. Ce rôle se retrouve chez tous les organismes. Et le principe peut même être étendu à d'autres axes de polarité. Ainsi dans le membre chiridien des tétrapodes, plusieurs gènes Hox contrôlent les polarités du membre. Les gènes HoxA sont responsables de l'identité proximo-distale (le bras est différent de l'avant-bras et des doigts) et les gènes HoxD sont responsables de l'identité antéro-postérieur (le pouce est différent de l'auriculaire).

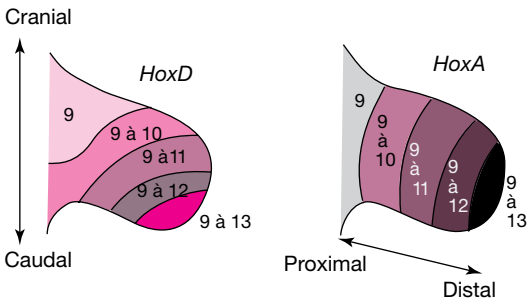


Figure 3 : Gènes homéotiques et organisation du membre chiridien

Disposition en série des gènes homéotiques

Une propriété étonnante des gènes homéotiques est que leur disposition en série sur l'ADN respecte la même succession que leurs domaines d'expression le long de l'axe qu'ils contrôlent. Cette disposition est liée à la possibilité de les activer séquentiellement.

fiche 159

Le modèle drosophile

La drosophile offre un modèle précieux de développement. La connaissance étroite de son génome ainsi que sa facilité d'élevage en font toujours un animal modèle de choix. De plus, les gènes du développement étant particulièrement bien conservés, de très nombreuses découvertes chez la drosophile ont pu servir de départ à des découvertes du même ordre chez le xénope ou la souris.

1. Un développement indirect

Cycle de développement de la drosophile

La drosophile a un développement indirect. Cela signifie que l'éclosion de l'œuf donne naissance à une larve qui se transformera en adulte après une métamorphose.

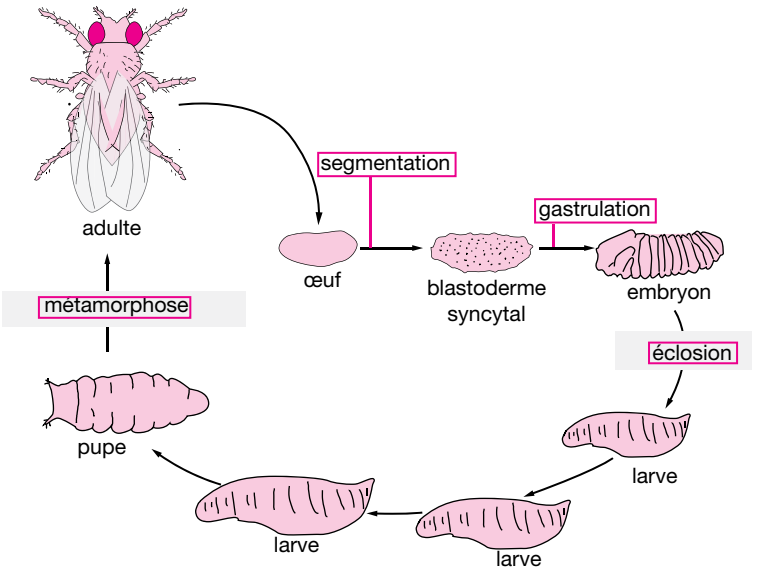


Figure 1 : Le développement de la drosophile

L'identité des segments de l'animal est acquise très tôt dans le développement

La larve, bien que différente de l'adulte présente la segmentation typique en 14 segments de l'adulte. Cette segmentation se retrouve au cours de toute la vie de l'insecte. Dans la larve, après l'éclosion, vont ensuite apparaître dans chaque segment des disques imaginaux, à l'origine de la plupart des organes définitifs de l'adulte.

2. Une construction séquentielle de l'animal

Les premières polarités

Les premières étapes du développement de l'embryon permettent de dessiner à grands traits le futur animal. Ainsi sont d'abord mis en jeu des gènes de polarité antéro-posté-

rieure présents sous forme d'ARNm pré-localisés dans l'œuf : *bicoid* en région antérieure, *nanos* postérieurement.

L'identité de position et les gènes homéotiques

L'acquisition de la polarité et de la segmentation antéro-postérieures chez la drosophile fait intervenir une cascade d'événements particuliers.

Fiche 158

Un premier « partage » en parasegments est assuré par des déterminants cytoplasmiques qui s'expriment en bandes successives dans l'embryon syncytial : les gènes *pair-rule.*

Par la suite, s'établit une polarisation des parasegments ainsi définis : le gène *engrailed* s'exprime à l'avant de chaque bande et définit ainsi la limite antérieure de chaque parasegment, le gène *wingless* en définit la zone postérieure.

Fiche 160

Les segments proprement dits apparaissent à partir de la gastrulation et se forment « à cheval » sur les parasegments, avec intervention, par exemple, du gène *patched*

Chaque segment a son identité. La spécification de cette identité est le fait de gènes homéotiques sélecteurs qui déterminent comment chaque segment évoluera.

On aboutit ainsi à un patron d'expression des gènes homéotiques qui définissent les 14 segments du futur insecte.

Après l'identification des gènes hométotiques *antennapedia* et *ultrabithorax* de nombreux autres gènes homéotiques ont été découverts.

Une propriété surprenante de ces gènes d'identité de position tient au fait que leur disposition dans la molécule d'ADN se fait dans le même ordre que leur patron d'expression le long de l'axe de l'animal qu'ils spécifient. Cette propriété qui se retrouve chez les Vertébrés est également observée pour l'identité de position au sein d'un organe, comme le membre chiridien des mammifères.

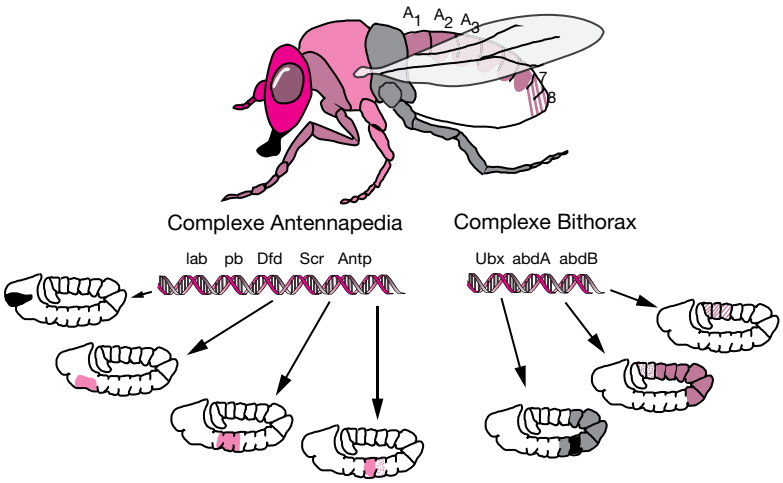


Figure 2 : Identité des segments chez la drosophile

Les gènes de la famille Antennapedia et Bithorax définissent l'identité des 14 segments de l'animal.

fiche 160

Les mécanismes cellulaires de la gastrulation

Lors du développement du Xénope, la gastrulation est une étape majeure qui voit en particulier la mise en place des trois feuillets embryonnaires. C'est aussi une étape d'importants mouvements. De ces mouvements résultent des mises en contact de territoires auparavant disjoints, qui permettent de nouvelles inductions et l'apparition de nouvelles potentialités.

1. L'initiation de la gastrulation à la lèvre blastoporale

Invagination et formation du blastopore

La gastrulation débute par la formation du blastopore ; il s'agit d'une encoche située en région dorsale par laquelle les territoires cellulaires de cette région s'invaginent peu à peu pour former une masse de cellule qui envahit le blastocœle. Cette encoche s'allonge tout en s'incurvant au fur et à mesure de la progression de l'invagination.

Les cellules en bouteille : déformation de cellules

Les premières étapes de cette invagination sont liées à l'apparition de cellules « en bouteille » dont la base dilatée progresse vers l'intérieur de l'embryon avec toutefois conservation des liens avec les cellules en surface. Leur rôle se bornerait ensuite à guider l'enroulement du mésoblaste, en faisant obstacle à sa progression vers le centre de l'embryon.

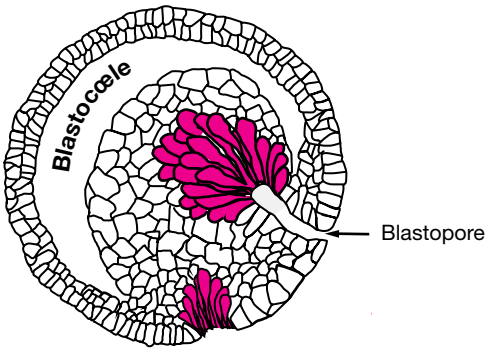


Figure 1 : Cellules en bouteille (en rouge) et initiation de la gastrulation

2. Les mouvements de gastrulation

Des intercalations de cellules

L'emploi de marques colorées a permis de suivre l'évolution géométrique des différents territoires au cours de la gastrulation. On a ainsi pu identifier :

- des mouvements d'épibolie : l'ectoderme s'étend et finit par recouvrir toute la surface de l'embryon ;
- des mouvements d'invagination : le mésoderme et l'endoderme sont entièrement internalisés ;
- des mouvements d'extension-convergence : en accompagnement de l'épibolie, l'ectoderme s'étend tout en convergeant vers le blastopore ;

- des mouvements d'extension-divergence : à l'intérieur de la gastrula, le mésoderme s'étend latéralement et diverge en formant les lames latérales.

Ces mouvements s'expliquent par une réorganisation tridimensionnelle où les intercalations cellulaires permettent, à volume constant, de diminuer une dimension (l'épaisseur par exemple) en en augmentant une ou deux autres (la surface par exemple).

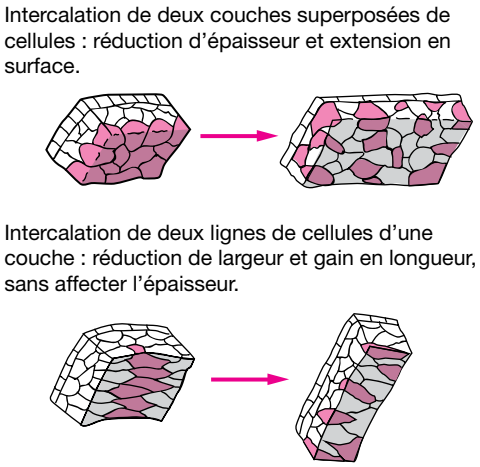


Figure 2 : Intercalations cellulaires

Les interactions cellule–matrice extracellulaire

Certains mouvements sont liés à des déplacements de cellules sur une matrice extracellulaire. C'est le cas de l'embolie des cellules mésoblastiques qui « rampent » sur un tapis de fibronectine. Cette reptation fait bien entendu intervenir des contacts focaux et des intégrines. Les mouvements cytosquelettiques et la réorganisation des contacts focaux permettent le déplacement sur la matrice.

Fiches 145, 149

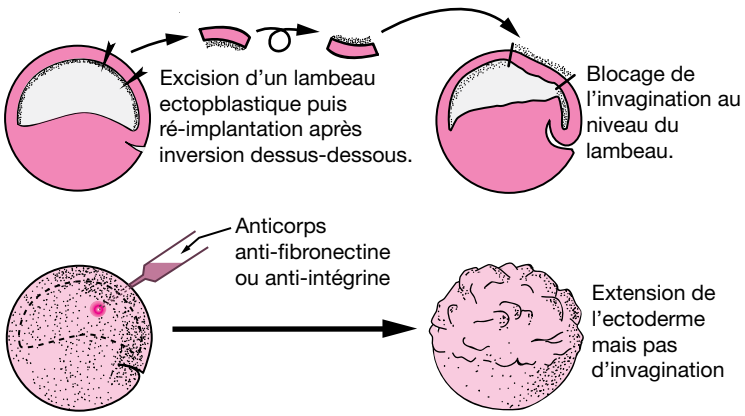


Figure 3 : Rôles de la fibronectine

fiche 161

Les cellules souches pluripotentes

On appelle cellule souche pluripotente des cellules qui ont la capacité à se différencier pour donner toutes les cellules d'un organisme adulte, y compris les cellules de la lignée germinale.

1. Obtention des premières cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires

Très rapidement après la fécondation, deux catégories de cellules se forment. Les cellules du trophectoderme seront à l'origine des annexes embryonnaires tandis que les cellules de la masse interne, qui font saillie à l'intérieur du blastocyste seront à l'origine de toutes les cellules de notre corps, c'est-à-dire tous les tissus dérivés des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Elles sont pluripotentes et non plus totipotentes puisqu'elles ne peuvent plus être réimplantées dans la paroi utérine.

C'est en 1981 que l'équipe de M. Evans (prix Nobel 2007) publie une technique de culture des cellules de la masse interne d'une lignée de souris et démontre leur caractère pluripotent (figure 1).

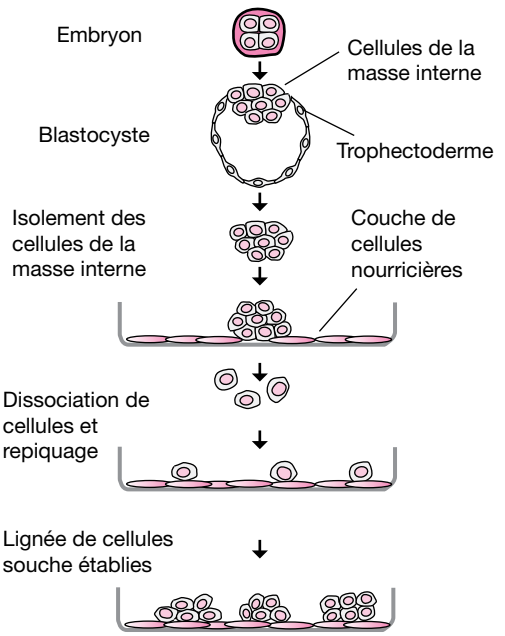


Figure 1 : Production de cellules souches embryonnaires

Les cellules souches d'origine germinale

D'autres sources de cellules embryonnaires ont également été à l'origine de lignées de cellules aux caractéristiques proches des cellules souches embryonnaires. Ainsi des lignées de cellules souches pluripotentes ont été établies à partir de cellules germinales primordiales prélevées sur des embryons murins et humains. Plus intéressant, en 2006,

des expériences réalisées après prélèvement de cellules souches spermatogoniales sur des testicules de souris adultes ont démontré leur caractère pluripotent.

2. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes

Fiche 138

Cultivées dans un milieu bien défini, les cellules souches pluripotentes peuvent proliférer à l'infini sans dérive génétique. Elles sont dépourvues du point de contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire et redémarrent des phases S sans avoir besoin de stimuli externes.

En modifiant les milieux de culture, elles peuvent donner naissance à toutes les lignées cellulaires issues des trois feuillets embryonnaires.

Chez la souris, lorsque ces cellules sont réimplantées à l'intérieur d'un blastocyte d'une souris donneuse, elles peuvent coloniser tous les tissus d'un embryon en développement, y compris les gonades, et donner naissance à des ovules et des spermatozoïdes.

En 1998, des cellules souches embryonnaires ont été produites à partir d'embryons humains. Elles présentent de nombreuses ressemblances avec les cellules souches embryonnaires. Leur caractère pluripotent est maintenant bien établi, mais il n'est pas certain qu'elles aient toutes les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires de souris. Pour des raisons éthiques on ne peut pas tester leur capacité à former un embryon et un adulte viable et fertile.

La culture des cellules souches embryonnaires est très complexe. Malgré de nombreuses tentatives on dispose de ces cellules que chez un nombre réduit d'espèces. Ainsi il a fallu attendre 2010 pour obtenir des cellules souches embryonnaires chez le rat.

3. Cellules souches embryonnaires et clonage thérapeutique

Le clonage thérapeutique consiste, dans son principe, à prélever le noyau d'une cellule somatique d'un patient puis à réaliser son transfert dans un ovocyte receveur (ce qui pose le problème chez l'homme de la disponibilité de ces ovocytes). Les cellules de la masse interne sont alors mises en culture puis peuvent servir à l'obtention de cellules différenciées qui seraient alors réimplantées chez le patient. Mais la reprogrammation du noyau de la cellule somatique n'est pas un phénomène actuellement maîtrisé.

Fiche 64

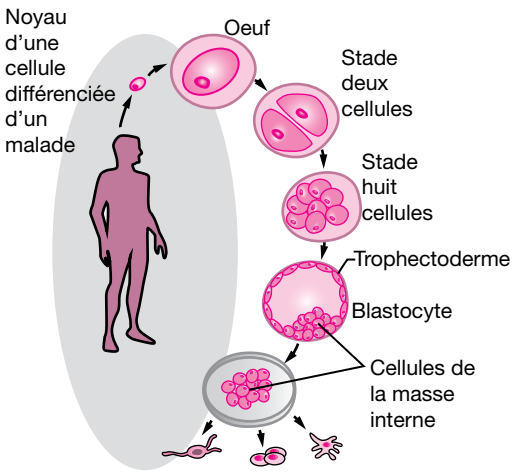


Figure 2 : Principe du clonage thérapeutique

fiche 162 Les cellules souches pluripotentes induites

Fiche 64

Les expériences de transplantation de noyau réalisées par J. Gurdon dans les années 1960 avaient clairement démontré que le noyau d'une cellule différenciée adulte pouvait, au contact du cytoplasme de la cellule œuf être « reprogrammé » pour assurer le développement d'un nouvel individu. Le clonage de la Brebis Dolly en 1997 par l'équipe de I. Wilmut a définitivement validé cette théorie.

Il devenait alors envisageable de rechercher à induire directement la transformation d'une cellule différenciée en cellules souches pluripotentes. C'est ce qui a été réalisé par l'équipe de S. Yamanaka en 2006. En 2012, J. Gurdon et S. Yamanaka ont obtenu le prix Nobel pour l'ensemble de leurs travaux.

1. L'expérience de Takahashi et Yamanaka

Il existe chez la souris un gène dont l'expression est spécifique des cellules souches embryonnaires mais dont l'inactivation ne produit pas de phénotype particulier. Ce gène peut donc être utilisé comme marqueur d'un phénotype « cellule-souche embryonnaire ». Pour réussir à induire in vitro la pluripotence de fibroblastes de derme de souris, l'équipe crée d'abord une lignée de souris transgénique exprimant le promoteur de ce gène spécifique couplé avec un gène de résistance à un antibiotique. Même si très peu de fibroblastes réacquièrent des caractéristiques de cellules souches embryonnaires, ils pourront être sélectionnés car ils seront les seuls à survivre en présence de l'antibiotique. Ils infectent alors à l'aide de rétrovirus, les fibroblastes de ces souris avec un cocktail de 24 facteurs moléculaires connus pour être spécifiques ou surexprimés dans les cellules souches pluripotentes. Ils obtiennent ainsi trois premières lignées de cellules qui présentent de nombreuses caractéristiques de cellules pluripotentes. Ils réduisent alors progressivement le nombre de facteurs jusqu'à découvrir que 4 gènes sont nécessaires et suffisants pour induire la pluripotence de cellules somatiques, les gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc.

Un an plus tard, ils réalisent la même expérience avec ces quatre facteurs sur des fibroblastes de derme humain et produisent ainsi les premières lignées de cellules souches pluripotentes induites. Plusieurs équipes de par le monde ont maintenant confirmé ces résultats.

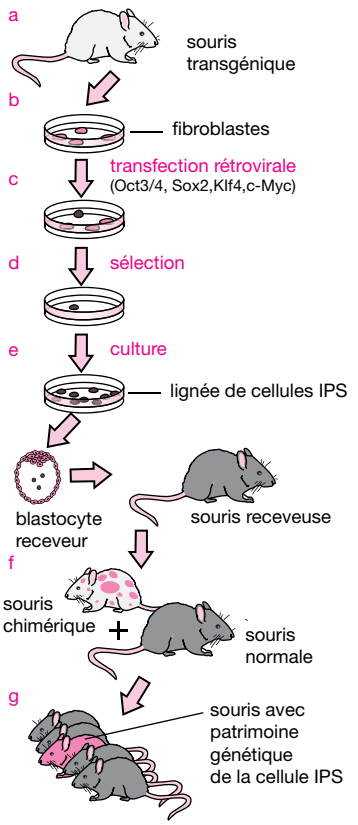


Figure 1 : Production de cellules IPS *(Induced Pluripotent Stem Cells)*

2. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes induites

Fiche 161

Chez la souris tout au moins, ces cellules souches présentent toutes les caractéristiques de cellules souches pluripotentes. Néanmoins l'intégration de ces gènes par des rétrovirus n'est pas neutre et augmente considérablement le risque de formation de tumeurs en s'insérant dans le génome. De nouvelles constructions sont à l'essai pour pallier à ce problème. D'autre part plusieurs travaux réalisés en 2010 montrent que ces cellules ne sont pas complètement comparables aux cellules souches embryonnaires. En effet, si on compare la capacité de différenciation de cellules souches embryonnaires « natives » ou obtenues par clonage thérapeutique aux cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes ou de cellules sanguines, on constate que les cellules souches induites ont gardé une certaine « mémoire » de leur tissu d'origine. Elles sont bien pluripotentes puisqu'elles peuvent donner tous les types cellulaires mais le taux de succès est plus important pour les types cellulaires correspondant à leur lignage. Cela signifie que les modifications épigénétiques qui se sont produites au cours de leur vie antérieure de cellule différenciée n'ont pas été toutes effacées.

Fiche 62

De nombreux travaux sont donc encore nécessaires pour imaginer l'utilisation de ces cellules en thérapie. Il n'en demeure pas moins qu'elles représentent un réel espoir puisque une fois les obstacles levés il deviendra possible de différencier les cellules en culture et donc de s'affranchir du clonage et du passage par un embryon.

3. Vers un contrôle de la reprogrammation cellulaire

Fort des résultats obtenus par l'équipe de Yamanaka, d'autres équipes de recherche ont essayé, en utilisant une approche expérimentale similaire, de reprogrammer des cellules somatiques directement en d'autres types de cellules (en quelque sorte sans repasser par la case départ). Comme on peut le voir sur la figure 2 toujours en partant de fibroblastes de derme il a été possible d'obtenir des cellules nerveuses, des cellules cardiaques ou des cellules sanguines en changeant les cocktails de gènes.

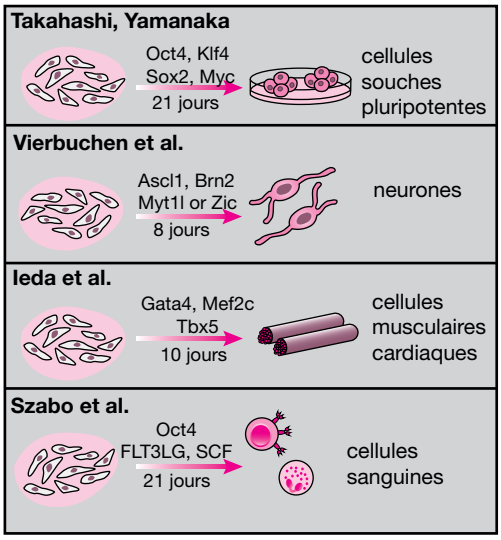


Figure 2 : Contrôle de la reprogrammation nucléaire
D'après *Cell*, 2011, 145 p. 827.

fiche 163 Les cellules souches embryonnaires et la transgenèse

La production de cellules souches embryonnaires a révolutionné chez la souris les techniques de transgenèse. Ce n'est pas par hasard si en 2007 le comité Nobel de médecine a associé M. Evans, découvreur des cellules souches embryonnaires à M. Capecchi et O. Smithies qui ont été les premiers à réaliser des insertions ciblées de transgènes. Ils ont en effet profité de la capacité de ces cellules à proliférer à l'infini pour mettre au point une technique permettant la sélection d'événements rares et donc impossible à réaliser par injection dans la cellule œuf.

Fiche 158

1. Principe de la transgenèse à partir des cellules souches embryonnaires

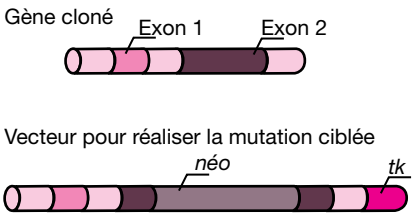


Figure 1 : Construction d'un vecteur pour la réalisation d'un KO

Nous allons décrire ici le principe de l'inactivation génique, également nommé Knock Out (KO). Comme on peut le voir sur la figure 1, la première étape consiste à ajouter une séquence dans l'exon du gène codé que l'on souhaite inactiver. Cette séquence va servir à la fois à interrompre le cadre de lecture, et donc à empêcher la traduction d'une protéine fonctionnelle et à introduire un gène de sélection, ici un gène de résistance à un antibiotique, la néomycine (néo).

Un deuxième gène de sélection sera ajouté à l'extrémité de la construction, le gène de la thymidine kinase (tk). L'expression de ce gène dans une cellule la rend sensible à un produit très toxique, le Ganciclovir.

La construction ainsi réalisée est introduite dans des cellules souches embryonnaires en cours de prolifération. Si la construction ajoutée ne s'insère pas dans le génome de la cellule, ce qui est le cas le plus fréquent, les cellules filles ne pourront pas survivre en présence de néomycine. Si la construction s'insère de façon aléatoire dans le génome en une ou plusieurs copies (cas assez fréquent), les cellules filles pourront survivre en présence de néomycine mais pas en présence de Ganciclovir.

En revanche, si la construction s'insère lors de la réplication, par un mécanisme appelé recombinaison homologue, à la place de la copie normale du gène de la cellule, les cellules filles survivront en présence de néomycine et de Ganciclovir. Ce phénomène est très rare (1×10^7), mais la grande capacité de prolifération des cellules souches et le double système de sélection permet d'isoler sans difficultés les cellules ainsi transformées.

Fiche 35

Nous venons de voir ici l'exemple de l'inactivation d'un gène, mais il est également possible de faire du Knock In en ajoutant à la construction, en plus du gène de sélection une séquence d'intérêt.

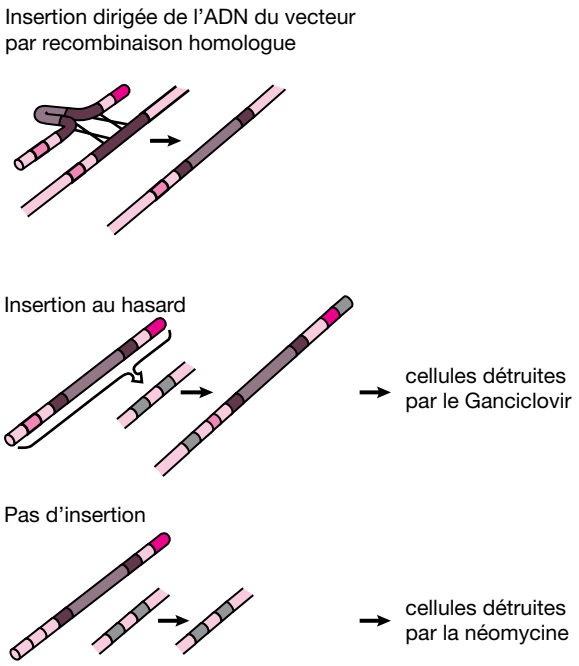


Figure 2 : Devenir des vecteurs après incorporation dans les cellules souches embryonnaires

2. Obtention des lignées de souris transgéniques

Les cellules souches transformées sont réintroduites dans un blastocyste de souris sauvage, ce blastocyste étant lui-même réintroduit dans une souris receveuse. Il suffit alors qu'une seule d'entre elles viennent se mélanger aux cellules de la masse interne pour que ses descendants participent à la construction de l'organisme et viennent coloniser l'ensemble des tissus, y compris les cellules de la lignée germinale. En F1, la présence du gène modifié est recherchée par PCR car il est rare que l'inactivation d'une seule allèle se traduise par une modification phénotypique. Les souris chimères sont croisées entre elles pour obtenir des lignées homozygotes. L'inactivation de certains gènes produisant des phénotypes létaux, la lignée doit parfois être maintenue à l'état hétérozygote.

Fiche 40

3. Mutagenèse conditionnelle

Plusieurs situations rendent délicates l'interprétation des résultats obtenus après KO ou KI. C'est le cas par exemple lorsque l'inactivation d'un gène est létale ou lorsque celui produit des effets dans de très nombreuses cellules. Des techniques de mutagenèse conditionnelle ont donc été développées qui permettent de ne provoquer l'inactivation du gène qu'au moment et au lieu désiré. Le système le plus connu est le système appelé Cre/Lox. Des séquences d'ADN appelé Lox, sont disposées de chaque côté du gène que l'on souhaite inactiver. Ces séquences sont spécifiquement reconnues par l'enzyme Cre. Dans une autre partie du génome, la séquence de cette enzyme est introduite sous le contrôle d'un promoteur inductible (par exemple par un antibiotique) ou d'un promoteur spécifique d'une catégorie de cellules (les neurones par exemple), ou les deux.

L'inactivation ne se produira que lorsque l'enzyme sera produite puisqu'elle se fixera sur les sites Lox et enlèvera les séquences situées entre les deux sites.

fiche 164

Le développement des plantes

Les méristèmes sont les acteurs essentiels de la croissance et du développement des plantes. Ce sont des massifs de petites cellules indifférenciées à forte activité mitotique. La prolifération cellulaire (la mérèse) dont ils sont l'objet produit des cellules qui ensuite croissent et se différencient, générant différents organes. Le méristème apical caulinaire, au cœur des bourgeons est ainsi le centre de production des tiges feuillées.

1. Organisation du méristème apical caulinaire (MAC)

Différents types cellulaires

Le MAC produit par mérèse des protubérances latérales, les *initiums*, qui préfigurent les futures feuilles. Par la suite, les *initiums* évoluent en *primordiums* qui donneront des ébauches de feuilles. Cette activité produit ainsi des suites de feuilles empilées, ce qui préfigure la future tige.

On observe plusieurs zonations dans le MAC. Une première stratification morphologique, horizontale, permet de distinguer une tunica (deux assises de cellules, externes) et un corpus. Une seconde zonation, radiale, montre une zone périphérique annulaire (ZP) à très forte activité mitotique entourant une zone centrale (ZC) méristématique également mais moins active. La zone médullaire (ZM), nettement moins active, présente des cellules plus grandes produisant les parties internes de la tige. La prolifération de ZP produit régulièrement des primordiums foliaires, tandis que ZC entretient le méristème.

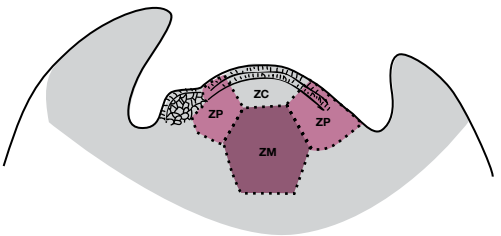


Figure 1 : Le méristème apical caulinaire

Des gènes du développement chez *Arabidopsis thaliana*

L'étude du développement de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier des mutations affectant le MAC. On y a ainsi identifié plusieurs gènes :

- dont la mutation affecte l'existence ou le fonctionnement du MAC ;
- dont on montre par hybridation *in situ* qu'ils s'y expriment spécifiquement.

2. Interactions wus-clv et entretien du méristème

Les gènes impliqués

Le gène *stm* (*Shootmeristemless*) : sa mutation provoque la suppression de l'activité méristématique. Il s'exprime dans ZC, ZM et ZP. Il serait un gène d'identité méristématique
Le gène *wus* (*wuschel*). Sa mutation entraîne l'épuisement progressif de l'activité méristématique. Il ne s'exprime que juste sous la ZC. Ce domaine étroit d'expression pourrait être un « centre organisateur » du MAC, maintenant l'identité des cellules souches.

Les gènes *clv* (*clavata*). Les deux plus importants sont *clv1* et *clv3*. Leur mutation provoque une surproduction de feuilles. Leur domaine d'expression est juste au-dessus de *wus*, dans ZC.

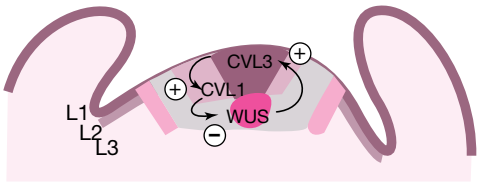


Figure 2 : Entretien du méristème

Une boucle contrôlant l'entretien du méristème

Le gène *wus* semble stimuler leur expression tandis que ces mêmes gènes *clv* inhibent l'expression du gène *wus*. Cette boucle négative aurait pour fonction de contrôler la taille du méristème, à l'image d'une boucle de régulation.

3. La formation d'un primordium foliaire

Une mise en place contrôlée dans le temps et dans l'espace

Lors du fonctionnement du MAC, seul un secteur de l'anneau ZP est en activité forte, ce qui produit un primordium foliaire. La feuille suivante sera ensuite produite par un autre secteur de l'anneau, engendrant ainsi ce que l'on nomme les hélices foliaires. Tour à tour, la zone d'activité dans ZP se déplace régulièrement.

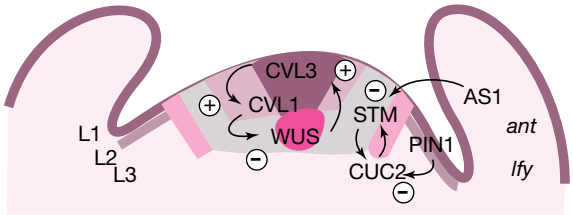


Figure 3 : Primordium foliaire

Des gènes spécifiques du primordium

Au niveau d'un primordium en train d'apparaître, on observe que :

- l'expression de *stm* cesse ;
- des gènes spécifiques s'expriment (ex. : gènes *as1* et *ant*) ;
- l'expression de *as1* inhibe celle de *stm*.

On pense que *as* et *ant* seraient des gènes définissant l'état de cellules de primordium (et non plus de cellules méristématiques d'entretien) ; ils seraient exprimés en réponse à un signal de position (hypothétique) et orienteraient les cellules vers un comportement qui mène à la formation d'un nouvel organe.

À la base du primordium, le gène *cuc2* inhibe la croissance de la zone et l'isole ainsi du reste de l'apex, permettant l'individualisation de l'ébauche.

fiche 165

La sénescence réplicative

La sénescence est synonyme de vieillissement. Si ce phénomène nous semble évident chez un métazoaire (organisme pluricellulaire) et singulièrement dans notre propre espèce, ce mécanisme existe aussi chez les organismes unicellulaires. La sénescence réplicative correspond donc au nombre de cycle de division qu'une cellule peut initier.

Dans l'exemple de la figure 1, la lignée cellulaire peut faire 5 cycles réplicatifs. À chaque cycle, la cellule mère donne naissance à une cellule fille qui pourra à son tour se diviser. Au cours de l'avancement dans le nombre de divisions, la cellule mère accumule un certain nombre de modifications qui vont la conduire à ne plus pouvoir se diviser (et donc à la mort). Ces modifications peuvent influer sur la « qualité » de la cellule fille.

Fiche 170

En parallèle de cet âge « réplicatif », on trouve l'âge chronologique. L'âge chronologique est le temps pendant lequel une cellule reste viable dans un état de non-division (état équivalent à ce qui est trouvé dans les neurones).

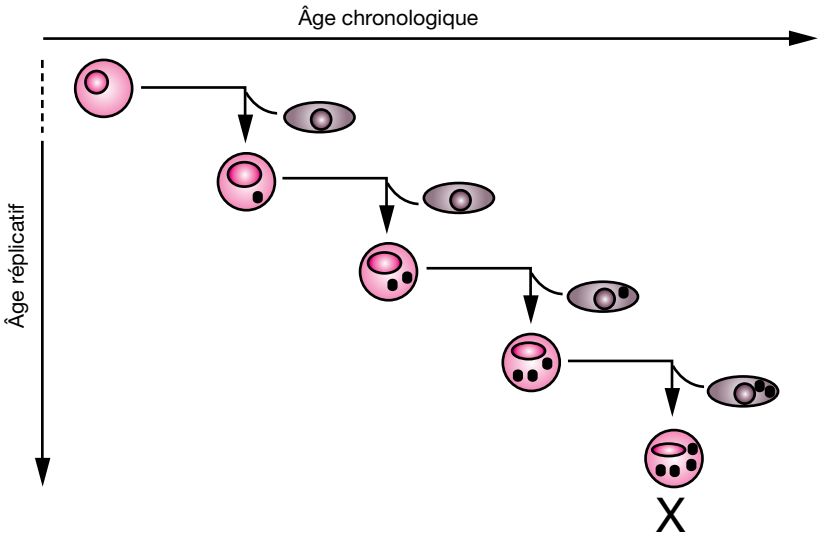


Figure 1 : Différence entre l'âge réplicatif et chronologique

Seules les cellules souches prolifèrent pendant toute la vie. De manière remarquable, toutes les cellules vouées à mourir ne le feront pas de manière synchrone. Dans les cultures cellulaires, la sénescence (la mortalité) est observable dès le début de la mise en culture. Lorsque ces cultures sont entretenues par repiquage et mise en culture de cellules déjà cultivées, le pourcentage de mort cellulaire augmente régulièrement. La probabilité pour une cellule de mourir augmente donc au cours des cycles réplicatifs. Différents facteurs expliquent cette mortalité et donc ce compte à rebours.

1. Réplication des télomères

L'érosion des télomères est un phénomène réel. Outre les aspects mécanistiques liés à la réplication, il est également du à des processus complexes faisant intervenir la recombinaison. Des mesures réalisées sur des fibroblastes humains en culture ont permis de constater que les chromosomes perdent 100 à 200 pb à chaque doublement de population. Cette érosion des télomères a été également mesurée chez des individus au cours de leur vieillissement. Dans le monde vivant, la diminution de la longueur des télomères est corrélée avec l'avancée en âge (il est généralement admis que le raccourcissement correspond à une centaine de paires de bases par division).

Fiche 37

Chez les animaux, la sénescence réplicative fait l'objet d'une régulation. Elle affecte la plupart des cellules somatiques, parce que leurs télomères s'érodent peu à peu, mais épargne les cellules germinales. En fait, les cellules immortelles empêchent leurs chromosomes de raccourcir grâce un système d'entretien faisant appel à un enzyme particulier : la télomérase. On a mesuré l'activité de la télomérase au cours du développement humain. Dans les tumeurs cancéreuses, l'activité de la télomérase est anormalement élevée. Cette forte expression de l'enzyme tend à apporter une certaine immortalité aux cellules. Ce travail a permis à E. Blackburn, C. Greider et J. Szostak, d'obtenir le prix Nobel en 2009 pour leurs travaux sur les télomères et l'enzyme télomérase qui protègent les cellules du vieillissement.

Fiche 37

Fiche 201

2. Télomère, sénescence et tumorisation

La perte des télomères à l'extrémité des chromosomes est perçue par la cellule comme la présence d'anomalie chromosomique. On peut avancer l'hypothèse que ces extrémités sont reconnues comme des cassures d'ADN. Ils vont donc induire une réponse impliquant les systèmes de réparation. L'entrée en sénescence s'accompagne d'une augmentation de la fonction transactivatrice de p53. Cet activateur transcriptionel de 393 acides aminés est impliqué dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Son rôle est de maintenir un génome intègre. En cas d'endommagement de ce génome, l'induction de p53 permet de bloquer le cycle cellulaire à des points de contrôle durant l'interphase.

Fiches 138, 141

Ce blocage va laisser le temps nécessaire pour réparer les dommages cellulaires. Il va donc être un acteur important pour éviter l'apparition de mutations délétères et jouer un rôle anti-tumoral essentiel. Ce rôle est renforcé par sa capacité à induire l'apoptose. Si la cellule est trop modifiée, elle doit être éliminée pour éviter une multiplication anarchique. L'activateur p53 joue là encore un rôle essentiel et fait donc partie des suppresseurs de tumeurs.

La relation entre sénescence et p53 montre ainsi que la sénescence peut être considéré comme un mécanisme de protection qui permet d'empêcher à la fois l'apparition de la tumeur et son développement.

fiche 166 La sénescence métabolique ou chronologique

Fiche 165

Le vieillissement est un phénomène qui comporte deux dimensions. La première dimension est liée au nombre de division qu'une cellule peut faire.
Le deuxième aspect est la capacité pour une cellule qui ne se divise pas, ou ne se divise plus, de pouvoir toujours réaliser ses fonctions. Ce vieillissement métabolique (ou chronologique) et donc lié au phénomène de quiescence. La quiescence est un état de dormance cellulaire. Cet état est trouvé chez les métazoaires pour certaines lignées cellulaires comme les neurones qui ont l'âge de l'organe auxquels ils appartiennent. Pour les organismes unicellulaires comme la levure *S. cerevisiae*, cette quiescence est observée en fin de croissance. Après une augmentation exponentielle, la densité cellulaire atteint un plateau dû à l'épuisement du milieu nutritif. Les cellules s'arrêtent alors de se diviser et, bien que l'arrêt ne soit pas systématiquement observé en G0, rentrent en phase de quiescence. L'intérêt majeur de ce système provient de la facilité de l'analyse génétique qui peut alors être réalisée (on peut mesurer la capacité à se diviser de ces cellules au cours du temps et étalant un aliquot sur une boîte de Petri et en comptant le nombre de colonies formées après incubation de cette boîte). Cette approche permet donc de mesurer le temps pendant lequel les cellules peuvent survivre (figure 1).

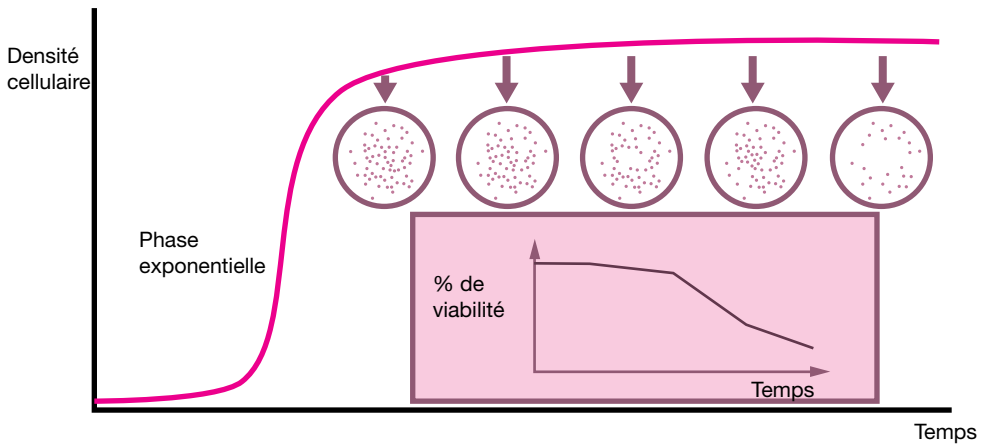


Figure 1 : mesure du vieillissement chronologique chez *S. cerevisiae*

1. Le métabolisme oxydatif : un acteur central

Toutes les études réalisées sur différents modèles convergent vers le métabolisme de l'oxygène. Dans les mitochondries, un petit pourcentage (moins de 5 %) des électrons transitant dans la chaîne respiratoire est directement détourné vers l'oxygène. La conséquence est la production de radicaux. L'oxygène sera ainsi réduit par étapes en produisant différents intermédiaires réactifs : le radical superoxyde, $O_2^{\bullet -}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $OH^{\bullet -}$. Ces espèces sont alors extrêmement réactives et capables de rompre des liaisons carbone-hydrogène ou oxyder les doubles liaisons carbone-carbone des molécules indispensables à la cellule (phospholipides, protéines, acides nucléiques). L'augmentation des espèces actives de l'oxygène est un phénomène

corrélé avec la sénescence et il a logiquement été proposé qu'elle en soit la cause. Cette hypothèse du stress oxydatif a été récemment fortement nuancée par une étude menée sur le nématode *C. elegans*. Les auteurs ont désactivé cinq gènes responsables de la production d'un groupe de protéines de la famille des superoxydes dismutases (SOD), qui neutralisent l'une des principales espèces actives de l'oxygène. Dans ces conditions, la durée de vie de *C. elegans* n'a pas augmenté (comme l'aurait voulue la théorie du stress oxydatif), mais au contraire, c'est l'inverse qui s'est produit ! Ainsi les espèces actives de l'oxygène ne sont pas forcément délétères en elles-mêmes, leur concentration et lieu de production pourraient également avoir un rôle prépondérant. Ainsi, une interprétation des expériences menées sur *C. elegans* serait que la mitochondrie joue un rôle essentiel dans le processus de vieillissement, mais qu'en réduisant l'activité mitochondriale par l'intermédiaire des espèces actives de l'oxygène, les vers vivent plus longtemps. Ces résultats peuvent aussi être interprétés comme la démonstration qu'un même effet (production d'espèces actives de l'oxygène) peut avoir des conséquences opposées selon que les cellules se divisent (rôle positif sur le vieillissement) ou non (effet délétère sur des cellules post-mitotiques).

2. La restriction calorique (ou diététique)

Des résultats anciens (1935) ont permis de constater que des rats ayant accès à une quantité de nourriture limitée vivent plus longtemps que les animaux « contrôles » soumis à un régime riche dispensé sans aucune limite. Ce phénomène, communément appelé « Restriction Calorique » (RC) a été confirmé chez un grand nombre d'espèces. Chez les souris, l'espérance de vie peut être jusqu'à 30 % supérieure pour un animal dont l'alimentation est limitée. Ce phénomène n'est pas strictement relié au nombre de calories car un régime pauvre en méthionine augmente également la longévité. De manière intéressante, l'effet de la restriction diététique est aussi trouvé la chez la levure S. cerevisiae. Des cellules arrivées au plateau et transférées dans un milieu sans glucose vont survivre 2 à 3 fois plus longtemps que les cellules non transférées.

Si ce phénomène est clair, les mécanismes mis en jeu sont pour l'heure toujours objet de débats et polémiques. La restriction calorique induit l'expression de gènes particuliers : les sirtuines. Ces protéines initialement découvertes chez *S. cerevisiae* sont clairement impliquées dans la longévité de cet organisme unicellulaire. Plusieurs études établissaient que les sirtuines prolongeaient la vie non seulement de levures, mais de vers nématodes et de mouches drosophiles. L'impact des sirtuines est d'autant plus intéressant que ces protéines peuvent être induites par une molécule, le resveratrol, dont on trouve des traces dans le vin rouge. Pour l'heure, les données obtenues ont montré une très grande dépendance au fond génétique des animaux utilisés et l'importance des sirtuines dans le vieillissement reste donc à clarifier.

FOCUS Dolly

Le 5 juillet 1996 est née Dolly, premier mammifère obtenu après transfert de noyau diploïde dans un ovocyte, suite aux travaux de I. Wilmut et K. Campbell en Écosse. On parle parfois (abusivement) de clonage pour cette technique.

Le transfert de noyau sur ovocyte

Lors du développement embryonnaire, les premières phases de la segmentation sont très largement dépendantes de l'organisation du cytoplasme de l'ovocyte. La pré-répartition d'ARNm et de protéines dans cet ovocyte détermine les héritages cytoplasmiques des différents territoires peu à peu isolés par la segmentation.

Ainsi, l'objectif de produire, de cloner, un organisme à partir d'une cellule différenciée semble hors d'atteinte. En revanche, il demeure possible de réaliser un développement à partir du génome, du noyau, d'une cellule différenciée, pour peu que ce génome soit introduit dans un ovocyte présentant toute son architecture cytoplasmique. L'idée était présente dans les travaux de H. Spemann, prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1935.

Le premier succès d'une transplantation a été effectué par J.B. Gurdon en 1962 chez la grenouille. Les résultats de ces travaux ont été contestés, mais Gurdon les a confirmés sans ambiguité en 1970. Il s'agissait de détruire aux ultra-violets le noyau d'un ovocyte et d'y transplanter le noyau d'une cellule intestinale de grenouille.

Pour Dolly, la technique est sensiblement la même que pour les expériences de Gurdon, à ceci près que pour un mammifère, l'implantation chez une mère porteuse est également nécessaire. Dolly a été obtenue à partir du noyau d'une cellule de glande mammaire prélevée sur une brebis âgée de 6 ans. De nombreux essais ont été réalisés en parallèle : 277 cellules œufs « hybrides » ont été préparées, parmi lesquelles seuls vingt-neuf ont donné des embryons entamant un développement. Dolly fut la seule à se développer jusqu'à l'âge adulte.

Dolly vécut jusqu'à l'âge de 6 ans où elle a été euthanasiée suite à une pathologie pulmonaire incurable.

Dolly et le clonage

Il est important de considérer que ce mode de production d'individu sans aucune fécondation n'est pas à proprement parler un clonage. En effet, les gènes mitochondriaux de Dolly proviennent de la brebis donneuse d'ovocyte, tandis que les gènes nucléaires proviennent du génome de la brebis donneuse du noyau de cellule mammaire. En conséquence, le génome entier de Dolly est de type mixte. Pour obtenir un génome entier homogène, il faudrait que la femelle donneuse d'ovocyte soit aussi la donneuse de cellule mammaire.

Par ailleurs, Dolly n'est pas non plus identique (morphologiquement, par exemple) à la mère donneuse de noyau parce que le développement de Dolly s'est fait également en fonction du milieu.

Dolly et le vieillissement

Il est apparu assez rapidement que Dolly vieillissait prématurément. Elle a été assez tôt atteinte d'arthrite. Cependant, certains ont attribué cette arthrite à la vie trop sédentaire et protégée de Dolly. Un vieillissement prématuré pourrait être dû à l'âge chromosomique de Dolly. En effet, la brebis donneuse de noyau était âgée de 6 ans et ses chromosomes avaient donc des télomères raccourcis.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

14.1 La séparation des homologues lors d'une méiose :
- ☐ a. est impossible
- ☐ b. se produit en anaphase I
- ☐ c. se produit en anaphase II

14.2 Le chromosome Y d'un mammifère :
- ☐ a. est bien plus petit que le chromosome X
- ☐ b. est bien plus grand que le chromosome X
- ☐ c. est responsable de la détermination du sexe mâle

14.3 Le spermatozoïde :
- ☐ a. fournit à l'ovule la moitié de ses mitochondries
- ☐ b. perd sa mobilité à l'approche de la zone pellucide
- ☐ c. ne fournit aucune mitochondrie à l'ovule

14.4 La réaction corticale :
- ☐ a. est une réaction des spermatozoïdes dans la zone pellucide
- ☐ b. est provoquée par la piqure spermatique
- ☐ c. est une exocytose des granules sous membranaires de l'ovule

14.5 L'embryon de Xénope :
- ☐ a. présente une symétrie cylindrique
- ☐ b. acquiert ses polarités à partir de la fécondation
- ☐ c. a une symétrie sphérique jusqu'à la gastrulation

14.6 Les gènes homéotiques :
- ☐ a. organisent la mise en place des membres
- ☐ b. déterminent l'identité de position de cellules
- ☐ c. sont tous identiques

14.7 La Drosophile :
- ☐ a. n'a qu'une paire d'ailes, comme toutes les mouches
- ☐ b. a permis d'identifier de nombreux gènes homéotiques
- ☐ c. présente un développement semblable au Xénope

14.8 Les cellules souches pluripotentes embryonnaires :
- ☐ a. proviennent de la masse interne du blastocyste
- ☐ b. peuvent être implantées dans un utérus
- ☐ c. proviennent de la lignée germinale

14.9 Les cellules souches pluripotentes induites :
- ☐ a. sont produites à partir de cellules différenciées
- ☐ b. ont perdu leur pluripotence
- ☐ c. conservent pour partie une « mémoire » de leur différenciation antérieure

14.10 Le méristème apical caulinaire :
- ☐ a. assure l'allongement des tiges sans produire de feuille
- ☐ b. produit des ébauches foliaires tout en assurant son propre entretien
- ☐ c. est quiescent jusqu'à une éventuelle mise à fleur

Réponses

14.1 **b**. Dès la prophase I, les homologues se réunissent, ce qui permet ensuite de les positionner par paires sur la plaque métaphasique. L'anaphase I qui suit les sépare alors après dissociation des chiasmas.

14.2 **a** et. **c**. Plus que le chromosome Y, c'est le gène Sry porté par ce chromosome qui est responsable du sexe mâle. Le chromosome Y est une centaine de fois plus petit que le chromosome X. mâle.

14.3 **c**. Lors de la fécondation, le spermatozoïde ne fournit à l'ovule que son noyau et un centriole qui formera ensuite le spermaster. Très peu de cytoplasme est intégré à l'ovule.

14.4 **b** et **c**. La réaction corticale est l'exocytose des granules corticaux. Elle est initiée au point de piqûre spermatique et est déclenchée par cette piqûre au moyen d'un signal calcium.

14.5 **b**. Alors que l'ovocyte présente une symétrie cylindrique, la fécondation impose, *via* la rotation de symétrisation, une symétrie bilatérale à l'embryon. Seule l'ovogonie présente une symétrie sphérique, vite remplacée par la symétrie cylindrique de l'ovocyte au cours de sa différenciation.

14.6 **b**. Les gènes homéotiques sont des gènes d'identité de position : ils s'expriment dans les cellules ayant une certaine position dans l'organisme et ils contrôlent l'expression de nombreux autres gènes. Ils codent pour une protéine à homéodomaine pouvant se lier à l'ADN.

14.7 **a** et **b**. Le modèle Drosophile de développement, bien que très éloigné des Vertébrés a permis d'identifier les premiers gènes homéotiques qui ont alors servi de sondes pour leur recherche dans d'autres organismes. L'un des tous premiers gènes homéotique fut le gène *bithorax* qui se manifeste par la mise en place d'une seconde paire d'ailes chez la Drosophile qui n'en possède normalement qu'une (comme tous les Diptères).

14.8 **a**. La possibilité de re-implantation dans l'utérus caractérise les cellules totipotentes. Ce n'est plus le cas des cellules du stade blastocyste, qui ne sont que pluripotentes : elles peuvent engendrer tous les types cellulaires de l'organisme.

14.9 **a** et **c**. Les cellules souches pluripotentes induites sont des cellules « dédifférenciées » qui ont recouvré un caractère pluripotent suite à un traitement approprié. Elles peuvent à nouveau engendrer tous les types cellulaires mais présentent toutefois une plus forte probabilité d'engendrer une lignée conforme à leur ancien type cellulaire.

14.10 **b**. Le méristème apical caulinaire est le centre de production de la tige feuillée : en produisant de jeunes feuilles dont les bases s'empilent, il produit une tige embryonnaire qui s'allongera par la suite. Il procède par une intense mérèse qui engendre d'une part des territoires qui se différencient ensuite, d'autre part des cellules qui entretiennent le méristème en le restaurant. Il fonctionne durant toute la vie végétative de l'organe.

Chapitre 15

Organisation et renouvellement des tissus

Objectifs

À l'issue du développement (chapitre précédent) les organismes pluricellulaires présentent différents organes permettant des fonctions précises. Ces organes sont constitués à partir de quatre grands types de tissus qui présentent des caractéristiques précises et s'assemblent de façon ordonnée.

Une très petite proportion de nos cellules a perdu l'aptitude à se renouveler. Elles demeurent néanmoins capables de renouveler, et parfois très rapidement, l'ensemble de leurs constituants.

Dans la plupart cas, des cellules souches adultes persistent tout au long de la vie de l'adulte. Elles ne sont plus pluripotentes mais peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires. La plus célèbre est sans aucun doute la cellule-souche hématopoïétique qui assure le renouvellement régulier des cellules sanguines.

Mais il en existe également dans de nombreux autres tissus, y compris le tissu musculaire et le tissu nerveux.

Ces cellules souches sont à la base des thérapies cellulaires existantes et de celles à venir.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 167

Les grandes catégories de tissus

On considère qu'il existe chez l'homme environ 250 types de cellules différentes qui s'organisent en tissus pour former des organes. Le tissu est un assemblage de cellules associées entre elles et capable d'exercer une fonction particulière. Il est donc en général constitué de différentes sortes de cellules. Un organe est formé de l'assemblage des plusieurs tissus pour une fonction bien précise.

1. Les tissus épithéliaux

Les tissus épithéliaux sont constitués de cellules étroitement juxtaposées qui revêtent l'extérieur du corps et les cavités de l'organisme. Ils ont des fonctions variées : protection, sécrétion, excrétion, réception sensorielle. Ils sont fortement polarisés, ce qui permet de distinguer une face apicale en contact avec la lumière de la cavité qu'ils bordent et une face basale qui repose sur le tissu conjonctif par l'intermédiaire d'une lame basale. On distingue les épithéliums de revêtement des épithéliums glandulaires.

2. Les tissus conjonctifs

Les tissus conjonctifs ont en commun d'être constitués de cellules non jointives entourées d'une matrice extracellulaire constituée de macromolécules, d'eau et de substances dissoutes. C'est dans cette matrice que l'on trouve les vaisseaux sanguins, les nerfs et des cellules du système immunitaire. Comme leur nom l'indique, ils relient entre eux les différents tissus. Il existe de nombreux types de tissus conjonctifs qui varient en fonction des cellules qu'ils contiennent et de la nature des constituants de la matrice extra-cellulaire. Le derme et les tendons sont des tissus conjonctifs. Certains conjonctifs sont plus spécialisés comme le tissu adipeux, les tissus squelettiques (cartilagineux et osseux) ou les tissus hématopoïétiques.

3. Les tissus musculaires

Il existe trois types de tissus musculaires qui partagent la propriété de contenir des cellules douées d'activité contractile.

Fiche 123

Le tissu musculaire strié doit son nom à l'existence de myofilaments composés d'actine et de myosine qui assurent la contraction de la cellule. Les cellules musculaires sont juxtaposées et organisées en faisceaux. Ces faisceaux sont eux-mêmes entourés d'une enveloppe conjonctive qui permet de transmettre à l'ensemble, formant le muscle, la force de contraction engendrée par chaque cellule. Le tissu musculaire strié permet les mouvements volontaires et réflexes.

Fiche 124

Le tissu myocardique est constitué de cellules musculaires striées de petite taille et avec un noyau central. Très irrigués et peu innervés les cardiomyocytes présentent des dispositifs de jonctions spécifiques qui assurent la cohésion de l'ensemble. Elles sont visibles au microscope photonique à l'extrémité des cellules et forment le trait scalariforme.

Le tissu musculaire lisse participe aux mouvements des appareils circulatoires digestif, génital, respiratoire et urinaire. La cellule musculaire lisse, fusiforme et allongée comporte un noyau unique central. Les protéines contractiles, actine et myosine ne sont pas arrangées de façon aussi organisée que dans le muscle strié.

Elles sont dépourvues de troponine.

4. Le tissu nerveux

Le tissu nerveux est un tissu constitué de neurones et de cellules gliales. L'ensemble du tissu nerveux est en continuité mais d'un point de vue fonctionnel, on distingue le système nerveux central qui regroupe l'encéphale et la moelle épinière et le système nerveux périphérique qui regroupe les ganglions et les nerfs périphériques.

Différentes catégories de cellules composent le tissu nerveux. Les neurones sont des cellules excitables qui propagent le potentiel d'action. Le corps cellulaire de la grande majorité des neurones est situé dans le système nerveux central. Seul les corps cellulaires des neurones végétatifs et sensitifs sont localisés dans les ganglions du système nerveux périphérique. Les cellules gliales sont de plusieurs types. Les astrocytes qui jouent un rôle très importants dans le fonctionnement du neurone, les oligodendrocytes qui produisent la gaine de myéline et les ependymocytes qui participent au fonctionnement de la barrière hémato-méningée. On trouve enfin les cellules de la microglie, qui ont des fonctions de macrophage.

5. Relation épithélio-conjonctive

L'association des épithéliums et des conjonctifs qui leur sont associés donnent naissance à des ensembles fonctionnels qui sont classés en relation avec leur localisation au sein de l'organisme. La classification est décrite dans le tableau ci-dessous.

Emplacement		Nom de l'épithélium	Nom du conjonctif	Nom de l'ensemble
Extérieur		**Épiderme**	**Derme**	**Peau**
Intérieur	En relation avec l'extérieur	Épithélium	Chorion	Muqueuse
	Cavité de l'organisme	Mesothélium	Couche sous mésothéliale	Séreuse
	Intérieur des vaisseaux sanguins	Endothélium	Couche sous endothéliale	Intima

Si les épithéliums donnent la fonction à l'organe, c'est le conjonctif qui en assure la nutrition. C'est également au travers des conjonctifs que se feront les échanges entre les épithéliums et les vaisseaux sanguins et que migreront certaines cellules du système immunitaire.

fiche 168

Les épithéliums

Les épithéliums sont de forme et de nature très variées. Ils présentent néanmoins toujours deux caractéristiques essentielles : les cellules sont polarisées et sont ancrées à la matrice extracellulaire par une lame basale. Ces caractéristiques sont liées à la présence des jonctions cellulaires. Les cellules épithéliales possèdent donc un pole basal et un pôle apical.

Fiches 146, 147

1. Les épithéliums de revêtement

Les épithéliums de revêtement sont formés de cellules jointives qui recouvrent l'extérieur du corps et les cavités de l'organisme. Ce sont des tissus non vascularisés.

Origine embryologique

L'épiderme dérive de l'ectoderme embryonnaire ainsi que l'épithélium des cavités buccales. Les autres épithéliums proviennent de l'endoderme. Les mésothéliums et les endothéliums dérivent quant à eux du mésoderme.

Fonction

Les épithéliums forment une barrière entre deux compartiments et protègent du milieu extérieur. Cette protection peut être mécanique (ex. : peau) ou chimique (ex. : tube digestif).

Ils permettent des échanges, comme par exemple les échanges O_2/CO_2 dans l'appareil respiratoire ou les échanges moléculaires entre le sang et l'urine dans le rein. Ils assurent l'absorption de nombreux substrats. Ils possèdent des cellules, ou des prolongements cellulaires qui captent et traduisent les messages sensoriels.

Renouvellement

Fiche 171

Le renouvellement de la plupart des épithéliums est assuré par des cellules souches. Celles-ci sont disposées de manière différente en fonction des catégories d'épithéliums. Elles sont soit intercalées et isolées à la base des cellules différenciées, soit groupées au contact de la lame basale ou encore regroupées en assises germinatives.

Classification

Les épithéliums sont classés selon trois critères :

- le nombre de couches cellulaire ;
- la forme des cellules de la couche superficielle
- la différenciation de certaines cellules (à mucus, caliciforme, à bordure en brosse, ciliées…)

On distingue ainsi schématiquement :

- des épithéliums monostratifiés qui sont soit pavimenteux (ex : endothélium des vaisseaux sanguins…) cubiques, (ex. : épithélium des tubules rénaux…) ou prismatiques (ex : épithélium de l'estomac…) ;
- des épithéliums pseudo-stratifiés où toutes les cellules sont prismatiques mais de hauteur variable. Elles sont toutes en contact avec la lame basale mais seules les cellules fonctionnelles sont en relation avec la lumière de l'épithélium (ex : épithélium de l'épididyme ou du tube digestif) ;
- des épithéliums pluristratifiés qui sont en général pavimenteux. On distingue les épithéliums pluristratifiés kératinisés comme l'épiderme ou non kératinisés comme dans l'œsophage. Ils comportent une vingtaine de couches cellulaires. On trouve également des épithéliums pluristratifiés cubiques dans quelques organes (canaux

excréteurs des glandes salivaires, segments urétraux) qui sont constitués de 2 à cinq couches de cellules. Enfin, une dernière catégorie, appelée épithélium de transition est caractéristique de la vessie. Ce dernier présente 5 à 7 couches de cellules dans une vessie vide et deux à trois dans une vessie pleine.

2. Les épithéliums glandulaires

Il existe des épithéliums qui possèdent des glandes intra-épithéliales uni ou pluricellulaires. On traitera ici des épithéliums glandulaires qui se trouvent localisés dans le tissu conjonctif (derme et surtout chorion). Ils naissent au cours du développement en formant des bourgeons. Lorsque la communication avec l'extérieur est maintenue, on parle de glandes exocrines, le produit de sécrétion étant déversé par un canal excréteur. Mais la communication avec l'extérieur peut être supprimée. Dans ce cas les produits de sécrétion, appelés hormones, sont déversés dans le sang. On parle alors de glandes endocrines.

Fiche 166

Les glandes exocrines

Les glandes exocrines peuvent être simples avec un canal excréteur plus ou moins long, ou composées. Dans ce dernier cas, lorsque l'élément sécréteur est en forme de tube, on parle de glandes tubuleuses, lorsqu'il est sphérique, on parle de glandes acineuses. Il existe également des glandes mixtes constituées de tubes et d'acini ou d'éléments mixtes (tubes se terminant par un acinus).

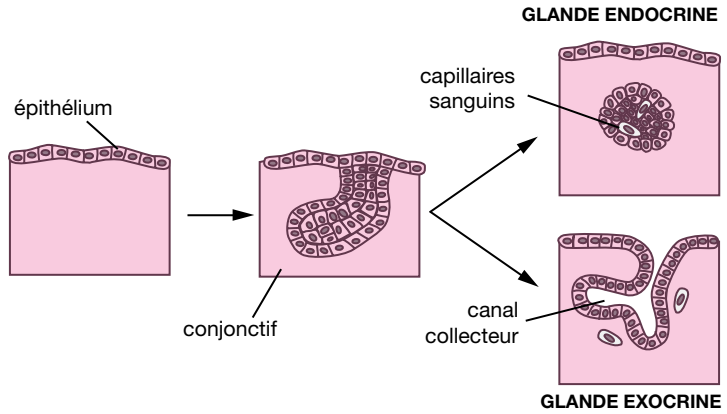


Figure 1 : Histogenèse des épithéliums glandulaires

Il existe trois modes de sécrétion des glandes exocrines :

- sécrétion mérocrine qui se fait par exocytose (la plus fréquente) ;
- sécrétion apocrine qui se fait par perte d'un fragment de leur cytoplasme (glande mammaire) ;
- sécrétion holocrine où la cellule dégénère et libère ainsi les substances accumulées (glandes sébacées).

Les glandes endocrines

Déversant leur produit de sécrétion dans le sang, elles sont toujours entourées d'un tissu conjonctif très vascularisé.

On distingue les glandes de type « en cordons » où les cellules sécrétrices sont organisées en cordons épais séparés par des espaces de conjonctifs riches en capillaires sanguins (la plupart des glandes endocrines) ou de glandes de type vésiculaire où les cellules délimitent des vésicules formant une lumière (glande thyroïde). Dans ce cas, une pré-hormone est synthétisée puis stockée dans la lumière. Elle est ensuite, mais de façon régulée, réabsorbée par les cellules et déversées dans le sang sous la forme de l'hormone mature.

fiche 169

Les tissus conjonctifs

Fiche 143

Les tissus conjonctifs ont en commun d'être constitués de cellules non jointives entourées d'une matrice extracellulaire constituée de macromolécules, d'eau et de substances dissoutes. C'est dans cette matrice que l'on trouve les vaisseaux sanguins, les nerfs et les cellules du système immunitaire. Comme leur nom l'indique, ils relient entre eux les différents tissus. Ils sont issus du mésoderme à l'exception de ceux de la face et du crâne qui proviennent des crêtes neurales. Si tous les épithéliums sont associés à un conjonctif, l'inverse n'est pas vrai.

1. Classification des tissus conjonctifs

On distinguera les tissus conjonctifs au sens propre des tissus conjonctifs spécialisés.

Tissus conjonctifs au sens propre

Les tissus conjonctifs au sens propre sont présents dans absolument tous les organes. Le tissu conjonctif lâche est également appelé tissu interstitiel. Très abondant dans tous les organes, il forme dans chaque organe un stroma stabilisateur. Le tissu conjonctif serré ou dense présente des fibres de collagène organisées en faisceaux. Ceux-ci sont soit disposées de manière irrégulière, comme dans le cas du derme, soit de manière ordonnée. C'est le cas par exemple des tendons, ligaments et aponévroses qui doivent résister à des efforts importants mais unidirectionnels.

Tissus conjonctifs spécialisés

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif spécialisé qui contient des adipocytes capables de stocker des réserves énergétiques lipidiques.

Les tissus de soutien, cartilagineux et osseux forment notre squelette. Le cartilage est un tissu conjonctif qui contient des cellules appelées chondrocytes. La matrice extracellulaire est solide. Déformable sous l'effet d'une stimulation mécanique, elle reprend ensuite sa forme initiale. Le plus répandu est le cartilage hyalin mais on trouve également du cartilage élastique caractérisé par la présence de nombreuses fibres élastiques (ex. : lobe de l'oreille) où fibreux qui contient des faisceaux épais de collagène (ex : disques intervertébraux). Le tissu osseux possède une matrice extra cellulaire fortement minéralisée et constituée essentiellement de fibres de collagène et de cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse et prennent le nom d'ostéocyte lorsqu'ils sont entièrement entourés de matrice osseuse. Le rôle précis des ostéocytes n'est pas encore complètement compris. On trouve dans le tissu osseux également des ostéoclastes qui sont des cellules issues de la lignée hématopoïétique et qui dégradent en permanence le tissu osseux, assurant ainsi son renouvellement permanent.

Fiche 1

Enfin, le tissu hématopoïétique est également un tissu conjonctif spécialisé dont il sera question plus longuement dans le chapitre 15.

2. Les cellules du tissu conjonctif

La cellule-souche mésenchymateuse est une cellule-souche multipotente qui donne naissance à presque toutes les cellules des tissus conjonctifs (figure 1)

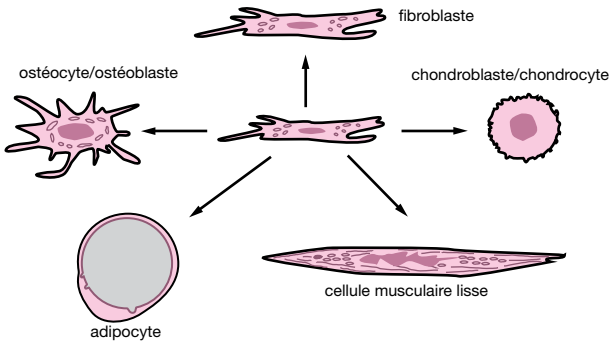


Figure 1 : Différentes voies de différenciation de la cellule souche mésenchymateuse

On trouvera également des cellules du système immunitaire qui dérivent de la lignée hématopoïétique : granulocytes, lymphocytes, macrophages, mastocytes et plasmocytes.

Fiche 173

Le fibroblaste est une cellule fusiforme qui synthétise l'ensemble des molécules insolubles de la matrice extracellulaire ainsi que de nombreuses molécules solubles (enzymes, cytokines…). Bien que son suffixe « blaste » laisse croire qu'il s'agit d'une cellule encore immature, le fibroblaste est une cellule différenciée très spécialisée dont la nature des sécrétions dépend de l'environnement cellulaire. Il synthétise et sécrète des glycoprotéines matures et des protéoglycanes, et est à l'origine des molécules de collagène et d'élastine. Il participe à la constitution des lames basales. Dans certaines situations, et en particulier pendant la cicatrisation, le fibroblaste peut acquérir des propriétés contractiles pour donner naissance à un myofibroblaste.

Fiche 143

De nombreuses pathologies sont associées à des défauts de synthèse de fibroblastes : le scorbut correspond à une déficience en vitamine A, cofacteur d'une enzyme impliquée dans la formation du collagène, des mutations dans le gène du collagène de type 1 sont à l'origine de la maladie des « os de verre » tandis que celles portant sur le collagène de type III provoquent une fragilité de la peau et des vaisseaux et une hyperlaxité ligamentaire, symptômes regroupés sous le nom de syndrome d'Ehlers-Danlos.

fiche 170

Le renouvellement des tissus

Une fois le développement embryonnaire achevé, chaque type cellulaire est spécifié dans un tissu précis. Suivra une période de croissance pendant lesquels les cellules prolifèrent tout en gardant dans l'immensité des cas leur spécialisation. Certains organismes (poissons et amphibiens par exemple) continue à croître toute leur vie tandis que chez d'autres (oiseaux, mammifères) la croissance s'arrête. Mais, même dans ce cas, les tissus sont en permanence renouvelés.

1. Maintien de l'état différencié

Fiche 62

Presque tous les tissus sont constitués de plusieurs types cellulaires. Dans ces tissus, à quelques exceptions prêts, les cellules meurent et sont régulièrement remplacées. Deux mécanismes fondamentaux régulent le maintien de l'homogénéité des tissus. Le premier est lié à l'existence des mécanismes épigénétiques qui donnent aux cellules une mémoire de leur lignage d'origine. Le deuxième est dû à l'existence de récepteurs qui permettent aux cellules de s'adapter en permanence à leur environnement. On peut ainsi considérer chaque tissu comme un écosystème où chaque catégorie de cellules s'adapte à son environnement. De nombreuses pathologies sont associées à la perte de cet équilibre. L'absence de remplacement de ces cellules se traduit par un envahissement du tissu par des fibroblastes.

2. Tissus à cellules permanentes

Il existe cependant certaines catégories de cellules qui n'ont pas l'aptitude à se renouveler. C'est le cas d'une grande partie des cellules nerveuses, des cellules musculaires cardiaques, des cellules auditives ciliées et des cellules du cristallin…

En général, les cellules permanentes renouvellent en permanence leurs constituants cellulaires. La cellule musculaire cardiaque refait en 10 à 15 jours l'ensemble de ces protéines. Les bâtonnets, cellules photoréceptrices de la rétine, illustrent bien ce phénomène car le renouvellement des « disques » se fait de façon ordonné. La figure 1 montre les résultats obtenus dans les années 1970 grâce à la technique d'autoradiographie. Une petite quantité de leucine radioactive est incorporée dans la cellule. Quelques minutes après, 1 000 fois plus de leucine froide est ajoutée. De cette manière, seule les protéines qui auront incorporées la radioactivité en présence de l'acide aminé radioactif « non dilué » seront repérables par la suite. On constate que quelques heures après le « pulse » de radioactivité, les protéines marquées sont dans le Golgi. On les retrouve ensuite à la base des disques des bâtonnets.

La radioactivité « grimpe » ensuite à la vitesse de quatre disques par heure témoignant du renouvellement incessant des protéines.

3. Renouvellement des cellules au sein des tissus

La très grande majorité des cellules ne sont pas permanentes. Le renouvellement se fait soit par duplication des cellules existantes, soit par différenciation de cellules souches.

La différenciation par cellules souches est de loin le mécanisme le plus fréquent et fera l'objet de la fiche suivante.

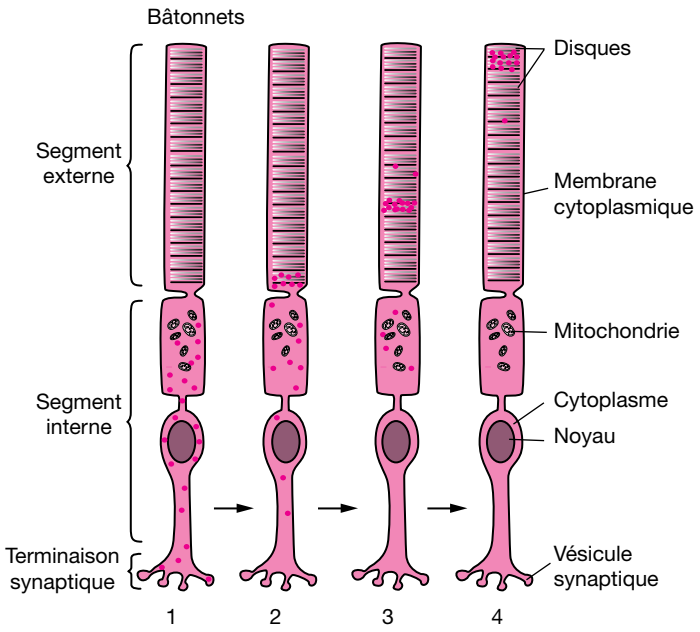


Figure 1 : Mise en évidence par autoradiographie du renouvellement des constituants des disques dans les cellules à bâtonnets de la rétine

Les points rouges indiquent la présence des éléments radioactifs.

Deux types cellulaires peuvent se diviser par simple duplication : les hépatocytes et les cellules endothéliales.

La régénération hépatique

Le foie adulte sain est constitué d'hépatocytes hautement différenciés mais qui gardent la possibilité de se réengager dans un processus de prolifération. Le meilleur exemple de cette aptitude est démontré lors de l'ablation chirurgicale de morceau de foie. Après l'hépatectomie les hépatocytes vont progresser de façon synchrone dans le cycle cellulaire. La transition entre la phase G0 et G1 du cycle cellulaire se produit dans les minutes qui suivent l'ablation. La phase G1 se poursuit ensuite et une première vague de phase S est observée 16 h après. Au cours de ce processus les hépatocytes modifient transitoirement leur état de différenciation et réacquièrent des caractères embryonnaires.

On observe ensuite une deuxième vague de prolifération qui va se faire en coordination avec les autres types cellulaires. Au bout de quelques jours le foie a retrouvé sa masse d'origine.

On notera cependant que si les hépatocytes sont détruits de façon régulière, comme par exemple dans le cas d'alcoolisme chronique, les hépatocytes perdent leur capacité à proliférer de façon synchrone et un déséquilibre se fait en faveur des fibroblastes. C'est la cirrhose.

La duplication des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une couche de cellules qui tapissent l'ensemble des vaisseaux sanguins. En marquant les cellules endothéliales avec de la thymidine tritiée, on montre que la prolifération de ces cellules est plus importante dans les zones les plus soumises aux turbulences de la circulation sanguine. Mais c'est dans les mécanismes de l'angiogenèse que ce phénomène est le plus important.

Fiche 174

fiche 171

Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes existent dans un grand nombre de tissus. Elles subsistent tout le long de la vie de l'individu. Elles peuvent produire en permanence des cellules différenciées en quantité régulée. Elles ne sont plus pluripotentes mais peuvent donner naissance à plusieurs types cellulaires (cellules souches multipotentes) ou un seul type (cellules souches unipotentes).

1. Découverte des cellules souches adultes

La découverte des cellules souches adultes remontent aux débuts des années 1960. C'est en effet en 1961 que J. Till et E. Mc Culloch, deux chercheurs canadiens publient leur découverte sur les cellules souches du système hématopoïétique.

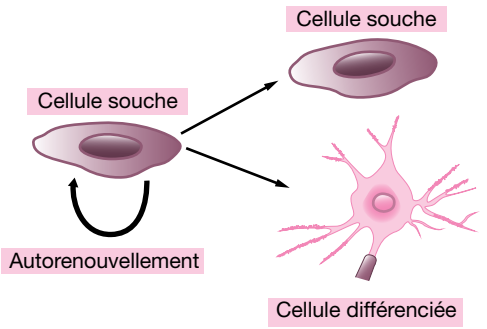


Figure 1 : Caractéristiques de cellules souches adultes

Leur mise en évidence a été réalisée chez la souris. Après avoir détruit l'ensemble des cellules hématopoïétique par irradiation, ils injectent à ces dernières de la moelle osseuse d'une autre souris. Ils constatent alors la formation dans la rate de ces animaux (chez la souris, la rate, contrairement à l'homme, reste un tissu hématopoïétique après la naissance) des colonies de cellules de taille et de composition variées. De nombreuses observations les amènent à conclure que chacune de ces colonies a pour origine une seule cellule, elle-même issue d'une seule cellule qu'il nomme cellule-souche.

Fiche 173

Les cellules souches hématopoïétiques ont longtemps été considérées comme une exception mais petit à petit on découvrit de nouvelles cellules souches dans différents tissus, y compris le système nerveux, de telle sorte qu'il devint évident à la fin des années 1990 que le renouvellement des tissus par les cellules souches étaient un mécanisme qui concernaient la quasi-totalité des tissus. Des cellules souches ont en effet été découvertes dans de très nombreux organes : sein, peau, intestin, conjonctifs, prostate, pancréas, foie muscle, etc.

De façon intéressante on notera que certaines cellules souches (dans la rétine par exemple) sont présentes chez l'homme mais ont perdu leur capacité à se différencier, propriétés qu'elles possèdent encore chez d'autres classes de vertébrés (amphibien par exemple). De nombreuses recherches sont menées pour comprendre les mécanismes sous-jacents.

2. Caractérisation des cellules souches adultes

Les cellules souches adultes ont, en général, une faible capacité de prolifération. Elles donnent naissance à des progéniteurs, qui comme elles, ne sont pas différenciées. Ces dernières ont perdu leur capacité à s'auto-renouveler mais possèdent de plus grandes capacités de prolifération. De ce fait, l'isolement et la purification des cellules souches adultes dans les tissus sont difficiles à réaliser.

Les deux approches les plus utilisées pour les caractériser sont les suivantes :

- Les cellules sont marquées *in vivo* dans le tissu puis isolées. Pour chaque type de cellules ainsi prélevées une vérification de leur capacité de prolifération et de différenciation est ensuite effectuée in vitro.
- Les cellules sont isolées, puis marquées *in vitro* et retransplantées dans un animal receveur pour suivre leur capacité à coloniser certains tissus.

En utilisant ces deux approches, il est ainsi possible de montrer qu'une cellule souche est capable de donner naissance à des cellules pouvant proliférer puis se différencier dans les types cellulaires attendus et, tout aussi important, qu'elle est capable de s'intégrer dans un tissu et de donner les types cellulaires nécessaires à une régénération équilibrée du tissu.

3. Notion de niches

Les cellules souches sont localisées dans des environnements cellulaires spécifiques appelés « niches ». De nombreuses expériences, réalisées en particulier chez la drosophile et la souris, ont permis de montrer que le contact avec les cellules de soutien était indispensable au maintien de leur état non différencié. La niche procure à la cellule-souche un environnement qui la protège des stimuli qui déclenchent la différenciation ou l'apoptose. Elle protège également les cellules souches d'un excès de prolifération qui pourrait induire la formation de cancer. Elle assure l'activation des divisions qui donnent naissance aux progéniteurs qui assureront la production des cellules différenciées nécessaires à l'homéostasie des tissus. Chaque type de cellules souches a une niche qui lui est propre et la figure 2 schématise les différents éléments qui peuvent avoir une influence sur la cellule souche. Ainsi l'implication des contacts avec les cellules stromales, de facteurs solubles, de composants de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion, de la présence de réseau de capillaires sanguins ou de stimulation neuronale a été démontrée sans qu'aucun schéma général n'ait encore pu être proposé.

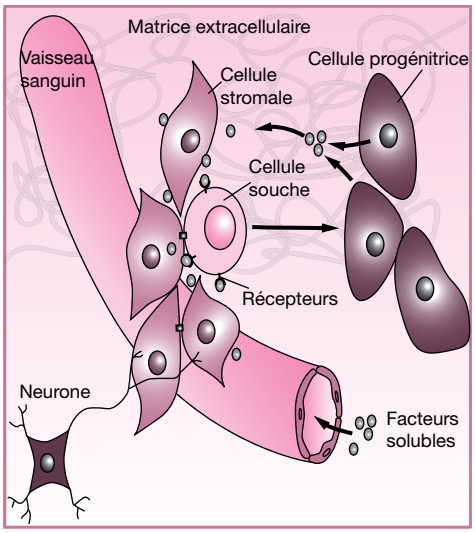


Figure 2
Schéma décrivant les différents éléments de la « niche » des cellules souches
D'après *Nature Reviews Mol. Cell. Biol.*, *9* p. 11 (2008).

fiche 172 Le renouvellement des tissus musculaires

Le muscle est un tissu constitué de fibres contractiles permettant de produire un mouvement. L'ensemble des muscles participent aux diverses fonctions essentielles à la vie de l'organisme : respiration, circulation sanguine, digestion, locomotion… Selon leur aspect et le mécanisme de leur contraction, on distingue plusieurs types de muscles.

1. Les types de muscles de l'organisme

Fiche 123

Les muscles striés présentent des alternances de bandes sombres et claires liées à la présence de myofibrilles organisées en sarcomères sur toute la longueur de la fibre. Les muscles lisses n'ont pas une telle organisation des filaments contractiles. Ce sont des muscles non volontaires qui servent à mouvoir des organes creux et des tubes (appareil digestif, vaisseaux sanguins, voies aériennes…). Le muscle cardiaque, bien que strié, est très différent des muscles squelettiques. Ces derniers sont responsables de la posture générale et des mouvements.

	Muscle lisse	Muscle cardiaque	Muscle squelettique
Fibres = cellules	En fuseau	Cylindriques, striées	Allongées, striées
Noyaux	Un noyau central		Multiples et périphériques
Appareil contractile	En diagonale	Myofibrille en sens longitudinal. Alternance de bandes claires et sombres	
Contraction	Involontaire, lente	Involontaire	Volontaire
Localisation	Parois des viscères, des vaisseaux	Cœur	

Un muscle squelettique est organisé en plusieurs faisceaux musculaires, eux-mêmes constitués d'une cinquantaine de fibres musculaires. Contrairement aux fibres musculaires lisses qui sont des cellules uniques pouvant se diviser, les fibres musculaires squelettiques sont la fusion de plusieurs précurseurs et sont mises en place pendant le développement embryonnaire.

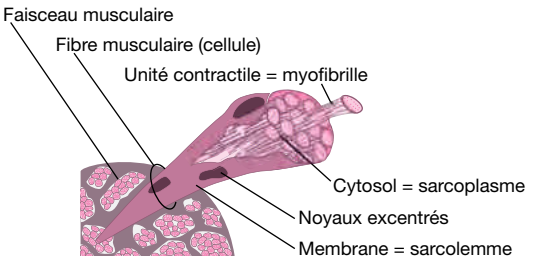


Figure 1 : Organisation du muscle squelettique

Les fibres musculaires squelettiques n'ont pas toutes les mêmes propriétés mécaniques et métaboliques. Certaines sont lentes : elles permettent des contractions soutenues (endurance, posture). Ce sont des fibres rouges qui contiennent beaucoup de mitochondries et de myoglobine et fonctionnent en aérobie. D'autres fibres sont rapides et permettent des mouvements intenses. Celles qui favorisent la glycolyse sont appelées fibres blanches, elles se fatiguent rapidement.

Fiche 124

2. Croissance et régénération musculaire

Les muscles lisses peuvent se régénérer ou se créer (autour de nouveaux vaisseaux sanguins par exemple) par simple division de cellules musculaires lisses existantes. Les fibres striées au contraire ne peuvent plus se diviser après leur différenciation. L'ensemble des fibres musculaires squelettiques de l'organisme est mis en place à la naissance. Le développement musculaire entre la naissance et l'âge adulte provient d'une croissance en volume ou en longueur des fibres existantes, ou encore de la fusion de nouveaux précurseurs avec les fibres existantes mais pas d'une augmentation du nombre de fibres. Un facteur de croissance de la famille du TGFβ, la myostatine, joue un rôle central dans la régulation de la taille des fibres musculaires. Elle est produite par les cellules musculaires et exerce donc un rétro-contrôle.

Fiche 192

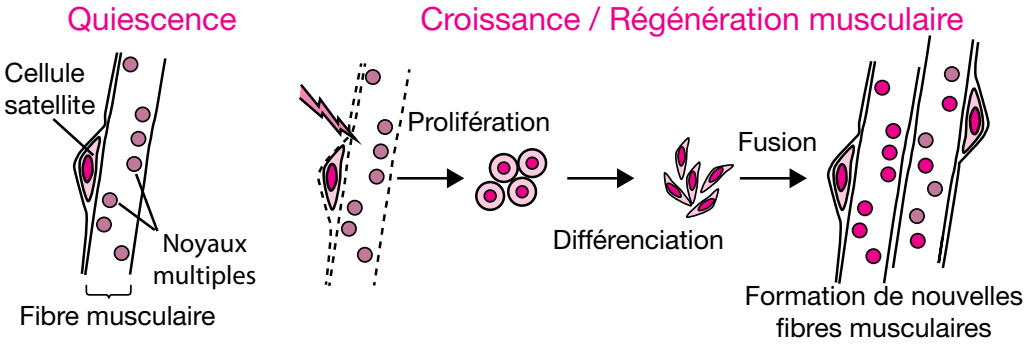


Figure 2 : Régénération du muscle squelettique

Les cellules satellites sont des progéniteurs musculaires situées au contact des fibres musculaires sous la même lame basale. Elles assurent la croissance ou la régénération des fibres musculaires en maintenant le ratio entre le nombre de noyaux et le volume de la fibre. Lorsque ces myoblastes sont activés, ils prolifèrent et activent des gènes myogènes tels que MyoD, un facteur de transcription. Les cellules reçoivent alors des signaux de différenciation. Les cellules s'alignent ensuite les unes par rapport aux autres, établissent des jonctions communicantes puis fusionnent en myotube. Le myotube évolue enfin en myocyte (ou fibre musculaire) en exprimant des isoformes adaptées d'actine et de myosine selon son statut de fibre rapide ou lente.

Le stock de cellules satellites et leur capacité d'auto-renouvellement n'étant pas important, la régénération musculaire est limitée. Elle diminue donc avec l'âge ou s'épuise lors de maladie génétique comme la myopathie de Duchenne, dans laquelle les fibres musculaires sont fragilisées par l'absence d'une protéine du cytosquelette membranaire, la dystrophine.

fiche 173 Le renouvellement des cellules sanguines

Le sang peut être considéré comme un tissu conjonctif circulant constitué de cellules libres, les éléments figurés du sang, et de fibres, le fibrinogène qui participe à la coagulation. Les éléments figurés sont des cellules : les globules rouges ou érythrocytes (4 à 6 × 10^{12} /L soit 90 %) et les globules blancs ou leucocytes (4 à 10 × 10^{9}/L) et des fragments de cellules issus des mégacaryocytes, les plaquettes ou thrombocytes (150 à 400 × 10^{9}/L). Le volume relatif de ces éléments figurés, appelé hématocrite, est de 40 à 50 % du sang. La partie liquide est le plasma, distinct du sérum qui est dépourvu de toutes les protéines de la coagulation.

1. Origine des cellules du sang

Toutes les cellules du sang dérivent d'une seule petite population de cellules de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules multipotentes ont une capacité d'auto-renouvellement et peuvent également s'engager dans plusieurs voies de différenciation. Des tissus variés peuvent être obtenus expérimentalement bien qu'il ne soit pas clair si cela se produit physiologiquement.

La production des cellules du sang, ou hématopoïèse, se fait dans la moelle des os plats : crâne, vertèbres, sternum, côtes, bassin, haut du fémur et de l'humérus. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en progéniteurs d'aspects indifférenciés mais déjà engagés dans la voie myéloïde (progéniteur myéloïde commun, PMC) ou la voie lymphoïde (progéniteur lymphoïde commun, PLC). Ces cellules représentent autour de 0,002 % des cellules médullaires. Chaque voie de différenciation se poursuit jusqu'aux cellules fonctionnelles matures qui représentent 99 % de la moelle osseuse et qui rejoignent la circulation sanguine. La seule exception concerne les lymphocytes T, pour lesquels des progéniteurs T quittent la moelle vers le thymus où se déroule leur développement.

2. Le contrôle de l'hématopoïèse

Fiche 192

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques est contrôlée par des facteurs de croissance hématopoïétique, de la famille des cytokines. Ils sont produits à distance par des cellules immunitaires activées et surtout localement par les cellules stromales de la moelle en interaction directe avec les différents précurseurs. Chaque facteur de croissance hématopoïétique peut exercer des effets à différentes étapes (pléiotropie), à dose très faible (10^{-10} à 10^{-12} M) et de façon redondante avec d'autres facteurs.

Seules les productions d'érythrocytes et de thrombocytes sont contrôlées par des hormones, l'érythropoïétine (EPO) et la thrombopoïétine (TPO) produites par les reins et le foie. L'hypoxie (baisse de l'oxygène dans le sang) stimule la production d'EPO qui relance et accélère la fabrication des globules rouges. Au contraire, la TPO est produite à niveau constant et dégradée par les plaquettes qui exercent ainsi un rétrocontrôle sur la production de leurs précurseurs, les mégacaryocytes.

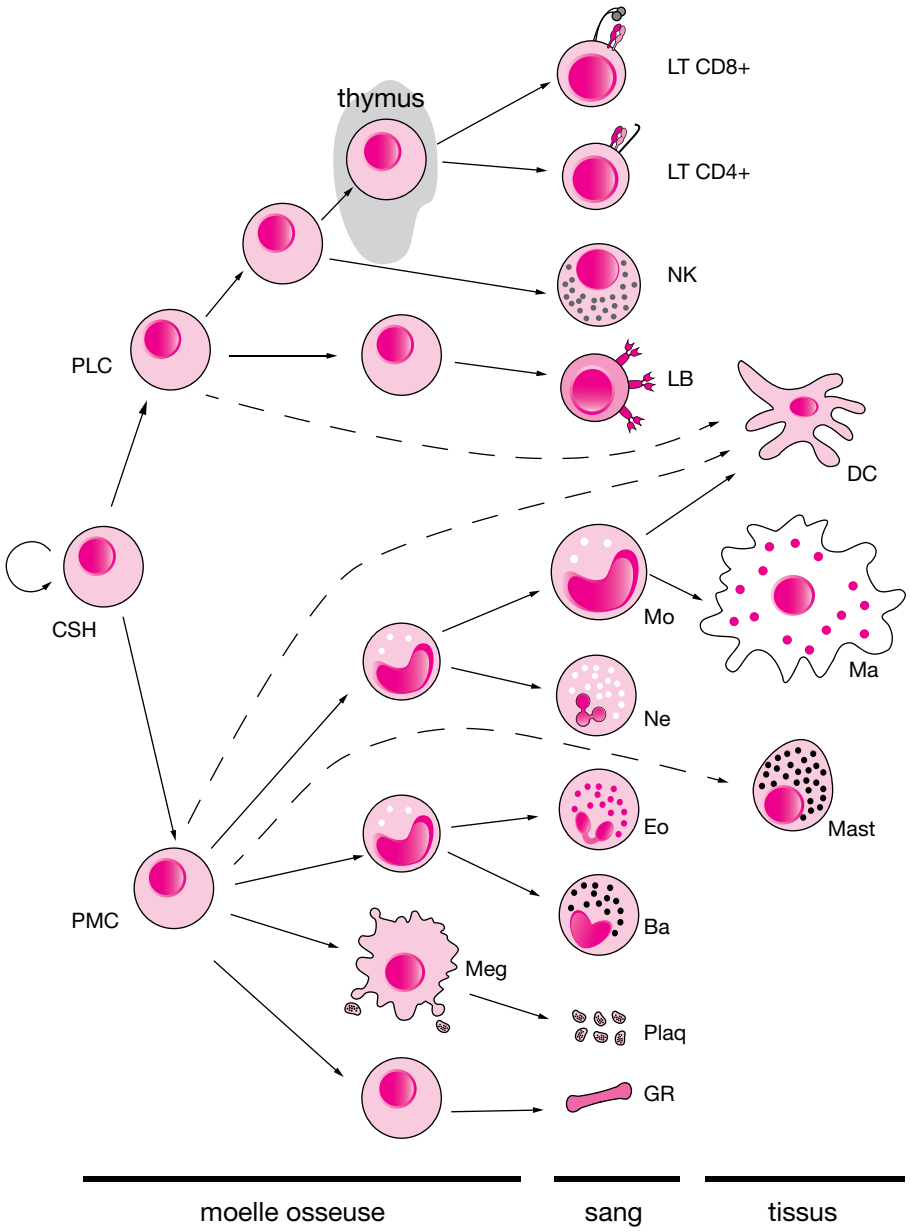


Figure 1 : Principales étapes de l'hématopoïèse

CSH : cellule-souche hématopoïétique. PLC : progéniteur lymphoïde commun. PMC : progéniteur myéloïde commun. LT CD8+ : lymphocyte T CD8+. LT CD4+ : lymphocyte T CD4+. NK : natural killer. LB : lymphocyte B. DC : cellule dendritique. Mo : monocyte. Ma : macrophage. Ne : neutrophile. Eo : éosinophile. Ba : basophile. Mast : mastocyte. Meg : mégacaryocyte. Plaq : plaquette. GR : globule rouge.

fiche 174

L'angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus normal lors de la réparation tissulaire mais qui peut être détourné et exacerbé dans certaines pathologies (cancers…). Toutes les cellules de l'organisme sont habituellement à moins de 100 µm d'un capillaire.

1. Les étapes de l'angiogenèse

Les capillaires sanguins ont une paroi constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une lame basale. Les vaisseaux plus gros ont une paroi plus importante contenant en plus une épaisseur variable de muscle lisse, de fibres élastiques et de tissu conjonctif. Ce sont les cellules endothéliales qui contrôlent la perméabilité des vaisseaux sanguins aux cellules (globules blancs) ou aux macro-molécules.

Fiche 170

Les cellules endothéliales sont normalement quiescentes mais gardent la possibilité de se diviser pour réparer des lésions ou créer de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces cellules ont une durée de vie de plusieurs mois à plusieurs années et sont remplacées par duplication des cellules existantes. La vitesse de croissance est accélérée pour le renouvellement de l'endomètre (après les règles) ou lors d'une inflammation des tissus.

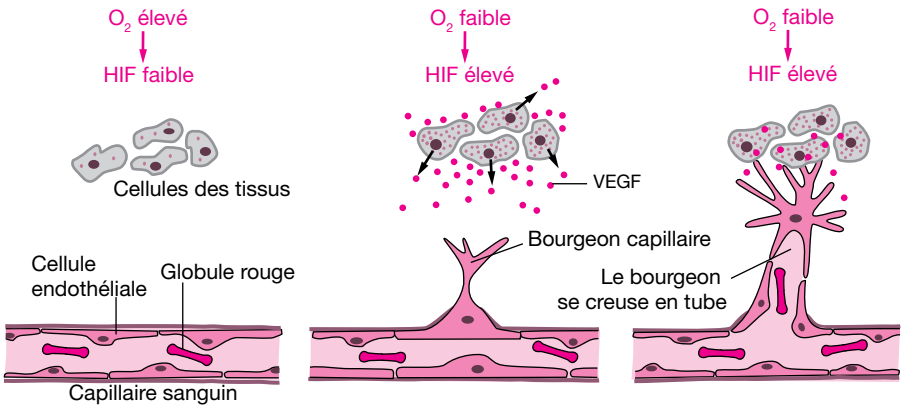


Figure 1 : L'angiogenèse est contrôlée par les besoins en oxygène

Les nouveaux vaisseaux naissent après activation des cellules endothéliales par les cellules du tissu environnant. Les cellules endothéliales libèrent des protéases qui dégradent la lame basale du capillaire et la matrice extracellulaire avoisinante. Elles émettent alors des pseudopodes qui évoluent en un bourgeon capillaire. Les cellules endothéliales préexistantes migrent vers la source du signal chimique activateur (chimiotactisme) puis se divisent. Le bourgeon capillaire se creuse alors en un tube dirigé vers les cellules devant être irriguées. Le processus se poursuit jusqu'à ce que le nouveau tube se connecte à un autre capillaire, prolongeant ainsi le réseau vasculaire. Les nouvelles cellules endothéliales se différencient en exprimant des protéines transmembranaires différentes pour les artérioles et les veinules afin que le réseau soit correctement organisé. Les nouveaux vaisseaux peuvent ensuite évoluer en augmentant de diamètre ou

en bourgeonnant à nouveau. L'augmentation du diamètre s'accompagnera d'un recrutement des cellules nécessaires à une paroi plus solide (muscle lisse, tissu conjonctif).

2. Les facteurs du contrôle de l'angiogenèse

Il existe une balance de signaux activateurs et inhibiteurs qui contrôle l'angiogenèse. Le principal agent pro-angiogénique est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Il est habituellement produit par les cellules des tissus en hypoxie (manque d'oxygène). En situation normale d'apport en oxygène, le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) est oxydé et se lie au facteur de von Hippel Lindau (pVhl) qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Lorsqu'une cellule manque d'oxygène, HIF-1 n'est plus oxydé et ne peut pas être dégradé. Il joue alors son rôle de facteur de transcription et peut moduler plus de 70 gènes cibles, dont ceux de l'érythropoïétine (EPO, facteur de croissance des globules rouges) et du VEGF. Le retour à un niveau normal d'oxygène entraîne la dégradation de HIF-1 dans le noyau. II arrive parfois que d'autres inducteurs, tels que des facteurs de croissance (*Epidermal Growth Factors*, *Platelet Derived Growth Factor* ou *Insulin-like Growth Factor-1*), agissent en augmentant la transcription de HIF-1.

Il existe plusieurs agents anti-angiogéniques tels que l'angiostatine, l'endostatine ou la thrombospondine qui sont des molécules secrétées ou des molécules d'adhérence membranaire. Selon que les signaux inhibiteurs ou activateurs seront les plus forts, les cellules endothéliales seront activées ou non pour former de nouveaux vaisseaux.

Les molécules anti-angiogéniques sont aujourd'hui très étudiées pour leur potentiel anti-cancéreux. L'avastin® (Bevacizumab) qui est un anticorps neutralisant le VEGF a été autorisé dans le traitement de plusieurs cancers en 2004 et comme traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) en 2015. Il apparaît sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS.

fiche 175

Les cellules souches neurales

Le cerveau a longtemps été considéré comme un organe ou seules les cellules gliales étaient capables de proliférer. La célèbre phrase du physiologiste R. Cajal, prix Nobel 1906 pour ses travaux sur le système nerveux « *we are born with a certain number of brain cells which decrease with age. Everything must die in the brain or spinal cord, nothing can regenerate* » a longtemps été considéré comme un dogme.
Cette idée était renforcée par l'observation de l'invasion des régions lésées par des cellules gliales après un accident. Mais comme nous allons le voir il existe des cellules souches dans le système nerveux qui possèdent des propriétés qui n'avaient pas été soupçonnées.

1. Découverte des cellules souches neurales

En 1965, J. Altamn publie un article montrant que des neurones différenciés avaient incorporé de la radioactivité chez des patients adultes ayant reçu, dans le cadre d'un traitement, des injections d'une molécule radioactive qui était connue comme un marqueur spécifique de la phase S. Cela signifiait clairement l'existence d'une neurogenèse active chez l'adulte. Cependant, à l'époque, ces travaux furent peu relayés et il fallut attendre le début des années 1980 pour qu'une nouvelle étude mette en évidence l'existence de synapse sur les cellules neurales néoformées. Le nombre de cellules visualisées étant minime, le mécanisme fut de toute façon considéré comme anecdotique. À la fin des années 1980, le développement de techniques plus sensibles permis de se rendre compte que ce phénomène était plus important que soupçonné. Depuis, la neurogenèse a été caractérisée chez de nombreuses espèces de mammifères et en 1992, les premières cellules souches furent isolées à partir de cerveau de souris puis à partir de tissu humain en 1999. Enfin différentes expériences, dont celle présentée figure 1 montrèrent clairement que la neurogénèse donnait naissance à des neurones fonctionnels. Dans le cadre de cette expérience des rats reçoivent des injections intracérébrales d'une suspension contenant des rétrovirus qui ajoutent au génome de la cellule infectée un fragment d'ADN autorisant l'expression d'une molécule fluorescente, la GFP. Les rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules qui sont en mitose. La présence de fluorescence dans des neurones matures signifie donc qu'ils ont été formés chez l'animal adulte. Après quelque temps l'animal est sacrifié et les neurones matures exprimant la fluorescence sont visualisés sous microscope et leur fonctionnement étudié par électrophysiologie. Les chercheurs constatent alors que ces neurones sont actifs et incorporés dans des réseaux de neurones fonctionnels.

Néanmoins, si la neurogenèse peut être très active (par exemple il naît environ 500 nouveaux neurones par jour dans l'hippocampe d'un homme adulte), elle demeure limitée à des zones particulières du cerveau, telles que le bulbe olfactif, les zones sous ventriculaires, l'hippocampe et même dans le canal central de la moelle épinière.

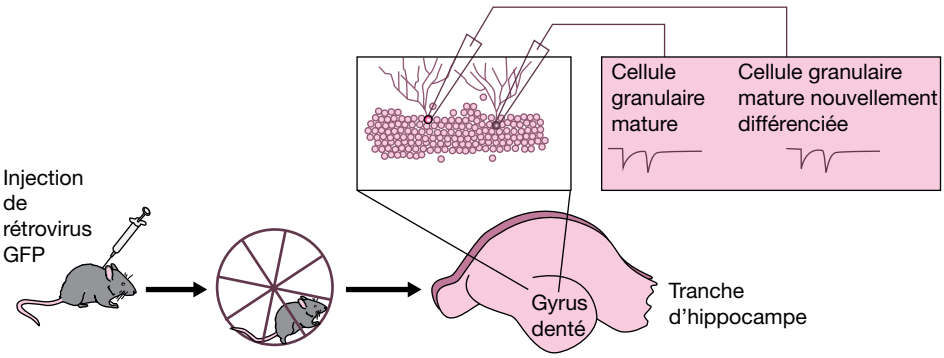


Figure 1 : Mise en évidence de la formation de neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales chez le rat adulte

2. Caractéristiques des cellules souches neurales

Les cellules souches neurales sont des cellules multipotentes. Comme indiqué dans la figure 2, elles peuvent donner des neurones ou des cellules de la lignée gliales, les astrocytes ou les oligodendrocytes. Des expériences d'inactivation de gènes chez la souris montrent clairement que certains gènes codent pour des facteurs de transcription qui sont responsables de la spécification de la cellule vers une voie de différenciation tandis que d'autres interviennent uniquement dans la différenciation terminale de la cellule. D'un autre coté, l'inactivation d'autres facteurs de transcription provoque une différenciation accélérée des cellules nerveuses. Il existe donc un équilibre subtil, qui sous le contrôle, de facteurs environnementaux, régule le taux de formation des progéniteurs à partir des cellules souches contenues dans la niche tandis que d'autres adaptent la voie de différenciation et le pourcentage de chaque catégorie de cellules au besoin du tissu. L'étude de ces signaux fait l'objet actuellement de nombreux travaux.

Il reste cependant encore beaucoup de questions en suspens.

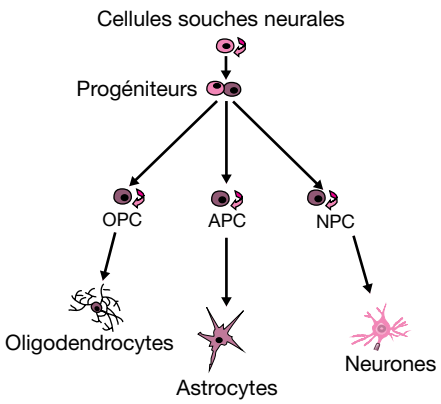


Figure 2 : Différentes voies de différenciation de la cellule souche neurale

OPC : cellules précurseurs d'oligodendrocytes
APC : cellules précurseurs d'astrocytes
NPC : cellules précurseurs de neurones

fiche 176 L'ingénierie des cellules souches adultes

Fiche 173

La découverte des cellules souches hématopoïétiques dans les années 1960 a eu des conséquences importantes en autorisant les greffes de moelle osseuse qui se sont développées au fur et à mesure que nos connaissances en immunologie progressaient. Les propriétés de cellules souches adultes présentent des perspectives en thérapie et d'autres techniques voient le jour qui permettront sans doute d'associer thérapie cellulaire et thérapie génique.

1. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules souches où des cellules qui proviennent des cellules souches pour remplacer ou réparer des tissus endommagés.
Mais si la thérapie cellulaire est aujourd'hui une réalité les applications demeurent encore limitées et nécessitent de nombreuses recherches.
Depuis plus de cinquante ans maintenant, les greffes de moelle osseuse, qui contient des cellules souches hématopoïétiques permettent de remplacer le système hématopoïétique de patients atteints de maladie génétique du système immunitaire ou de cancers comme les leucémies. Le sang du cordon ombilical des nouveaux nés présente également des cellules souches aux mêmes potentialités qui viennent remplacer les cellules de la moelle osseuse pour certaines applications.
Des cultures de cellules à partir d'explants de peau ou de la cornée sont également utilisées en clinique. Les cellules souches contenus dans ces prélèvements redonnent des tissus complets qui sont ensuite greffés sur les patients.
Toutes les autres thérapies cellulaires sont encore au stade expérimental. À titre d'exemples, de nombreux essais sont effectués actuellement sur les cellules souches mésenchymateuses qui ouvrent de nombreuses perspectives pour la reconstruction osseuse et cartilagineuse en orthopédie, pour la régénération du muscle cardiaque etc….

2. Manipulation des cellules souches adultes

La possibilité de cultiver les cellules souches adultes permet d'envisager leur manipulation « *ex vivo* » avant un éventuel transfert. Jusqu'à ces toutes dernières années, les manipulations génétiques sur ces cellules se faisaient par insertion d'ADN dans le génome de la cellule à l'aide de vecteurs viraux. Des premiers essais cliniques réalisés dans les années 2000 ont montré que ces insertions pouvaient fragiliser le génome de la cellule et induire la formation de cancer. Ils ont donc été arrêtés et n'ont repris que quelques années plus tard suite à la mise en place de nouveaux vecteurs permettant un meilleur contrôle du site d'insertion du transgène.

Focus en fin de chapitre

Mais depuis quelques années de nouvelles méthodes voient le jour qui provoquent de nouveaux espoirs. En effet elles permettent, de façon ciblée, de supprimer le fonctionnement d'un gène déficient ou de le remplacer.

Ces techniques sont basées sur l'utilisation de protéines produites par biotechnologie qui présentent la particularité de se fixer « en ciseau » sur les deux brins de l'ADN et de le couper. Plusieurs techniques sont actuellement utilisées mais nous allons en décrire une plus précisément, appelée « Nucléase à doigts de zinc ».

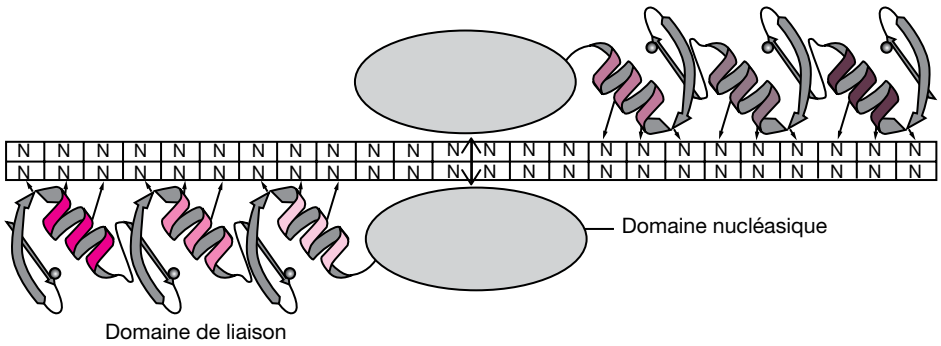


Figure 1 : Principe de fonctionnement des Nucléases à doigts de zinc

Les protéines à doigt de zinc sont des facteurs de transcription qui se fixent sur des séquences précises d'ADN. Chaque doigt de zinc reconnaît très spécifiquement une séquence de trois nucléotides. Il est donc possible de fabriquer des protéines composées de plusieurs doigts de zinc côte à côte qui sont choisis pour reconnaître la séquence d'ADN que l'on souhaite modifier.

Comme indiquée sur la figure 1, trois doigts de Zinc permettent de reconnaître 9 nucléotides sur chaque brin d'ADN. En choisissant ainsi 9 nucléotides sur chacun des deux brins la probabilité d'avoir plus d'un site de coupure dans le génome et très faible.

À l'extrémité de cette protéine, on ajoute une nucléase qui, une fois la liaison à l'ADN établi, provoquera une coupure du double brin.

Ensuite, soit la coupure est fermée par les systèmes de réparation de la cellule, soit elle n'est que partiellement refermée et dans ce cas, en fonction de la séquence choisie, on aboutit à une inactivation du gène. C'est ce qui se produit dans un cas sur trois environ.

Il est également possible de profiter de cette cassure pour insérer une nouvelle séquence et ainsi, par exemple, changer un gène déficient en gène fonctionnel.

Récemment, l'étude de l'interaction entre les bactéries de la famille Xanthomonas et leurs plantes cibles a permis de découvrir un nouveau type de domaine d'interaction à l'ADN appelé TALE pour *Transcription Activator-Like Effector.* Ce domaine, composé de répétitions d'un bloc de 34 acides aminés possède en son centre deux résidus variables qui déterminent spécifiquement l'interaction du bloc avec l'une des quatre bases de l'ADN. Ce domaine répété très prometteur, pouvant reconnaitre plusieurs dizaines de nucléotides, pourrait rapidement remplacer les doigts de zinc en amont de la nucléase.

Mais dans ce secteur en pleine révolution, l'année 2013 a vu l'émergence d'une nouvelle avancée : le système CRISPR/Cas. Chez les bactéries ce système est à la base de l'immunité acquise. Des fragments d'ADN étranger à la cellule sont incorporés dans un locus du génome de la bactérie et transcrits sous forme de CRISP ARN. Ces derniers sont ensuite couplés à une autre séquence ARN qui guide la séquence Crisp vers la protéine Cas, une endonucléase. En créant des Crisp ARN contre des séquences ciblées on peut ainsi provoquer des coupures de façon spécifique. Ce système, beaucoup plus simple, est également beaucoup moins cher

fiche 177

La cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de faire des mesures de plusieurs paramètres à la fois (taille, fluorescence…) sur un grand nombre de cellules passant les unes après les autres dans le système optique. La marque déposée FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) est une technique de tri utilisant la cytométrie en flux.

Les cellules doivent obligatoirement être en suspension, donc avoir été décollées de leur support pour les cellules naturellement adhérentes ou dissociées à partir de tissus. Selon l'objet de l'étude, les cellules sont marquées par une sonde fluorescente appropriée et comparées à un deuxième lot de cellules non marquées.

1. Le fonctionnement d'un cytomètre

La suspension cellulaire est envoyée sous pression dans une chambre d'analyse où un liquide physiologique, arrivant de part et d'autre, constitue une gaine fluide d'entraînement des cellules. Elles passent alors une par une devant une source de lumière de type LASER qui excite les fluorochromes utilisés pour le marquage. La lumière émise par les cellules est captée dans deux directions : aux petits angles et à angle droit par rapport à l'axe d'excitation. Grâce à des jeux de miroirs dichroïques et de filtres sélectifs, cette lumière est redirigée vers différents détecteurs ou photomultiplicateurs. Les données sont transmises à l'ordinateur qui permet leur analyse.

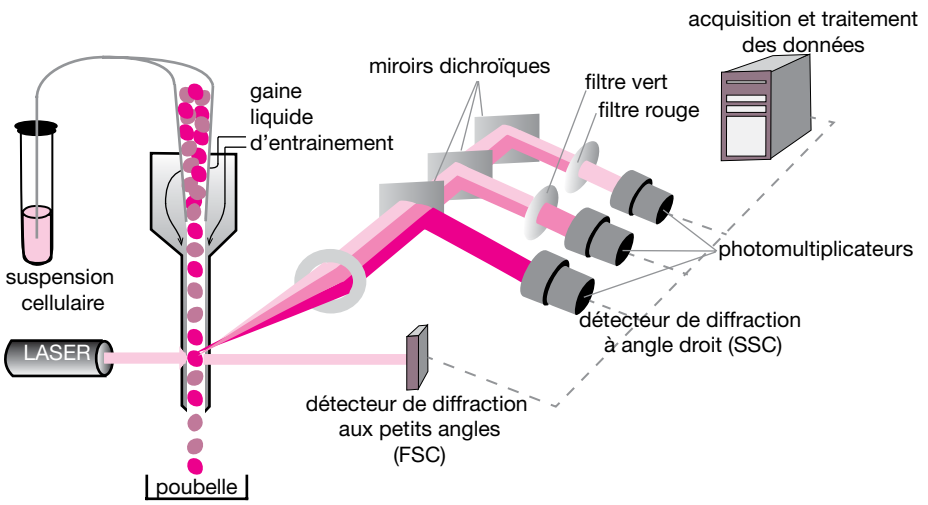


Figure 1 : Schéma de principe d'un cytomètre en flux
Avec l'aimable autoristation de C. Piquet-Pellorce IRSET Rennes.

La lumière diffractée « aux petits angles » (*forward scatter*, FSC) permet d'évaluer la taille des cellules. La lumière diffractée à angle droit (*side scatter*, SSC) reflète la complexité de la structure cellulaire : présence de granules, de nombreux organites internes, compaction de l'ADN. Ce paramètre est fréquemment appelé structure ou granulosité. Les fluorescences émises par les cellules, suite à leur marquage par une ou plusieurs sondes, sont sélectionnées par des filtres. Ainsi la lumière verte (530-550 nm) et la lumière rouge (560-580 nm) sont mesurées par des photomultiplicateurs différents.

2. La présentation des données

Pour chaque évènement passant devant le laser, tous les paramètres (FSC, SSC et fluorescence) ont été enregistrés. L'utilisateur demande l'affichage des données sous forme de diagramme biparamétrique ou d'histogramme. Le diagramme taille/structure (figure 2A) est indispensable pour déterminer une fenêtre de sélection de cellules homogènes (ici R1, R2 ou R3) pour lesquelles afficher les autres paramètres. Les histogrammes (figure 2, B1 et B2) sont des représentations monoparamétriques. Dans l'exemple, B1 reflète la fluorescence verte des cellules de la région R3 et B2 celle de la région R2. Les cellules ayant une autofluorescence naturelle, il faut comparer le signal des cellules incubées avec la sonde (courbes colorées) au signal de cellules contrôle, préparées sans la sonde dans un autre tube (courbes grises pointillées). La zone de positivité correspond à un signal de fluorescence supérieur à celui des cellules contrôle. Dans l'exemple (figure 2, B2), seulement 29 % des cellules de la région R2 ont un signal supérieur au contrôle, et seront considérées comme « positives » pour le marqueur considéré tandis que la quasi-totalité des cellules de la région R3 exprime le marqueur d'intérêt.

Lors d'un marquage multiple, deux fluorescences peuvent être analysées simultanément sur un diagramme biparamétrique (figure 2C). Les limites de positivité pour chaque fluorochrome sont positionnées grâce aux tubes contrôles (non visible ici). Les cellules peuvent être double positive (DP) pour les deux marqueurs, double négative (DN), ou simple positive (SP) pour l'un ou l'autre des marqueurs.

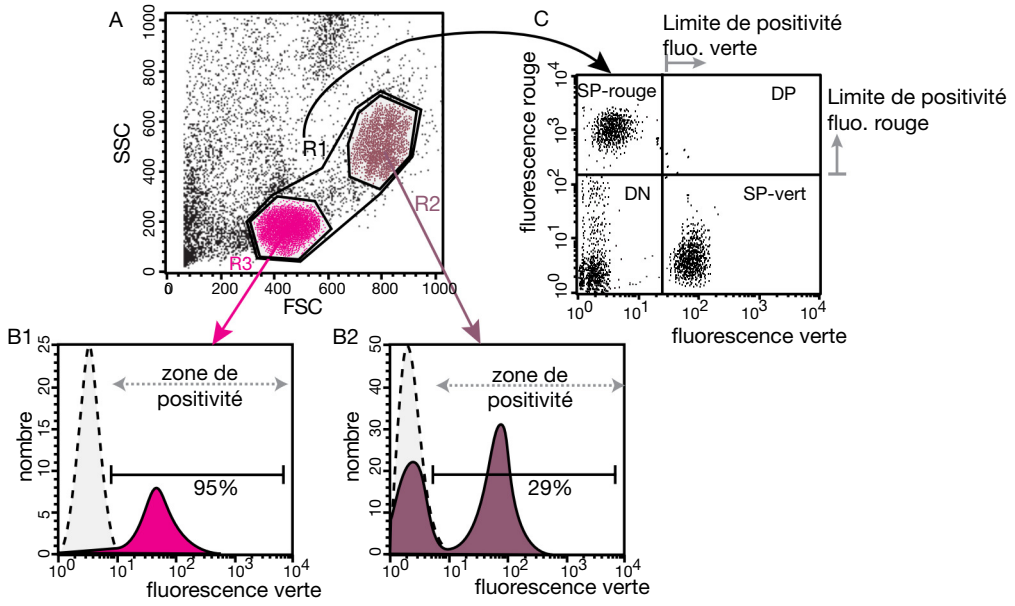


Figure 2 : Exemple de présentation des données

A : diagramme taille/structure, B : histogramme d'intensité de fluorescence,
C : diagramme biparamétrique pour l'analyse d'un double marquage.
Avec l'aimable autoristation de C. Piquet-Pellorce IRSET Rennes.

Cette méthode permet d'étudier de nombreuses caractéristiques cellulaires comme l'expression d'une molécule de surface ou intracellulaire, le cycle cellulaire, la mort cellulaire, l'état de la membrane… Le grand nombre d'évènements enregistrés permet d'observer des phénomènes rares, d'obtenir des analyses statistiques fiables, et cela même dans un mélange hétérogène de cellules sans nécessiter de les séparer physiquement.

FOCUS

Thérapie génique et maladie des « bébés bulles »

Le Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié au Chromosome X

On surnomme « bébés bulles » les enfants touchés par une déficience grave du système immunitaire appelée « Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié au chromosome X » ou DICS-X. Les enfants atteints de cette pathologie sont sensibles à tous les agents infectieux présents dans leur environnement.

Le DICS est une maladie génétique qui se caractérise par des anomalies importantes de cellules du système immunitaire et en particulier des lymphocytes T et B et des cellules NK. Le DICS-X est la forme la plus courante et est provoqué par une anomalie du gène codant pour la chaîne γ courante commune aux récepteurs de plusieurs interleukines. Comme ce gène est porté par le chromosome X cette maladie rare qui touche un bébé sur 200 000 ne concerne que les garçons.

Thérapie génique du DICS-X

La seule thérapie existante jusqu'à récemment était la greffe de moelle osseuse. Mais il n'est pas toujours possible de trouver des donneurs compatibles

En 1999, Alain Fisher, Marina Cavazanana-Calvo et Salima Hacein Bey Abina réalisent à l'Hôpital Necker une première expérience de thérapie génique. Elle consistait à insérer, à l'aide d'un vecteur rétroviral un gène « médicament » correspondant à la copie saine du gène déficient dans des cellules souches hématopoïétiques prélevés chez les enfants et cultivés « *ex vivo* ». Les cellules modifiées, après contrôle de leur viabilité, étaient ensuite réinjectées chez les enfants sans risque de rejet.

Sur les huit enfants traités 4 ont cependant développés une leucémie dans les années suivantes et si trois des enfants ont pu être guéris, un est décédé. En observant les cellules tumorales force a été de constater que ces leucémies étaient liées à l'insertion du vecteur. En effet les rétrovirus induisent des insertions aléatoire dans le génome et on avait sous estimé l'influence du lieu d'insertion du transgène dans le fonctionnement de la cellule.

Ces résultats démontraient la faisabilité de la thérapie génique. Ils ont été confirmés par des essais réalisés en Grande Bretagne. Mais les effets indésirables ont provoqué l'arrêt de tout nouvel essai jusqu'à ce qu'une méthode assurant le contrôle du lieu d'insertion du transgène soit trouvée. Comme nous l'avons vu fiche 173, ces méthodes existent désormais et de nouveaux essais ont débutés en 2010 sur cinq nouveaux enfants.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

15.1 Les épithéliums :
- ☐ a. peuvent être mono où pluristratifiés
- ☐ b. sont richement vascularisés
- ☐ c. sont toujours associés à un tissu conjonctif

15.2 Dans le derme on trouve systématiquement :
- ☐ a. des fibroblastes
- ☐ b. des ostéocytes
- ☐ c. des adipocytes

15.3 Une cellule souche adulte :
- ☐ a. peut donner deux nouvelles cellules souches
- ☐ b. peut donner une cellule souche et une cellule différenciée
- ☐ c. peut donner deux cellules différenciées

15.4 Une cellule souche adulte :
- ☐ a. se divise en permanence
- ☐ b. est localisée dans un environnement particulier : la niche
- ☐ c. donne naissance à des progéniteurs

15.5 Les cellules satellites des muscles :
- ☐ a. sont douées d'activités contractiles
- ☐ b. sont des progéniteurs musculaires
- ☐ c. sont au contact de la même lame basale que les cellules musculaires striées.

15.6 Les cellules souches hématopoïétiques :
- ☐ a. sont localisées dans la moelle des os longs
- ☐ b. sont totipotentes
- ☐ c. donnent naissance à toutes les cellules du sang

15.7 Retrouver le facteur angiogénique :
- ☐ a. Angiostatine
- ☐ b. Endostatine
- ☐ c. VEGF

15.8 Les cellules souches neurales :
- ☐ a. donnent naissance à des neurones fonctionnels
- ☐ b. donnent naissance à des oligodendrocytes
- ☐ c. sont localisées dans l'ensemble des zones du cerveau

15.9 Pour être analysées par cytométrie de flux les cellules doivent :
- ☐ a. être en suspension
- ☐ b. être marquées par un fluorochrome
- ☐ c. être toutes de la même taille

15.10 Le Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié à l'X ou DICS-X :
- ☐ a. est une maladie du vieillissement
- ☐ b. a fait l'objet d'essai de thérapie génique
- ☐ c. atteint essentiellement les filles

Réponses

15.1 **a** et **c**. Constitués de cellules jointives, les épithéliums ne sont pas vascularisés. En revanche ils reposent toujours sur un tissu conjonctif par l'intermédiaire de la lame basale.

15.2 **a**. Dans le derme, qui est un tissu conjonctif, on trouve toujours des fibroblastes qui sont les cellules qui vont synthétiser en permanence les molécules caractéristiques de la matrice extracellulaire. On ne trouve pas d'ostéocytes qui sont des cellules d'un tissu conjonctif spécialisé, le tissu osseux. On peut trouver des adipocytes mais pas de façon systématique.

15.3 **a** et **b**. Les cellules souches adultes peuvent se renouveler, par exemple pendant la croissance et donc donner deux nouvelles cellules souches. Elles perdurent pendant toute la vie de l'individu et ne peuvent donc pas donner deux cellules différenciées.

15.4 **b** et **c**. Les cellules souches se divisent peu. Elles donnent naissance à des progéniteurs qui eux ont une forte capacité de prolifération

Fiche 172

15.5 **b** et **c**. Voir Fiche 172.

15.6 **c**. Les cellules souches hématopoïétique sont multipotentes qui donnent naissance à toutes les cellules du sang. Les cellules totipotentes sont capables de générer un nouvel individu et les cellules pluripotentes toutes les cellules de l'organisme. Elles sont localisées dans les os plats.

15.7 **c**. L'angiostatine et l'endostatine sont des facteurs anti angiogénique.

15.8 **a** et **b**. Les cellules souches neurales sont des cellules souches multipotentes qui donnent naissance à des cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes) et à des neurones. Mais elles ne sont pas présentes dans toutes les zones du cerveau.

15.9 **a**. Les cellules doivent être toutes en suspension afin de pouvoir être analysées séparément dans le cymomètre. Mais elles peuvent être de taille différente, la taille pouvant être un critère de sélection des cellules. Si le marquage par fluorescence est très fréquemment utilisé, il n'est pas obligatoire et dépend de ce que l'on souhaite étudier.

15.10 **b**. Le DICS-X est une maladie monogénétique qui se déclare à la naissance. Comme elle est liée à une mutation sur un gène du chromosome X, elle atteint essentiellement les garçons.

Chapitre 16

Le système immunitaire

Objectifs

Un organisme pluricellulaire doit être capable de se nourrir, de se reproduire mais également de se protéger des agressions extérieures ou des dysfonctionnements intérieurs. C'est la fonction du système immunitaire que l'on retrouve plus ou moins développé des plantes supérieures aux mammifères en passant par les invertébrés.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent aux mammifères de différencier leurs cellules normales des cellules pathogènes et ceux qui assurent l'élimination de ces pathogène sont maintenant en grande partie compris. La connaissance des anticorps et de leurs propriétés est à la base de technologies dont l'importance dépasse largement le domaine de l'immunologie.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 178

Les cellules de l'immunité

Les cellules de l'immunité comprennent non seulement la majorité des cellules du sang, mais également des cellules spécialisées retenues dans les tissus.

1. Un peu de vocabulaire

Fiche 173

Le terme de « globule blanc » est normalement réservé aux leucocytes circulants dans le sang (en anglais *peripheral blood leucocyte*, PBL), ces cellules peuvent être d'origine myéloïde ou lymphoïde. La morphologie des noyaux a également conduit à distinguer les « polynucléaires » au noyau unique mais polylobé des « cellules mononuclées » ayant un noyau plus régulier (lymphocytes et monocytes). Les polynucléaires contiennent tous de nombreux granules colorés différentiellement sur les frottis sanguins et portent donc aussi le nom de granulocytes.

Cahier couleur Frottis

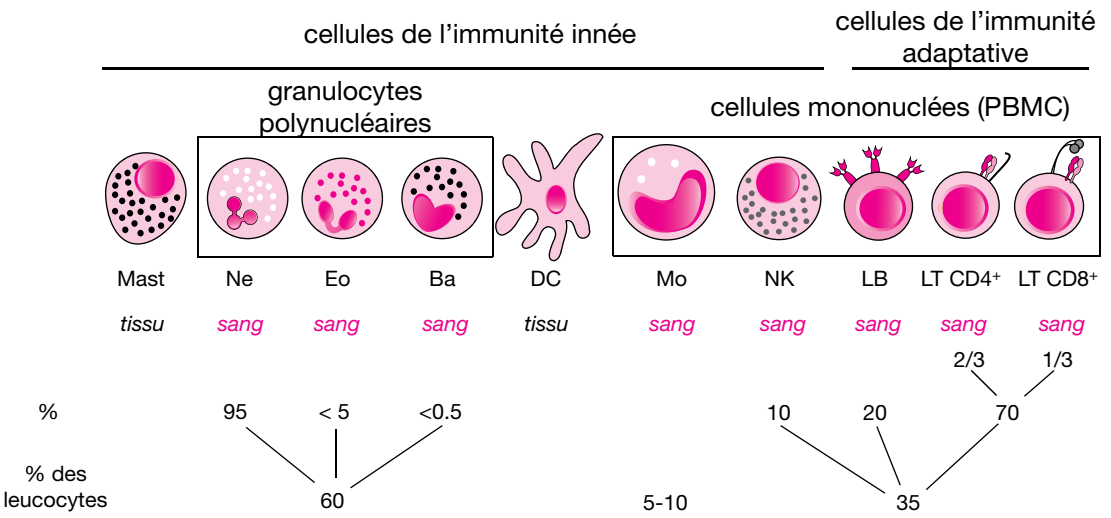


Figure 1 : Répartition des cellules de l'immunité

Mast : mastocyte. Ne : neutrophile. Eo : éosinophile. Ba : basophile DC : cellule dendritique. Mo : monocyte. NK : natural killer. LB : lymphocyte B. LT CD4+ : lymphocyte T CD4+. LT CD8+ : lymphocyte T CD8+.

Les leucocytes dérivent de cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse qui est donc définie comme un organe lymphoïde primaire, c'est-à-dire un lieu de production. Le thymus, indispensable à la production des lymphocytes T, en est un également. Chez les oiseaux, il existe un autre organe lymphoïde primaire, la bourse de Fabricius, indispensable à la production des lymphocytes B qui lui doivent leur nom.

Les lieux de rencontre entre les leucocytes qui permettront le déclenchement des réponses adaptatives sont appelés des organes lymphoïdes secondaires. Ces organes sont à tous les points d'entrée des pathogènes : le sang est filtré par la rate, les tissus sont drainés par la lymphe qui rejoint les ganglions lymphatiques et enfin les muqueuses sont surveillées par le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) comme par exemple les amygdales, les plaque de Peyer dans l'intestin ou l'appendice.

2. Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée vont permettre une réponse rapide permettant d'éliminer la plupart des pathogènes.

- Les neutrophiles (2 000 à 7 000/µL) sont les leucocytes les plus nombreux. Recrutés très rapidement du sang vers les tissus et capables de phagocytose, ils sont importants dans la lutte antimicrobienne.
- Les éosinophiles (50 à 400/µL) produisent beaucoup de toxines. Ils sont capables de phagocytose et interviennent dans l'immunité contre les parasites.
- Les basophiles (< 100/µL) sont des cellules circulantes dont les granules renferment de l'histamine. Ils sont impliqués dans la réponse allergique, l'inflammation antiparasitaire et la régulation de l'inflammation.
- Les mastocytes sont des leucocytes tissulaires dont les fonctions sont proches de celles des basophiles. Ils libèrent des médiateurs de l'inflammation.
- Les monocytes (200 à 800/µL) sont des cellules phagocytaires impliquées dans la lutte antimicrobienne. Ils peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques.
- Les cellules dendritiques sont majoritairement tissulaires. Elles jouent un rôle très important dans l'élimination des pathogènes par phagocytose et dans l'induction de la réponse adaptative. Elles existent sous une forme immature qui induit la tolérance aux antigènes et sous une forme mature qui active les lymphocytes T.
- Les macrophages sont des cellules phagocytaires tissulaires dont la morphologie varie selon les tissus. Ils permettent l'évacuation des débris cellulaires et l'élimination des pathogènes et peuvent activer certains lymphocytes T.
- Les Natural Killer (150-400/µL) sont des cellules lymphoïdes qui participent à la cytotoxicité contre des cellules anormales de l'organisme (infectées, cancéreuses).

3. Les cellules de l'immunité adaptative

Fiche 185

Les cellules de l'immunité adaptative expriment des récepteurs spécifiques d'un antigène. Elles sont sélectionnées en réponse à un antigène spécifique, prolifèrent et permettent une destruction ciblée du pathogène.

- Les lymphocytes T $CD4^+$ (600 à 1 200/µL) sont les chefs d'orchestre de l'immunité adaptative. Ils orientent la réponse en produisant des médiateurs solubles, les cytokines.
- Les lymphocytes T $CD8^+$ (300 à 700/µL) sont des lymphocytes cytotoxiques responsables de l'immunité à médiation cellulaire contre les cellules infectées de l'organisme.
- Les lymphocytes B (100 à 400/µL), après activation et différenciation en plasmocytes, produiront les anticorps responsables de l'immunité à médiation humorale. Ils peuvent aussi activer des lymphocytes T $CD4^+$.

fiche 179 Reconnaissance des pathogènes et premières défenses

Notre organisme est continuellement exposé à des agressions, physico-chimiques (pollution, tabagisme, UV…) ou infectieuses (bactéries, virus, champignons, parasites). Nos barrières externes naturelles constituent une première ligne de défense. Si elles sont franchies, notre organisme doit détecter la présence d'agents pathogènes pour déclencher une réponse immune.

1. Les barrières physiologiques

Fiche 167

La peau et les muqueuses constituent les surfaces de contact avec l'extérieur. Ce sont des barrières physiques qui empêchent l'entrée des pathogènes dans des conditions physiologiques mais elles peuvent être facilement endommagées par blessures ou piqûres par exemple.

Les cils vibratiles, la production de salive ou de mucus, la motricité des épithéliums constituent des barrières mécaniques qui limitent les interactions prolongées des agents infectieux avec nos cellules et favorisent l'expulsion des agresseurs.

Les sécrétions corporelles contiennent des composés chimiques antimicrobiens. Cela peut être un pH acide, des enzymes (lysozyme, enzymes digestives…) ou des peptides antimicrobiens (défensines, spermine…).

Enfin la flore commensale non pathogène de la peau et des muqueuses constitue une barrière biologique importante, elle entre en effet en compétition avec les espèces pathogènes, produit des substances toxiques vis-à-vis des agents pathogènes et améliore l'immunité des muqueuses.

2. Les PRR : récepteurs de danger de l'immunité innée

PAMP	PRR
Lipopolysaccharides (paroi gram–)	CD14 + TLR4 ; Scavenger R ; complément ...
Peptidoglycanes, lipopeptides (parois microbiennes)	TLR1, 2, 6 ; Scavenger R ; NLR
Flagellin (bactéries flagellées)	TLR5, NLR
Mannose (paroi levure)	*Mannose binding lectine*, mannose récepteur
fMLP (résidus du métabolisme microbien)	Récepteur au fMLP (famille des RCPG)
Phosphatidylcholine & lipides microbiens	C réactive protéine
ARN simple brin (virus)	TLR7, 8 ; RLH
ARN double brin (virus)	TLR3 ; RLH
ADN CpG mon méthylés	TLR9

Les barrières physiologiques sont malgré tout régulièrement franchies par des pathogènes qui sont alors détectés en quelques minutes par les cellules immunes résidentes des tissus : mastocytes, macrophages et cellules dendritiques immatures. La détection des pathogènes par ces cellules de l'immunité innée se fait grâce à des récepteurs invariables codés dans l'ADN germinal. Ils sont appelés récepteurs de reconnaissance de profil (PRR) et leurs ligands sont des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP,

pathogen associated molecular pattern), tels que des composants de la paroi (lipopolysaccharides, mannose…), des résidus de leur métabolisme (fMLP), des acides nucléiques caractéristiques des pathogènes (ARN double brin des virus). Les PRR peuvent parfois détecter des motifs moléculaires issus de dysfonctionnements internes (stress, nécrose cellulaire) signalés par des alarmines, on parle donc globalement de motifs associés au danger (DAMP, *Damage Associated Molecular Pattern*). Plusieurs catégories de PRR se distinguent :

PRR solubles : les opsonines

Ces molécules sont libérées dans les fluides extracellulaires et se lient aux micro-organismes puis facilitent leur élimination par phagocytose. Il s'agit de sous-unités du complément, de collectines (*Mannose binding lectine*, MBL) ou de pentraxines (*C reactive protein*, CRP). Ce sont des protéines dites de phase aigüe (PPA) de l'inflammation.

PRR d'endocytose

Ces molécules sont présentes à la membrane plasmique des cellules endocytaires et phagocytaires telles que monocytes, macrophages ou cellules dendritiques. Elles permettent la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes soit par interaction directe (récepteur du mannose, récepteurs Scavenger, récepteur au fMLP) ou en fixant des particules déjà opsonisées (récepteurs du complément, intégrines, récepteurs Fc).

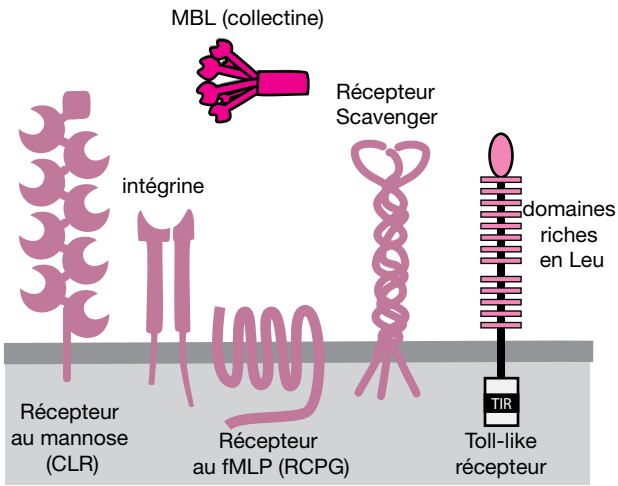


Figure 1 : Exemples de PRR

CLR : récepteur de type lectine C. RCPG : récepteurs couplés aux protéines G.
TIR : domaine tyrosine kinase de la famille Toll /IL1 récepteur.

PRR de signalisation

Ces molécules permettent l'activation des cellules ayant rencontré des micro-organismes ou des signaux de danger. Trois familles de récepteurs sont impliquées : Les TLR (*Toll-like receptor*), les NLR (*Nod-like receptor*), et les RLH (*RigI-like helicases*). Ces récepteurs sont exprimés soit à la membrane plasmique (TLR1,2,4,5,6), soit à la surface des endo-lysosomes (TLR3,7,8,9) soit dans le cytoplasme (NLR, RLH).

Pour les TLR, le domaine tyrosine kinase permet plusieurs cascades de signalisation *via* des protéines adaptatrices telles que MyD88 ou TRIF qui activent des kinases et modulent l'activité du facteur de transcription NF-κB.

La découverte de ces récepteurs d'activation de l'immunité innée a valu à J. Hoffmann et B. Beutler le prix Nobel de médecine 2011.

fiche 180 Le système du complément

En 1895, J. Bordet découvre que deux éléments du sérum sont indispensables à la destruction des bactéries : un composé thermostable présent chez les animaux déjà immunisés (les anticorps) et un composé thermolabile commun à tous les animaux et dont l'activité complémente celle des anticorps : le complément. Il reçoit le prix Nobel en 1919.

1. Nature et activation du système du complément

Il s'agit d'un ensemble de glycoprotéines solubles ou membranaires. Elles sont produites sous forme inactive par les macrophages et par les hépatocytes lors de la phase aigüe de l'inflammation. Les protéines C1 à C5 sont activées par protéolyse en cascade *via* des convertases jusqu'aux molécules effectrices. Les convertases sont elles-mêmes des assemblages de composants du complément.

La voie classique (voie a figure 1)

Le complexe C1 se lie soit à des anticorps (IgG et IgM) soit à des pentraxines (CRP par exemple) fixés sur des antigènes et est ainsi activé. La sous-unité C1s clive le facteur C4. La partie C4b se lie aux surfaces microbiennes et fixe C2 qui est clivé par la convertase C1s. L'ensemble C4bC2b forme une C3 convertase.

La notation C4bC2a est fréquemment retrouvée et précède la normalisation des notations depuis laquelle le fragment le plus gros est noté b.

La voie des lectines (voie b figure 1)

La *mannose binding lectine (*MBL) se fixe aux sucres des parois microbiennes et recrute MASP, une protéase. Celle-ci clive le facteur C4, ce qui aboutit comme dans la voie classique à la formation de la C3 convertase, C4bC2b.

La voie alterne, boucle d'amplification (voie c figure 1)

Lorsqu'il y a des lésions tissulaires, C3 peut se lyser spontanément dans le sérum. C3b se fixe de façon stable aux parois microbiennes en présence de facteur P (properdine). Cela permet le recrutement puis le clivage du facteur B pour former une C3 convertase alterne, C3bBb. Il y a alors une boucle d'amplification au contact des membranes microbiennes.

Toutes les voies d'activation du complément conduisent à la même séquence terminale : clivage du composé C3 en C3a et C3b, association de C3b aux C3 convertases pour créer des C5 convertases et clivage de C5.

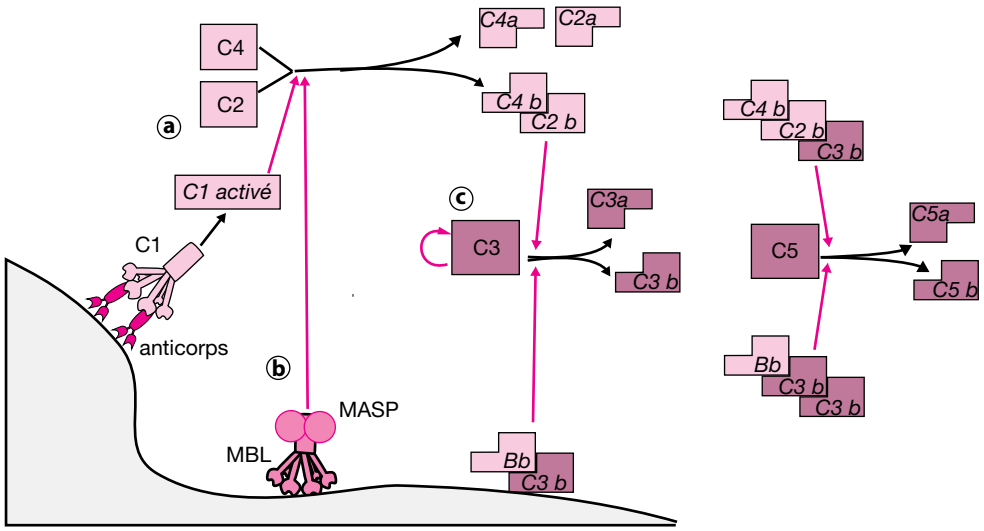


Figure 1 : Schéma simplifié des voies d'activation du complément

2. Les molécules effectrices du complément

Activation cellulaire par les anaphylatoxines

Les composés C3a, C4a et C5a constituent les anaphylatoxines (responsables des chocs anaphylactiques). Ils exercent un chimiotactisme sur les leucocytes, permettent la dégranulation des basophiles et des mastocytes, augmentent la perméabilité vasculaire et l'inflammation.

Élimination des pathogènes et des déchets

C3b et C4b se lient aux parois microbiennes, aux complexes antigènes-anticorps et aux corps apoptotiques. Cela favorise la phagocytose (opsonisation) et l'élimination des antigènes grâce aux récepteurs du complément exprimés par les érythrocytes et les phagocytes. La production d'anticorps sera également exacerbée *via* les récepteurs CR3 sur les lymphocytes B.

Complexe d'attaque membranaire (CAM)

C5b se lie à C6 et C7 puis le complexe C5b67 s'attache aux membranes des pathogènes (virus, bactéries) avec C8. C9 est recruté et polymérise, formant un pore d'environ 10 nm qui provoque un choc osmotique et conduit à la mort du pathogène.

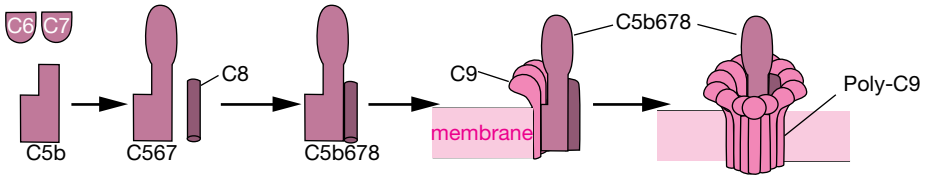


Figure 2 : Les stades de formation du complexe d'attaque membranaire

3. Les facteurs de régulation

Les sous-unités actives sont instables et donc rapidement inactivées ce qui supprime des actions délétères sur des cellules voisines. Il existe aussi des protéines de régulation de l'activation du complément, soit présentes sur les membranes des cellules hôtes telles que DAF (*Dissociation Acceleration factor*), MCP (*Membrane Cofactor Protein*), la protectine… soit libérés comme facteurs solubles (inhibiteur du C1, facteur H et I…).

fiche 181

La réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse naturelle coordonnée des leucocytes et des cellules endothéliales vasculaires qui permet de combattre les stades précoces de l'infection puis de réparer les tissus et de revenir à une situation normale. Les quatre symptômes caractéristiques ont été définis par A. C. Celsus au I^er^ siècle : « *Rubor et tumor cum calore et dolore* », rougeur, gonflement, chaleur et douleur.

1. Phase d'initiation

Fiche 179

Fiche 182

Les signaux d'initiation de la réponse inflammatoire peuvent être physiques, chimiques ou infectieux, il s'agit des *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMP). Ils conduisent à l'activation des leucocytes résidents (macrophages, cellules dendritiques, et mastocytes) et de l'endothélium vasculaire. Cette activation induit la libération de médiateurs de l'inflammation : cytokines pro-inflammatoires, histamine, leucotriènes et prostaglandines par exemple.

2. Phase vasculaire

L'hémostase permet de réparer les vaisseaux de la zone touchée et de limiter la propagation des microbes. L'activation des systèmes plasmatiques protéolytiques contribue à l'activation du complément, à la vasodilatation et au recrutement des leucocytes. La vasodilatation est accompagnée d'une constriction des muscles lisses des capillaires. Les quatre signes de l'inflammation résultent principalement de l'augmentation du flux sanguin.

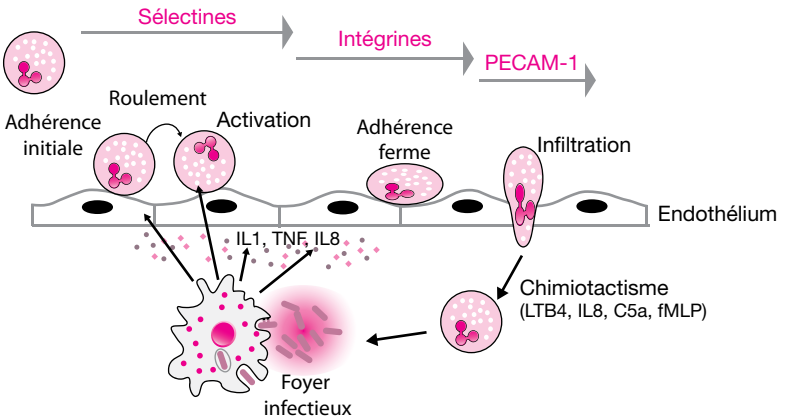


Figure 1 : Les étapes de la diapédèse des leucocytes

Les cellules endothéliales et les leucocytes sont activés par les substances d'appels produites sur le foyer infectieux. L'expression séquentielle de molécules d'adhérence de plus en plus fortes (sélectines, intégrines, PECAM) va permettre l'adhérence initiale où les leucocytes continuent à rouler sous la pression du flux sanguin, puis l'adhérence ferme où le leucocyte est figé et enfin la migration transendothéliale (diapédèse).

Les leucocytes infiltrés sont attirés vers le foyer inflammatoire par un gradient de chimiokines. Le recrutement des globules blancs est séquentiel, d'abord éosinophiles et neutrophiles, puis monocytes et enfin lymphocytes activés

3. Phase cellulaire

Suite à l'activation des cellules résidentes (mastocytes, macrophages et cellules dendritiques) et des cellules endothéliales, les cellules effectrices de l'inflammation (neutrophile et monocytes/macrophages) sont recrutées sur le site de l'infection. Plusieurs mécanismes sont alors mis en jeu pour éliminer les pathogènes : la libération des enzymes et molécules antimicrobiennes contenues dans leurs granules (défensines, lactoferrine, lysozyme…), la phagocytose et la libération d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote, l'expulsion par les neutrophiles d'une structure faite d'ADN, d'histones et de protéases (NET, *Neutrophils Extracellular Traps*) qui piège et attaque les pathogènes. Les cellules activées produisent également des médiateurs qui vont amplifier le recrutement de nouveaux leucocytes.

Fiche 183

Les macrophages et les cellules dendritiques, par leur statut de cellules présentatrices d'antigènes, pourront présenter des peptides aux lymphocytes T et ainsi faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Fiche 190

4. Phase systémique

Les processus de destruction des pathogènes sont également toxiques pour l'hôte mais les médiateurs inflammatoires induisent une réponse systémique qui protège l'organisme.

- L'IL1 et le TNF stimulent l'hypothalamus et provoquent la fièvre, nécessaire à la formation des protéines de choc thermique qui protègent les molécules endogènes des effets des radicaux libres. La fièvre améliore aussi la fonction des cellules présentatrices d'antigènes.
- L'IL1, le TNF et l'IL6 conduisent la glande corticosurrénale à la produire de la cortisone, un anti-inflammatoire puissant.
- L'interleukine 6 et la cortisone induisent la production de protéines de phase aigüe (PPA) par le foie : protéines du complément, pentraxines CRP (*C reactive protein*), collectines, elles permettent d'accélérer l'élimination des pathogènes et donc de minimiser la durée de l'inflammation.
- Des facteurs de croissance sont produits par les macrophages activés et par les cellules résidentes de la moelle osseuse sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires. Ils stimulent l'hématopoïèse afin de reconstituer le stock de globules blancs détruits.

Fiche 192

L'inflammation aigüe se conclut normalement par la réparation tissulaire après disparition des pathogènes et élimination des leucocytes infiltrés. Les macrophages produisent alors de l'IL10, du TGFβ et des médiateurs lipidiques de type résolvines. Ces molécules anti-inflammatoires stimulent également la prolifération des fibroblastes et la reconstruction du tissu nécessaires à la cicatrisation.

Lors de certaines pathologies, l'inflammation ne peut pas être stoppée, elle devient alors chronique.

fiche 182 Les médiateurs de l'inflammation et les anti-inflammatoires

L'inflammation est un processus devant être finement régulé car il s'auto-amplifie naturellement grâce aux cellules effectrices qui produisent des médiateurs.

1. Les systèmes plasmatiques protéolytiques

Ces protéines du plasma sont activées par protéolyse en cascade. Quatre systèmes sont interconnectés : le complément, les kinines, la coagulation et la fibrinolyse. Ils sont initiés par l'activation du facteur de Hageman (facteur XII de la coagulation).

Le système contact des kinines

Fiche 180

Il aboutit à la bradykinine qui provoque la contraction les muscles lisses, la dilation des capillaires sanguins et la douleur *via* des récepteurs sur des neurones sensoriels. La kallicréine, active le complément en clivant le C5.

La coagulation et la fibrinolyse

La coagulation et la fibrinolyse permettent l'hémostase qui répare les vaisseaux de la zone touchée. Les fibrinopeptides issus de l'action de la thrombine permettent une perméabilité vasculaire accrue et attirent des neutrophiles par chimiotactisme. Après cicatrisation, le caillot de fibrine est dégradé par la plasmine. Celle-ci active le complément par la voie classique et les produits de dégradation de la fibrine attirent des neutrophiles.

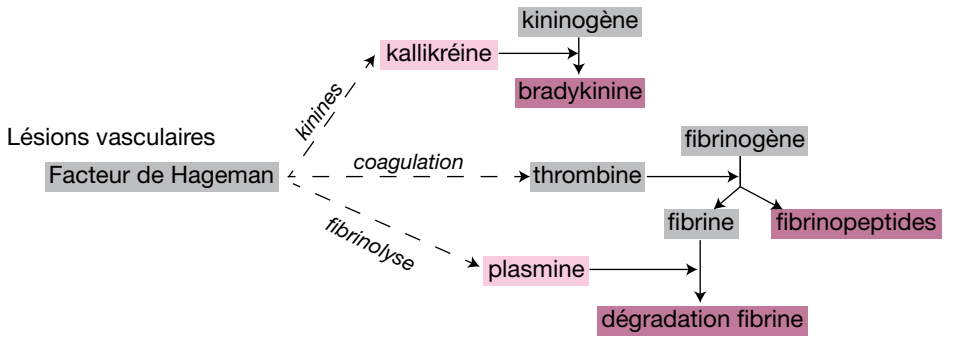


Figure 1 : Les médiateurs inflammatoires parmi les systèmes plasmatiques protéolytiques

En rose, activateur du complément. En mauve, vasodilatation et chimiotactisme des neutrophiles.

2. Les cytokines de l'inflammation

Les cytokines sont une large famille de médiateurs de l'immunité.

Les chimiokines

Fiche 192

Ce sont des facteurs chimiotactiques ciblés produits en situation de danger par les leucocytes résidents, les cellules des tissus endommagés (fibroblastes, cellules endothéliales) et les leucocytes activés recrutés sur le foyer inflammatoire. Les principales chimiokines sont l'interleukine 8 (IL8), MIP et RANTES. Leurs récepteurs sont de la famille des RCPG.

TNFα, IL1 et IL6

Ces cytokines sont produites en majorité par les macrophages et les cellules dendritiques activés et en moindre quantité par les neutrophiles sur le foyer inflammatoire. Elles ont des rôles redondants d'activation cellulaire, d'augmentation de la perméabilité vasculaire, de chimiotactisme et elles induisent les réponses systémiques de l'inflammation.

3. Les médiateurs lipidiques et les anti-inflammatoires

Les médiateurs lipidiques de l'inflammation, ou éicosanoïdes, sont issus des phospholipides membranaires. En situation inflammatoire, des isoformes particulières d'enzymes sont exprimées. Des phospholipases A2 inductibles (PLA2) coupent les phospholipides en acides arachidoniques et lyso-phospholides qui se métabolisent en PAF (facteur d'agrégation des plaquettes). L'acide arachidonique est transformé en leucotriènes par les lipoxygénases (LOX) et en prostaglandines par les cyclo-oxygénases (COX). Les éicosanoides produits ont des effets amplifiant tous les aspects de la réponse inflammatoire : vasodilatation, recrutement et activation des cellules effectrices, fièvre, douleur…

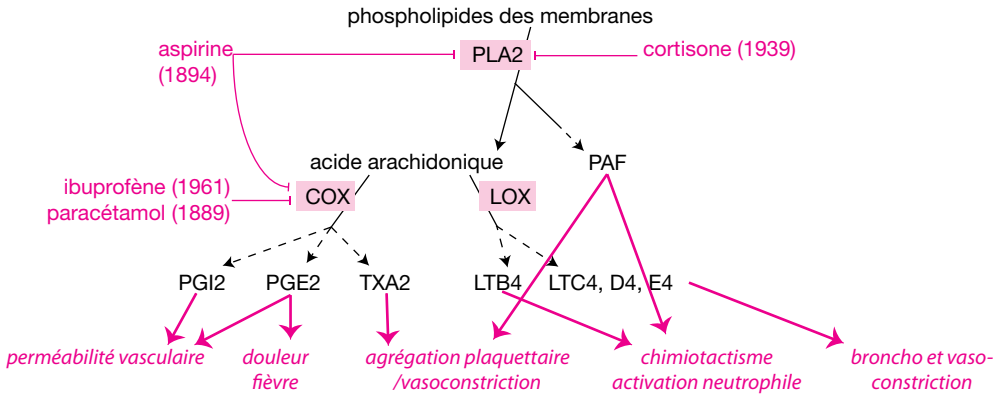


Figure 2 : Effets des éicosanoïdes et cible des anti-inflammatoires
En rouge, différentes classes d'anti-inflammatoires avec l'année de leur découverte.

Des médicaments anti-inflammatoires, comme l'écorce de saule, sont connus depuis l'antiquité. De nos jours, on distingue les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) de la famille de la cortisone et les non-stérodiens (AINS). La synthèse chimique de ces derniers à la fin du XIXe siècle a permis un bond prodigieux dans le traitement des maladies inflammatoires. Leur mode d'action, identifié par J. Vane en 1971 (prix Nobel 1982) passe par l'inhibition plus ou moins sélective de différentes isoformes de COX, leur donnant des effets désirables et indésirables légèrement différents. Les AIS qui sont des dérivés de la cortisone produite physiologiquement par l'organisme, sont de très puissants anti-inflammatoires mais ils ont beaucoup d'autres effets notamment sur le squelette, les reins, le métabolisme du glucose, la protection des muqueuses gastro-intestinales, le système cardio-vasculaire.

fiche 183 Phagocytose et production de radicaux libres

La phagocytose est un processus indispensable à l'élimination des débris et des cellules mortes de l'organisme. Le rôle des macrophages, les éboueurs de l'organisme, a été découvert par E. Metchnikoff (Prix Nobel 1908), qui concluait en 1883 que « les cellules phagocytaires, qui sont originellement des cellules digestives chez l'éponge, retiennent leur rôle dans les phénomènes pathologiques pour détruire les pathogènes envahisseurs ».

1. Reconnaissance et capture des particules

Fiche 101

La phagocytose est une forme d'endocytose réservée aux particules d'au moins 250 nm et nécessitant une ré-organisation des filaments d'actine. En réponse à cette ingestion, les phagocytes professionnels seront capables de produire des agents microbicides. Il s'agit des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles et éosinophiles.

La première étape est l'attachement de la particule à la cellule phagocytaire. Il se produit *via* différents types de récepteurs du phagocyte :

Fiche 179

- des PRR d'endocytose qui sont capables d'interagir directement avec des molécules à la surface de la particule (très souvent des sucres) : TLR, CLR, Scavenger récepteur.
- Des récepteurs d'opsonines qui vont reconnaître des molécules solubles elles-mêmes interagissant avec les particules : récepteur du complément, récepteur Fc liant les complexes immuns, intégrines.

L'engagement séquentiel de ces récepteurs polarise le cytosquelette de la cellule phagocytaire. Des pseudopodes se forment et s'allongent jusqu'à englober totalement la particule dans une vacuole : le phagosome.

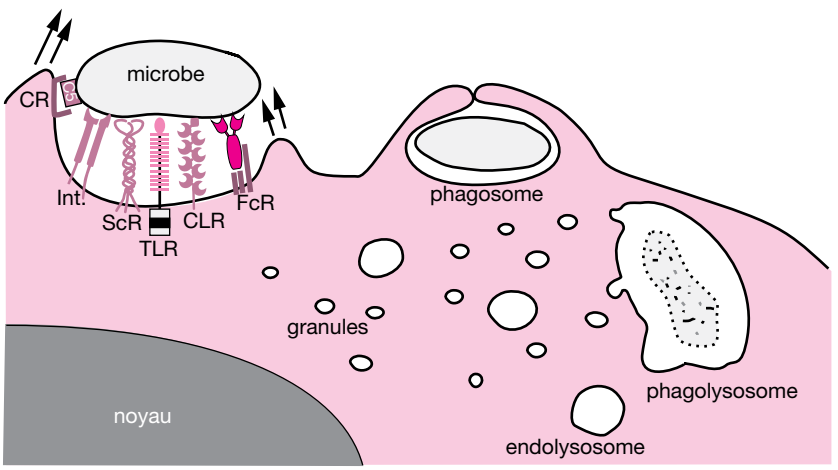


Figure 1 : Les étapes de la phagocytose

Le phagosome fusionne alors avec les granules cytosoliques abondants dans les cellules phagocytaires, et avec les endolysosomes, conduisant à une baisse du pH dans le phagolysosome ainsi constitué.

2. Destruction du contenu du phagolysosome

Par les molécules libérées des granules

Les granules des phagocytes contiennent de nombreuses enzymes qui vont s'attaquer aux microbes du phagolysosome : protéases, phosphatases, lysozyme, hydrolases acides et autres enzymes lysosomiales.

Des molécules actives non-enzymatiques sont aussi libérées : défensines, lactoferrine, protéines cationiques, neurotoxine de l'eosinophile, protéines du complément (par le monocyte) s'attaquent aux microbes. Les amines vaso-actives (histamine, sérotonine) contribuent à recruter de nouveaux phagocytes.

Enfin les granules vont libérer des molécules responsables de la production de radicaux libres.

Par la production de radicaux libres

Tous les phagocytes professionnels produisent des espèces réactives dérivées de l'oxygène, les ROS (*reactive oxygen species*), lors d'un processus dit métabolisme oxydatif ou explosion respiratoire. Le complexe de la NADPH oxydase génère des anions superoxydes (O_2^-) à partir d'oxygène grâce à un transport actif d'électrons *via* le flavocytochrome b558. O_2^- est un radical libre (noté $^\bullet$), c'est-à-dire qu'il y a un électron célibataire qui rend la molécule hyper-réactive. La superoxyde dismutase (SOD) et la myéloperoxydase (MPO) permettent de produire d'autres radicaux libres oxygénés : peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), radicaux hydroxyles $OH^{\bullet -}$ (réaction de Fenton), hypochlorite HOCl (composant l'eau de Javel). Ces ROS altèrent les lipides, protéines, acides nucléiques permettant ainsi la destruction des pathogènes enfermés dans le phagosome.

Les monocytes et macrophages activés disposent également d'une NO synthase inductible lors de l'inflammation (iNOS) qui produit de l'oxyde nitrique (NO) transformé en peroxynitrique ($ONOO^-$) ou nitrogène dioxyde (NO_2) encore plus puissants.

Ces radicaux libres ne sont pas spécifiques des pathogènes et ils finissent par détruire aussi les phagocytes, formant ainsi le pus.

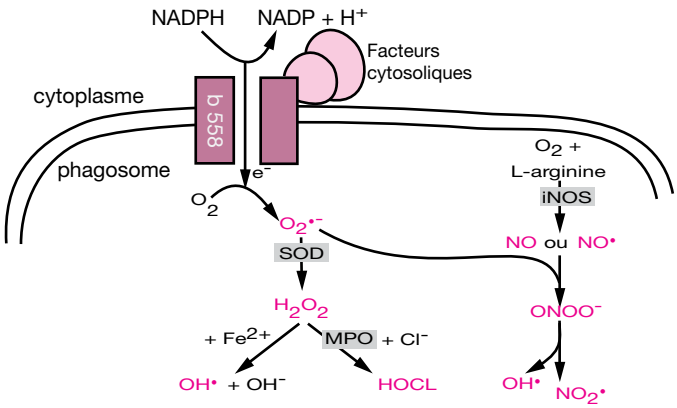


Figure 2 : Production des radicaux libres

Les enzymes sont grisées. Les molécules réactives sont en rose.

fiche 184 Interférons et Natural Killer : d'autres réponses innées aux virus

Fiche 181

L'inflammation est un processus général de défense contre toute sorte de micro-organismes pathogènes. Il existe par contre des mécanismes plus spécifiques mis en place contre les pathogènes intracellulaires, et en particulier contre les virus : la production d'interférons de type I et la cytotoxicité des Natural Killer.

1. Les interférons de type I

Fiches 192 et 193

Les interférons (IFN) ont été identifiés à la fin des années 1950 comme des facteurs inhibant la prolifération virale. Cette famille à part de cytokines est maintenant divisée en 2 classes fonctionnelles : les interférons de type I incluant les variants d'IFNα et l'IFNβ, et l'interféron γ dit de type II. Ce dernier a des fonctions plus larges dans la réponse cytotoxique alors que les interférons de type I sont plus spécifiquement anti-viraux.

Fiche 179

Les cellules infectées des tissus, tels que les fibroblastes, détectent les virus dans leur cytosol *via* des hélicases de type RLH et produisent de l'IFNβ. Les sentinelles de l'immunité innée en réponse à l'IFNβ ou après détection des virus *via* les TLR ou les RLH produisent de grandes quantités d'IFNα et β ce qui permet une amplification du signal. En particulier, la sous-population des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) est spécialisée dans la production d'IFN à tel point qu'elles sont appelées « cellules productrices d'interférons » (IPC, *Interferon Producing Cells*).

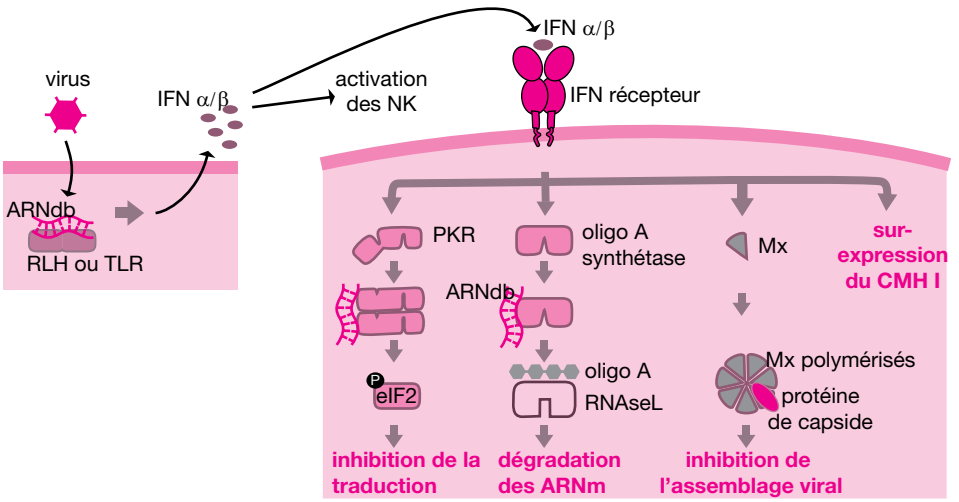


Figure 1 : Production et fonctionnement des interférons

Le récepteur commun aux IFN de type I va induire l'expression de plusieurs molécules permettant de limiter la propagation virale :

- une protéine kinase ARN-dépendante, PKR, sensible aux ARN double brins viraux, qui va provoquer la phosphorylation et l'inactivation de eIF2, facteur d'initiation de la traduction.
- une 2'-5'oligoadenylate synthétase, dont le produit obtenu après exposition aux ARN double brins viraux active une RNAse cellulaire.

- Des protéines Mx (pour Myxovirus résistance) qui sont des GTPases capables de s'oligomériser et qui semblent avoir différents effets dont celui de piéger les protéines de capside virale pour bloquer l'assemblage des virions.

L'exposition aux IFN de type I ou II augmente également l'expression des protéines du CMH et des molécules de co-stimulation sur les cellules présentatrices d'antigènes.

Fiche 190

2. Cytotoxicité des Natural Killer

Les lymphocytes Natural Killer (NK) ne possèdent pas de récepteurs spécifiques d'antigènes, ce sont des lymphocytes de l'immunité innée. Ils contiennent des granules remplis de perforines et de granzymes comme les LT $CD8^+$.

Fiche 178

Les NK sont activés lorsque la balance entre les signaux médiés par leurs récepteurs activateurs et les signaux médiés par leurs récepteurs inhibiteurs est en faveur de l'activation. Ils peuvent également être activés par des complexes immuns (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps). Les IFN de type I et l'interleukine 12 renforcent aussi leur activation, qui conduit à la lyse des cellules cibles et à la production d'IFNγ.

Fiche 195

Les récepteurs activateurs et inhibiteurs (collectivement dits NK récepteurs, NKR) sont multiples à la surface d'une cellule NK. Les récepteurs inhibiteurs se lient aux protéines de CMH I mais la nature exacte des ligands activateurs est imprécise, il peut s'agir de lectines de type C, de molécules d'adhérence, de molécules de stress… Dans les cellules normales, les signaux inhibiteurs et activateurs s'équilibrent mais dans les cellules infectées ou tumorales, la cytotoxicité peut être induite soit par un excès de signaux activateurs (*induced-self*), soit par une absence de signaux inhibiteurs (*missing-self*).

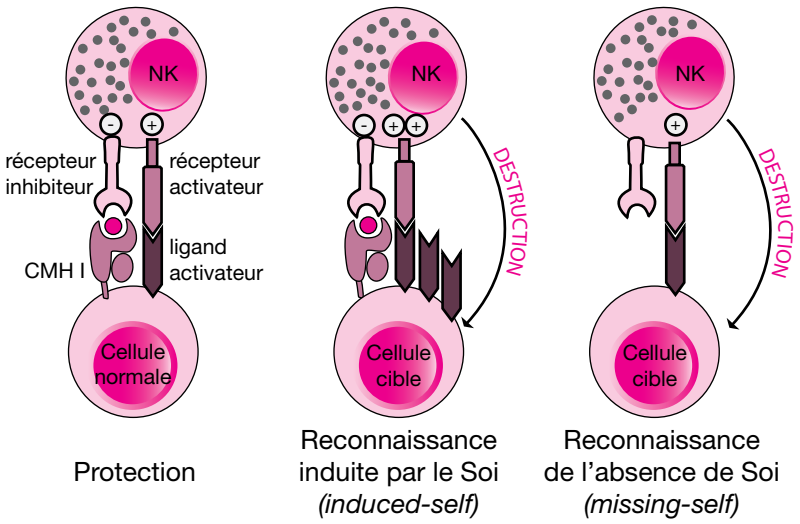


Figure 2 : Modèle d'opposition des signaux pour l'activation des Natural Killer

fiche 185 Les lymphocytes ont des récepteurs spécifiques d'antigènes

Les lymphocytes disposent à leur surface de récepteurs, différents d'un lymphocyte à l'autre, capables d'interagir avec un antigène particulier. On parle du répertoire des lymphocytes B, avec plus de 10^9 clones différents, et du répertoire des lymphocytes T ($> 10^{11}$ clones), chacun ayant une spécificité antigénique propre. L'acquisition de ces récepteurs spécifiques se fait au cours de la différenciation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes primaires.

1. Caractéristiques des récepteurs des lymphocytes

Le récepteur des cellules B : BcR

C'est une immunoglobuline (Ig) membranaire permettant la liaison à l'antigène associée à un hétérodimères Ig α et Ig β permettant la transduction du signal. Une immunoglobuline, membranaire ou soluble, est un hétérotétramère de deux chaînes légères identiques (Lc) associées par ponts disulfures à deux chaînes lourdes identiques (Hc).

Les immunoglobulines sont repliées en domaines structuraux caractéristiques, dits « domaines immunoglobulines » : deux brins β antiparallèles reliés par un pont disulfure. La chaîne légère est organisée en deux de ces domaines structuraux mais l'essentiel de la variabilité de séquence entre chaînes légères de deux lymphocytes différents se localise sur les acides aminés du domaine N-terminal, appelé domaine variable (V_L). L'autre domaine est dit constant (C_L), sa séquence varie faiblement entre différentes classes d'immunoglobulines.

La chaîne lourde contient également un domaine variable (V_H) en position N-terminale, et trois à quatre domaines constants selon la classe d'immunoglobulines (C_{H1} à C_{H4}). Elle est glycosylée (S). Entre les domaines C_{H1} et C_{H2} de chaque chaîne lourde se situe une charnière flexible qui délimite les zones fonctionnelles de la molécule. D'une part se situent les deux fragments de liaison à l'antigène (Fab), et d'autre part le fragment cristallisable (Fc) assurant les fonctions effectrices de l'immunoglobuline.

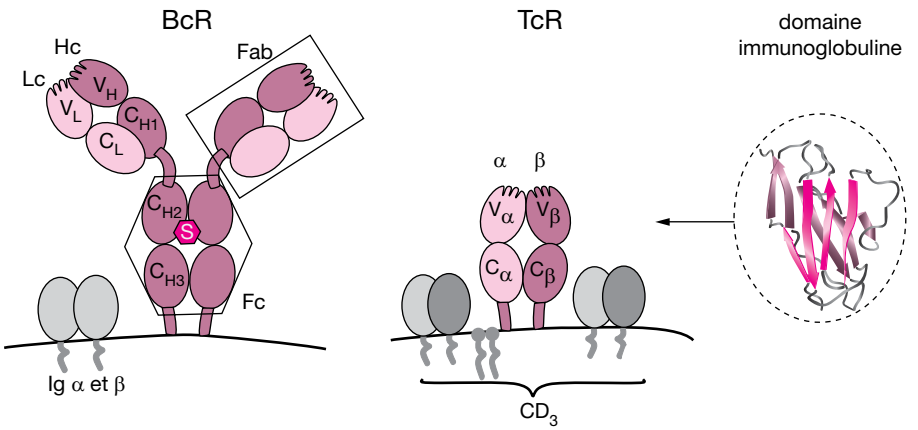


Figure 1 : Schéma des récepteurs des lymphocytes B et T

Le récepteur des cellules T : TcR

Le récepteur des cellules T (TcR) est constitué d'un dimère α/β permettant la liaison au ligand associé à un complexe de transduction du signal appelé CD3. Toutes ces molécules appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les chaînes α et β sont constituées d'un domaine N-terminal variable (Vα et Vβ respectivement) et d'un domaine C-terminal constant (Cα et Cβ). Elles sont ancrées dans la membrane par une hélice transmembranaire et s'associent par un pont disulfure. Un TcR a une structure proche d'un fragment Fab d'une immunoglobuline ; il peut lier un ligand alors que l'Ig en lie deux simultanément.

Les lymphocytes T ont aussi des co-récepteurs, soit CD4, soit CD8. Ils sont invariables et participent à l'interaction avec les molécules de présentation des antigènes.

2. Les antigènes reconnus par les lymphocytes

Toute molécule chimique, peptide, glucide voire lipide qui peut se fixer sur un récepteur de lymphocyte est un antigène. Lorsqu'il y a déclenchement d'une réponse immune, l'antigène est dit immunogène. Certaines petites molécules chimiques comme le dinitrophénol sont reconnues par des immunoglobulines mais ne déclenchent une réponse que si elles sont couplées à d'autres molécules plus grosses, on les appelle des haptènes. Un antigène de grande taille tel qu'un micro-organisme ou même une protéine peut être reconnu par plusieurs récepteurs, on dira qu'il contient plusieurs épitopes. Ces épitopes peuvent être accessibles en surface ou bien enfouis et révélés lors d'un processus de fragmentation nommé « apprêtement de l'antigène ». Ils peuvent correspondre à une séquence continue de résidus (épitope linéaire) ou au contraire à une séquence discontinue où les résidus se retrouvent proches suite au repliement de la molécule (épitope conformationnel).

Fiche 189

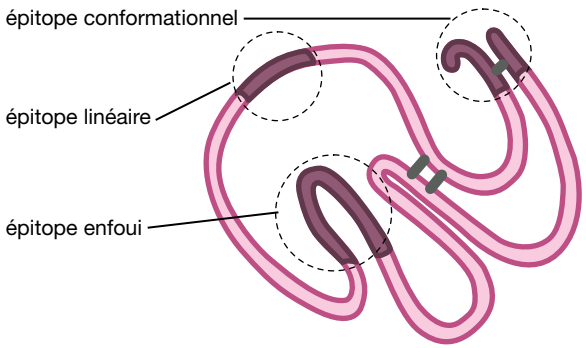


Figure 2 : Différents types d'épitopes

Les lymphocytes B et T ne reconnaissent pas les mêmes épitopes :

- Les épitopes des cellules T sont uniquement des peptides associés à des molécules du CMH. Ce sont donc des épitopes linéaires, mais qui peuvent être enfouis ou non.
- Les épitopes des cellules B peuvent être des peptides, des glucides, éventuellement des lipides ou des petites molécules chimiques. Il n'y a pas d'intervention des molécules du CMH, l'interaction est directe entre le BcR et son épitope. Celui-ci doit donc être accessible en surface, il peut être linéaire ou conformationel.

Fiche 187

fiche 186 Origine et diversité des récepteurs B et T

Étant donné l'étendue du répertoire des lymphocytes, chaque récepteur ne peut pas être codé par un gène différent comme le voudraient les modèles génétiques classiques. La solution vient d'une hypothèse révolutionnaire de W. Dryer et J. Benett démontrée par S. Tonegawa en 1976 : le modèle de la recombinaison.

« Les domaines variable et constant d'une chaîne d'immunoglobuline sont codés par des segments de gènes éloignés dans la lignée germinale. » S. Tonegawa (Prix Nobel 1987).

Alors que le domaine constant est codé par un exon nommé C, le domaine variable est codé par la jonction de plusieurs fragments V, D et J ce qui par combinaison permet d'augmenter le nombre de possibilité.

1. Des gènes fragmentés dans l'ADN germinal

L'ADN des cellules souches hématopoïétiques contient de multiples fragments de gènes dans leur configuration germinale au locus des récepteurs des lymphocytes. Sous cette forme, ces fragments ne peuvent pas être transcrits. Pour les domaines variables de la chaîne lourde V_H, et de la chaîne bêta du TcR Vβ, il y a trois familles de fragments : V (variable), D (diversité) et J (jonction) avec plusieurs dizaines de fragments différents dans chaque famille (voir figure 1). Pour la chaîne alpha du TcR, Vα est codée par des fragments V et J. Enfin, le domaine V_L de la chaîne légère d'Ig peut être exprimé soit à partir du locus kappa, soit à partir du locus lambda qui contiennent des fragments V et J.

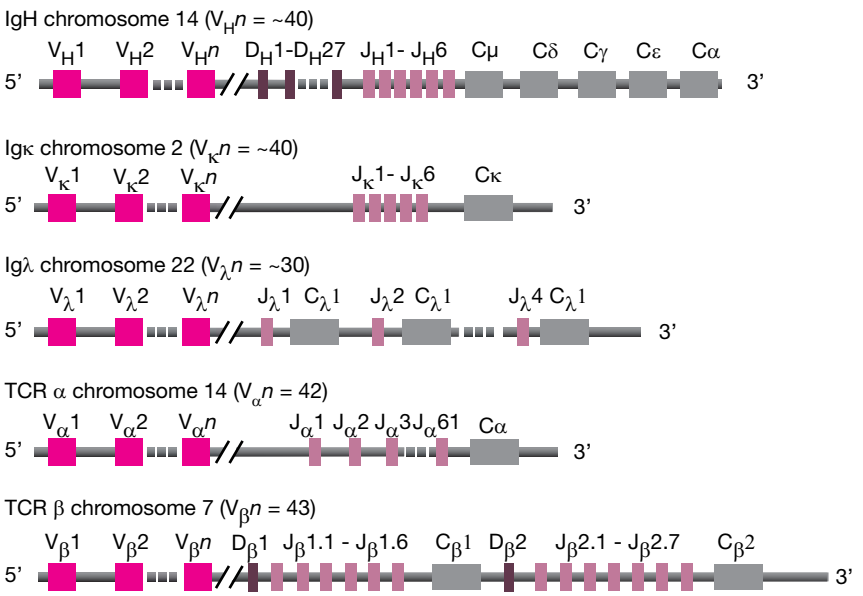


Figure 1 : Structure germinale des gènes des immunoglobulines et du TcR

2. Diversité combinatoire et diversité jonctionnelle

Au cours de leur développement, les lymphocytes vont subir des recombinaisons somatiques (réarrangement de gènes) permettant d'associer un fragment issu de chaque famille, aléatoirement. C'est ce qu'on appelle la diversité combinatoire. Les recombinases RAG1 et RAG2, spécifiques des lymphocytes, reconnaissent des séquences qui encadrent les fragments géniques. Pour les loci Hc et TcRβ, un des fragments D est recombiné au hasard avec un des fragments J, puis un des multiples fragments V est recombiné avec le réarrangement DJ. Pour TcRα et Lc, il y a seulement recombinaison V-J. Ainsi chaque lymphocyte circulant contient un ADN recombiné particulier qui est transcrit et qui est différent de l'ADN germinal.

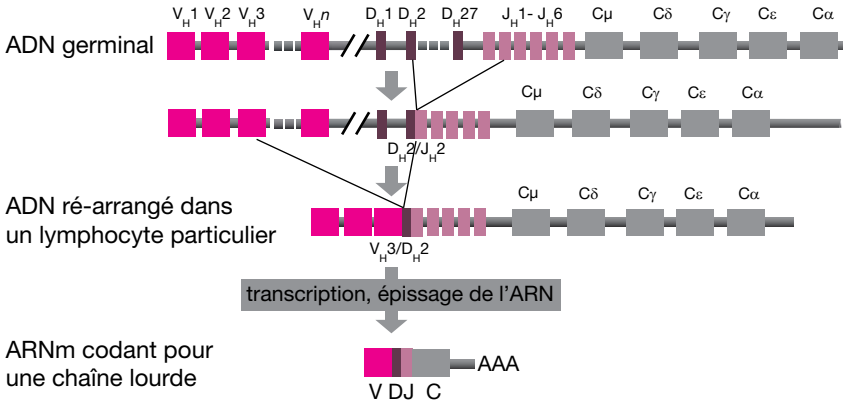


Figure 2 : Ordre des réarrangements permettant de créer une chaîne lourde d'Ig

Lors de la recombinaison, les fragments se rapprochent puis les 2 brins d'ADN sont coupés et joints, l'ADN entre les fragments étant excisé. Il y a donc perte de matériel génétique pendant le développement des lymphocytes. Au moment de la cassure double brin, des nucléotides peuvent être supprimés, d'autres peuvent être ajoutés aléatoirement par la *terminal désoxyribonucléotidyl transferase* (TdT) créant une diversité jonctionnelle responsable de dizaines de milliers de possibilités supplémentaires.

À cause de cette flexibilité jonctionnelle et de ces ajouts de nucléotides, le cadre de lecture peut être modifié entraînant des codons stop prématurés : ce sont des réarrangements non productifs. La cellule peut alors faire un 2e essai de recombinaison sur l'autre allèle à partir du 2e chromosome homologue. Par contre si le 1er réarrangement est productif, un mécanisme d'exclusion allélique empêche des recombinaisons sur le 2e chromosome. De même pour la chaîne légère, la production d'une chaîne kappa empêche les recombinaisons au locus lambda.

Lorsqu'un lymphocyte ne réussit pas à faire un réarrangement productif pour l'une des deux chaînes de son récepteur, il est éliminé par apoptose. Les mécanismes de diversité jonctionnelle offrent énormément de possibilité de diversité des récepteurs, mais seulement environ 10 % des cellules en développement parviennent à maturité en exprimant un récepteur fonctionnel.

fiche 187

Les protéines du CMH, structure et propriétés

Le CMH, ou complexe majeur d'histocompatibilité, est un complexe génétique codant pour des marqueurs tissulaires dits antigènes de transplantation ou *human leucocyte antigen* (HLA).

Après avoir mis en évidence des anticorps dirigés contre les leucocytes chez des polytransfusés en 1958, J. Dausset découvre le rôle des HLA dans le rejet de greffe de peau entre père et enfants. Il reçoit le prix Nobel en 1980.

Les protéines du CMH sont exprimées à la surface des cellules et chargées avec des peptides du soi ou exogènes qui seront présentés aux lymphocytes T.

1. Structure et expression des protéines du CMH

Ces molécules de présentation peuvent se partager en deux classes en fonction de leur structure et de leur expression.

Les molécules de classe I du CMH

Les molécules de classe I du CMH sont exprimées continuellement par toutes les cellules de l'organisme capables de néosynthèse. Elles portent des peptides présents dans le cytosol : ils peuvent être physiologiques ou pathologiques lorsque la cellule est infectée. La molécule est constituée d'une chaîne α variable d'un individu à l'autre, et de la β2-microglobuline qui est conservée. La chaîne α s'organise en trois domaines structuraux. Le domaine α3 de séquence conservée s'associe à la β2-microglobuline, ce sont tous deux des « domaines immunoglobulines ». Les domaines α1 et α2 sont constitués de feuillets β et d'hélices α formant le fond et les bords d'un panier où vient se loger un peptide de 8 à 10 résidus. On appelle ce creux « sillon antigénique » ou « poche de fixation du peptide ».

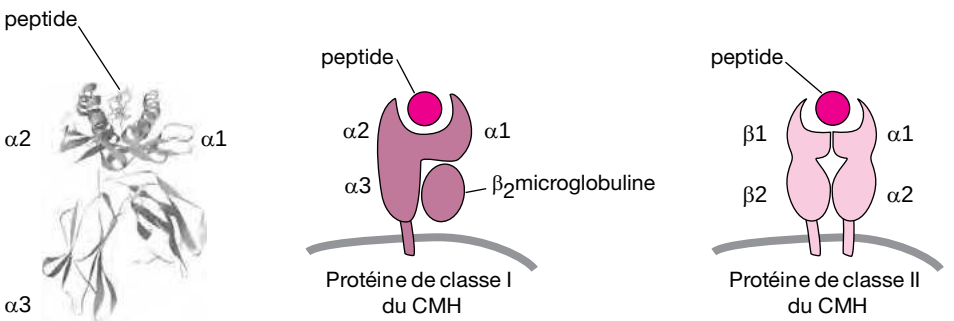


Figure 1 : Structure des protéines du CMH

À gauche structure cristalline de la molécule HLA-B53 (PDB 1a1m) portant un peptide dans son sillon central. Au milieu, schéma d'une molécule de classe I dont la chaîne α est associée à la β2-microglobuline. À droite, schéma d'une molécule de classe II constituée de chaînes α et β.

Les molécules de classe II du CMH

Fiche 191

Les protéines de classe II du CMH ne sont exprimées que par quelques types cellulaires : les cellules présentatrices d'antigènes. Celles-ci, principalement les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B, peuvent capturer des antigènes à l'extérieur par endocytose ou phagocytose. Ces antigènes exogènes capturés seront présentés sur les molécules de classe II du CMH.

Les molécules de classe II sont constituées de deux chaînes : α et β. Les domaines α2 et β2, proche de la membrane, sont de type immunoglobuline et les domaines α1 et β1 forment un sillon antigénique constitué d'un fond en feuillet β et d'un bord en hélice α. Les peptides accueillis font de 13 à 18 acides aminés.

2. Spécificité et variabilité des protéines du CMH

Chaque molécule du CMH ne porte qu'un peptide à la fois. Néanmoins de très nombreux peptides différents peuvent être portés par une molécule donnée du CMH qui a une spécificité large. Chaque cellule exprime plusieurs sortes de molécules du CMH et présente donc à sa surface de très nombreux peptides différents. Les protéines du CMH sont rapidement recyclées et reflètent l'état de la cellule (protéine de classe I) ou de son environnement (protéines de classe II sur les cellules présentatrices d'antigènes).

L'ensemble des molécules HLA exprimées par un individu est parfois appelé carte d'identité moléculaire car la variabilité est énorme entre individus. En effet, ce locus du génome est polygénique, il y a plusieurs gènes de classe I (gènes A, B et C) et plusieurs gènes de classe II (DP, DQ, DR avec un gène α et β à chaque fois). Les gènes de classe I et II s'expriment tous et sont co-dominants, c'est-à-dire que les 2 allèles s'expriment. Chaque personne produit donc 6 protéines de classe I et jusqu'à 12 protéines de classe II. Enfin, il y a dans l'ensemble de la population une diversité extrême appelée polymorphisme des allèles du CMH (plusieurs milliers pour HLA-A et B, des centaines pour la classe II). Cette diversité est restreinte au niveau du sillon antigénique. Il est ainsi quasiment impossible de trouver dans la population non consanguine une personne ayant le même profil HLA.

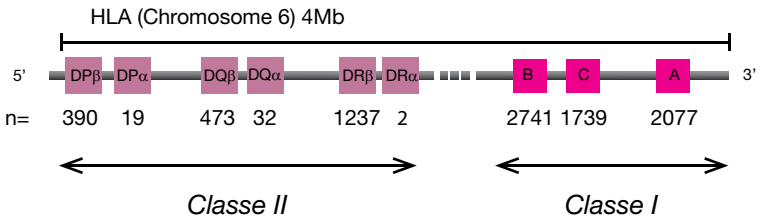


Figure 2 : Carte simplifiée du locus du CMH

Les principaux gènes de classe I et II sont représentés avec une indication du nombre d'allèles connus dans la population (d'après http://hla.alleles.org/oct.2014).

fiche 188 Le développement des lymphocytes et l'apprentissage du soi cellulaire

L'acquisition des récepteurs spécifiques des lymphocytes se fait au cours d'une étape de développement dans les organes lymphoïdes primaires. Les lymphocytes auto-réactifs sont ensuite éliminés dans un processus d'éducation au soi.

1. Génération du répertoire des lymphocytes T

Les progéniteurs lymphoïdes T fabriqués à partir des cellules souches dans la moelle osseuse migrent vers le thymus. Ils n'expriment ni CD4 ni CD8 et sont donc appelés doubles négatifs DN, ils entrent alors en prolifération intense.

Fiche 186

Après cette étape de prolifération, il y a des tentatives de réarrangement au locus de la chaîne β du TcR sur l'un puis l'autre allèle. La présence d'une chaîne β du TcR à la membrane cellulaire marque la fin des recombinaisons sur ce locus par exclusion allélique. Si les deux réarrangements sont non productifs, la cellule meurt par apoptose.

Fiche 139

Les cellules qui expriment une chaîne β deviennent doubles positifs DP $CD4^+$ $CD8^+$ et font des recombinaisons au locus α du TcR. L'expression d'une chaîne α à la surface entraîne la fin des recombinaisons, son absence entraîne l'apoptose.

À ce stade, les lymphocytes DP du thymus expriment un TcR fonctionnel. Les TcR sont sans contrainte et peuvent reconnaître toutes sortes de molécules, la diversité du répertoire T est estimée à 10^{15} possibilités.

2. L'apprentissage du Soi cellulaire

Fiche 185

Les lymphocytes T matures circulants obéissent à des contraintes et ne reconnaissent que des peptides étrangers présentés par des molécules du CMH. Une sélection va donc avoir lieu parmi l'ensemble des clones produits par recombinaison génétique, on l'appelle « éducation des lymphocytes T ».

La sélection positive : restriction au CMH

Fiche 187

Dans la zone superficielle du thymus, le cortex, les lymphocytes DP entrent en contact avec les cellules épithéliales corticales qui expriment des molécules de classe I et II du CMH, marqueurs du Soi. Les lymphocytes dont le TcR n'interagit pas du tout avec ces protéines du CMH subissent l'apoptose. Les lymphocytes restants sont donc restreints au CMH du Soi. Cela a été démontré par R. Zinkernagel grâce à des greffes de moelle et de thymus sur des souris, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1996. Il s'agit d'une sélection positive car l'existence d'une interaction permet la survie des lymphocytes.

La sélection négative : tolérance au soi

Les lymphocytes survivants de la sélection positive progressent vers la zone plus profonde de la médulla et deviennent simple positif (SP), soit $CD4^+$, soit $CD8^+$. Ils subissent une sélection négative au contact des cellules de l'environnement (DC résidentes et cellules épithéliales de la medulla) ayant échantillonné les protéines de l'organisme. Les lymphocytes auto-réactifs, dont les récepteurs T interagissent trop fortement avec des complexes peptide-protéines du CMH du Soi, sont éliminés par apoptose. Cette sélection négative induit une tolérance centrale aux antigènes du Soi.

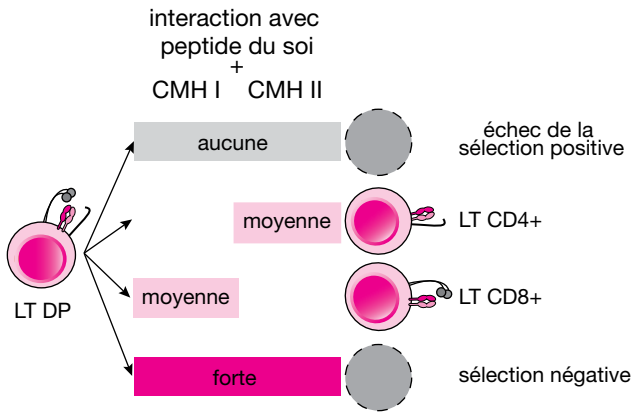


Figure 1 : Devenir des lymphocytes T double positifs en fonction des interactions avec les complexes peptides + CMH.

Les lymphocytes T simple positif qui ont survécu à l'éducation dans le thymus représentent à peine 2 % des précurseurs avant les réarrangements génétiques. Ils ont une affinité moyenne pour le CMH du soi et pourront reconnaître des peptides étrangers portés par des molécules de CMH du soi, c'est-à-dire le « soi modifié ». Ces lymphocytes quittent le thymus pour la circulation sanguine et lymphatique.

3. Le développement des lymphocytes B

Chez l'Homme, les lymphocytes B font entièrement leur développement dans la moelle osseuse. Les progéniteurs lymphoïdes B (pro-B), après prolifération, subissent des réarrangements au locus de la chaîne lourde des immunoglobulines. Dès qu'une chaîne lourde est exprimée, les recombinaisons stoppent à ce locus (exclusion allélique) et la cellule passe au stade pré-B.

Fiche 186

Au stade pré-B, il y a des ré-arrangements d'abord au locus kappa puis au locus lambda jusqu'à expression en surface d'une chaîne légère d'immunoglobuline qui bloque toute recombinaison ultérieure. À ces stades pro-B et pré-B, l'absence d'expression de chaînes fonctionnelles (chaîne lourde et légère, respectivement) entraîne la mort cellulaire par apoptose.

Les lymphocytes B immatures ainsi produits expriment un BcR fonctionnel, l'immunoglobuline membranaire est de type IgM. Les cellules subissent alors une sélection négative : toutes celles reconnaissant des antigènes du Soi exprimés dans la moelle osseuse sont éliminées.

Fiche 194

La dernière étape est alors la co-expression en surface d'IgM et d'IgD grâce un épissage de l'ARN réarrangé de la chaîne lourde qui utilise soit Cμ soit Cδ. Le lymphocyte B est alors mature, il quitte la moelle osseuse pour la circulation sanguine et lymphatique.

fiche 189 L'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T

Les protéines du CMH sont des molécules de présentation qui permettent d'exposer des peptides à la surface des cellules. Selon l'origine des antigènes, plusieurs voies de fragmentation et de chargement des peptides existent, il s'agit des voies d'apprêtement des antigènes.

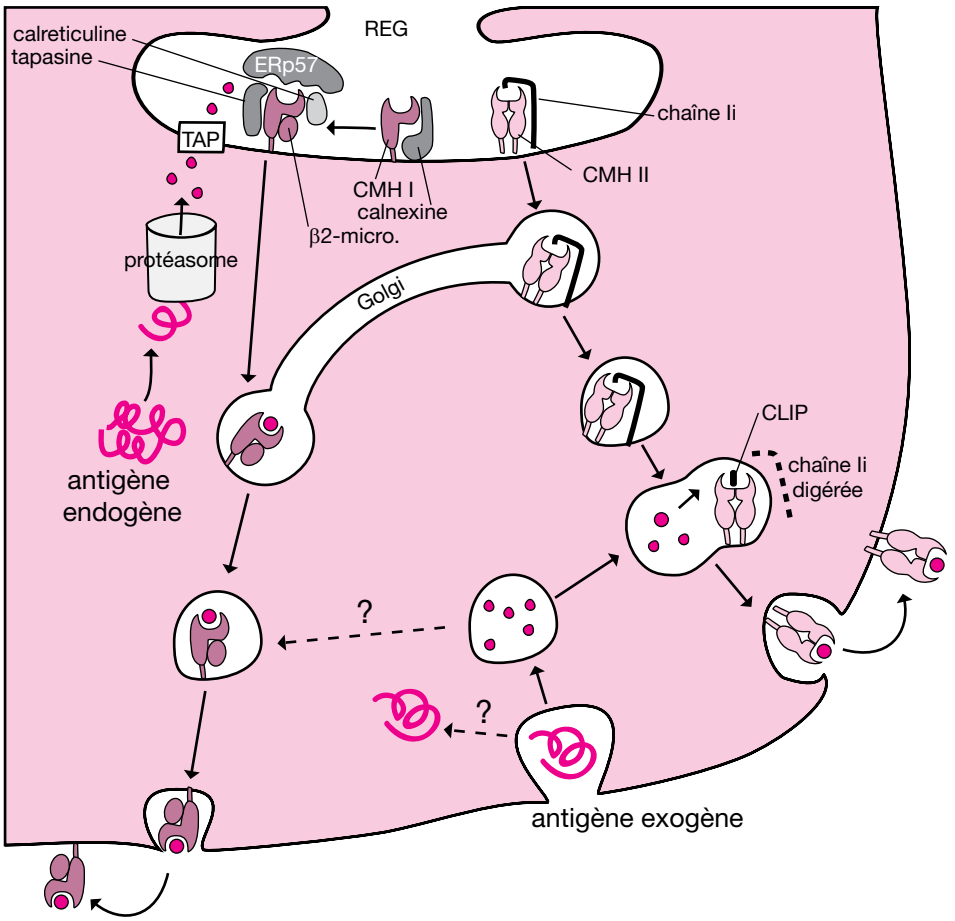


Figure 1 : Les voies d'apprêtement des antigènes

1. La voie cytosolique d'apprêtement des antigènes endogènes

Les protéines normales du cytosol ainsi que les protéines de pathogènes intracellulaires (virus, bactéries) sont dégradées en peptides d'environ 9 acides aminés par le protéasome. Ces fragments entrent dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) par transport actif *via* TAP. Les protéines du CMH, transmembranaires, sont synthétisées dans le REG. La chaîne α de classe I se replie correctement grâce au chaperon calnexine puis s'associe à la β2-microglobuline en présence de calréticuline, d'ERp57 et de la Tapasine. Cette dernière permet le rapprochement avec TAP. Ainsi les peptides transloqués vont pouvoir s'insérer dans le sillon antigénique des protéines de classe I du CMH.

Fiches 89 et 93

Le complexe CMH I + peptide est ainsi stabilisé et peut être exporté jusqu'à la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi.

2. La voie endocytaire d'apprêtement des antigènes exogènes

Les protéines de CMH II également formées dans le REG ne peuvent pas charger de peptides endogènes car leur sillon central est occupé par une chaîne invariante (Ii, CD74). Ce complexe est exporté vers les endosomes précoces *via* le Golgi. La chaîne invariante est progressivement dégradée en un peptide invariant, CLIP. Les antigènes exogènes capturés par les cellules présentatrices par endocytose ou phagocytose sont fragmentés dans les endosomes puis lysosomes mettant en œuvre des protéases à pH acide. Les vésicules enrichies en protéine de classe II fusionnent finalement avec les endo-lysosomes et il y a échange entre CLIP et les peptides exogènes ce qui permet l'export des complexes CMH II + peptide à la membrane des cellules présentatrices d'antigènes.

3. La présentation croisée dans les cellules dendritiques

Dans certains cas, les cellules dendritiques sont capables de présenter des antigènes exogènes sur des protéines de classe I du CMH. Les mécanismes sont encore incertains : soit le contenu de certains endosomes retourne dans le cytosol et suit alors la voie endogène du CMH I, soit il y a échange entre des peptides exogènes et des peptides déjà chargés sur les molécules de classe I. Cela permet aux cellules dendritiques de présenter des peptides issus du même antigène sur les protéines de classe I et II.

4. Les rôles du CMH

Les protéines du CMH interviennent à trois moments des réponses immunitaires.

- Lors de la sélection des lymphocytes T dans le thymus, les antigènes du Soi sont pré sentés aux lymphocytes en développement ce qui induit la tolérance au Soi.
- Les protéines du CMH I fournissent des signaux inhibiteurs aux lymphocytes NK ce qui empêche la destruction des cellules normales.
- Les lymphocytes T matures circulants peuvent interagir avec leur antigène spécifique puis être activés. Comme le co-récepteur CD4 interagit avec le domaine β2 des protéines de CMH II, les LT CD4$^+$ reconnaîtront des peptides exogènes présentés sur les protéines de classe II des cellules présentatrices d'antigènes. Le co-récepteur CD8 interagit lui avec le domaine α3 des protéines de CMH I, ainsi les LT CD8$^+$ reconnaîtront des peptides endogènes présentés sur les protéines de classe I.

Fiches 188, 190, 191, 193

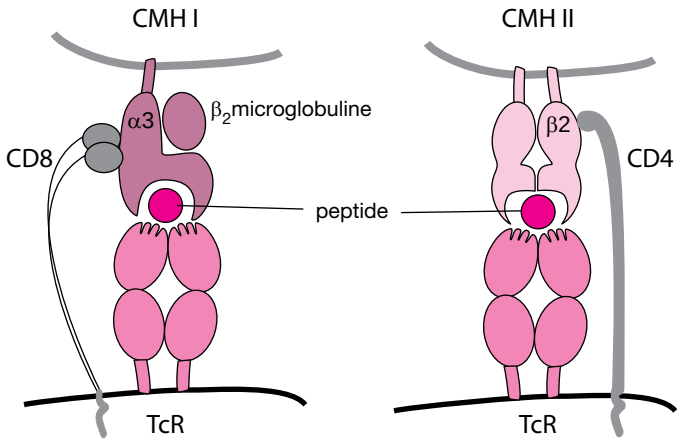
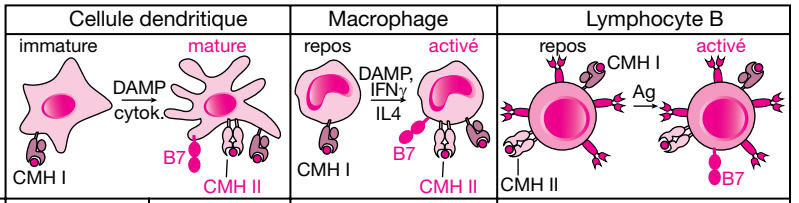


Figure 2 : Interaction CMH-peptide-TcR et co-récepteurs

fiche 190 Les cellules présentatrices d'antigènes

Fiches 178, 187

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont par définition des cellules présentant les antigènes aux lymphocytes T (LT) CD4+ et exprimant donc les protéines de classe II du CMH. Les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B sont les principales et sont nommées CPA professionnelles. Ces cellules peuvent activer des LT CD4+ dans des organes lymphoïdes secondaires tels que rate, ganglions lymphatiques et tissu lymphoïde associé aux muqueuses.
Ces trois types de CPA ont chacune des caractéristiques propres.



	Cellule dendritique		Macrophage		Lymphocyte B	
Capture des Ag	Endocytose phagocytose	-	Phagocytose		Endocytose du récepteur à l'Ag	
Expression du CMH II	- (Intracellulaire)	+++	-	++	++	++
Co-stimulation	-	+++	-	++	-	++
Activation des LT	Anergie des LT	LT naïf LT effecteur LT mémoire	-	LT effecteur LT mémoire	LT effecteur LT mémoire	LT naïf LT effecteur LT mémoire

Figure 1 : Caractéristiques des CPA professionnelles

1. Cellules dendritiques

Bien qu'observées au XIXe siècle par Langerhans, ces cellules aux nombreux pseudopodes tels des dendrites sont restées méconnues des immunologistes jusqu'aux années 1980 où elles sont redécouvertes par R. Steinman (Prix Nobel 2011). Elles constituent un groupe hétérogène de cellules, avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles diverses. Les DC conventionnelles résidant dans les tissus et les organes lymphoïdes existent sous forme immature ou mature, par ailleurs d'autres cellules de l'immunité peuvent se différencier en cellules dendritiques et sont considérées comme des précurseurs (monocytes et cellules productrices d'interférons).

Cellules dendritiques immatures

Les cellules dendritiques immatures sont des sentinelles de l'immunité innée abondantes dans les organes en contact avec l'extérieur. Elles se spécialisent selon leur localisation : cellules de Langerhans dans l'épiderme, cellules interstitielles dans le derme et les tissus, cellules voilées circulant dans le sang et la lymphe.

Ces cellules sentinelles ont un fort pouvoir de capture d'antigènes par endocytose, pinocytose et phagocytose et peuvent donc échantillonner leur environnement. Par contre, la majorité des protéines de CMH II restent séquestrées dans des vésicules intracellulaires et les cellules expriment peu de molécules de co-stimulation. Si elles rencontrent un LT CD4+ naïf à ce stade, elles ne pourront pas l'activer.

Fiche 191

Ces cellules dendritiques immatures expriment de très nombreux récepteurs de reconnaissance de motif des pathogènes (PRR). Lorsque ces récepteurs seront stimulés par des signaux associés aux pathogènes (PAMP), des signaux de dangers (DAMP) ou en contexte inflammatoire, la cellule pourra devenir mature.

Fiche 179

Cellules dendritiques matures

Pour devenir mature, la cellule dendritique perd sa capacité de capture des antigènes et se met à exprimer de fort taux de CMH II extracellulaire et de molécules de co-stimulation tels que B7 et CD40. Elle devient très mobile et migre vers les organes lymphoïdes secondaires où elle entre en contact avec des lymphocytes. Elle libère des cytokines dont la nature dépend du type de PRR engagé. Elle oriente ainsi la différenciation des LT $CD4^+$ et le type de réponse immunitaire.

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles les plus efficaces, elles peuvent activer des LT $CD4^+$ et $CD8^+$, qu'ils soient naïfs ou mémoire.

2. Monocytes et macrophages

Les monocytes sanguins peuvent migrer dans les tissus où ils se spécialisent en macrophages : macrophages alvéolaires dans les poumons, histiocytes dans les muqueuses, cellules de Kupffer dans le foie, cellules mésangliales dans les reins, cellules microgliales dans le cerveau et ostéoclastes dans les os.

Ces cellules sont les éboueurs de l'organisme et ont la caractéristique de phagocyter des particules de très grande taille, telle que des cellules eucaryotes. Elles jouent un rôle très important dans la surveillance des tissus sains et le remodelage des tissus abîmés. Au repos, elles expriment très peu de CMH II et de molécules de co-stimulation et ne peuvent pas activer de LT. En contexte infectieux, sous l'effet de signaux de danger ou de cytokines comme l'IFNγ ou l'interleukine 4 (activation alternative), les macrophages sont activés et deviennent capables de ré-activer des LT effecteurs ou mémoires. Ils n'expriment généralement pas suffisamment de molécules de co-stimulation pour être efficace sur les LT naïfs.

3. Lymphocytes B

La caractéristique principale des lymphocytes B comme cellules présentatrices d'antigènes est qu'ils expriment un récepteur spécifique d'un antigène (BcR) qui permet une interaction de haute affinité avec de petites molécules solubles. Ainsi les LB sont les seuls à pouvoir présenter des toxines, des allergènes.

Au repos, les LB n'expriment pas de molécules de co-stimulation et ne peuvent pas activer des LT naïfs, mais ils expriment des protéines du CMH II et peuvent activer des LT effecteurs ou mémoires.

Au-delà d'un certain seuil, le contact avec l'antigène spécifique du LB conduit à sa pré-activation et à l'expression de B7. Le LB pré-activé peut activer des LT $CD4^+$ naïfs, et pourra être totalement activé en retour.

Fiche 194

fiche 191 Les LT CD4+ effecteurs dirigent les réponses immunes adaptatives

Les lymphocytes T CD4+ qui n'ont encore jamais rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques sont dits naïfs. Ils circulent dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires. Ces derniers sont des lieux de rencontre privilégiés avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) les plus efficaces, les cellules dendritiques matures. Le dialogue entre ces cellules va permettre la différenciation des LT CD4+ en différents LT effecteurs (LThelper, LTh) qui orienteront les réponses immunes adaptatives *via* des cytokines.

Fiche 190

1. Activation des LT CD4+

Les cellules dendritiques (DC) apportent aux LT CD4+ les antigènes captés en périphérie ou présentent des antigènes solubles captés au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Elles se déplacent dans la zone paracorticale (zone T) des organes lymphoïdes secondaires et interagissent d'abord transitoirement avec les lymphocytes T *via* des molécules d'adhérence (figure 1).

Premier signal antigène spécifique

Cette première interaction faible permet l'analyse du signal spécifique de l'antigène par le TcR de chaque lymphocyte. L'interaction ternaire entre le TCR, le peptide et la molécule de CMH II est renforcée par l'interaction du co-récepteur CD4 avec les parties conservées de la chaîne β du CMH II. Ce premier signal d'empreinte conduit à un renforcement de l'expression des molécules d'adhérence, donc à une interaction plus forte mais n'est pas suffisant pour l'activation.

Fiche 185

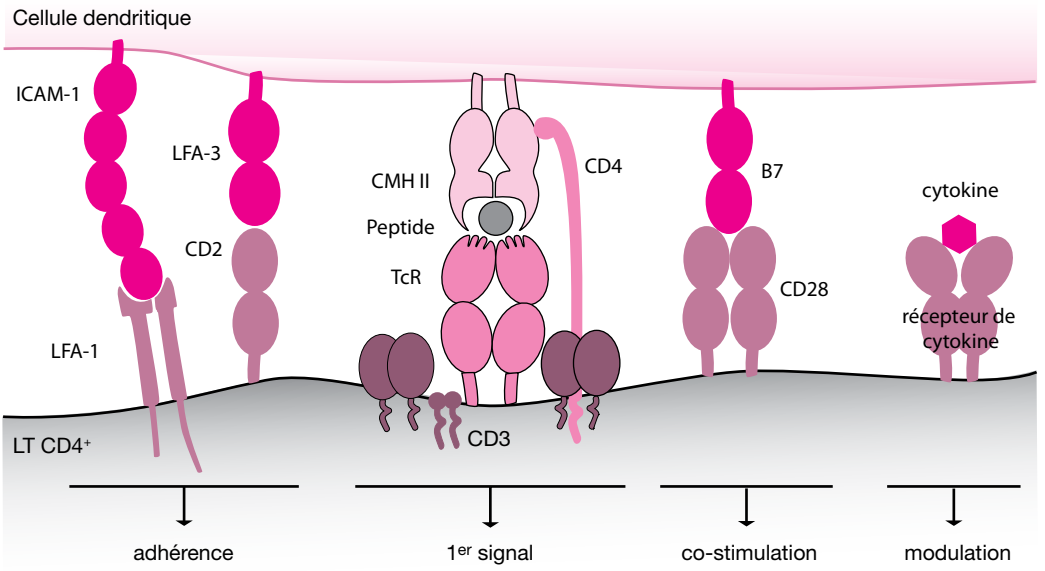


Figure 1 : Étapes de l'activation des LT CD4+

Signal de co-stimulation

Un signal de danger se matérialise par l'expression de molécules de co-stimulation sur les CPA professionnelles activées. Les principales molécules de co-stimulation appartiennent à la famille B7 (CD80/CD86) et interagissent avec CD28 exprimé constitutivement par les LT. En l'absence de ce second signal, le LT devient anergique, il ne pourra jamais être activé par la suite et sera rapidement éliminé.

2. Expansion clonale et différenciation en LT Helper

Lorsque le signal d'empreinte et le signal de co-stimulation sont reçus par le LT CD4+, celui-ci est entièrement activé. Il commence à exprimer des récepteurs inhibiteurs de la famille de CD28 qui termineront la réponse. Il exprime CD40-ligand, le récepteur à l'IL2 et libère de l'IL2 ce qui lui permet de proliférer. Cette expansion clonale permet d'augmenter le nombre de LT efficaces vis-à-vis de l'antigène. Une partie de ces clones se transforme en LT mémoire et le reste se différencie en LT auxiliaire (*Helper*) effecteur.

Fiche 196

Le rôle de ces LTh est de produire de grandes quantités de cytokines, notamment IL2, IL3, GM-CSF. Mais selon le dialogue moléculaire avec la CPA, différents cocktails de cytokines seront libérés et influenceront la réponse immunitaire.

Fiche 192

- Les Th1 inflammatoires obtenus en présence d'IL12 induisent une inflammation et une cytotoxicité cellulaire efficace contre les cellules tumorales ou infectées.
- Les Th2 inhibés par l'IL12 et induits par l'IL4 provoquent une immunité à médiation humorale passant par les anticorps.
- Les Th17 attirent des neutrophiles et sont de puissants inducteurs de l'inflammation. Ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies.
- Les T régulateurs limitent l'activation des lymphocytes T naïfs et réduisent les réponses immunitaires inappropriées (auto-immunité).

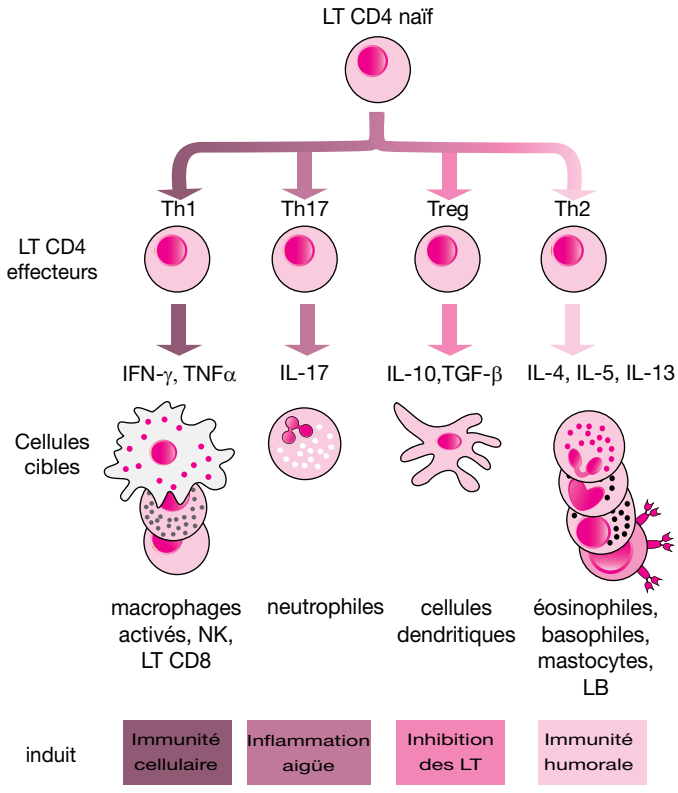


Figure 2 : Différence entre les LTh

fiche 192

Les cytokines

S. Cohen (Prix Nobel 1986) a été le premier en 1974 à nommer cytokines un groupe de glycoprotéines produites par des cellules immunitaires et modulant l'activité de cellules inflammatoires.

1. Propriétés générales des cytokines

Les cytokines sont de petites glycoprotéines (15-25 kD) solubles qui sont majoritairement secrétées par des cellules de l'immunité innée ou adaptative. Elles ne sont pas stockées (sauf IL1 et TNFα dans les macrophages) mais au contraire induites après exposition à l'antigène ou aux signaux de danger. De même l'expression des récepteurs est strictement régulée.

Les cytokines sont très rapidement dégradées et ont une durée de vie très courte, elles agissent donc plutôt localement (action autocrine et paracrine) et à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Ce sont les principales molécules de communication du système immunitaire. Chaque cytokine peut être produite par plusieurs types cellulaires, et agir sur différentes cellules cibles, ce qui les distingue des hormones. Elles ont des fonctions multiples (pléïtropie) et redondantes entre elles.

2. Les familles de cytokines et leurs récepteurs

Interleukines (IL), facteur de croissance des colonies (CSF), facteur nécrosant des tumeurs (TNF), interférons (IFN), chimiokines, les noms des cytokines donnent un aperçu de leurs fonctions mais la classification est basée sur la structure de leurs récepteurs. Ceux-ci peuvent parfois être produits sous forme soluble et agir comme des inhibiteurs spécifiques.

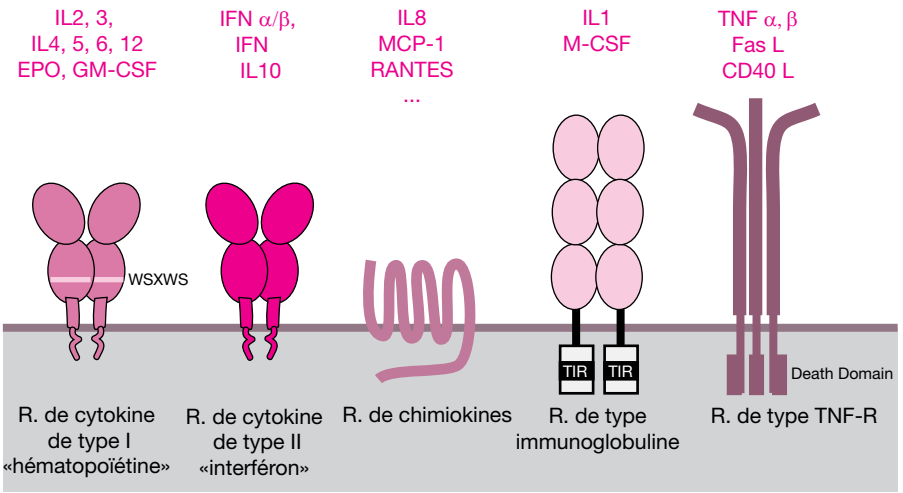


Figure 1 : Les types de récepteurs de cytokines

Récepteurs de cytokines de type I (hématopoïétine du type IL2). Dans cette très grande famille, les récepteurs contiennent une séquence conservée WSXWS. Ce

sont des di ou trimères qui partagent une sous-unité de transduction du signal ce qui explique redondance et antagonisme fonctionnels dans des sous-groupes.

Récepteurs de cytokines de type II (Interférons). Les récepteurs ont une structure tridimensionnelle proche du type 1 sans la séquence conservée. 27 cytokines différentes se lient à ces récepteurs.

Récepteurs de chimiokines. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G. Les chimiokines contrôlent l'activation et le trafic des leucocytes. Elles contiennent des cystéines conservées séparées ou pas par un acide aminé quelconque (sous-groupes CXC et CC).

Fiche 127

Récepteurs de la superfamille des Ig (hématopoïétine du type IL1). Le domaine de transduction du signal est identique à celui des TLR (TIR pour *Toll/IL1 Receptor*).

Récepteurs des TNF. Ce sont des trimères. Une partie d'entre eux contient des domaines de mort (*death domain*) et induit l'apoptose alors que l'autre partie contient des domaines d'activation.

Tableau 1 : Quelques cytokines importantes ou représentatives

Molécules	Produites par	Principaux effets
EPO	Rein, foie	Production des globules rouges
GM-CSF	Macrophages, LTH	Croissance des cellules souches hematopoiétiqes, production de macrophages et neutrophiles
IFNγ	LTH1, CTL, NK	Active les macrophages, augmente expression du CMH, inhibe prolifération des LTH2
IL 1	Macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales	Active macrophages et neutrophiles ; induit la fièvre et les PPA, induit une vasodilatation, stimule l'hématopoïèse, active les lymphocytes T
IL 2	LTH	Prolifération des lymphocytes T, stimule les NK
IL 3	Macrophages, LTH	Croissance des cellules souches hématopoïétiques
IL 4	LTH2, mastocytes	Costimulation et prolifération des LB, induit la production d'IgE, inhibe la production d'IL12
IL 5	LTH2, mastocytes	Prolifération des éosinophiles
IL 6	Macrophages, cellules endothéliales LTH2	Induit la fièvre et les PPA, induit une vasodilatation, stimule l'hématopoïèse, maturation et prolifération des LB, stimule la sécrétion d'anticorps
IL 10	LTH2, macrophages	Inhibe la production de cytokines par LTH1 et macrophages, inhibe l'expression du CMH II, augmente la prolifération et différenciation des LB
IL 12	Macrophages, cellules dendritiques, LB	Induit prolifération et différenciation des LTH1, active les NK, augmente la production d'IFNγ
TGFβ	LB, macrophages, mastocytes	Attire les macrophages, inhibe la prolifération cellulaire, favorise la cicatrisation
TNFα	Macrophages	Active macrophages et neutrophiles, induit la fièvre et les PPA, induit une vasodilatation, effet cytotoxique
IL 8 = CXCL8		Attire les neutrophiles
MCP1 = CCL2		Attire les monocytes et lymphocytes T

fiche 193 La réponse immune adaptative à médiation cellulaire

Fiche 196

La réponse adaptative à médiation cellulaire est une réponse cytotoxique médiée par les LT CD8+ qui sont activés dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires.

1. Activation et différenciation des LT CD8+

Fiche 191

L'activation des LT CD8+ est très similaire à celle des LT CD4+ avec un premier signal antigène-spécifique et un signal de co-stimulation.

Le signal d'empreinte ou 1er signal implique le TcR des LT CD8+ naïfs qui reconnaît un peptide étranger sur le CMH I d'une cellule dendritique (DC) mature. Il est renforcé par l'interaction du co-récepteur CD8 avec le domaine α3 du CMH I. Les peptides étrangers se retrouvent sur le CMH I des DC soit parce que celles-ci sont infectées par un pathogène intracellulaire, soit parce qu'il y a eu présentation croisée d'un antigène exogène qui est donc présenté sur le CMH II et le CMH I après phagocytose par la DC.

Fiche 189

Les LT CD8+ requièrent beaucoup de signaux de co-stimulation pour être activés, la coopération avec un LT CD4+ de même spécificité antigénique sera donc le plus souvent nécessaire. En effet la DC mature exprime des molécules de co-stimulation type B7 à un taux suffisant pour activer des LT CD4+ et provoquer leur différenciation en LTh1. Ces derniers *via* la libération d'IFNγ et l'interaction CD40/CD40L vont re-stimuler les DC présentant l'antigène spécifique pour leur faire produire plus d'IL12 et exprimer plus de B7. Cela sera alors suffisant pour activer un LT CD8+ naïf qui exprimera le récepteur de l'IL2 et se mettra à proliférer.

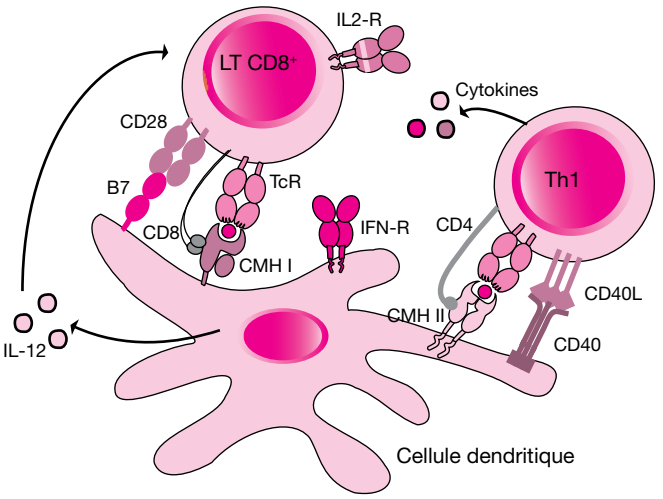


Figure 1 : Ménage à trois entre DC, LT CD8+ et LT CD4+

Ce ménage à trois entre une DC, un Th1 et un LT CD8+ permet donc l'activation de ce dernier et son expansion clonale puis une partie des cellules se différencieront en LT CD8 effecteurs alors que les autres se transformeront en LT mémoires.

2. Les LT CD8⁺ effecteurs, des LT Cytotoxiques

Les LT CD8⁺ effecteurs sont essentiellement des LT Cytotoxiques (LTC). Ils quittent les organes lymphoïdes secondaires et sont attirés par des chimiokines vers les tissus infectés. Là ils scannent les cellules des tissus à la recherche de leurs cellules cibles qui présentent sur le CMH I le peptide ayant déclenché l'activation. Cette simple interaction TcR-peptide-CMH I suffit à déclencher l'arsenal cytotoxique des LTC qui n'ont plus besoin de signal de co-stimulation (comme tous les lymphocytes effecteurs).

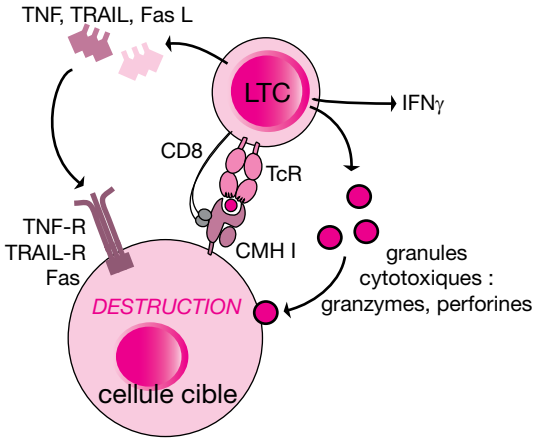


Figure 2 : Destruction des cellules cibles par les LTC

Les LTC ne peuvent détruire que les cellules du Soi, il y a une restriction au CMH comme cela a été montré par R. Zinkernagel et P. Doherty (Prix Nobel 1996). Cette destruction passe par la lyse induite par les perforines et par l'induction de l'apoptose par les granzymes et par le TNF ou Fas ligand exprimés par le LTC. Les cellules voisines non infectées sont protégées car la libération des granules cytotoxiques est hyperpolarisée à la jonction LTC / cellule cible (on parle de protection du spectateur innocent). Après libération des granules, le LTC continue à circuler dans le tissu en quête d'une autre cible jusqu'à la disparition de l'antigène. Les lymphocytes effecteurs entreront alors aussi en apoptose.

Fiche 139

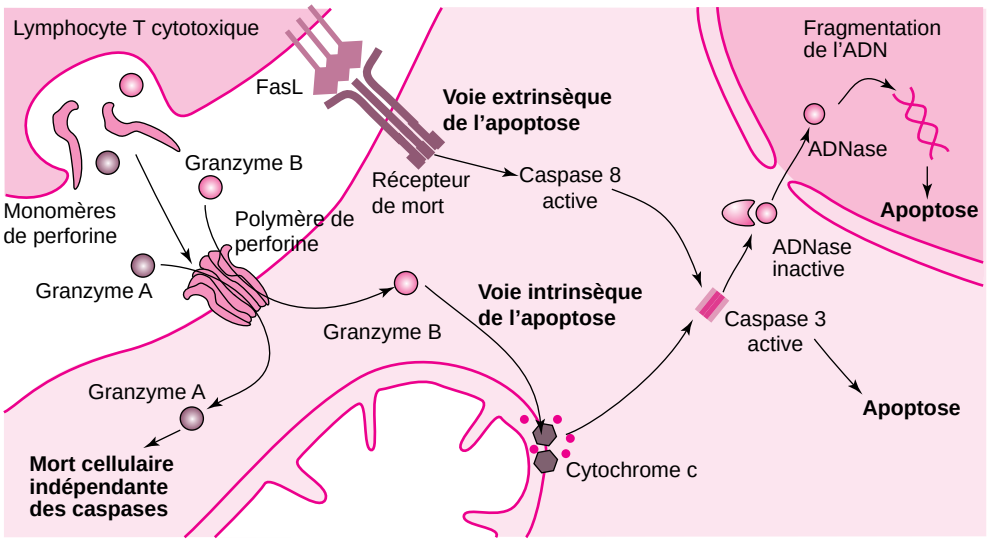


Figure 3 : Mécanisme d'action des lymphocytes T cytotoxiques

fiche 194 La production des anticorps au cours de la réponse humorale

Fiche 185

La réponse adaptative humorale est la cascade d'événements partant de la reconnaissance d'un antigène à la production d'immunoglobulines solubles.

1. Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B produits dans la moelle osseuse circulent ensuite dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires. Ils peuvent reconnaître directement des antigènes dont les épitopes sont accessibles en surface.

Premier signal antigène-dépendant

Fiches 187, 201

Lorsqu'un nombre suffisant de récepteurs est engagé dans une interaction spécifique avec l'antigène, cela conduit à une pré-activation du LB. L'antigène est capturé par endocytose du BcR, fragmenté dans les endosomes et présenté sur les molécules de classe II du CMH. L'expression de molécules de co-stimulation de type B7 est induite à la surface du LB qui peut alors présenter les antigènes aux LT CD4+.

Lorsque le LB est ainsi pré-activé, il prolifère modérément et sécrète des anticorps de type IgM (figure2). Les sucres et lipides antigéniques présents à la surface des pathogènes sont des épitopes très répétés qui induiront une stimulation suffisante pour cette production d'IgM, ils sont appelés antigènes T-indépendants (TI). Par contre, les protéines, qui sont bien moins souvent répétées, nécessitent la présence de LT CD4+ activés pour déclencher la production d'anticorps, ils sont appelés antigènes T-dépendants (TD).

Confirmation par les LT CD4+ (LTh2)

Fiche 191

Les LB pré-activés migrent dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires. En tant que CPA efficaces, ils peuvent activer des LT CD4+ naïfs ou interagir avec les LTh2 déjà activés par des cellules dendritiques.

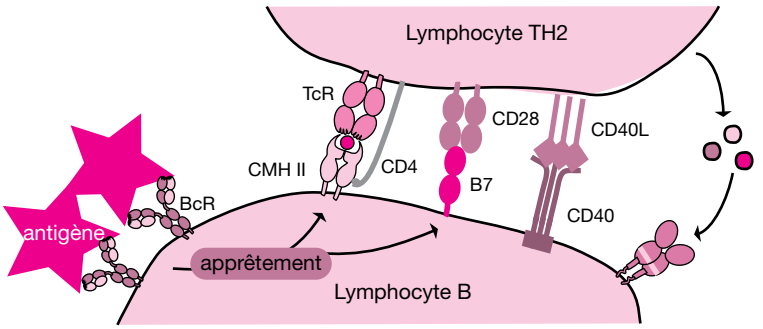


Figure 1 : Coopération LB / LT pour le déclenchement d'une réponse humorale

Le LT CD4+ reconnaît le LB par l'intermédiaire des interactions TcR-peptide-CMH II et CD4/CMH II et le LB délivre un second signal ou signal de co-stimulation *via* l'interaction B7/CD28. Il se forme alors un « conjugué » cellulaire entre le LB et le LT. Le LTh2 exprimant CD40L induit l'expression de récepteurs de cytokines par le LB exprimant CD40. Les cytokines produites par le LTh2 permettent la prolifération du LB activé, son expansion clonale et sa différenciation en LB mémoire ou LB producteur d'anticorps, le plasmocyte.

2. Production de différentes classes d'anticorps

Seuls les LB reconnaissants des antigènes T-dépendants et stimulés par des LTh2 peuvent produire différentes classes d'anticorps et produire des LB mémoires.

Maturation d'affinité

Après coopération avec le LTh2, les LB activés retournent dans la zone B en périphérie des organes lymphoïdes secondaires. Ils prolifèrent intensément sous l'effet de l'IL4 et 5, et forment des centres germinatifs. Au cours de cette expansion clonale, le taux de mutation dans la partie d'ADN codant pour les domaines variables du BcR est 1 000 fois plus élevé que la normale, provoquant de légères modifications d'affinité pour l'antigène. Seuls les clones les plus efficaces pour lier l'antigène retenu sur des cellules dendritiques folliculaires recoivent des signaux de survie. Ainsi l'affinité des BcR augmente au cours du temps.

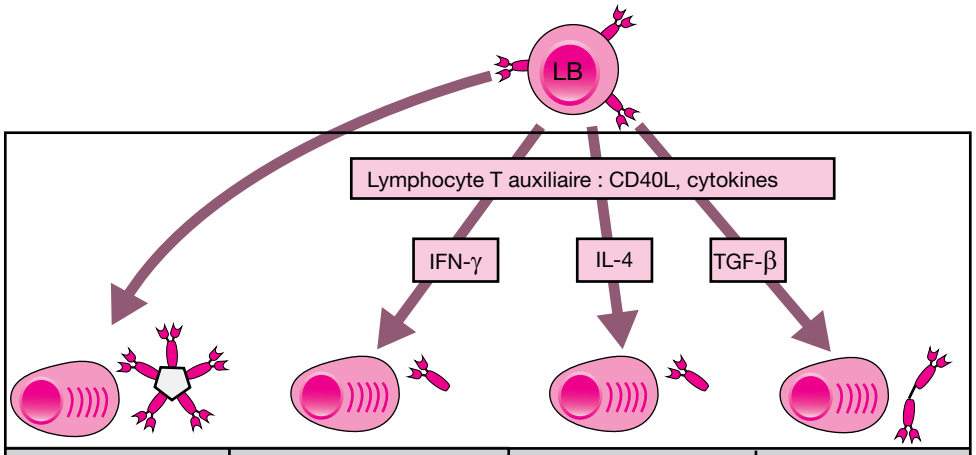
Commutation de classe

Il peut aussi y avoir des ré-arrangements géniques dans la portion codant la partie constante du BcR et définissant son isotype M, D, G, E ou A. La commutation de classe est une recombinaison avec perte de matériel génétique qui est contrôlée par le LTH et les cytokines produites.

Fiches 186, 195

Après les étapes de prolifération qui incluent la maturation d'affinité et la commutation de classe, les LB se différencient soit en LB mémoires qui circulent dans la lymphe, soit en plasmocytes producteurs d'anticorps qui peuvent persister quelques années dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans la moelle osseuse.

Fiche 197



IgM	IgG	IgE	IgA
- Premières Ig libérées - Sécrétées comme pentamères - Agglutinines - Activation du complément	- 80% des Ig du sérum - Opsonisation - Protection du foetus - Activation du complément - Neutralisation - ADCC	- Activation des éosinophiles (parasites) - Sensibilisation des mastocytes et basophiles (allergies)	- Monomères dans le sérum - Dimères dans les sécrétions des muqueuses - Neutralisation

Figure 2 : Les différentes classes d'anticorps sécrétés

fiche 195 Le rôle des anticorps dans les mécanismes de défense

Les anticorps spécifiques d'un antigène donné sont inexistants avant l'exposition à cet antigène (seuls existent les immunoglobulines membranaires des BcR), mais après sélection clonale par l'antigène et production des anticorps solubles, ceux-ci vont mobiliser toutes les ressources du système immunitaire pour éliminer le pathogène et prévenir les ré-infections.

1. Fab et Fc, 2 parties aux fonctions complémentaires

R. R. Porter (Prix Nobel 1972 avec G. Edelman) a décrit l'anticorps comme un Y dont les branches sont les Fab liant l'antigène et la base le Fc déterminant les propriétés fonctionnelles des anticorps.

Fiche 185

Le Fab : site de liaison à l'antigène

En fonction des séquences en acides aminés des domaines V_H et V_L inclues dans le Fab (*fragment, antigen binding*), l'immunoglobuline pourra établir un ensemble de liaisons faibles avec l'épitope. La somme des énergies de ces liaisons va définir l'affinité de l'anticorps pour l'antigène, c'est-à-dire la facilité et la force de la liaison Fab/épitope, mesurée par une constante d'affinité Ka de l'ordre de 10^5 à 10^{10} M.

L'avidité prend en compte le nombre d'épitopes liés par un anticorps, 2 dans le cas général (IgG, IgD et IgE), 4 ou 10 pour les anticorps multimériques IgA et IgM.

Le Fc détermine la distribution et les partenaires fonctionnels de l'anticorps

Fiche 194

Le fragment cristallisable Fc est constitué de domaines C_H et constitue l'isotype, ou la classe, de l'immunoglobuline. En fonction de l'exon utilisé (Cμ, Cδ, Cγ, Cε, Cα) après commutation de classe, les propriétés de l'anticorps IgM, D, G, E ou A sont différentes car il existe des récepteurs de partie Fc (FcR) pour chaque isotype.

- La distribution des anticorps dépend de la présence de FcR sur les barrières anatomiques à franchir. Ainsi seules les IgG traversent la barrière placentaire alors que les IgA dimériques traversent les barrières épithéliales et se retrouvent dans les sécrétions des muqueuses.

Fiche 180

- Le composant C1q du complément peut être activé en présence de complexes immuns (antigène-anticorps) mais uniquement lorsqu'il s'agit d'une IgM ou de plusieurs IgG proches à la surface du pathogène.
- Il existe des FcR spécifiques d'isotypes sur certaines cellules effectrices de l'immunité innée ce qui renforce l'activation de ces cellules. Les FcγR sur les cellules phagocytaires, les NK, les DC et les mastocytes, lient les complexes contenant des IgG. Les complexes immuns à IgE sont reconnus par les FcεR sur les basophiles, éosinophiles et mastocytes. Les complexes immuns à IgA sont capturés par les FcαR sur les phagocytes.

2. L'anticorps, effecteur et adaptateur des réponses immunes

Les anticorps sont majeurs dans la réponse humorale contre les pathogènes extracellulaires mais ils sont aussi importants au cours de la réponse contre les pathogènes intracellulaires.

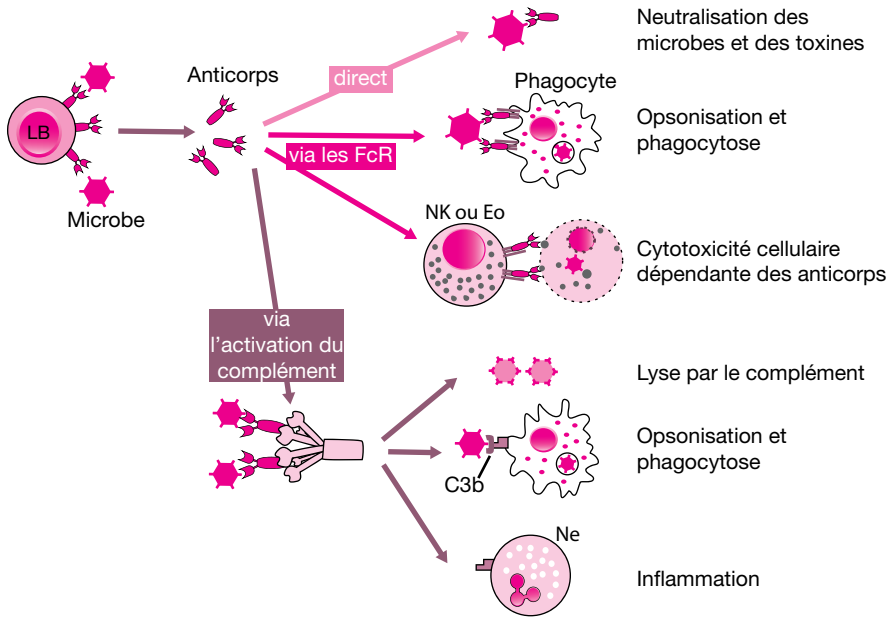


Figure 1 : Rôle des anticorps pour la destruction des pathogènes

Neutralisation ou agglutination des pathogènes et des toxines

La formation de complexes antigène/anticorps (complexes immuns) empêche les pathogènes intracellulaires d'infecter leurs cellules cibles ou empêche les toxines d'exercer leurs effets.

Opsonisation et détoxification

Les anticorps, en synergie avec le complément, augmentent la phagocytose des particules qu'ils recouvrent. De même les antigènes solubles piégés dans des complexes immuns sont ensuite éliminés dans la rate après capture *via* des récepteurs du complément exprimés sur les globules rouges.

Fiche 183

Cytotoxicité cellulaire induite par les anticorps (ADCC)

Les cellules possédant des FcR sont activées par les complexes immuns. Les NK déversent leurs granules cytotoxiques sur des cellules recouvertes d'IgG et la production de radicaux libres ou de TNF sera exacerbée chez les neutrophiles et les macrophages. Les IgE activent les éosinophiles qui libèrent des neurotoxines lors de réponses antiparasitaires. La fixation des complexes immuns sur les récepteurs Fc provoque aussi la libération d'histamine par les mastocytes et les basophiles lors de réponses allergiques.

Fiche 184

Activation du complément

L'activation du complément par la voie classique provoque la lyse des pathogènes par formation du complexe d'attaque membranaire, l'opsonisation, et plus généralement l'augmentation de la réponse inflammatoire par les anaphylatoxines.

Fiche 180

fiche 196 Tolérance et points de contrôle immunitaire

Le système immunitaire des tétrapodes est un système anticipatoire pour lequel de très nombreux récepteurs variables pour des antigènes sont créés sur les lymphocytes, avant même l'exposition à ces antigènes. Dès lors, comment le système immunitaire peut-il n'être activé qu'à bon escient, et non pas contre des molécules physiologiques, ce qui conduit à l'auto-immunité ? Il faut comprendre qu'un antigène n'est pas forcément immunogène, car les lymphocytes qui auraient pu être activés ont été détruits (tolérance centrale) ou bien n'ont pas reçu les signaux suffisants pour une réelle activation (tolérance périphérique).

Fiche 185

1. Tolérance centrale

La tolérance centrale s'exerce sur les précurseurs de lymphocytes B et T dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus). Lorsqu'un lymphocyte immature interagit à ce stade avec un antigène (qu'on appellera alors « antigène du soi »), il meurt habituellement par apoptose, c'est la sélection négative. Le facteur de transcription AIRE (*Autoimmune Regulator*) permet l'expression de nombreuses protéines de tous les tissus par les cellules épithéliales du thymus. 5 à 10 % des lymphocytes T se transforment plutôt en lymphocytes CD4+ régulateurs caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 ; ils auront des fonctions immunosuppressives. Certains lymphocytes B ont l'opportunité de subir d'autres recombinaisons génétiques sur le locus des chaînes légères, ce qui peut suffire à changer la spécificité du récepteur (révision des récepteurs ou *receptor editing*).

Fiche 188

2. Tolérance périphérique

La tolérance périphérique est induite par l'anergie ou la mort lorsqu'un lymphocyte mature rencontre pour la première fois l'antigène dans les tissus ou organes lymphoïdes secondaires et qu'il n'y a pas suffisamment de signaux d'activation.

L'anergie est induite chez un lymphocyte T, s'il reconnaît un peptide du soi sur une cellule en l'absence de signal de co-stimulation. Un excès de signal inhibiteur peut également empêcher la mise en place de la réponse. En effet, dans les 24 h après l'activation d'un LT, des récepteurs inhibiteurs de la famille de CD28 s'expriment et constituent des points de contrôle immunitaire (*immune checkpoint*). Il s'agit notamment des récepteurs CTLA-4 et PD-1 qui vont exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activation du LT et permettre la fin de la réponse lorsque la quantité de ligands de co-stimulation (tels B7) va diminuer.

Fiche 191

Un autre mode de contrôle de l'autoréactivité des lymphocytes passe par les fonctions immunosuppressives des Lymphocytes T régulateurs (T-reg). Ils empêchent l'activation d'un LT naïf en libérant des cytokines inhibitrices (IL10, TGFβ) ou en interférant dans son interaction avec la cellule présentatrice d'antigène.

Enfin, l'activation des lymphocytes B dépend généralement de lymphocytes T CD4+ activés reconnaissant le même antigène. C'est donc le contrôle étroit de l'activation des LT qui permet d'éviter d'activer les LB auto-immuns.

Fiche 194

3. Inhibition des points de contrôle immunitaire

Les récepteurs inhibiteurs les lymphocytes T, comme CTLA-4 et PD-1, sont des freins à la suractivation des LT lors d'une réponse anti-infectieuse et contribuent à la tolérance vis-à-vis des antigènes physiologiques des tissus (antigène du soi). Leur invalidation conduit à de très nombreuses maladies auto-immunes, montrant l'importance de ces signaux d'inhibition dans l'homéostasie des lymphocytes.

Cependant, lors d'infections chroniques ou de développement d'une tumeur, ils peuvent être aussi des freins à une réponse immunitaire suffisamment efficace. Des ligands de PD-1 sont effectivement retrouvés sur certaines tumeurs, limitant leur élimination par les lymphocytes cytotoxiques.

James P Allison et Tasuku Honjo ont reçu le prix Nobel 2018 de médecine pour avoir montré comment des anticorps bloquant ces freins immunitaires permettent d'exacerber la réponse cytotoxique contre certains cancers, tels des mélanomes et certains cancers du poumon.

Fiche 208

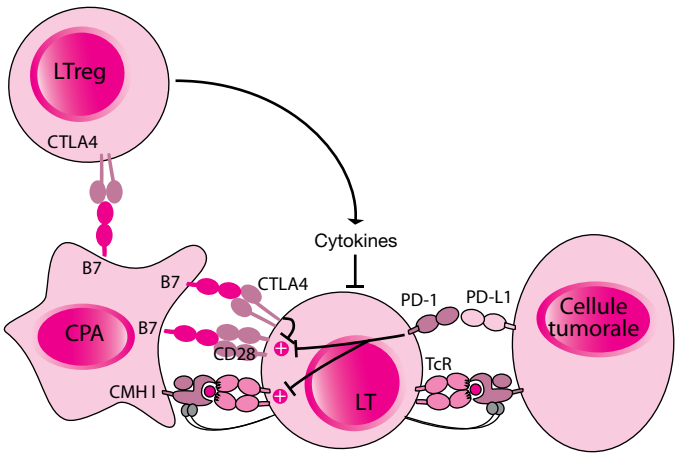


Figure 1 : Points de contrôle immunitaire.

Le lymphocyte T est activé (+) par l'engagement du TcR-peptide-CMH et par le signal de co-stimulation B7/CD28. Le LT régulateur peut produire des cytokines inhibitrices. CTLA4 entre en compétition avec CD28 pour la liaison à B7, et réduit ainsi les signaux activateurs. L'engagement entre PD-1 et PD-L1 inhibe le signal lié au TcR et celui lié à CD28. L'activation du LT est réduite.

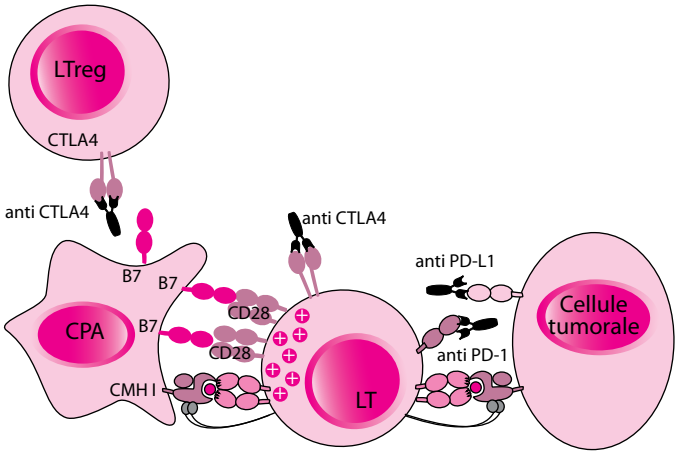


Figure 2 : Blocage thérapeutique des points de contrôle immunitaire.

Les anticorps anti-CTLA4 empêchent la compétition avec CD28 pour la liaison à B7 (levée du frein immunitaire). Les LT régulateurs bloqués par ces anti-CTLA4 ne libèrent plus de cytokines inhibitrices. Le blocage de PD-1 par des anticorps neutralisants accélère l'activation du LT. Les anticorps anti-PD-L1 peuvent conduire à la destruction *in vivo* des cellules tumorales. L'activation du LT et la réponse immunitaire anti-tumorale sont exacerbées.

fiche 197

La mémoire immunitaire

La mémoire immunologique est une caractéristique de la réponse immunitaire adaptative dont nous tirons profit par la vaccination.

1. Transfert d'immunité et naissance de l'immunologie

Alors que E. Jenner dès la fin du XVIIIe siècle puis L. Pasteur dès 1880 prouvèrent l'efficacité de la vaccination, les mécanismes n'en furent connus que plus tard. E. A. Von Behring et S. Kitasato (prix Nobel de médecine 1901) montrèrent en 1890 que l'immunité après vaccination contre le tétanos pouvait être transférée à un autre animal par les fluides biologiques, c'était la théorie humorale de l'immunité. Mais d'autres chercheurs comme E. Metchnikoff (Prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur la phagocytose), croyaient à une immunité cellulaire qui ne fut mise en évidence que dans les années 1940 par M. Chase avec le bacille de la tuberculose.

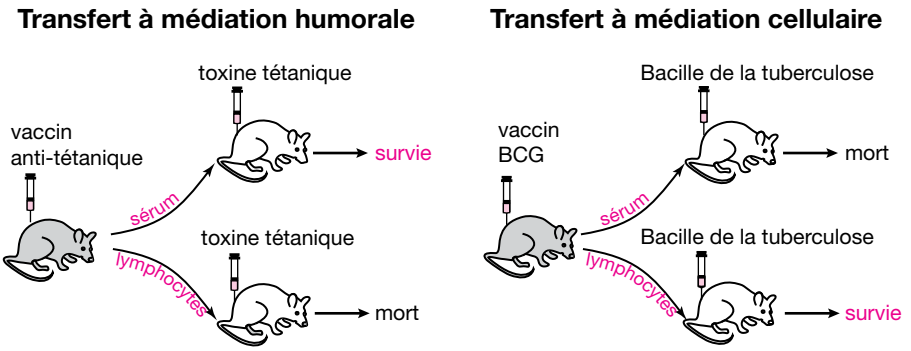


Figure 1 : Les deux types de transfert d'immunité adaptative

Ces transferts d'immunité sont possibles car lors de la réponse immunitaire primaire qui se développe contre un pathogène rencontré pour la première fois (pathogène atténué ou tué lors d'une vaccination), une mémoire immunologique spécifique s'établit qui permettra d'avoir une immunité, une protection, lors des rencontres ultérieures avec ce même pathogène. Cette protection humorale ou cellulaire peut être transférée à un autre animal.

2. Les caractéristiques de la mémoire immunologique

Des lymphocytes mémoires

Ce sont les lymphocytes mémoires qui permettent la protection active contre un pathogène déjà rencontré. Ces lymphocytes B, T CD4+ et T CD8+ mémoires sont obtenus après les phases de sélection puis d'expansion clonale, au cours de la différenciation. Les lymphocytes activés deviennent soit effecteurs, soit mémoires. Alors que les lymphocytes effecteurs sont éliminés lorsque l'antigène disparaît, les lymphocytes mémoires persistent tout au long de la vie dans un état quiescent.

La réponse secondaire est plus efficace que la réponse primaire

Si les lymphocytes mémoires nous protègent d'une ré-infection, c'est parce qu'ils sont plus efficaces que les lymphocytes naïfs.

D'abord la phase de latence nécessaire à la mise en place d'une réponse adaptative est réduite. En effet les lymphocytes mémoires se localisent préférentiellement dans le type de tissus où ils ont rencontré pour la première fois l'antigène et ils sont ré-activés par des seuils d'antigènes plus bas. Ils ont besoin de moins de signaux de co-stimulation et peuvent être activés par toutes les CPA efficaces. Ils prolifèrent plus rapidement et plus intensément, la réponse immunitaire adaptive est donc plus rapide (quelques jours au lieu d'une semaine) et de 100 à 1 000 fois plus forte, que ce soit une réponse humorale ou cellulaire.

Fiche 191

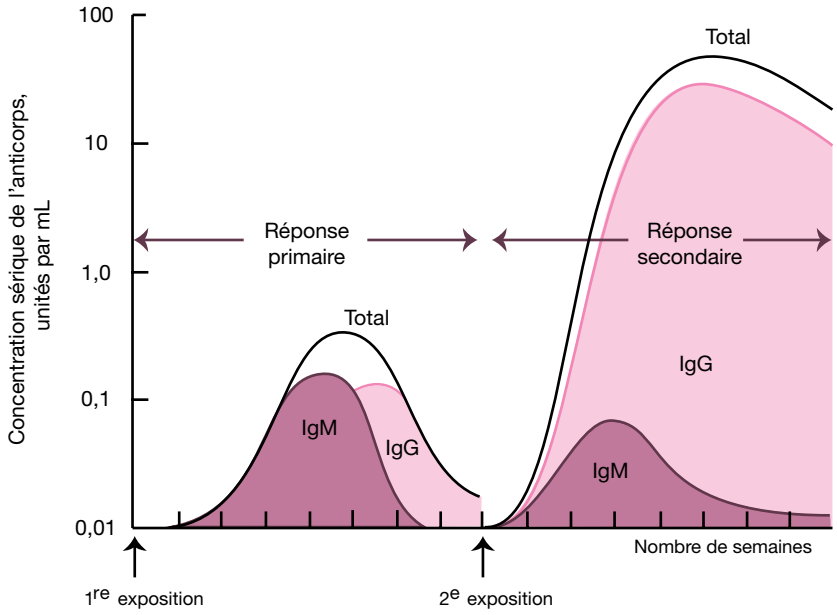


Figure 2 : Comparaison des réponses humorales primaires et secondaires

Dans le cas particulier de la réponse humorale, des modifications du type d'anticorps sont également constatées. Pendant la réponse primaire, il y a d'abord production d'IgM d'affinité moyenne puis, par maturation d'affinité et commutation de classe, l'isotype des anticorps s'adapte aux types de pathogènes et l'affinité des anticorps augmente. Ce sont ces lymphocytes plus adaptés de la réponse primaire qui deviennent mémoires. Lors de la 2e réponse, il y a donc tout de suite production d'IgG ou E ou A avec une affinité tout de suite très élevée et qui continue à augmenter par compétition entre les clones. Mais seuls les LB reconnaissant des antigènes T-dépendants et recevant les signaux d'un LTh2 peuvent devenir mémoire et produire des réponses secondaires, tertiaires, etc.

Fiche 194

Lors d'une vaccination, nous exposons notre organisme à un antigène suffisamment proche du pathogène mais inoffensif pour induire une réponse primaire et une mémoire immunitaire. Ainsi lors d'une nouvelle exposition au pathogène, notre organisme développe une réponse de type secondaire et le pathogène est éliminé avant les symptômes de la maladie.

fiche 198 L'utilisation des anticorps au laboratoire

L'intérêt de la sérothérapie comme traitement médical a été établi dès la fin du XIXe siècle. L'anticorps est aujourd'hui un outil dont on ne saurait se passer en laboratoire.

Fiche 208

1. Anticorps polyclonaux et monoclonaux

Jusqu'en 1975, la seule source d'anticorps est le sérum prélevé à des animaux immunisés contre les antigènes d'intérêt. L'animal est choisi de taille suffisante pour autoriser le prélèvement de volumes intéressants (lapin, chèvre, cheval). L'antigène est injecté à plusieurs reprises pour que la réponse anticorps soit intense. L'antigène est additionné d'un adjuvant qui stimule le système immunitaire. L'animal produit des anticorps contre les épitopes les plus immunogènes de l'antigène : le sérum est donc un mélange polyclonal d'anticorps.

Fiches 185, 197

En 1975, G. Köhler et C. Milstein (Prix Nobel 1984) réussissent à fusionner des lymphocytes B activés, qui ont une durée de vie limitée en culture, à des cellules immortelles de myélome, qui ne produisent pas d'anticorps. Les hybridomes issus de cette fusion sont des cellules immortalisées qui produisent des anticorps. Il est donc possible d'isoler des clones homogènes qui produisent des anticorps dirigés contre un seul épitope. Ce sont des anticorps monoclonaux. Cette technique fonctionne en routine sur les cellules de petits rongeurs, type souris. Grâce à elle, il est possible d'obtenir en abondance des séries d'anticorps dirigés contre presque n'importe quelle molécule préalablement purifiée. Pour des antigènes protéiques de grande taille, des peptides choisis peuvent suffire. Les anticorps monoclonaux utilisés en thérapie peuvent être « humanisés » pour être mieux tolérés.

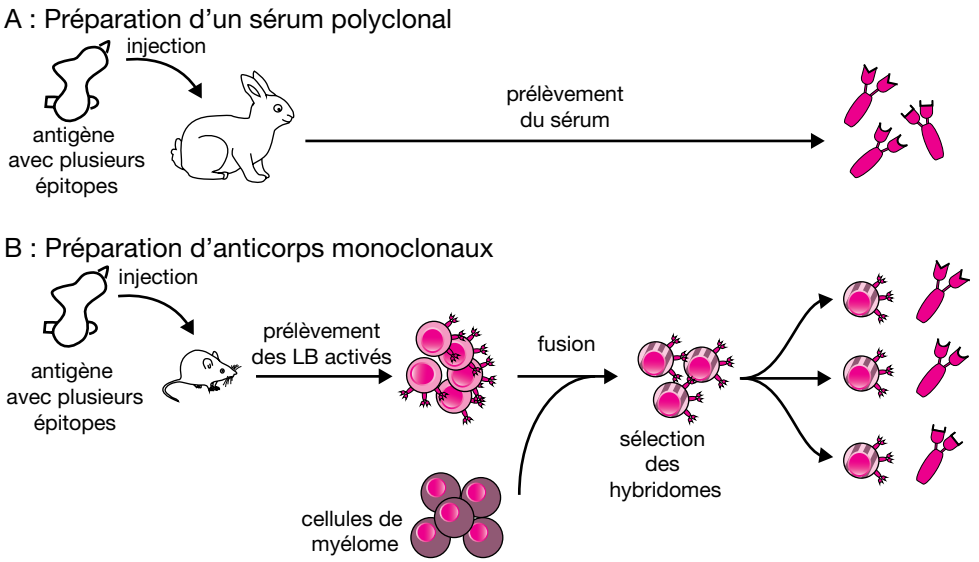


Figure 1 : Fabrication des anticorps

2. Les anticorps servent pour les marquages

Grâce à leur partie Fab spécifique de l'antigène (qui peut d'ailleurs être utilisée seule), les anticorps permettent d'identifier des molécules d'intérêt avec une grande spécificité et une grande sensibilité. Ils sont utilisés couplés à des billes d'or, des fluorochromes ou des enzymes qui permettent la visualisation au microscope, par cytométrie en flux ou après électrophorèse (immuno-empreinte).

Fiches 6, 25, 177

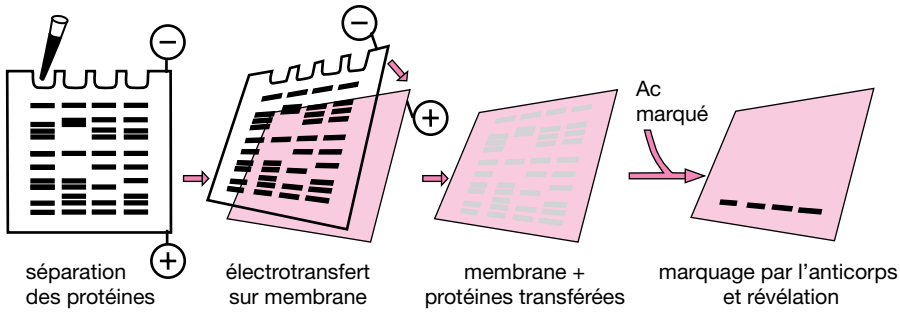


Figure 2 : Révélation de protéines spécifiques par immuno-empreinte après SDS-PAGE

Ils peuvent être aussi utilisés à des fins préparatives ; par exemple pour isoler des cellules portant des marqueurs de surface (tri cellulaire sur cytomètre en flux, anticorps couplé à des billes magnétiques) ou pour séparer l'antigène reconnu d'un mélange complexe (immunoprécipitation, chromatographie d'affinité).

3. Les dosages utilisant les anticorps

L'interaction antigène/anticorps est quantitative. Elle peut donc être utilisée pour doser des quantités très faibles d'antigènes. Les premières méthodes de dosages radioimmunologiques (RIA *radioimunoassay*) ont été développées en 1960 par S. A. Berson et R. Yalow (Prix Nobel en 1977). Depuis 1971, avec les techniques actuelles d'ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) qui utilisent des anticorps couplés à des enzymes, les méthodes de dosages immunologiques se sont réellement démocratisées. Les techniques plus courantes sont :

- L'ELISA indirect : l'antigène fixé permet de capturer les anticorps dans un mélange complexe (c'est la première méthode utilisée pour déterminer la séropositivité au VIH).
- l'ELISA en sandwich : Un premier anticorps permet de capturer l'antigène même en quantité très faible, un 2e anticorps spécifique couplé à l'enzyme permet la détection.

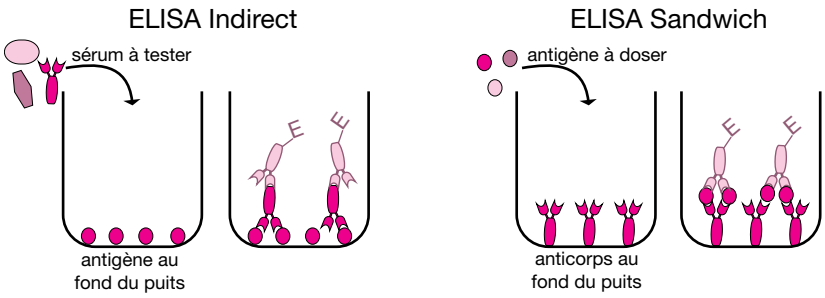


Figure 3 : Principe des ELISA

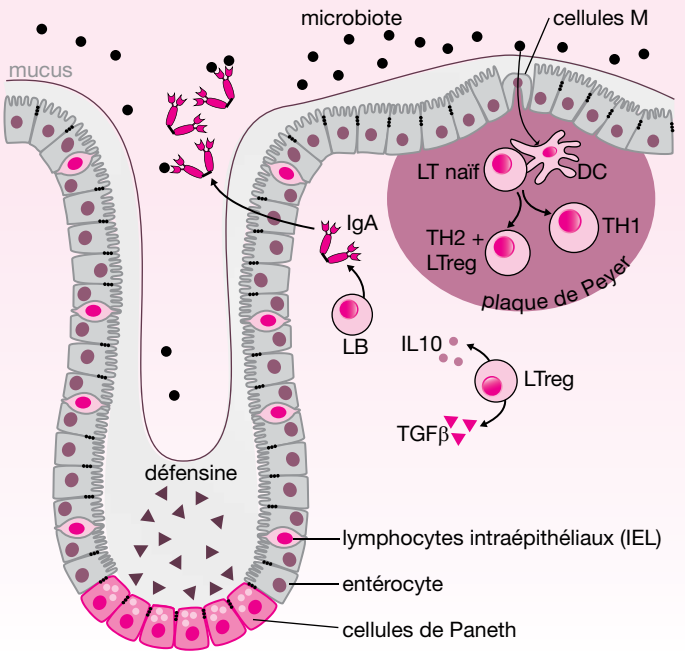
FOCUS L'immunité des muqueuses

Les muqueuses, avec plus de 400 m^2 de surface, sont la plus grande partie du corps exposé à l'environnement. Dans l'intestin, la flore commensale, ou microbiote, compte plus de cellules que le corps humain entier (10^{15} contre 10^{14}). Alors comment fait notre organisme pour tolérer les « bonnes bactéries » et réagir aux pathogènes ?

La première stratégie réside dans la limitation des contacts : une couche de mucus recouvre l'épithélium, particulièrement épaisse au niveau des cryptes où se situent les cellules souches permettant le renouvellement des entérocytes. Dans ce mucus, les entérocytes et les cellules de Paneth libèrent des peptides anti-microbiens et des défensines et les plasmocytes de la lamina propria libèrent des IgA. Cela empêche l'accès des bactéries à la zone la plus proche des cellules épithéliales. L'épithélium des muqueuses contient également de nombreux lymphocytes T non classiques, les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) qui participent notamment aux réponses antivirales.

Malgré tout, dans les plaques de Peyer, les cellules M (*microfold cells*) permettent d'échantillonner les antigènes dans la lumière intestinale. Les DC résidentes présentent les antigènes aux lymphocytes localement. Ces DC sont conditionnées par les entérocytes et les bactéries commensales en condition normale : elles expriment peu de PRR, peu de molécules de co-stimulation et vont produire des cytokines qui conduisent à une différenciation des LT $CD4^+$ en LT régulateurs ou en LTh2. La production d'IL10 et de TGFβ par les LTreg permettra d'inhiber les réponses cytotoxiques. En condition normale, l'inflammation locale est donc réduite mais il y a activation de LB et production d'IgA qui neutralisent la flore intestinale. Le microbiote n'est pas ignoré mais toléré.

En conditions pathologiques, les dégâts sur les cellules épithéliales ou la présence de marqueurs de virulence sur les bactéries vont déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires par l'épithélium et le recrutement de CPA non conditionnées venant des ganglions mésentériques. Ces nouvelles CPA présenteront les antigènes des pathogènes et orienteront la différenciation des LT $CD4^+$ vers des profils Th1 ou Th17 qui susciteront une forte réponse cellulaire et inflammatoire, donc l'élimination des pathogènes.



QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

16.1 Quelles cellules peuvent activer des lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$?

16.2 Vrai ou faux ? Un déficit immunitaire qui concerne l'immunité innée est moins grave qu'un déficit concernant l'immunité adaptative.

16.3 Qu'est-ce que la commutation de classe isotypique ? Quand cela se produit-il et quelles en sont les conséquences fonctionnelles ?

16.4 Quelles sont les différences entre un anticorps monoclonal et polyclonal en termes de spécificité et de sensibilité ?

16.5 Les mécanismes qui permettent à un lymphocyte B de produire des immunoglobulines différentes au cours du temps sont :

- ☐ L'épissage différentiel des ARN
- ☐ La recombinaison V(D)J
- ☐ Le switch isotypique
- ☐ L'hypermutation somatique de l'ADN

16.6 En quoi la diversité du répertoire des lymphocytes est-elle différente de la diversité des molécules du CMH ?

16.7 Quelles sont les différences entre un lymphocyte naïf et un lymphocyte mémoire ?

16.8 Quelles cellules contribuent à la cytotoxicité dépendante des anticorps ?

- ☐ a. Neutrophiles
- ☐ b. Éosinophiles
- ☐ c. Basophiles
- ☐ d. Mastocytes
- ☐ e. Cellules dendritiques
- ☐ f. Macrophages
- ☐ g. Natural Killer

16.9 Que sont les points de contrôles immunitaires (*immune check points*) ?

16.10 Comment le système immunitaire fait-il pour réagir différemment lors d'une infection intracellulaire ou extracellulaire ?

Réponses

16.1 Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes activées, surtout les cellules dendritiques

16.2 **Faux**, les deux cas conduisent à la mort en bas âge sans mesures prophylactiques

16.3 La commutation de classe isotypique est une recombinaison de l'ADN qui conduit à modifier l'isotype des anticorps sécrétés par les lymphocytes B. Cela se produit après activation par l'antigène, et au contact d'un lymphocyte T helper.

16.4 L'anticorps monoclonal est issu d'un seul clone de lymphocytes B activés et reconnaît un seul épitope de l'antigène, la spécificité est donc très grande. L'anticorps polyclonal est le sérum obtenu après que tous les lymphocytes B spécifiques de l'antigène aient été activés, plusieurs épitopes sont donc ciblés. La sensibilité peut être supérieure.

16.5 **a**, **c** et **d**. Avant activation par l'antigène, un lymphocyte B produit à la fois des IgM et IgD grâce à l'épissage différentiel de la chaîne lourde. Après activation par l'antigène et au contact d'un LT helper, un changement d'isotype peut avoir lieu par recombinaison au niveau de l'ADN des chaînes lourdes. Dans le centre germinatif, des mutations ponctuelles au niveau de l'assemblage VDJ/VJ sont très fréquentes et conduisent à une maturation de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène.

16.6 La très grande diversité du répertoire des lymphocytes chez un individu ($> 10^{12}$ clones) provient de réarrangements de segments de gènes, ce sont les lymphocytes d'un même individu qui sont différents entre eux. La diversité des allèles du CMH ($> 10^{11}$ combinaisons) s'observe à l'échelle de la population ; toutes les cellules d'un seul individu sont identiques.

16.7 Les lymphocytes mémoires ont une durée de vie plus longue, ils ont des seuils d'activation plus bas et ils peuvent patrouiller dans les tissus.

16.8 **a**, **b**, **f** et **g**. Ce déclenchement de la cytotoxicité cellulaire se fait par détection de complexes immuns par des récepteurs de partie Fc d'immunoglobulines G ou E.

16.9 Les *immune check points* régulent positivement ou négativement l'activation d'un lymphocyte T après qu'il ait interagi avec son antigène spécifique. Ce sont des molécules de co-activation ou de co-inhibition.

16.10 Les lymphocytes T helper (auxiliaires) libèrent des cocktails de cytokines qui orientent l'activation des autres cellules effectrices (LTh1, LTh2…). La différenciation des LT CD4+ naïfs vers ces différents profils est elle-même influencée par les cytokines produites par les cellules de l'immunité innée qui ont détecté l'infection par différents récepteurs de reconnaissance de motif (PRR).

Chapitre 17
Les cancers

Objectifs

Le cancer est une prolifération anarchique de cellules qui abandonnent l'agencement bien organisé des tissus. L'étude des cellules cancéreuses a permis de comprendre de nombreux mécanismes de la biologie cellulaire et de la génétique des cellules saines. De même, une bonne connaissance des différents aspects de la biologie cellulaire « normale » est nécessaire pour rechercher des thérapies anticancéreuses.

Les bases moléculaires des processus de cancérisation ainsi que les caractéristiques générales des cellules tumorales commencent à être comprises.

Un aperçu des traitements classiques ou ciblés permettra également au lecteur de mieux comprendre les problématiques d'un grand nombre de laboratoires de recherche en biologie cellulaire à l'heure actuelle.

Les bonus web sur dunod.com

Testez vos connaissances sur ce chapitre avec le quiz en ligne corrigé et commenté !

fiche 199

Les types de cancers

Le cancer est une prolifération, désordonnée et illimitée dans le temps et l'espace, de cellules dont la différenciation est bloquée. C'est un désordre génétique multifactoriel et progressif. L'étude des cancers permet de déduire les mécanismes cellulaires et moléculaires de processus, tels que la réparation de l'ADN, le contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, etc.

1. Tumeur et cancer

Lorsque certaines cellules de l'organisme se mettent à proliférer de manière incontrôlée et illimitée, elles sont dites « transformées » et forment des tumeurs. De telles cellules sont utilisées ou créées pour la culture cellulaire, car elles peuvent être maintenues indéfiniment, contrairement aux cultures primaires de tissus sains.

Fiches 142, 151

In vivo, certaines tumeurs, même de grande taille, restent en une seule masse entourée d'une capsule de tissus conjonctifs fibreux. Il s'agit de tumeurs bénignes, avec des cellules régulières dont la croissance est plutôt lente et qui ne peuvent pas disséminer. Elles sont généralement sans gravité, sauf lorsque leur taille excessive provoque des problèmes mécaniques. D'autres cellules tumorales sont capables de se détacher et d'infiltrer les tissus environnants, voire de disséminer dans d'autres organes. Ce sont des cellules cancéreuses issues de tumeurs malignes. Elles sont de morphologie atypique. Plus elles sont envahissantes et prolifèrent vite, plus les cancers sont agressifs et difficiles à traiter.

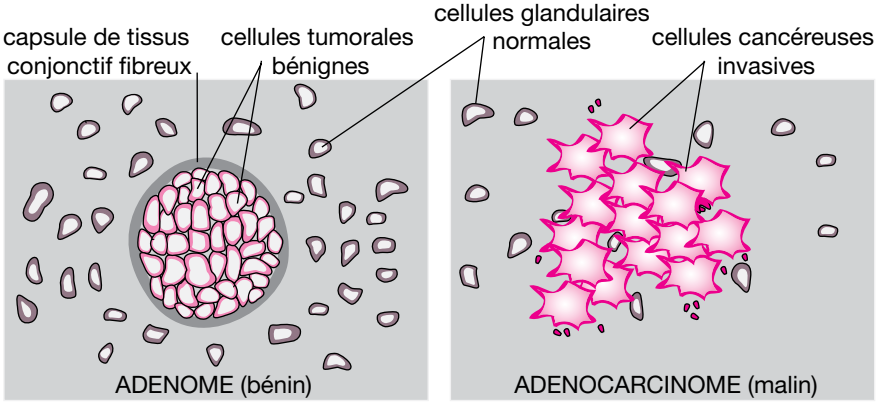


Figure 1 : Différence entre tumeur bénigne et maligne

Selon le type de tissus initial, on distingue plusieurs grandes catégories de tumeurs : les tumeurs des tissus épithéliaux sont soit des adénomes bénins, soit des carcinomes malins. Les carcinomes représentent 80 % des cancers. Les tumeurs des tissus conjonctifs et musculaires sont soit des fibromes bénins, soit des sarcomes malins. Les lymphomes sont des tumeurs malignes (principalement solides) des organes lymphoïdes, alors que les leucémies sont des cancers des globules blancs, dans la moelle osseuse ou dans le sang. Les suffixes en –blastomes concernent des tumeurs embryonnaires (neuroblastome, par exemple).

Fiche 167

Fiche 178

2. Incidence des cancers et mortalité

La lutte contre le cancer est un grand enjeu de santé publique puisqu'il s'agit de la première cause de décès en France depuis 2004 (34 % des décès en 2011) avant les maladies cardiovasculaires (22 %). Les cancers sont des maladies connues depuis l'Antiquité. Ce sont des dysfonctionnements évolutifs, le risque s'accroît donc avec l'âge. L'augmentation et le vieillissement de la population ont conduit à une augmentation du nombre de cancers diagnostiqués en France depuis 30 ans, alors que le taux de mortalité est en baisse depuis 25 ans. Ramené à une population de même taille et de même âge moyen, le nombre de cancers diagnostiqués a augmenté de 48 % et le risque de décès par cancer a diminué de 25 % (Institut de veille sanitaire 2012).

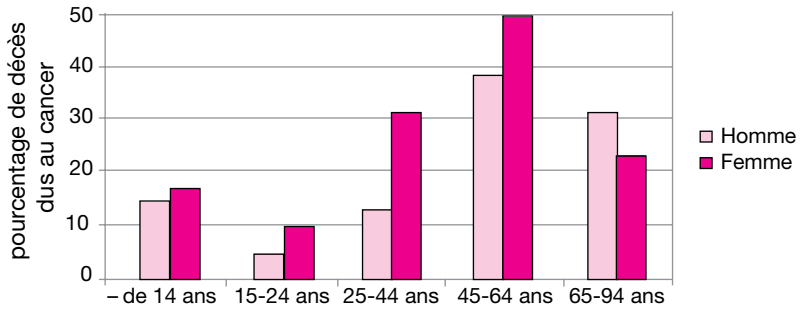


Figure 2 : Proportion de décès dus aux cancers par classe d'âge et par sexe

Les cancers les plus fréquents en France sont ceux du sein chez la femme et de la prostate chez l'homme ; puis les cancers du poumon et du colon-rectum dans les deux sexes. Le dépistage systématique de certains cancers (sein, colon-rectum) a contribué à augmenter l'incidence (le nombre de cas détectés) mais également à diminuer la mortalité. De même, la modification des comportements (baisse de la consommation d'alcool, de sel) a contribué à diminuer l'incidence de certains cancers.

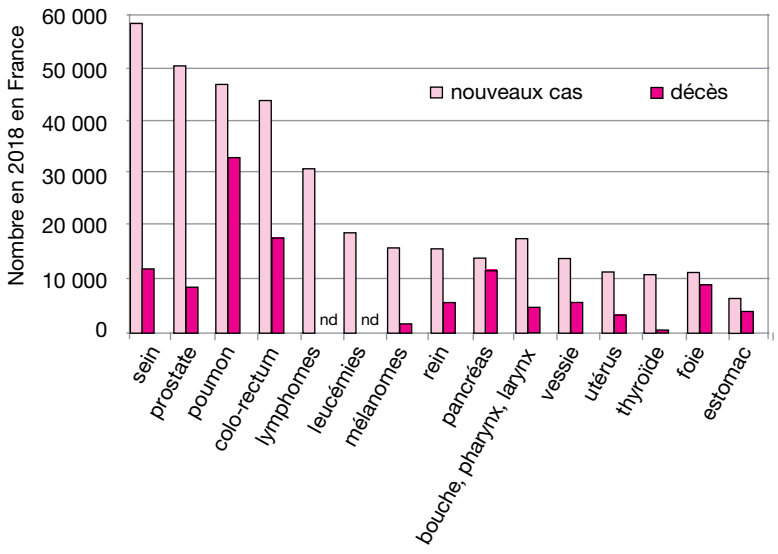


Figure 3 : Incidence des cancers et mortalité en France en 2018

fiche 200

Propriétés des cellules tumorales

Les cellules tumorales, bénignes ou malignes, partagent certaines propriétés qui leur permettent de proliférer et survivre. Les cellules cancéreuses ont en plus la capacité d'être envahissantes et de disséminer dans des sites étrangers.

1. Elles ont un potentiel de division illimité et échappent à la sénescence

Fiches 37, 165

Les cellules normales ont un potentiel de 60 à 70 divisions cellulaires. À chaque division, des imperfections de l'ADN polymérase conduisent à un raccourcissement des extrémités des chromosomes, les télomères. Lorsque les télomères sont très courts, les cellules deviennent sénescentes et ne peuvent plus se diviser. Les cellules affranchies de cette limitation sont des cellules immortalisées (utilisées en culture cellulaire par exemple). 90 % des cellules cancéreuses en stade tardif expriment une télomérase qui empêche le raccourcissement des télomères et assure l'immortalité cellulaire.

2. Elles prolifèrent sans régulation

Fiche 138

La prolifération des cellules normales dépend de la présence de facteurs de croissance (EGF, *epidermal growth factor*, ou insuline) ou de contacts avec la matrice extracellulaire qui leur permettent de sortir de la phase de quiescence du cycle cellulaire. Les cellules tumorales acquièrent une capacité de prolifération autonome. Différentes stratégies existent : la production de facteur de croissance ou de leurs récepteurs (PGDF, Erb-B), l'expression de récepteurs constitutivement activés ou l'activation de leurs seconds messagers (Ras), l'activation constitutive d'effecteurs du cycle cellulaire (comme les cyclines).

Fiche 202

3. Elles perdent l'inhibition de contact

Fiches 145, 148, 149

La plupart des cellules normales en culture poussent en monocouche sur un support auquel elles adhérent. Lorsque les cellules se touchent (à confluence), des inhibiteurs de croissance (TGFβ) entrent en action *via* des molécules d'adhérence telles que E-cadherine ou intégrines. Les cellules tumorales perdent cette inhibition de contact. Elles peuvent croître en couches multiples et parfois se détacher du support pour pousser en suspension.

Les cellules immortalisées peu dépendantes des facteurs de croissance et dépourvues de l'inhibition de contact sont dites transformées. Une cellule transformée n'est dite cancéreuse que lorsqu'elle est capable de donner une tumeur après injection chez l'animal.

4. Elles échappent à l'apoptose

Fiche 140

Les cellules normales entrent en apoptose ou mort cellulaire programmée lorsque leurs senseurs détectent des anomalies à l'intérieur de la cellule (lésions de l'ADN, lésions des mitochondries) ou à l'extérieur de la cellule (absence de signaux de croissance ou de survie, défaut de molécules d'adhérence, molécules toxiques). Les cellules tumorales résistent à l'apoptose, ce qui leur permet entre autres de proliférer malgré leurs aberrations génétiques, et ce qui peut également conférer une résistance au traitement pour les cancers les plus agressifs. Elles accumulent ainsi les erreurs et deviennent de plus en plus anormales (instabilité génomique).

Fiche 204

5. Elles échappent au système immunitaire

Le système immunitaire est capable d'éliminer des cellules anormales pré-tumorales, notamment lorsqu'elles exposent à leur surface des antigènes associées à la tumeur (TAA). Cependant, de nombreuses cellules cancéreuses limitent la présentation d'antigène sur le CMH, ou expriment des ligands de récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T, comme PD-L1.

Fiche 196

6. Elles stimulent l'angiogenèse

Toutes les cellules ont besoin de nutriments pour leur survie. Les cellules à plus de 100 µm d'un capillaire sanguin manquent de nutriments et meurent. Le développement d'une tumeur au-delà d'un centimètre de diamètre (stade de détection clinique) requiert donc la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour irriguer cette tumeur. L'angiogenèse tumorale est stimulée par la production de facteur de croissance vasculaire (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) par les cellules tumorales elles-mêmes, ou par des cellules saines environnantes, formant le micro-environnement tumoral. La vascularisation de la tumeur augmente le risque de dissémination.

Fiche 176

Fiche 204

7. Elles modifient leur métabolisme

Les cellules différenciées saines utilisent la phosphorylation oxydative mitochondriale comme source d'énergie en présence d'oxygène. Paradoxalement, les cellules cancéreuses privilégient la fermentation, 18 fois moins efficace pour la production d'ATP que la respiration cellulaire. Cet « effet Warburg », du nom de son découvreur en 1924, favoriserait la biosynthèse de nucléotides et acides aminés nécessaires au renouvellement cellulaire. Il limiterait également le stress oxydant lié à la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative, ce stress oxydant étant susceptible d'endommager l'ADN et de provoquer l'apoptose.

Ce métabolisme des cellules cancéreuses est très consommateur de glucose. Cela est mis à profit pour la détection des tumeurs par imagerie médicale grâce à la tomographie par émission de positon (TEP) qui mesure l'incorporation de glucose modifié, le ^{18}-fluorodésoxyglucose (^{18}FDG).

Fiche 107

8. Elles envahissent les tissus sains et forment des métastases

La différence entre tumeur bénigne et maligne est la capacité d'envahir le tissu sain sous-jacent, voire de disséminer vers d'autres d'organes, c'est-à-dire de métastaser.

Les cellules cancéreuses dont les capacités d'interactions cellulaires et d'interaction avec la matrice extracellulaire sont perturbées, perdent la capacité de vivre en tissu organisé. Elles deviennent envahissantes et forment un cancer *in situ*. Les cellules tumorales qui parviennent à rompre la lame basale et à pénétrer dans les capillaires sanguins ou lymphatiques peuvent parfois s'installer dans d'autres organes et former des tumeurs secondaires. Cela reflète la dangerosité de la tumeur.

fiche 201 Les bases moléculaires de la cancérisation

Les cancers sont des maladies où un petit groupe de cellules échappe aux règles de vie en société organisée et prolifèrent sans contrôle, jusqu'à menacer le fonctionnement normal des organes puis la vie de l'individu.

1. Des altérations génétiques à la base du dysfonctionnement

Les altérations des cellules cancéreuses ont lieu sur l'ADN et peuvent être transmises aux cellules filles. Ainsi une cellule, qui aura accumulé des modifications génétiques lui permettant de proliférer, donnera naissance à une grande population de cellules filles formant une tumeur. 90 % des cancers sont des cas sporadiques qui résultent de mutations somatiques, c'est-à-dire ne touchant pas les gamètes. Seuls 10 % des cancers sont dits héréditaires car les mutations touchent les gamètes. La descendance a alors une prédisposition au cancer.

Fiche 204

Les altérations peuvent être génétiques ou épigénétiques car la modification de l'expression des gènes n'est pas forcément liée à une modification de la séquence d'ADN. Parmi les altérations de séquence, il y a des remaniements chromosomiques et des mutations ponctuelles. Ces mutations viennent de l'exposition à des cancérigènes ou d'erreurs non réparées lors de d'une réplication de l'ADN. Le taux de mutation étant estimé à 10^{-6}, les cellules du corps humain résultant de 10^{16} divisions au cours de la vie, plusieurs milliards de mutations surviennent au cours d'une vie. Mais le développement d'un cancer nécessite l'accumulation dans une seule cellule de plusieurs mutations dont les effets donnent des propriétés tumorales. C'est pourquoi le risque de cancer augmente avec l'âge.

Fiche 62

Fiche 203

Fiche 200

Les aberrations chromosomiques fréquentes dans les cellules tumorales résultent de cassures de l'ADN. Il peut y avoir alors des amplifications ou délétions de gènes, des translocations qui donnent naissance à des protéines chimères, des modifications du nombre de chromosomes (aneuploïdie)…

Enfin, l'expression anormale de micro ARN non codant (ARNmi) peut empêcher la traduction d'ARNm ciblés et perturber l'expression génétique dans certains cancers.

Fiche 44

2. Les familles de gènes touchés

Parmi toutes les cellules subissant des altérations, il n'y a que celles qui peuvent proliférer plus vite et indéfiniment qui deviennent cancéreuses. Elles ont un avantage sélectif par rapport aux autres. Cela implique des modifications de l'expression de gènes impliqués dans certaines fonctions particulières. Les gènes qui favorisent la cancérisation sont des oncogènes, ceux qui l'inhibent des suppresseurs de tumeurs.

Fiche 202

Gènes du contrôle de la différenciation et de la prolifération

La vitesse de croissance est un atout pour le développement tumoral. Toutes les mutations concernant les facteurs de croissance, leurs récepteurs, ou leur cascade de signalisation intracellulaire sont susceptibles de provoquer des cancers. De même pour les protéines de point de contrôle du cycle cellulaire. À l'inverse, si la différenciation est bloquée, les cellules s'accumuleront au lieu d'évoluer physiologiquement.

Fiche 138

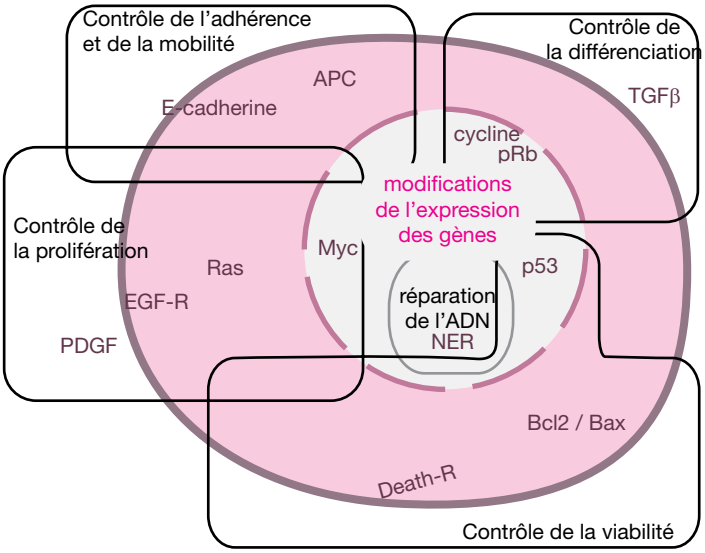


Figure 1 : Fonctions modifiées dans les cellules tumorales
Des exemples de molécules effectrices sont indiqués avec leur localisation cellulaire : membrane, cytoplasme ou noyau.
D'après Hanahan *et al.*, *Cell* 100 : 57, 2000.

Gènes du contrôle de la survie cellulaire

Malgré une accumulation de mutations qui devraient déclencher l'apoptose cellulaire, les cellules tumorales sont « immortelles » car elles présentent fréquemment des modifications des senseurs ou des effecteurs de l'apoptose, en particulier des mutations de p53. Cette résistance à l'apoptose induit parfois aussi une résistance aux traitements anti-cancéreux.

Focus en fin de chapitre

Gènes de la réparation de l'ADN

Des cellules défectueuses dans leur processus de réparation de l'ADN subiront davantage de mutations. Ce phénotype « mutateur » est générateur d'instabilité et peut causer une dérive plus rapide d'un phénotype « normal » vers un phénotype cancéreux.

Immortalité et télomérase

Pour les cellules engagées dans une voie de différenciation, le nombre de cycle de division est limité car les télomères se raccourcissent à chaque mitose. Les cellules souches ou germinales expriment une télomérase qui, en réparant les télomères, leur permet un nombre de divisions illimité. 90 % des cancers ré-expriment la télomérase et acquièrent ainsi l'immortalité.

Fiche 37

Gènes du contrôle de l'adhérence et de la mobilité

Les cellules tumorales deviennent invasives en modifiant leurs interactions avec la matrice extracellulaire et avec les autres cellules. Elles perdent ainsi l'inhibition de contact et peuvent devenir capables d'entrer et sortir des capillaires pour disséminer.

fiche 202 Oncogènes et suppresseurs de tumeurs

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs font partie des gènes critiques du cancer, c'est-à-dire ceux dont les mutations combinées conduisent à des cancers.

1. Les oncogènes et les proto-oncogènes

Fiche 203

Ce sont des gènes qui favorisent le développement des cancers, en favorisant la prolifération ou la survie des cellules. Ils ont d'abord été découverts dans des oncovirus qui induisent des cancers, comme le virus du sarcome de Rous. Les oncogènes sont des formes activées de proto-oncogènes qui existent normalement dans les cellules. Des altérations génétiques modifient la séquence (mutation ponctuelle, translocation) ou le nombre de copie du gène (ré-arrangement chromosomique, amplification), ce qui conduit au dérèglement cellulaire.

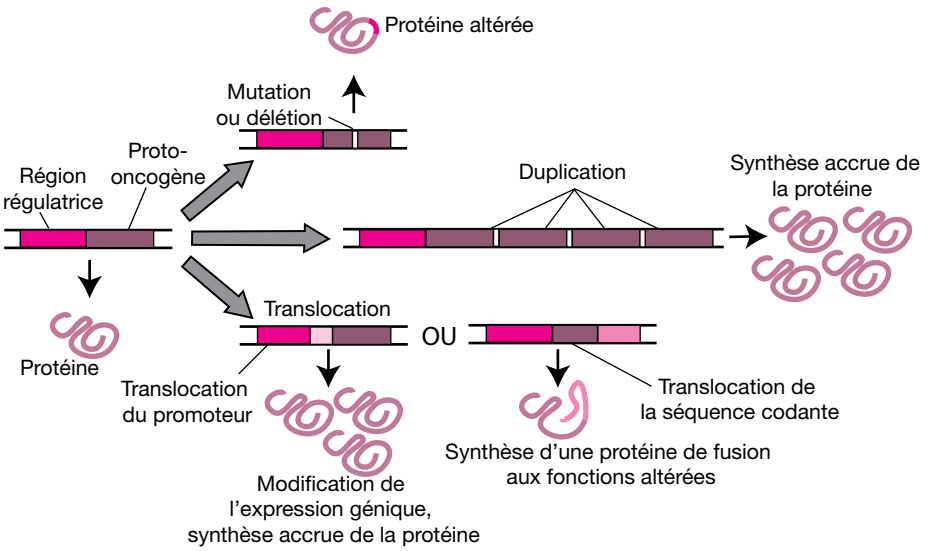


Figure 1 : Voies d'activation d'un proto-oncogène en oncogène

Les proto-oncogènes mutés sont hyperactivés, mutation « gain de fonction ». Ils sont dominants : la mutation d'une seule copie du gène est suffisante pour que la cellule glisse vers un état cancéreux. Plus d'une centaine d'oncogènes ont été identifiés et peuvent être regroupés en grandes familles de fonction :

- Les facteurs de croissance ou leur récepteur (n° 1 et 2 sur la figure 2) : Le facteur de croissance des plaquettes PDGF est associé à des cancers du cerveau. Les récepteurs de l'EGF (*epidermal growth factor*) Erb-B et HER2 sont associés à de nombreux cancers.
- Les protéines kinases (n° 3 et 4 sur la figure 2) : Les transducteurs cytoplasmiques tels que Ras et Src sont des intermédiaires dans le signal de prolifération cellulaire. Les versions oncogéniques sont bloquées sous forme active et stimulent constamment le cycle cellulaire. Les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (cdk) sont aussi des proto-oncogènes.

Fiche 137

- Les facteurs de transcription nucléaires (n° 5 sur la figure 2) : différentes formes de *myc* sont exprimées de façon amplifiée dans de nombreux cancers.

- Les senseurs ou effecteurs de l'apoptose (n° 6 sur la figure 2) : Bcl2 est une protéine anti-apoptotique sur-exprimée dans des lymphomes suite à une translocation des chromosomes 14 et 18. Bcl2 s'oppose à la libération du cytochrome c hors des mitochondries.

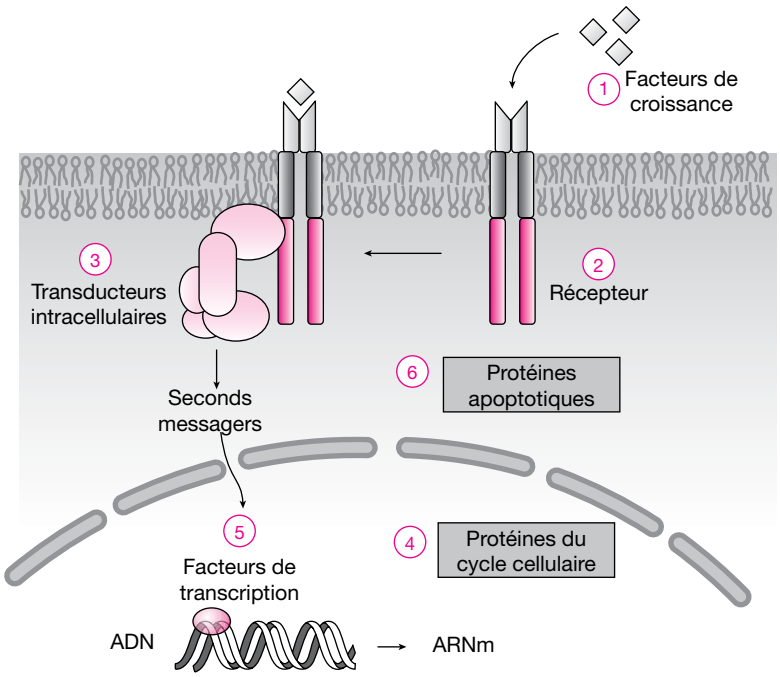


Figure 2 : Les grandes familles d'oncogènes

2. Les suppresseurs de tumeur

Les hybrides de cellules normales issues de culture primaire et de cellules cancéreuses perdent leur capacité de proliférer. C'est parce que les cellules normales expriment des gènes suppresseurs de tumeur qui empêchent une prolifération anarchique. Les gènes suppresseurs de tumeur mutés sont également des gènes de prédisposition au cancer. C'est ainsi qu'a été identifié le premier d'entre eux, Rb, dans des rétinoblastomes dont 40 % sont des cas familiaux.

Fiche 204

- pRb, le produit du gène Rb, est un régulateur universel du cycle cellulaire et agit comme un frein pour la progression dans le cycle.
- p53 est mutée dans 50 % des cancers. Cette protéine, surnommée « gardienne du génome » est le produit du gène *Tp53*. C'est un facteur de transcription activé en cas de lésions de l'ADN ou de stress cellulaire. Il bloque le cycle cellulaire ou déclenche l'apoptose si les dommages ne peuvent être réparés.
- Les protéines de réparation de l'ADN limitent les lésions spontanées lors de la réplication ou suite à l'exposition à des cancérogènes. BRCA1 et 2 sont des exemples de telles protéines invalidées dans certains cancers du sein.

Focus en fin de chapitre

Beaucoup d'autres mécanismes sont impliqués comme le maintien de la cohésion cellulaire *via* la E-cadhérine (E-cad), la signalisation par Wnt (APC) ou par le TGF-β (Smad4).

L'invalidation d'un suppresseur de tumeurs doit avoir lieu sur les deux copies du gène dans la même cellule (mutations perte de fonction). Les événements peuvent être des mutations ponctuelles, des délétions géniques mais aussi des modifications épigénétiques sans altération de la séquence d'ADN. Par exemple, le gène peut être placé dans de l'hétérochromatine ou son promoteur peut être hyperméthylé, ce qui empêche l'expression génique.

Fiches 30, 62

fiche 203

Les agents transformants externes

Certains facteurs exogènes, biologiques, chimiques ou physiques, peuvent modifier des cellules saines pour les rendre immortelles ou, plus encore, leur faire perdre la dépendance aux facteurs de croissance et perdre l'inhibition de contact. Ces facteurs sont appelés « agents transformants ». Ils sont responsables de l'initiation des cancers *in vivo* et peuvent aussi être utilisés sur des cellules en culture.

1. Les virus

10 % des cas de cancers dans le monde sont attribuables à des virus. Lorsqu'un génome viral s'intègre au génome de la cellule hôte, il y a transformation cellulaire car ce nouveau matériel génétique est transmis aux cellules filles. Lorsque cette intégration dérégule la prolifération cellulaire, le virus est oncogène. Seule une faible proportion des personnes infectées déclencheront finalement un cancer. Il peut s'agir de virus à ADN ou de rétrovirus à ARN. Ces derniers doivent préalablement synthétiser une copie d'ADN viral à partir de l'ARN grâce à une transcriptase inverse.

Tableau I : Virus reconnus comme oncogènes chez l'homme

Virus		Cancers associés
Hépatite B (HBV)	ADN, Hepadnavirus	Hépatocarcinome
Hépatite C (HCV)	ARN, Flavivirus	Hépatocarcinome
Herpèsvirus 8 humain (HHV-8 ou KSHV)	ADN, Herpèsvirus	Sarcome de Kaposi, Lymphome des cavités
Papillomavirus (HPV) 16, 18 & 31	ADN, Papovavirus	Cancer du col utérin, cancers ano-génitaux
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	ADN, Herpèsvirus	Lymphome de Burkitt, Lymphome de Hodgkin, carcinome du nasopharynx
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 & 2)	ARN, Rétrovirus	Sarcome de Kaposi, carcinome de la conjonctive
Virus lymphotrope T humain (HTLV-1)	ARN, Rétrovirus	Lymphome T de l'adulte

Les mécanismes par lesquels les virus induisent des cancers sont multiples. L'insertion du génome viral peut provoquer des mutations insertionnelles, ayant d'autant plus d'impact si elles se produisent dans des gènes critiques du cancer. Il s'agit alors de cis-activation mais ces événements semblent rares chez l'homme.

Le virus peut également contenir des oncogènes qu'il utilise pour favoriser sa multiplication et pousser ses cellules cibles à proliférer. Il s'agit alors de trans-activation. C'est le cas de l'antigène T de l'adénovirus SV40, très utilisé *in vitro* pour transformer des cultures primaires en lignées cellulaires immortelles. Les papillomavirus HPV 16 et 18, responsables de 70 % des cancers du col de l'utérus, codent les protéines E6 et E7 qui répriment des suppresseurs de tumeurs (p53 et Rb respectivement).

Fiche 202

D'autres types de virus peuvent contenir des oncogènes dérivés de proto-oncogènes présents dans la cellule hôte. Le virus du sarcome de Rous contient la forme oncogénique v-src, alors que les cellules saines contiennent la forme c-src de cette tyrosine kinase contrôlant le cycle cellulaire. La protéine E5 du papilloma virus est une forme toujours active du récepteur au PGDF.

D'autres virus enfin, en particulier ceux des hépatites B et C, provoquent une inflammation chronique et des cycles de prolifération régénérative qui sont des facteurs d'instabilité. Des infections chroniques par des bactéries ou des parasites peuvent de la même manière favoriser la survenue de certains cancers. Par exemple *Helicobacter pylori* provoque des cancers de l'estomac.

Fiche 204

2. Les substances chimiques

La liste des substances connues pour être cancérigènes (catégorie 1) contient plus de 30 molécules, et celle des « potentiellement cancérigènes » (catégories 2 et 3) est 10 fois plus longue. On peut citer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, tel que le benzo[a]pyrène), les nitrosamines, les agents alkylants, certaines toxines comme l'aflatoxine B1 issue de moisissures.

Fiche 33

Parmi ces substances, beaucoup sont des génotoxiques. Par exemple le bromure d'éthidium (BrEt ou BEt), utilisé pour visualiser l'ADN sous illumination UV, est un agent intercalant qui peut provoquer des erreurs au moment de la réplication et donc des mutations transmissibles. Il s'agit d'un agent mutagène. Les génotoxiques peuvent également provoquer des réarrangements chromosomiques ou des amplifications géniques suite à des erreurs provoquées au moment de la division cellulaire. Des modifications épigénétiques sont aussi induites par des cancérigènes chimiques.

Fiche 62

Certains cancérigènes ne sont pas génotoxiques mais provoquent une cytotoxicité cellulaire importante. Celle-ci est suivie d'une hyperprolifération compensatrice, ce qui est un facteur d'instabilité génomique donc de cancers. Certaines molécules enfin ne sont pas cancérigènes à elles seules mais elles amplifient les effets. Ce sont des promoteurs tumoraux comme par exemple les esters de phorbol utilisés comme mitogènes *in vitro*.

Fiche 204

3. Les agents physiques

Il y a deux catégories d'agents physiques induisant des cancers :

- les radiations ionisantes avec, par ordre d'énergie donc de danger décroissant, les rayons gamma, les rayons X, et les ultraviolets (UV). Sur Terre, nous sommes essentiellement exposés aux UV-A (de 315 à 400 nm) et à de faibles doses d'UV-B (280 à 315 nm), les UV-C (100 à 280 nm) plus nocifs étant arrêtés par l'atmosphère. Ces rayonnements provoquent des lésions de l'ADN qui induisent des mutations et jusqu'à la mort cellulaire ;
- les fibres minérales telles que l'amiante, dont le mécanisme d'action n'est pas connu.

fiche 204 Les facteurs intrinsèques favorisant les cancers

Notre environnement et notre mode de vie comportent plus ou moins de facteurs de risque de cancer. Mais certains éléments internes peuvent aussi expliquer une partie des variabilités individuelles face au cancer.

1. Prédisposition génétique au cancer

Fiche 202

Les cancers résultent d'une accumulation de désordres génétiques qui conduisent à la dérégulation de la cellule. En particulier, des fonctions oncogènes apparaissent ou au contraire des gènes suppresseurs de tumeurs sont invalidés.

Si de telles mutations apparaissent dans la lignée germinale, elles sont transmises à toutes les cellules somatiques de la descendance et constituent des gènes de prédisposition, ou de susceptibilité, au cancer. La plupart de ces gènes sont des suppresseurs de tumeurs, comme Rb muté dans 40 % des cas de rétinoblastome. Il a permis d'établir le modèle de Knudson et Comings qui explique la fréquence accrue de cancers chez les porteurs du gène muté. Pour les cas de cancer sporadique, deux modifications dans la même cellule sont nécessaires pour invalider les deux copies du gène. Pour les porteurs du gène muté, une seule mutation suffit pour déclencher une tumeur. *brca1* et *brca2* prédisposent aux cancers du sein et de l'ovaire et il existe des tests de dépistage pour repérer les mutations les plus courantes. La fréquence des sujets porteurs d'une mutation de *brca1* ou *2* est de 1/1 000 dans la population générale. Ces personnes ont un risque accru de développer un cancer, et non pas une certitude d'avoir un cancer.

Des prédispositions échappant au modèle de Knudson concernent les mutations dans des oncogènes tels que *ret*, codant pour un récepteur à tyrosine kinase qui prédispose au cancer de la thyroïde et des glandes surrénales.

Des mutations d'enzymes de détoxification tel que le cytochrome p450 donnent une sensibilité augmentée aux cancérigènes chimiques. Mais le sur-risque restera très faible tant que la personne ne sera pas exposée à des cancérigènes.

2. Instabilite génomique

La probabilité de mutation cellulaire est normalement très faible (de l'ordre de 10^{-6}) mais une accumulation de mutations dans une seule cellule est nécessaire pour que celle-ci acquière des caractéristiques tumorales. On observe effectivement un taux de mutations très élevé dans les cellules tumorales : elles sont instables génétiquement.

Focus chapitre 17, Fiche 34

L'accumulation des mutations peut être accélérée par des déficiences au niveau des systèmes de surveillance de l'intégrité du génome, comme p53 et autres gènes de stabilité (*caretaker genes*), impliqués dans la réparation des erreurs sur l'ADN. On parle de phénotype « mutateur ». Par exemple le syndrome de Lynch ou HNPCC (Cancer du colon héréditaire sans polypose) est provoqué par une mutation sur un gène parmi 4 localisés sur des chromosomes différents (*msh2, mlh1, pms1* et *pms2*). Ces gènes sont impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair*). Dans le xeroderma pigmetosum, c'est le système de réparation des lésions qui est touché *via* le gène *ner* (*nucleotide excision repair*).

L'instabilité génomique peut aussi provenir d'une instabilité chromosomique, c'est-à-dire des remaniements, des translocations voire des nombres anormaux de chromosomes (aneuploïdie). L'une des hypothèses avancées est qu'un raccourcissement des télomères a lieu dans une cellule insensible aux signaux de sénescence (par exemple par mutation de p53). Au lieu d'entrer en sénescence, les cellules subiraient alors une « catastrophe génétique » avec de multiples cassures puis réparations aléatoires des chromosomes.

Fiche 165

L'instabilité génomique, en favorisant les mutations, augmente la probabilité qu'apparaisse un phénotype tumoral. Mais les mutations peuvent apparaître n'importe où et être nuisible pour la cellule. Les cellules génétiquement instables ne sont donc favorisées que si elles obtiennent un avantage compétitif par rapport aux cellules saines.

3. Micro-environnement tumoral

Le cancer est une accumulation d'altérations dans des cellules qui deviennent tumorales, mais c'est également un dérèglement de l'organisation tissulaire. Un cancer est un organe dérégulé dans lequel les cellules tumorales interagissent avec les fibroblastes, les globules blancs résidents, les cellules endothéliales des capillaires et la matrice extracellulaire.

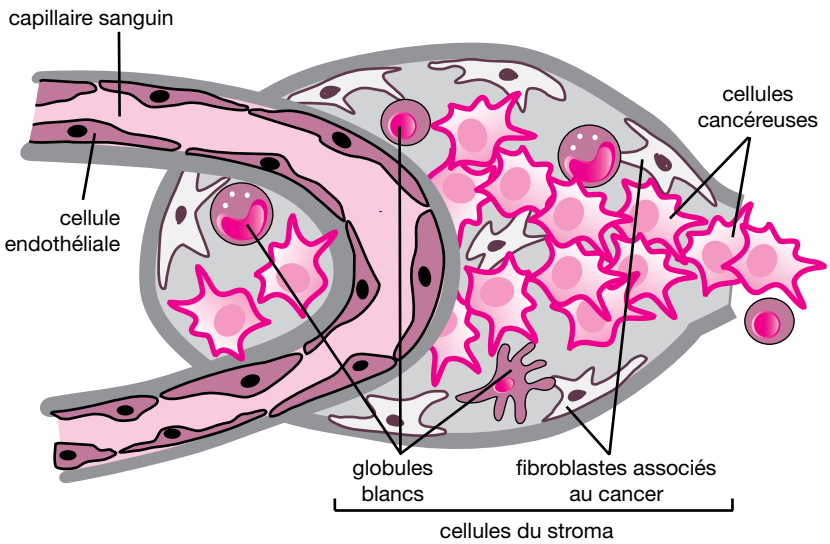


Figure 1 : Les cellules du stroma tumoral

Au fur et à mesure du développement tumoral, une conversation s'établit entre les acteurs présents. Les cellules du stroma fournissent des facteurs de croissance et des molécules stimulant l'angiogenèse. Même les globules blancs sont loin de tous lutter contre les cellules tumorales anormales. Certains macrophages par exemple génèrent un environnement inflammatoire propice à la régénération, donc à la prolifération cellulaire. La compréhension et le contrôle de ce micro-environnement tumoral sont donc des voies possibles de traitements des cancers.

Fiche 205

fiche 205

Le développement d'une tumeur

Le cancer est une maladie à développement lent et gradualiste. La plupart des tumeurs sont issues d'un seul clone dans lequel de multiples altérations génétiques se sont accumulées (modèle multi-hit). Après chaque nouvelle mutation, une compétition entre les cellules filles permet la sélection de celles ayant accumulé des avantages en terme de rapidité de croissance, d'immortalité, d'indépendance vis-à-vis du substrat, etc. Ainsi la tumeur évolue et devient de plus en plus agressive et envahissante.

1. Les stades histologiques du développement tumoral

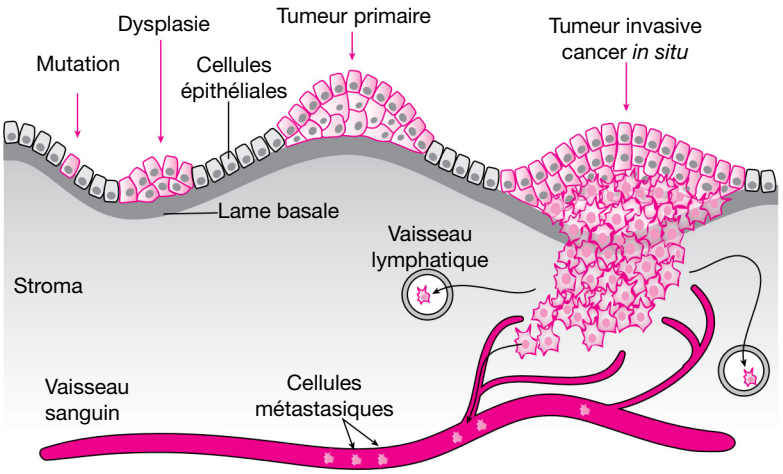


Figure 1 : Les différentes phases d'évolution d'une tumeur

Initialement, une cellule saine isolée perd le contrôle de sa prolifération et se multiplie indépendamment du tissu environnant. Il peut s'agir d'une cellule souche adulte qui a déjà l'immortalité et la capacité de prolifération, et dont aucune des cellules filles ne se différencie. Elle se transforme alors en cellule souche cancéreuse (CSC). Il peut s'agir au contraire d'une cellule différenciée qui se « dédifférencie ». Cette nouvelle croissance (néoplasie) s'accélère (hyperplasie) si les cellules modifiées ont une division plus rapide que les cellules normales.

L'accumulation des mutations génétiques produit des anomalies de maturation, de différenciation et de multiplication qui conduisent à une forme et un aspect anormal des cellules (dysplasie). Cela correspond à un état précancéreux qui peut régresser ou au contraire progresser vers une tumeur primaire. Les cellules sont de plus en plus anormales et se reproduisent de plus en plus vite mais ne franchissent pas la membrane basale. Il s'agit toujours d'une tumeur bénigne.

Si les cellules acquièrent la capacité de franchir la lame basale et d'envahir le tissu conjonctif, elles sont devenues malignes et forment un cancer invasif. Les cellules qui pourront migrer dans le sang ou la lymphe formeront éventuellement des tumeurs secondaires, ou métastases.

La limite de détection des tumeurs est autour de 1 cm, soit 10^9 cellules. La vie de l'individu est menacée lorsque le cancer atteint 10^{12} cellules.

2. Les étapes de la cancérogenèse

Au niveau cellulaire, trois étapes ont été identifiées.

Initiation

Il s'agit de mutations irréversibles provoquées par un cancérigène génotoxique ou initiateur tumoral. Les lésions peuvent concerner des gènes impliqués dans la croissance ou la différenciation cellulaire. Il peut également s'agir d'activation d'oncogènes ou de perte de suppresseur de tumeur dans des cellules souches adultes. Les cellules initiées restent parfois longtemps quiescentes.

Fiche 203

Promotion

La promotion correspond à la prolifération intense des cellules initiées. Cette prolifération favorise l'apparition d'autres mutations qui s'accumulent. Des substances exogènes ou endogènes peuvent jouer le rôle de promoteurs tumoraux. Ceux-ci permettent l'expression phénotypique des lésions induites par les initiateurs tumoraux. Il s'agit d'hormones, de facteurs de croissance, de cytokines, d'autres activateurs des voies de signalisation et de cancérigènes non génotypiques.

Progression

La transformation irréversible en cellules cancéreuses requiert des altérations génétiques supplémentaires au cours de la phase de progression. Cela se produit grâce à l'instabilité génomique, qui accélère le rythme des mutations ponctuelles ou des remaniements chromosomiques jusqu'à ce que la cellule ait accumulé les propriétés des cellules cancéreuses.

Fiche 200

Si on choisit le modèle du cancer colorectal, l'analyse des lésions précancéreuses et cancéreuses montre un ensemble très varié de lésions génétiques d'une tumeur à l'autre. Mais des suites d'événements se retrouvent fréquemment :

- Une mutation précoce d'*apc* (*Adenomatous Polyposis Coli*) dans 80 % des cas. C'est un gène suppresseur de tumeur contrôlant la transition G1/S.
- Puis des mutations de *k-ras* et de *dcc* (*Deleted in Cancer Carcinoma*, absents dans 70 % des carcinomes) conduiraient à des adénomes.
- La perte de p53 supprimerait l'apoptose et favoriserait l'accumulation des mutations provoquant finalement des carcinomes.

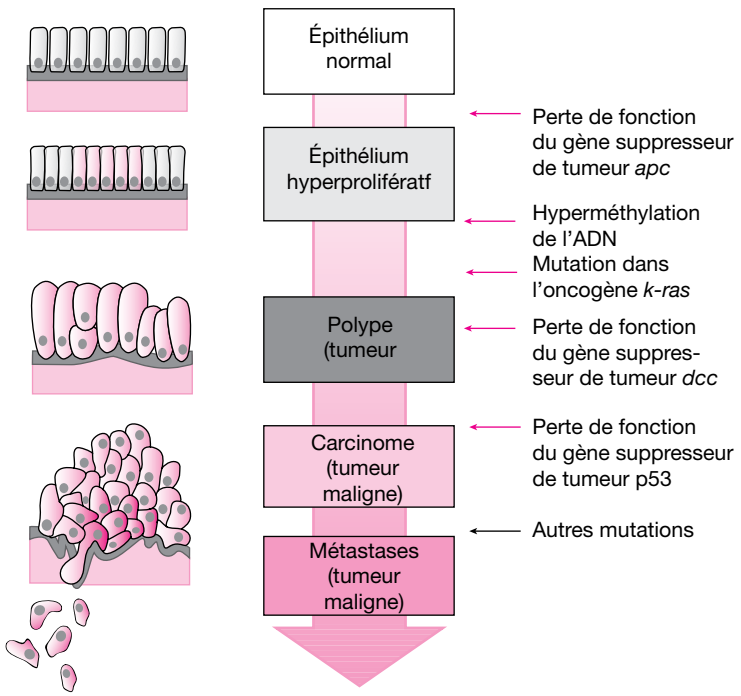


Figure 2 : Exemples d'étapes dans le développement d'un cancer colorectal

fiche 206

Envahissement par les métastases

La capacité d'envahir les tissus environnants est le propre des cellules cancéreuses, c'est ce qui les différencie des cellules tumorales bénignes. La dissémination dans tout le corps de multiples tumeurs secondaires rend le cancer difficile à éradiquer. Les métastases font toute la gravité d'un cancer et sont d'ailleurs responsables de 90 % des décès par cancer.

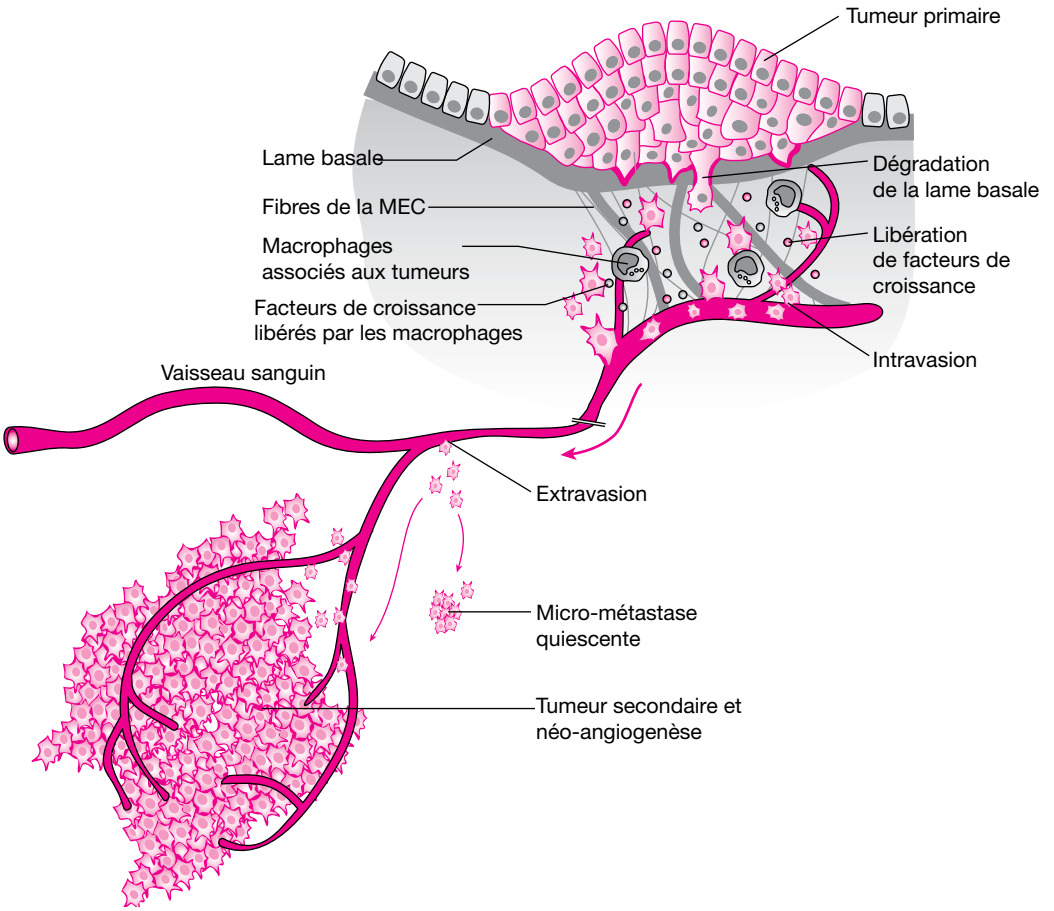


Figure 1 : La formation de métastases

1. Perte de cohésion et envahissement local

Le passage d'une tumeur bénigne à une tumeur maligne implique l'altération des mécanismes qui maintiennent normalement la cohésion d'un tissu. On assiste à un processus de transition épithélium/mésenchyme (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) où les cellules épithéliales très organisées prennent un phénotype de cellules mésenchymateuses, faiblement liées entre elles et capables de migration.

Fiche 167

Au cours de ce processus, il y a des modifications des molécules d'adhérence intercellulaire, en particulier la perte d'expression des E-cadhérines, et des molécules d'adhérence avec la matrice extra-cellulaire (MEC), les intégrines. Il y a sur-expression de protéases dégradant la MEC tels que des MMP (*Matrix MetalloProteinase*), des gélatinases qui digèrent la membrane basale. Enfin, la motilité cellulaire est augmentée par sur-expression de Rho, une petite protéine G impliquée dans la réorganisation du cytosquelette.

Fiches 148, 149, 155

Fiche 125

2. Néo-angiogenèse et intravasation

Les cellules ont besoin de nutriments et d'oxygène pour leur survie. Même si les cellules tumorales peuvent s'adapter aux conditions anaérobies, elles ont besoin de sucres et d'acides aminés essentiels car elles ont une croissance rapide. Au cours de la progression tumorale, des gènes impliqués dans l'angiogenèse sont altérés et vont favoriser la formation de nouveaux vaisseaux irriguant la tumeur.

Fiche 174

La sur-activation de récepteurs de facteurs de croissance (EGF, PDGF), d'intermédiaires de signalisation intracellulaire ou de facteurs de transcription (Ras, Src, HIF pour *Hypoxia Inducible Factor*) conduit à la production de grandes quantités de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par les cellules cancéreuses et le micro-environnement tumoral. Cette production n'est plus strictement limitée par la baisse de l'oxygène disponible (hypoxie), il y a donc un déséquilibre, nommé « switch angiogénique ». Les cellules endothéliales prolifèrent sous l'effet du VEGF et forment de nouveaux vaisseaux de façon anarchique, avec une perméabilité accrue.

Ce nouvel apport de nutriment permet le développement de la tumeur, mais permet également sa dissémination. Certaines cellules cancéreuses peuvent en effet pénétrer dans les capillaires sanguins (voie hématogène) et surtout dans les capillaires lymphatiques (voie lymphatique), ce qu'on appelle intravasation.

3. Développement de tumeurs secondaires

Les cellules cancéreuses sont soumises à de nouveaux stress dans les capillaires : pression sanguine, cellules de l'immunité… La mortalité est alors importante. Sous l'effet de facteurs d'adhérence, certaines cellules cancéreuses s'arrêtent puis sortent des capillaires (extravasation), notamment dans les ganglions lymphatiques ou les organes « filtres » (foie, poumons, os).

Dans ces nouveaux tissus, plusieurs scénarios sont possibles :

- les cellules cancéreuses n'arrivent pas à s'adapter à leur nouvel environnement, souffrent de carence nutritionnelle et meurent ;
- les cellules survivent mais restent quiescentes pendant une durée indéterminée. Elles sont susceptibles de se remettre à proliférer si des conditions favorables apparaissent ;
- les cellules cancéreuses réussissent à trouver une niche favorable à leur survie et forment une tumeur secondaire, ou métastase. La probabilité de survie dépend de la similitude entre le tissu initial et le tissu secondaire.

Seulement une cellule cancéreuse circulante sur 10 000 sera capable de former une métastase.

fiche 207 Principe des traitements classiques anti-tumoraux

Le cancer étant un dérèglement de l'homéostasie cellulaire, les traitements qui le combattent visent le plus souvent à intervenir dans les mécanismes du fonctionnement cellulaire. Il est donc intéressant pour le biologiste cellulaire de les connaître. Mais d'un point de vue médical, la prévention (donc l'éducation sur les comportements à risque) semble meilleure que le traitement.

1. Les traitements locaux

Chirurgie

L'ablation d'une tumeur bénigne ou maligne est possible lorsque celle-ci est bien délimitée. C'est une technique très efficace si le risque de laisser des cellules métastatiques est absent.

Radiothérapie

Comme avec certains traitements de chimiothérapie, l'instabilité génomique des tumeurs est poussée à son paroxysme. En effet, la radiothérapie consiste à irradier localement la zone de la tumeur avec une source externe à distance du corps ou au contraire une source scellée placée directement au contact (curiethérapie). Les radiations ionisantes endommagent l'ADN en provoquant des cassures simple brin, double brin ou des altérations de bases. Mais alors que les cellules saines arrêtent leur cycle cellulaire jusqu'à ce que les lésions soient réparées, les cellules cancéreuses ont justement perdu cette capacité. Elles se divisent donc avec des lésions catastrophiques qui provoquent leur mort.

2. Les traitements systémiques

Ils sont aussi appelés chimiothérapie. Les principaux modes d'actions sont de générer un stress cytotoxique ou de priver la tumeur d'éléments vitaux. Ces traitements « classiques » peuvent être considérés comme « à large spectre », car ils touchent des mécanismes fondamentaux de toutes cellules, même si la réponse tumorale est variable d'un patient à un autre en raison du polymorphisme génétique.

Lésions directes de l'ADN

Différentes familles de molécules attaquent directement l'ADN. Les agents alkylants (ex. cyclophosphamide, mitomycine C) créent des ponts inter-brins ou intra-brins, qui empêchent le dédoublement de l'ADN lors de la transcription ou de la réplication. Les alkylants monofonctionnels sont collectivement appelés « moutardes azotées » et sont des cancérigènes à plus faible dose. Les sels de platine qui sont bi-fonctionnels, créent des ponts entre les 2 brins. La division cellulaire ne peut alors aboutir. D'autres molécules, comme la bléomycine, provoquent des cassures double brin de l'ADN.

Perturbateurs des topo-isomérases

Fiche 31

Les topo-isomérases, ou hélicases, sont les enzymes indispensables pour désenrouler l'ADN avant sa transcription ou sa réplication. Les inhibiteurs empêchent la ligation des brins d'ADN après le désenroulement, ce qui conduit à des cassures qui finissent par

provoquer l'apoptose. La camptothécine (inhibiteur de topo-isomérase I) est extraite de « l'arbre de vie » chinois (*Camptotheca acuminata*). L'étoposide et les anthracyclines (doxorubine) sont des inhibiteurs de topo-isomérase II. Ces derniers sont également des agents intercalants.

Anti-métabolites

Ils perturbent la synthèse d'ADN en inhibant les enzymes nécessaires à la synthèse des bases ou en inhibant l'élongation des acides nucléiques. Le méthotréxate par exemple se combine à la dihydrofolate réductase (DHFR) et empêche la production d'acide folique indispensable pour la synthèse de la thymidine. D'autres molécules, comme le 5-Fluoro-Uracile (5'FU), sont des analogues des bases azotées.

Perturbateurs du fuseau mitotique

Deux familles de molécules avec des mécanismes opposés sont utilisées, ce sont de véritables anti-mitotiques. Les vinca-alcaloïdes (vinblastine et vincristine) sont extraits de la pervenche de Madagascar. Ils inhibent la polymérisation de la tubuline. Les taxanes sont extraits de l'if (taxol, taxotère). Au contraire, ils inhibent la dépolymérisation de la tubuline. Dans les deux cas, la cellule ne peut plus réaliser de mitoses.

Fiche 119

3. La résistance aux traitements

Les tumeurs dérivent le plus souvent d'un clone initial qui accumule des mutations. Au cours du processus de progression tumorale, alors que la tumeur grandit en taille et que les mutations s'accélèrent, différents sous-clones peuvent apparaître portant des mutations variées. La compétition pour les ressources fait que les sous-clones les plus performants se multiplient, la tumeur devient polyclonale. Lorsqu'un traitement anti-tumoral est administré, les différents sous-clones peuvent avoir une sensibilité différente du fait de leur variabilité génétique. Le traitement élimine les clones sensibles, mais les clones résistants prennent le dessus et la tumeur devient résistante.

Les sous-clones résistants peuvent réussir à évacuer les drogues anti-tumorales *via* la sur-expression de transporteurs ABC appelés *MultiDrug Resistant* (MDR). D'autres sous-clones ont tellement inhibé les voies de l'apoptose que les traitements ne conduisent pas à la mort cellulaire, mais au contraire aggravent encore plus l'instabilité génomique.

fiche 208

Les thérapies ciblées

Chaque cancer est le résultat d'une histoire naturelle particulière de mutations et d'aberrations qui ont conduit à un phénotype particulier de la tumeur. La médecine de précision, ou thérapie ciblée, s'adapte sur-mesure aux caractéristiques moléculaires de la tumeur.

En 2016, 43 thérapies sont autorisées en France, ciblant 20 mécanismes différents et bénéficiant souvent seulement à un sous-groupe de patients au sein d'un type histologique de cancer. En effet, des inhibiteurs de récepteurs spécifiques sont efficaces seulement si la tumeur du patient exprime ces récepteurs. Cela nécessite donc des nouvelles méthodes d'analyse moléculaire pour caractériser la maladie dont souffre un patient et décider de la meilleure option thérapeutique.

1. La détection des biomarqueurs des cancers

La connaissance approfondie de la biologie de différentes tumeurs a permis d'identifier des cibles thérapeutiques, appelées « biomarqueurs tumoraux ». Ces molécules sont sur-exprimées ou mutées sur certains cancers. Pour identifier un plus grand nombre de ces biomarqueurs, il est maintenant plus facile de caractériser individuellement une tumeur, par exemple par l'utilisation de puces à ADN. Ces puces permettent d'établir le profil d'expression des gènes et de faire des comparaisons entre tissus sain/dysplasique/cancéreux… Les biomarqueurs validés sont ensuite utilisés pour le diagnostic de l'agressivité d'une tumeur, le choix du traitement, la mise au point de nouveaux médicaments.

Fiche 53

En France, des plateformes hospitalières de génétique somatique des cancers sont chargées du dépistage de biomarqueurs qui sont la cible de thérapie ciblée prise en charge par l'assurance maladie.

Tableau 1 : Tests effectués par les plateformes de génétique moléculaire en France en 2012

Biomarqueur	Pathologies	Médicament
Détection de BCR-ABL	Leucémie myéloïde chronique (LMC) et Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)	imatinib (Glivec®), nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib
Quantification de BCR-ABL		
Mutation de BCR-ABL		
Mutation de cKit	Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	imatinib (Glivec®)
Mutation de PDGF-R		
Amplification de HER-2 (EGF-R)	Cancer du sein	Trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab, lapatinib
	Cancer de l'estomac	
Mutation de k-Ras	Cancer colorectal	Cetuximab (Erbitux®), panitumumab
Mutation d'EGF-R	Cancer du poumon	Gefitinib (Iressa®), erlotinib, afatinib
Mutation de BRAF	Mélanomes	Vemurafenib et dabrafenib
Translocation d'ALK	Cancer du poumon	Crizotinib

2. Mécanismes des thérapies ciblés

Les traitements ciblés peuvent être des thérapies hormonales, des inhibiteurs de récepteurs ou de voies de signalisation (avec un suffixe –ib pour les petites molécules inhibitrices, et –ab pour les anticorps monoclonaux ou encore des activateurs de la réponse immunitaire, qui sont traités fiche suivante.

Fiche 209

Les analogues d'hormones

Pour les cancers du sein, de la prostate et de la thyroïde, les récepteurs hormonaux sont conservés ou pas selon les tumeurs, ce qui peut constituer un facteur de pronostic. L'usage d'analogues hormonaux bloquant le fonctionnement des récepteurs (s'ils sont toujours présents) permet de limiter la prolifération tumorale. La découverte du tamoxifène, analogue de l'œstrogène, dans les années 1960, a révolutionné le traitement hormonal du cancer du sein.

Les inhibiteurs de tyrosine kinases

Après avoir bloqué la fixation du ligand sur son récepteur, une autre façon d'inhiber les récepteurs de facteur de croissance est d'interférer avec la transduction cytoplasmique du signal. C'est le rôle des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI). L'imatinib (Glivec ®) ou le géfitinib sont de petites molécules qui se fixent dans la poche de fixation de l'ATP du domaine tyrokine kinase de différents oncogènes. Dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques (LMC), 95 % des patients ont une translocation des chromosomes 9 et 22 (chromosome Philadelphie) conduisant à une protéine BcR-Abl toujours active. L'imatinib a permis de faire passer le taux de survie à 5 ans de 20 à 88 % pour ces patients.

Fiche 128

Les inhibiteurs des récepteurs de l'EGF

De très nombreux cancers dérivés de cellules épithéliales ont un dérèglement des récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*). Des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs HER 1 (cetuximab) ou HER 2 (trastuzumab, ou Herceptin ®) empêchent l'activation du récepteur par son ligand et provoquent la destruction des cellules couvertes d'anticorps par le système immunitaire (ADCC). Seulement 20 % des cancers du sein expriment HER-2, ce qui justifie de tester les patientes pour savoir si le traitement sera adapté. Il a été montré que certaines tumeurs présentent des mutations activatrices de *k-Ras* en aval du récepteur HER-1. Ces patients seront résistants au cetuximab.

Fiche 195

Les inhibiteurs de l'angiogenèse

Un autre type de thérapie ciblée consiste à « affamer » les tumeurs en inhibant le développement des vaisseaux sanguins qui les irriguent. Le Bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), interdisant ainsi la liaison de ce dernier avec ses propres récepteurs. La vascularisation de la tumeur s'en trouve inhibée et sa croissance limitée.

Fiche 174

fiche 209

Immunothérapie des cancers

Le concept que des cellules tumorales peuvent être éliminées par le système immunitaire a été proposé par Frank Macfarlane Burnet en 1957. Depuis de nombreux travaux s'intéressent à la détection des cancers par le système immunitaire, aux mécanismes d'échappement des tumeurs et aux moyens thérapeutiques qui en découlent, présentés ici.

Fiche 196

1. L'immunothérapie non spécifique

Le système immunitaire n'est pas toujours très activé contre certaines cellules tumorales qui sont anormales mais pas encore suffisamment.

L'immunothérapie non spécifique consiste à stimuler le système immunitaire de manière non ciblée, en lui fournissant des cytokines comme facteurs de croissance. Les molécules principalement utilisées sont les interférons et l'interleukine 2 qui vont stimuler l'action cytotoxique des lymphocytes T. Les premiers sont utilisés dans différents cancers de cellules immunitaires, le second dans des cancers du rein et des mélanomes. Dans le cas du cancer de la vessie, l'instillation de bactéries atténuées du BCG dans la vessie après la chirurgie provoque une inflammation locale qui favorise une réponse immune, y compris contre les cellules tumorales résiduelles.

Fiche 192

2. Des vaccins préventifs

Plus d'un cancer sur six dans le monde est de cause virale. Il existe des vaccins contre quelques-uns de ces virus comme l'hépatite B pouvant provoquer des cancers du foie et les papillomavirus pouvant provoquer des cancers du col de l'utérus mais aussi du pénis.

La mise au point de vaccins dirigés contre des antigènes tumoraux non viraux en est aux balbutiements.

Fiche 203

3. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Le premier, autorisé en France 2000, a été le trastuzumab dirigé contre le récepteur HER2 dans les cancers du sein ; il est proposé aujourd'hui pour de plus nombreuses indications. Les anticorps utilisés pour ces thérapies ciblées bloquent des récepteurs et des voies de signalisation, mais ils peuvent également provoquer la destruction des cellules tumorales recouvertes d'anticorps grâce aux molécules du complément et grâce à la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Il est même possible de coupler une chimiothérapie à un anticorps ciblant des antigènes tumoraux : c'est le cas du sacituzumab govitecan (trodelvy®) autorisé en France en 2021 contre les cancers du sein triples négatifs métastatiques.

Fiches 190, 195

Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICI)

Les anticorps monoclonaux bloquant CTLA-4 (ipilimumab, autorisé en 2011) et ceux bloquant PD-1 (nivolumab et pembrolizumab, autorisés en 2014 et 2017) sont les succès thérapeutiques pour lesquels Allison et Honjo ont reçu le prix Nobel de médecine 2018. Ils empêchent le blocage de la réponse immunitaire spécifique contre la tumeur, ce qui signifie que la réponse anti-tumorale sera renforcée. Leur utilisation en clinique contre

Fiche 196

des tumeurs métastatiques résistantes à tous les autres traitements (mélanomes, certains cancer du rein, et du poumon) a été très efficace mais seulement pour certains patients (environ 20 à 30%). Le traitement s'accompagne d'effets secondaires tels que des réactions auto-immunes, aussi il est important de comprendre comment traiter uniquement les patients qui en tireront un bénéfice. Traitement révolutionnaire en oncologie pour ces dernières années, le nombre d'indications est en rapide augmentation.

4. L'immunothérapie cellulaire

Il s'agit de médecine personnalisée : des cellules immunitaires du patient sont prélevées, améliorées *in vitro*, puis ré-injectées pour obtenir une réponse spécifique antitumorale plus efficace. On parle également de transfert adoptif.

Immunothérapie active

Le sipuleucel-T est le premier traitement de ce genre autorisé aux USA en 2010 et indiqué contre le cancer métastatique de la prostate. Des cellules dendritiques, capables d'activer les lymphocytes T cytotoxiques, sont prélevées au patient et activées *in vitro* en présence de PAP (*prostatic acid phosphatase*), un antigène spécifique de cette tumeur. Lorsqu'elles sont ré-injectées au patient, ces cellules initient une réponse immune antitumorale de la part des lymphocytes T, ce qui allonge la survie.

Fiches 190 et 193

Lymphocytes CAR-T

Ces lymphocytes T portent des récepteurs créés par génie génétique ciblant les cellules tumorales. Ces *Chimeric Antigen Receptor* associent des domaines variables d'immunoglobulines au domaine activateur du complexe de transduction du signal des lymphocytes T (CD3) ainsi qu'à des modules de co-stimulation.

Fiche 185

Les lymphocytes T du patient sont prélevés et modifiés par un lentivirus pour exprimer le récepteur chimérique dirigé contre une cible tumorale. Les CAR-T autorisés en 2017 (Axicabtagene ciloleucel et Tisagenlecleucel) ciblent la molécule CD19 présente sur les lymphomes B. Les lymphocytes T ainsi génétiquement modifiés sont activés *in vitro* et amplifiés avant d'être ré-injectés au patient. Au contact direct de l'antigène ciblé, les CAR-T libèrent leurs molécules cytotoxiques.

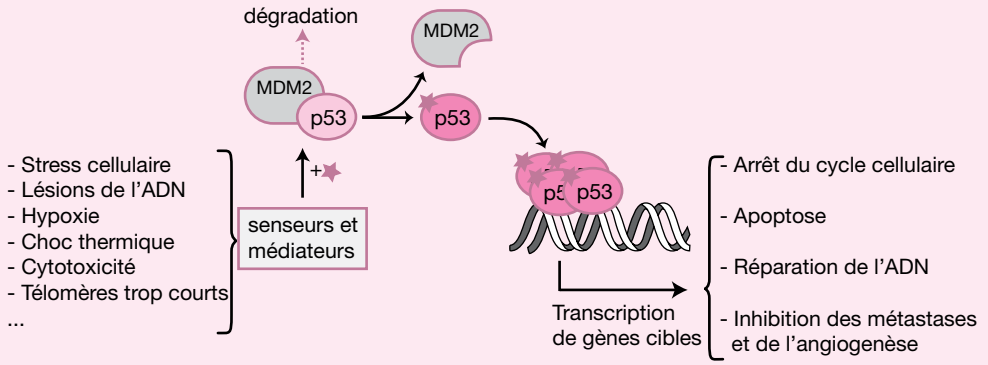
Cette méthode est pour l'instant surtout efficace sur les tumeurs non solides.

Depuis plus de 50 ans, la compréhension des réponses immunitaires fondamentales permet d'imaginer des outils thérapeutiques pour exacerber et déverrouiller l'action de nos propres cellules immunitaires contre nos tumeurs. L'immunothérapie du XXIe siècle, conçue sur mesure pour chaque tumeur, est en plein essor !

FOCUS p53, gardienne du génome

Il s'agit d'une protéine de 53kD identifiée en 1979 par 6 groupes indépendants de chercheurs. Cette protéine était abondante dans de nombreux cancers et était liée à la principale protéine oncogène du virus SV40. On lui attribua donc initialement un rôle oncogène, initiateur de tumeur. Le clonage du gène correspondant *TP53* en 1984 permit l'analyse de sa séquence dans de nombreux cancers.

Coup de théâtre en 1989, les scientifiques constatèrent que la séquence de *TP53* étudiée jusqu'alors était mutée par rapport aux cellules saines. Il ne s'agissait pas d'un oncogène mais au contraire d'un gène suppresseur de tumeur ! En 1990, les patients souffrant du syndrome de Li-Fraumeni furent identifiés comme porteurs de mutations héréditaires de *TP53*. Ils sont sujets à des cancers multiples et variés. Nous savons aujourd'hui que *TP53* est inactivée dans plus de 50 % des cancers et plus 25 000 mutations sont connues dont la majorité atteignent le domaine de liaison à l'ADN. En effet p53 agit comme un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose.



L'activité de p53 est modulée par des modifications post-traductionnelles. En 1993, le rôle MDM2 est mis à jour. C'est une ubiquitine ligase qui se lie à p53 et provoque sa dégradation par le protéasome. Ainsi dans les cellules normales, le taux de p53 est très bas. Lorsque la cellule subit différents types de stress, les senseurs de stress conduisent à des modifications particulières de la protéine p53 (phosphorylation, acétylation ou sumoylation). Celle-ci n'interagit plus avec MDM2 et s'accumule dans le noyau. Elle s'organise en tétramère et devient facteur de transcription. Il existe des centaines de gènes cibles de p53. Selon le type et le « niveau » de stress, différents gènes sont transcrits permettant à la cellule : de s'arrêter dans le cycle cellulaire pour réparer des lésions de l'ADN, d'entrer en sénescence lorsque les télomères sont trop courts, d'entrer en apoptose lorsque le génome ne peut être restauré… d'où son surnom de gardienne du génome.

La perte de fonction de p53 permet aux cellules de proliférer malgré des dommages de l'ADN, ce qui accroît l'instabilité génétique. Cela leur permet aussi d'échapper à l'apoptose et accélère donc le processus de cancérisation.

QCM

Indiquez la ou les réponses exactes. Les réponses sont au verso.

17.1 Quelles sont les affirmations exactes ?

- ☐ Les cellules qui prolifèrent de manière illimitée forment toujours des cancers
- ☐ Les cancers sont la première cause de décès partout dans le monde
- ☐ 40 % des cancers pourraient être évités par des changements de comportement

17.2 Quelles sont les affirmations exactes ?

- ☐ Les cancers sont des maladies génétiques, donc héréditaires
- ☐ Les porteurs de gènes mutés de prédisposition au cancer comme BRCA souffriront d'un cancer à un moment de leur vie
- ☐ Toutes les cellules d'une tumeur ont les mêmes mutations

17.3 Vrai ou Faux ? Les cellules tumorales diffèrent des cellules normales seulement par leur capacité de prolifération incontrôlée

17.4 Quels facteurs sont susceptibles de favoriser l'apparition ou le développement d'un cancer ?

- ☐ Facteurs hormonaux
- ☐ Facteurs immunitaires
- ☐ Agents physiques et chimiques
- ☐ Agents infectieux

17.5 Qu'appelle-t-on « gènes critiques du cancer » ?

17.6 Qu'appelle-t-on thérapie ciblée du cancer et en quoi est-ce différent des approches conventionnelles ?

17.7 Quelles sont les affirmations correctes ?

- ☐ Dans le micro-environnement de la tumeur, tout est mis en œuvre pour limiter son développement
- ☐ Toutes les tumeurs finissent par former des métastases
- ☐ Les cellules d'une tumeur peuvent former des métastases dans n'importe quel organe

17.8 Vrai ou Faux ?

- ☐ La chimiothérapie est le meilleur moyen de traiter les cancers
- ☐ Il n'existe pas de traitement du cancer sans effets secondaires importants

17.9 Donnez deux mécanismes de traitements systémiques anticancéreux

Réponses

17.1 **c**. Les cellules qui prolifèrent sans contrôle sont « transformées », certaines forment des tumeurs bénignes, et seulement certaines des tumeurs malignes. Dans les pays qui n'ont pas fait leur transition épidémiologique (pays en développement) les maladies infectieuses restent la première cause de mort. 4 cancers sur 10 résultent de l'exposition à des facteurs de risque liés à nos modes de vie et comportements, et pourraient donc être évités (Institut national du cancer).

17.2 **Aucune** ! Les cancers sont des maladies génétiques qui se produisent *de novo* dans les cellules somatiques. Lorsqu'un gène muté est transmis à la descendance, il entraîne un risque accru. L'instabilité génétique des tumeurs conduit à la formation de sous-clones, dont certains peuvent résister aux traitements.

17.3 **Faux**. Le métabolisme et les relations avec l'environnement (cellules voisines, cellules immunitaires) sont également modifiés.

17.4 **Tous**.

17.5 Ce sont les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Des mutations dans ces gènes peuvent aboutir à la tumorisation.

17.6 La thérapie ciblée s'adresse à des cancers qui ont une signature moléculaire particulière, par exemple l'expression du récepteur aux œstrogènes. Les traitements ciblés ne fonctionnent donc que sur ces tumeurs particulières, et tant que la cible est toujours présente au contraire des chimiothérapies classiques qui affectent toutes les cellules à des degrés divers.

17.7 **Aucune** ! Le micro-environnement est plutôt une niche favorable à la croissance de la tumeur. Seules les tumeurs qui acquièrent des propriétés de migration peuvent former des métastases, et elles s'installent généralement dans des tissus dont les caractéristiques histologiques sont proches du site initial.

17.8 **a**. **Faux**, la chirurgie permet de traiter 70 % des cancers solides, la radiothérapie est utilisée dans 2/3 des combinaisons de traitements. **b. Faux,** même si tous les traitements (y compris la chirurgie) peuvent induire des effets secondaires, les traitements locaux et les traitements ciblés induisent moins d'effets non souhaités.

17.9 Les traitements systémiques anticancéreux sont basés sur une l'immunothérapie, l'anti-hormonothérapie, des thérapies ciblées ou une induction non spécifique de la mort cellulaire.

Glossaire

Acide gras. Molécule fortement hydrophobe formée d'une longue chaîne carbonée et présentant une extrémité hydrophile sous forme d'un groupement acide carboxylique.

ADN germinal (configuration germinale de l'ADN). ADN transmis lors de la fécondation et transmis à toutes les cellules de l'organisme, sauf celles qui ont subi la méiose.

Alkylation, agent alkylant. Ajout d'un groupement alkyle (–CH3). Les guanines sont particulièrement la cible des agents alkylants qui induisent alors des dégâts dans l'ADN.

Allostérie. Cinétique particulière de certaines interactions protéine-ligand dans laquelle l'affinité de la protéine pour son ligand augmente avec l'abondance du ligand.

Amphiphile. Molécule composée d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe.

Antenne collectrice. Complexe de pigments des cellules photosynthétiques, permettant de capter un large spectre de radiations lumineuses.

Antigène. Molécule qui se lie à un récepteur du système immunitaire. Si en plus cette molécule déclenche une réponse, elle est alors immunogène.

Apoptose. Processus de mort cellulaire programmée, contrôlée par l'organisme, permettant le sacrifice d'une cellule ou d'une population de cellule en réponse à des signaux spécifiques.

Archées. Organismes procaryotes se différenciant entre autres des bactéries par leurs lipides membranaires.

ARNsi, RNAi (ARN interférent, *small interfering RNA*). Petits ARN double brin permettant la régulation de l'expression génique.

Asepsie. Méthodes visant à empêcher la contamination microbienne. À ne pas confondre avec l'antisepsie qui consiste à tuer les microbes.

Autocrine. Qualifie les processus où un messager chimique agit sur la cellule qui l'a produit.

Axonème. Partie axiale des cils ou flagelles eucaryotes.

Béta-oxydation. Voie métabolique de dégradation des acides gras par oxydation du carbone en position béta. Libère des fragments dicarbonés sous forme d'acétyl-coA

Canal ionique. Protéine transmembranaire assurant la diffusion facilité d'un ion. Son ouverture peut être permanente ou modulable.

Capside. Enveloppe protéique protégeant le matériel génétique d'un virus

CDK (*Cyclin dependant Kinase*). Kinase dépendant d'une cycline. Protéine de contrôle du cycle cellulaire.

Centre germinatif. Zone d'un follicule d'un organe lymphoïde secondaire (rate, ganglion lymphatique) dans laquelle les lymphocytes B activés sont en prolifération intense.

Chaîne de transfert d'électron. Voie métabolique d'oxydation et/ou de réduction de co-enzymes redox par transfert d'électrons le long d'une membrane, couplée à un transport transmembranaire de protons.

Chaperons. Facteurs protéiques permettant aux protéines l'acquisition d'une structure tridimensionnelle correcte.

Chiasma. Point de liaison entre deux chromosomes homologues à l'issue de la prophase I de méiose et lors de l'anaphase. Leur rupture définit le début de l'anaphase.

Chimiokine. Famille de cytokines stimulant le déplacement des leucocytes et leur migration dans les tissus.

Coatomères. Complexe protéique recouvrant les vésicules et permettant leur transport.

Coefficient de diffusion. Caractéristique d'une molécule indiquant sa facilité de déplacement dans un milieu donné, en $m^2 \cdot s^{-1}$.

Couplage. Mode de transfert d'énergie. Association de deux transformations, l'une spontanée, l'autre antispontanée, de telle sorte que la première entraîne la seconde.

Crossing-over. Mode de recombinaison de l'ADN chez les Eucaryotes. Lors de la prophase I de méiose, les brins d'ADN sont échangés entre chromatides.

Cycle de Calvin. Voie métabolique de production de matière organique à partir de dioxyde de carbone chez les organismes photosynthétiques.

Cycle de Krebs. Voie métabolique d'oxydation complète d'un acide acétique présenté sous forme d'acétyl-coA. Le déchet est le dioxyde de carbone.

Cytodiérèse. Étape de la mitose correspondant à la séparation des deux cellules filles.

Cytokine. Protéines agissant comme molécules de communication du système immunitaire.

Cytokinines. À ne pas confondre avec les cytokines ! Les cytokinines sont des messagers intercellulaires des plantes.

Domaine immunoglobuline. Repliement caractéristique d'un sous-domaine protéique en deux brins beta antiparallèles. Trouvé à l'origine pour les immunoglobulines, ou anticorps, ce motif structural est présent dans de très nombreuses protéines aux fonctions diverses.

Électrogénique. Qui crée une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Endosymbiose. Désigne l'acquisition des mitochondries et des chloroplastes par les Eucaryotes par symbiose interne de bactéries.

Entérocyte. Principale cellule de l'épithélium intestinal. Ce sont des cellules polarisées, responsables de l'absorption intestinale.

Enthalpie libre. Fonction thermodynamique d'état mesurant le degré de spontanéité d'une transformation. Plus sa variation est négative, plus la transformation est spontanée.

Eucaryote. Organisme dont les cellules possèdent un noyau véritable, délimité par une enveloppe nucléaire.

Exocytose. Processus permettant aux protéines d'être secrétées.

Exonucléase. Enzyme permettant de digérer un brin de l'ADN (soit en partant de l'extrémité 5' phosphate, soit de l'extrémité 3' OH).

Fermentation. Voie métabolique anaérobie d'oxydation incomplète de substrats organiques. Repose souvent sur la réalisation de la glycolyse.

Filipode, Lamellipode, Pseudopode. Excroissance cellulaire due au cytosquelette.

Flip-Flop. Passage d'une molécule lipidique d'un feuillet à l'autre dans une bicouche lipidique.

Flore commensale (microbiote de l'organisme humain). Ensemble des micro-organismes (bactéries, champignons, levures, virus) hébergés par l'homme et ne provoquant pas spontanément de maladies.

Fluorophore/fluorochrome. Molécule capable d'émettre de la lumière après excitation à une longueur d'onde particulière. Les longueurs d'onde (couleur) d'émission et d'excitation sont caractéristiques de la molécule.

fMLP : formyl-Méthionine-Leucine-Phénylalanine. Résidu du métabolisme microbien qui active fortement le système immunitaire.

GAP (protéines). Protéines stimulant l'activité de dégradation du GTP des protéines G (qui elles-mêmes sont des protéines fixant le GTP)

GEF (protéines). Protéines remplaçant le GDP par le GTP sur les protéines G. A le rôle inverse de la GAP.

Gène homéotique. Gène d'identité de position définissant lors du développement embryonnaire un segment de l'animal ou un segment d'un organe. Codent pour une protéine qui est un facteur de transcription.

Glycolyse. Voie métabolique d'oxydation ménagée du glucose menant à la production d'acide pyruvique

Gradient électrochimique. Différence d'abondance d'une espèce chimique de part et d'autre d'une membrane. Intègre à la fois la différence de concentration et la différence de potentiel électrique. S'exprime en $J \cdot mol^{-1}$

Granulocyte. Terme générique pour les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles qui sont des leucocytes contenant de nombreux granules cytoplasmiques.

Holoenzyme. Complexe enzymatique activé par des cofacteurs*.

Hydrophile. « Qui aime l'eau » et est donc soluble dans l'eau.

Hydrophobe. « Qui a peur de l'eau » et repousse ou est repoussé par l'eau. Ces molécules ne sont donc pas solubles dans l'eau mais plutôt dans les solvants organiques ou les corps gras (lipophile).

Isotype. Une des cinq formes de la partie constante des chaînes lourdes des anticorps IgM, IgD, IgG, IgE ou IgA, qui définit aussi la « classe » de l'anticorps.

Kinases-Phosphatases-Phosphorylases. Enzymes impliquées dans la liaison de groupements phosphates sur les molécules organiques. Les kinases catalysent le transfert du phosphoryl d'un ATP vers un substrat (ou l'inverse). Les phophatases catalysent le décrochage par hydrolyse d'un groupement phosphoryl (ou l'inverse). Les phosphorylases catalysent une phosphorolyse (ou l'inverse) sans intervention de molécule d'eau.

Kinétochore. Complexe multiprotéique qui relie le centromère aux microtubules.

Lamina propria. Tissu conjonctif sur lequel reposent les cellules épithéliales dans les muqueuses.

Lectine. Protéine pouvant reconaitre et se lier à des résidus glucidiques

Leucocyte ou globule blanc. Cellule du sang responsable des réponses immunitaires.

Lipopolysaccharide (LPS). Composé de la paroi des bactéries gram-négatives qui active fortement le système immunitaire.

LUCA (*Last Unique Common Ancestor*). Dernier ancêtre commun à tous les êtres vivants actuels.

Lymphe. Liquide biologique dérivé du plasma sanguin et contenant des lymphocytes. La circulation lymphatique draine les tissus parallèlement aux veines jusqu'aux ganglions lymphatiques.

Matrice extracellulaire. Phase macromoléculaire des espaces intercellulaires. On la nomme paroi squelettique dans le cas des cellules végétales.

---

* La partie protéique est appelée apoenzyme et la partie non protéique coenzyme.

Mésenchyme. Tissu de soutien à cellules non jointives contribuant à la communication entre les organes.

Métabolisme. Ensemble des réactions chimiques se produisant dans la cellule.

Miroir dichroïque. C'est un miroir semi-réfléchissant qui renvoie les rayons lumineux dont la longueur d'onde se situe dans une certaine plage et se laisse traverser par les rayons lumineux dont la longueur d'onde n'appartient pas à cette portion du spectre.

Mitogène. Substance qui provoque la mitose et la prolifération cellulaire.

Molécule du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Protéines permettant de présenter des peptides provenant du cytoplasme ou de l'entourage d'une cellule à des lymphocytes T.

Multipotente (cellule). Se dit d'une cellule-souche capable de donner naissance à plus d'un type cellulaire.

MVB. Lysosome contenant des vésicules d'endocytose

Myocyte. Cellule musculaire. Les cellules musculaires squelettiques sont des fibres résultant de la fusion de plusieurs précurseurs.

Nécrose. Processus de mort cellulaire « accidentelle », par rupture de membrane, suite à une anoxie ou une blessure, ou un choc osmotique…

NES (séquence). Séquence permettant à la protéine d'être exporté du noyau.

$Ni2^{+}$-NTA (*Nickel-NitriloTriacetic Acid*). Ces complexes sont utilisés principalement en chromatographie d'affinité pour retenir des protéines contenant une succession de 6 à 10 histine (poly-His tag).

NLS (séquence). Séquence permettant à la protéine d'être envoyé dans le noyau

Opéron. Unité d'expression de gènes. L'ensemble des phases codantes de l'opéron est transcrit dans la même molécule d'ARN.

Opsonisation. Processus de fixation de molécules à la surface des microbes et qui en accélère la phagocytose.

Organe lymphoïde primaire (ou centraux). Lieux de production et de développement des lymphocytes (moelle osseuse et thymus).

Organe lymphoïde secondaire (ou périphérique). Lieux de déclenchement des réponses immunitaires adaptatives.

Paracrine. Qualifie un processus où un messager chimique agit sur les cellules voisines de celle qui l'a produit.

Photosystème. Pièce maîtresse de l'acte photochimique de la photosynthèse. Organisé autour d'une molécule de chlorophylle, il permet, grâce à la lumière, de former un réducteur fort à partir d'un réducteur faible.

Pluripotente (cellule). Se dit d'une cellule-souche qui peut donner naissance à l'ensemble des types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme).

Potentiel de membrane. Différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule. Un potentiel négatif marque un compartiment intracellulaire négatif par rapport à l'extérieur.

Potentiel de Nernst. Défini pour un ion dans une situation donnée de concentrations intra- et extra-cellulaire. Donne la valeur du potentiel de membrane qui permettrait à la situation considérée d'être équilibrée.

Pression osmotique. C'est la pression qu'il faudrait appliquer pour empêcher l'eau de traverser une membrane semi-perméable vers la zone la plus concentrée en solutés.

Mesurée en milliosmole par litre (mOsm/L), elle dépend de la température et de la concentration des solutés de part et d'autre de la membrane.

Procaryote. Organisme dont le matériel génétique est libre dans le cytoplasme.

Processif (mécanisme). Se dit d'un mécanisme qui, une fois initié, se déroule de manière régulière sans s'interrompre « accidentellement ».

Protéasome. Complexe enzymatique multiprotéique permettant de dégrader les protéines anormales ou devant être recyclées après qu'elles aient été couplées à des ubiquitines.

Quiescence. État de « pause » physiologique permettant de redémarrer un processus de division cellulaire

Rab (protéines). Protéines G régulant le transport vésiculaires

Reverse transcriptase. Activité enzymatique permettant la synthèse d'ADN à partir d'une matrice ARN.

RISC (complexe). Complexe multi protéique permettant la fixation de l'ARNi sur sa cible

Sarcolemme. Structure composée de la membrane plasmique des cellules musculaires et de la lame basale les entourant.

Sénescence. Processus de vieillissement aboutissant à la mort

Séquençage en parallèle. On réalise simultanément des milliers, voire des millions de réactions de séquence.

Séquence signal. Peptide d'une protéine qui permet son adressage à un organite particulier.

Sérum. Partie liquide du sang après sa coagulation.

Site actif. Domaine d'une enzyme assurant la catalyse d'une réaction en contraignant les réactifs.

SNP. Polymorphisme dû à la mutation d'une base. La différence entre une mutation ponctuelle et un « SNP » est liée à la fréquence du SNP qui doit être retrouvé dans plus de 1 % de la population.

snRNP. Prononcez « snurp ». Particule regroupant un petit ARN et des protéines dans le noyau cellulaire.

Streptavidine-biotine. La streptavidine se lie à la biotine (ou vitamine H) avec une affinité de l'ordre de 10^{15} M. Cette interaction extrêmement forte est utilisée pour réaliser des couplages de molécules biologiques.

Synapse. Structure assurant la transmission d'un signal chimique très local (un neurotransmetteur) entre un neurone et une cellule cible (neurone, cellule musculaire, cellule sécrétrice).

Syncytium. Cytoplasme contenant plusieurs noyaux et entouré d'une membrane plasmique.

Totipotente (cellule). Cellule capable de générer un organisme entier.

Transcriptome. Ensemble de séquences transcrites d'une ou d'un groupe de cellules.

Transamination. Réaction d'échange d'un groupement amine entre un acide aminé et un acide alpha-cétonique.

Transduction. Processus par lequel une cellule répond à un signal qu'elle reçoit.

Transfection. Transfert de gènes dans une cellule eucaryote, similaire à la transformation pour les bactéries. Pour les eucaryotes, la transformation correspond à un état pré-cancéreux.

Index

Les numéros de page en **gras** correspondent aux entrées du glossaire.

Symboles

α-actinine 279, 283
γTuRC 275, 276

A

acétylation 143
acétyl-choline 353
acide
  abscissique 306
  alpha-cétonique 258
  aminé 28, 40, 66
  gras 32, 33, 155, 156, 157, 158, 159, 162, 163, 167, 196, 198, 226, 258, 310, **487**
actine 24, 278, 280, 283, 284, 304, 314, 338, 344
activateur 136
  CAP 127
  de croissance 324
adénylyl cyclase 294
ADN germinal 418, 432, 433, **487**
agent alkylant 471, 478, **487**
alkylation 75, **487**
allostérie 52, 53, 299, **487**
amidon 31, 36, 37
amination 258
AMPc 294, 298
amphiphile 29, 32, 155, 162, 164, 168, 183, 190, **487**
ancre GPI 163, 203
anergie 452
angiogenèse 404, 465, 477, 481
anneau contractile 278
antenne collectrice 252, **487**
anticorps 57, 120, 148, 186, 420, 450, 456
  monoclonal 15, 456, 481
  polyclonal 456
antigène 146, 184, 417, 420, 421, 423, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 453, 455, 456, 457, 458, **487**
anti-inflammatoire 425
antiport 172, 245
apoptose 161, 163, 214, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 383, 399, 433, 436, 437, 445, 447, 464, 465, 467, 469, 475, 479, 484, **487**
appareil de Golgi 16, 154, 161, 200, 202, 220, 224, 231, 300, 347
apprêtement des antigènes 438
aquaporine 168
archées 6, 8, 9, 246, **487**
ARF 220
ARN 34, 56, 66, 100
  polymérase 100, 103, 104
  polymérase II 108, 129
  polymérase III 110
ARNi 101, 134, 135, 329
ARNm 34, 100
ARNmi 134, 466
ARNr 100
ARNsi 329, **487**
ARNsn 101
ARNt 110
asepsie 328, **487**
astrocyte 391
asymétrie 160
ATP 49, 170, 207, 243, 244, 246, 248, 255, 264, 278, 284, 242, 294
ATPase P 170
ATPase V 171
ATPsynthase 164, 171, 244, 248, 255, 263
atténuation 127
autocrine 444, **487**
auto-immunité 452
autophagie 234
autophagosome 234
auxine 306
axonème ciliaire 277, 286, **487**

B

bactériophage 10
basophile 417
BcR 437
béta-oxydation 33, 192, **487**
biais codonique 99
bicouche 32, 183
BiP 205
blastopore 372
bouton synaptique 352
bréfeldine A 224

C

cadhérine 338, 344, 477
calcium-ATPase 170, 284
calmoduline 280
calnexine 203, 438
calréticuline 203, 438
CAM 338, 348
canal 21
  calcium potentiel-dépendant 284
  de fuite 169, 176
  ionique 165, 169, 178, 179, 180, 188, 226, 353, **487**
  ligand-dépendant 169
  mécanosensible 169, 354
  potentiel dépendant 169
canalopathie 188
cancérigène 471
capside 10, 11, 18, 429, **487**
CapZ 279, 283
caspase 323, 326
catalyseur 50
caténine 279, 344, 367
cavéole 231
CD40, CD40L 448
CDK 321, 324, 468, **487**
ceinture d'adhérence 281, 338
cellule
  dendritique 417, 423, 435, 439, 440
  endothéliale 397, 404
  germinale primordiale 143
  immortalisée 464
  multipotente 395, 398, 402, 407, 414
  pluripotente 374, 398, **487**
  présentatrice d'antigène 435
  souche
    adulte 398, 399, 408
    cancéreuse 474
    embryonnaire 375, 377, 378
    hématopoïétique 398, 402, 408, 432
    neurale 406
    pluripotente 145, 374, 376, 377
  totipotente 9, 17, 374, 388, **487**, 413, 414
cellulose 24, 36, 37, 39
centre
  germinatif 449, **487**
  réactionnel 253

centrifugation
différentielle 14
isopycnique 15
« sur coussin » 15
sur gradient 14
zonale 14
centriole 276
centromère 72, 316
centrosome 276, 318
chaîne de transfert d'électron 8, 198, 199, 244, 254, 266, 268, **487**
chaperon 198, 205, 206, 207, 215, 438, **487**
chiasma 360, 361, 388, **487**
chimiokine 423, 424, 444, 445, 447, **487**
chimiosynthèse 251
chimiotactisme 425
chimiothérapie 478
chip 148
chloroplaste 7, 16, 261, 262
chromatide 72, 316
chromatine 128, 136
chromosome 69, 72
cil 277
clathrine 218, 224, 225, 226, 228, 230
claudine 343
CMH 165, 429, 431, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 448, **487**
coagulation 424
coatomère 218, 220, 239, **487**
code des histones 140
codon 98
coefficient
de diffusion 158, 159, 166, 187, **487**
de perméabilité 166
cohésine 316
coiffe 108, 115, 134
collagène 24, 329, 334, 394
commutation de classe 449, 450, 455
complément 419, 420, 424, 427, 451
complexe synaptonémal 360
COMT 275, 276, 347
concentration micellaire critique 183
configuration germinale 432
conjonctif 335
connexon 340
constante d'affinité 450
contact focal 347
contrôle stringent 113
COP 220, 221, 223
corpuscule basal 277
co-transport 167
couplage 22, 23, 48, 49, 51, 59, 60, 108, 126, 164, 172, 184, 186, 190, 243, 244, 248, 249, 268, 284, 341, 356, **487**
crossing-over 78, 95, 360, **487**
cryofracture 158
CTLA-4 452
culture primaire 328, 350
cycle
cellulaire 73, 320, 324, 383
de Calvin 250, 251, 252, 254, 256, 258, 260, 261, 267, 268, **487**
de Krebs 49, 156, 198, 243, 244, 246, 258, 268, **487**
lytique 10, 11
cycline 321
cyclo-oxygénases 425
cytochalasine D 279
cytodiérèse 281, 314, 319, **487**
cytokine 231, 296, 395, 402, 417, 422, 423, 424, 425, 428, 441, 442, 443, 444, 445, 448, 449, 458, **487**
cytokinine 306, 307, **487**
cytométrie en flux 410
cytosquelette 9, 21, 24, 159, 278, 282, 286, 338, 347
cytotoxicité cellulaire
dépendante des anticorps 429, 451

D

DAMP 419, 422
décarboxylation 243
défensine 427
Delta 300
desmine 272, 283, 290
desmosome 338, 345
détergent 183
diabète sucré 310
diacinèse 360
diacylglycérol 294
diapédèse 422
Dicer 135
diffusion 167, 168
disque Z 283
division cellulaire 264
domaine immunoglobuline 430, 434, **487**
double-hybride 136
dynéine 228, 277, 281, 286

E

E-cadherine 464
ectoderme 372, 374
édition 138
EDTA 350
EGF 296, 477
éicosanoïde 425
électrogénique 171, **487**
électrophorèse 56
ELISA 457
empreinte génomique 142
endocytose 230
endoderme 372, 374
endosome 231
endosymbiose 7, 262, 303, **487**
énergie interne 44
entérocyte 342, 458, **487**
enthalpie libre 43, 44, 45, 46, 47, 59, 60, **487**
enveloppe nucléaire 194, 317, 318
enzyme 49, 52
de restriction 90
éosinophile 417, 423
ependymocyte 391
épibolie 372
épigénétique 140, 144, 150, 377, 396, 471
épissage 106, 134, 348
épithélium 390, 391, 392, 394
épitope 431
ERGIC-53 223
érythropoïétine (EPO) 402
éthylène 306
eubactéries 6, 8
exclusion allélique 433, 436, 437
exocytose 164, 193, 228, 238, 239, 265, 353, 365, 387, 388, 393, **487**
exon 106, 378
exonucléase 76, 82, 95, 100, 110, **487**
exosome 232
expansion clonale 443, 446

F

facteur de croissance 464, 468
de l'endothélium vasculaire (VEGF) 405
des colonies 444
EGF 296, 477
TGFβ 423
Th1 443
Th2 443
Th17 443
facteur de survie 324
facteur de transcription 130, 136, 419, 468
FADH2 243, 245, 246
FAK 346
fantôme d'hématies 182
fécondation 374

Index

fermentation 8, 17, 18, 246, 247, 267, 268, 465, **487**
feuillet bêta 41
fibre
  blanche 401
  de tension 281, 287
  rouge 285, 401
fibrinolyse 424
fibronectine 346, 373
filament
  épais 282
  fin 283
  intermédiaire 24, 272, 338, 345
filamine 279
filipode 287, 304, **487**
fimbrine 279
flagelle 277
FLIP 187
flip flop **487**
flippase 161
floppase 161
flore commensale 418, 458, **487**
fluorescence 410
fluorochrome (ou fluorophore) 54, 163, 184, 185, 186, 187, 410, 411, 413, 457, **487**
fMLP 418, 419, **487**
fragment d'Okazaki 82
FRAP 187
fuseau
  achromatique 314, 316, 318
  mitotique 276
fusion membranaire 25

G

ganglion lymphatique 416, 440
GAP 219, **487**
gastrulation 372
GEF 219, 224, 305, **487**
gène
  bicoid 371
  homéotique 368, 369, 371, 387, 388, **487**
  nanos 371
  sry 362
  suppresseur de tumeur 468, 472
  tdf 362
génome 64, 66, 68, 70, 84, 90, 162, 262, 316, 408
GFP 54, 186, 212, 264, 406
globule
  blanc 402, **487**
  rouge 402
glucagon 294
GLUT1 169
glycogène 37
glycolyse 30, 53, 157, 242, 243, 244, 246, 256, 258, 267, 268, 285, 401, **487**
glycophorine 182
glycosylation 146, 161, 202, 225
GMPc 294
gradient 47
  électrochimique 167, 171, 172, 175, 190, 244, 168, 170
granulocyte 231, 395, 416, **487**
granzyme 447
GTP 49, 243, 274
guanylyl cyclase 294

H

haptène 431
hélice alpha 41, 163
hématocrite 402
hématopoïèse 402
hématopoïétine 444
hémicellulose 336
hémidesmosome 346
hémostase 422
hépatocyte 397, 420
histamine 427
Holliday 78
HRE 131
Hsp70 198
hybridome 456
hydrophile 17, 18, 20, 26, 27, 28, 29, 32, 155, 188, 190, 199, 248, 334, 335, 337, **487**
hydrophobe 18, 27, 29, 32, 62, 131, 155, 162, 163, 167, 169, 183, 189, 190, 193, 195, 199, 203, 206, 212, 248, **487**

I

IEF 57
immunoglobuline
  Fab 430, 450, 457
  Fc 430, 450
  IgM 437
  IL1 423, 425
  IL6 423, 425
  isotype 449, 450, 455, **487**
  membranaire 430
Indel 74
initiateur tumoral 475
initium 380
inositol tri phosphate 294
instabilité
  dynamique 275, 278
  génomique 471, 472, 475, 478
insuline 296
intégrine 346, 373, 464, 477
interféron 296, 428, 444
interleukine 444
  immunoblot 57
intron 106
ion 27, 47, 167, 172, 176
iPS 130
isolateur 137

J

Jak-STAT 296
jonction
  gap 340
  lacunaire 340
  serrée 342

K

KDEL 222
kératine 272
kinase 105, 120, 290, 296, 297, 298, 299, 302, 305, 306, 311, 312, 321, 346, 378, 419, 428, 468, 471, 472, **487**
kinésine 228, 280
kinétochore 72, 73, 276, 316, 317, 319, 361, **487**
kinine 424
Knock Out 378

L

lame basale 335
lamellipode 278, 287, 304, **487**
lamina propria 458, **487**
lamine 273, 290, 316, 318
laminine 329, 346
lectine 203, 204, 223, 418, 419, 420, 429, **487**
leptotène 360
leucocyte 328, 349, 402, 416, 417, 421, 422, 423, 424, 434, 445, **487**
liaison peptidique 36
lidocaïne 188
lignée
  cellulaire 328
  immortalisée 328
  transformée 328
lignine 337
LINEs 81
lipidation 163
lipide 29, 32, 155, 158, 183
lipopolysaccharide 418, 419, **487**
liposome 183
lipoxygénase 425
loi de Fick 166
LUCA 7, 17, 18, **487**
lymphe 342, 416, 440, 442, 448, 449, 474, **487**

lymphocyte 423, 430
B 417, 435, 440, 441
intra-épithélial (IEL) 458
mémoire 443, 452, 454
naïf 442, 455
Natural Killer 417, 429
T
auxiliaire (Helper) 443
CD4+ 417
CD8+ 417
CD8 effecteurs 446
mémoire 443
régulateur 443, 458
lysosome 226

M

macromolécule 36, 38
macrophage 418, 420, 423, 435, 440, 441
MALT 416
mannose 6 phosphate 226
MAP 275, 276
MAPkinase 299, 307, 324
mastocyte 417, 418, 423
matrice extracellulaire 3, 24, 165, 257, 287, 338, 346, 350, 357, 373, 390, 394, 395, 399, 404, 414, 464, 465, 467, 473, **487**
maturation d'affinité 449, 455
médiateur 128, 129, 136
mégacaryocyte 402
méiose 73, 360
mémoire immunologique 454
méristème 337, 380
mésenchyme 476, **487**
mésoderme 372, 374, 394
mésosome 315
métabolisme 8, 11, 18, 28, 44, 130, 165, 196, 246, 247, 248, 250, 251, 261, 267, 268, 285, 310, 365, 384, 418, 419, 425, 465, **487**
oxydatif 427
métastabilité 43
métastase 465, 474, 476
méthode
de Sanger 85
du double hybride 55, 136
méthylation 143
micelle 32, 183
micro-environnement tumoral 473
microglie 391
microscope 185, 186, 282
confocal 186
électronique 264
à balayage 13
à transmission 12
optique 12
microtubule 24, 25, 274, 276, 280, 314, 316, 318, 361
microvésicule 232
microvillosité 278
migration transendothéliale 349
MIP 424
miroir dichroïque 410, **487**
MITES 81
mitochondrie 7, 16, 244, 261, 262, 264, 401
mitofusine 265
mitogène 320, 324, 325, 471, **487**
mitose 73, 314
modèle
de Holliday 78
de « Streisinger » 74
moelle osseuse 416, 437
monocyte 417, 440, 441
mosaïque fluide 158
moteur 23, 25
moléculaire 280
motoneurone 284
MPF 330
mucoviscidose 188
muqueuse 418, 440
muscle 400, 401, 404
mutagenèse conditionnelle 379
mutation 74, 139, 466
MutS-MutL 76
MVB 231, **487**
myéline 391
myéloperoxydase 427
myocyte 278, 282, 283, 284, 401, **487**
myofibrille 282
myoglobine 401
myosine 280, 284, 305, 314

N

NADH, H+ 243, 245, 246
NADPH 251, 254, 255
oxydase 427
nécrose 322, 324, 419, **487**
neurone 391
neutrophile 417, 423
Ni2+-NTA 184, **487**
niche 399
NLS 195, **487**
NO synthase 427
Notch 300
nucléosome 68
nucléotide 29, 34, 56, 68

O

occludine 343
oligodendrocyte 391
oncogène 466, 468, 470, 472
opéron 66, 67, 130, **487**
lactose 126, 173
tryptophane 127
opsonine 419
opsonisation 419, 421, 451, **487**
ORC 70
organe lymphoïde
primaire 416, 430, 436, **487**
secondaire 416, 440, 441, 442, 446, 448, 449, **487**
origine de réplication 70
ose 28
osmose 31, 167
ovocyte 364
oxydation 30

P

p53 469
pachytène 360
PAMP 418
paracellulaire 342
paracrine 444, **487**
patch-clamp 179
PCR 88, 148, 379
PD-1 452
pectine 336, 337
perforine 447
perméase 21, 168
peroxysome 196, 260, 261
phage display 55
phagocytose 230, 426
phagosome 230, 426
phosphatase 91, 108, 299, 305, 427, **487**
phosphatidyl inositol bis phosphate 294
phosphorylation 146, 298, **487**
photoblanchiment 187
photorespiration 260
photosystème 252, 254, 255, 268, **487**
phragmoplaste 315, 319
phytohormone 306
pinocytose 230
PKA 298
plaque
de Peyer 458
équatoriale 319
métaphasique 319
motrice 284, 352
plaquette 402
plasma 402
plasmine 424
plasmocyte 448
plasmodesme 340
PLC 294
point de contrôle 320
polarité cellulaire 159

polyadénylation 108, 134
pompe 21
pont d'acto-myosine 284
pore nucléaire 194
porine 163
potentiel
  d'action 178, 180
  de membrane 47, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 189, 190, **487**
  de Nernst 175, 176, 177, **487**
  électrique 174
PPSE 354
PPSI 354
pRb 469
prédisposition au cancer 466
présentation croisée 439, 446
pression osmotique 14, 167, 315, **487**
primordium 380
processif (mécanisme) 103, **487**
progéniteur 399, 402
promoteur 66, 127, 128, 147
  tumoral 475
protéasome 203, 204, 210, 211, 214, 215, 301, 311, 312, 405, 438, 484, **487**
protéinase K 212
protéine 40, 53, 66
  chaperon 203, 206
  de phase aigüe 423
  G 294, 302, 304
  kinase 468
  membranaire 155, 162
  Rab 219, 221, 228, 229, **487**
  Ras 297, 324, 477
  recombinante 146
  Rho 304, 346
protéoglycane 334
protéome 262
PRR 418
pseudopode 287, 404, 426, **487**
puce à ADN 118, 480

Q

quantum dot 184
quiescence 384, 464, **487**

R

radeau lipidique 159, 163
radicaux libres 427
radiothérapie 478
Ramachandran 40
RANTES 424
rayons X 55, 146
RBS 114
réaction acrosomiale 365
réarrangement 433, 436
RecBCD 79
récepteur
  couplé aux protéines G 445
  enzyme 302
  FcR 450
  membranaire 294
  nicotinique 353
  stéroïdien 131
recombinaison 78, 80
  homologue 378
  somatique 433
réponse
  primaire 455
  secondaire 455
répresseur LacI 127
réserve 31, 33
respiration anaérobie 246
resveratrol 385
réticulum endoplasmique 16, 154, 161, 200, 222
reverse transcriptase 81, 82, 95, **487**
RIA radioimunoassay 457
ribosome 112
RISC 135, **487**
RMN 55, 146
RNAi 101, 329, **487**
RubisCO 250, 260, 263

S

Sanger 85
Sar1 218, 220
sarcolemme 283, 284, 290, **487**
sarcomère 282, 284
SDS 56, 183
SDS-PAGE 56, 457
sécrétion
  apocrine 393
  holocrine 393
  mérocrine 393
sénescence 83, 351, 382, 383, 384, 385, 464, 473, 484, **487**
senseur 469
  métabolique 130
séquençage
  en parallèle **487**
  haut débit 86, 95, 119
séquence
  NES 195, **487**
  NLS 195
  Shine & Dalgarno 114
  signal 162, 195, 198, 199, 201, 215, 228, 239, **487**
sérum 328, 402, 420, 456, **487**
signal
  de co-stimulation 443, 446
  d'empreinte 442, 446
  mitogène 324
sillon antigénique 434, 438
SINEs 81
sirtuine 385
site actif 285, **487**
SNARE 219, 229, 231
SNP 65, **487**
snRNP 106, **487**
soi modifié 437
sommation 355
spectrine 279
spectrométrie de masse 54
spermatozoïde 364
spliceosome 106
spontanéité 42, 44, 46
SPR 55
Src 477
SRP 201
stéroïde 33
streptavidine-biotine 184, **487**
suppresseur de tumeur 466
symport 172
synapse 169, 229, 238, 341, 352, 353, 354, 355, 357, 358, 406, **487**
syncytia 282, 340, **487**
système
  Cre/Lox 379
  thermodynamique ouvert 22

T

TAF 104
TAP-TAG 120
Taq polymérase 88
tautomérisation 74
TBP 104
TcR 431, 436
télomérase 82, 83, 467
télomère 82, 464, 473
terminaison de la transcription 103
terminateur 66
thermocycleur 89
thrombocyte 402
thrombopoïétine (TPO) 402
thylacoïde 254
thymus 416, 436
tissu
  cartilagineux 335
  conjonctif 393, 394, 404
  osseux 335
TLR 419, 426, 428
TNF 423, 425, 444

tolérance
au soi 436
centrale 452
périphérique 452
TOM 198
trajet
antérograde 224
rétrograde 224
transamination 259, **487**
transcriptome 118, 119, 120, **487**
transduction 131, 165, 294, 295, 297, 299, 300, 305, 326, 430, 431, 445, **487**
transfection 147, 329, **487**
transformation cellulaire 464, 470
transgène 146
transition épithélium/mésenchyme 476
translocon 198
transport
actif 167, 170, 438
antérograde 218
rétrograde 218, 220
transporteur ABC 171
transposase 80
transposon 80
tropomyosine 279, 283, 284
troponine 283, 284
tubuline 274, 479
tumeur
bénigne 474, 476
maligne 476
primaire 474
tyrosine kinase 296

U

UAS 128
ubiquitine 210, 211
UvrA-UvrB 77

V

vaccination 455
vésicule synaptique 352
vieillissement métabolique 384
virus 10
voie des pentoses phosphates 256

Z

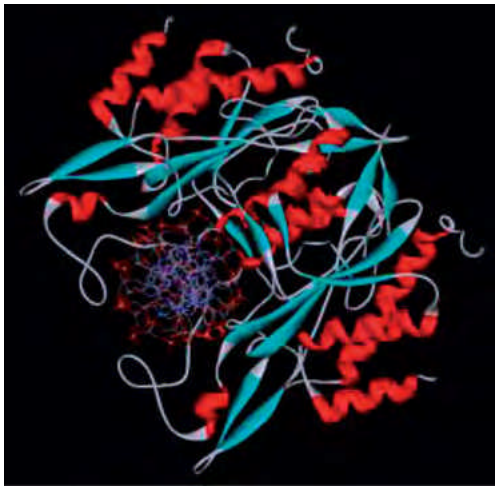
zone pellucide 365
zygotène 360

Crédits iconographiques

Toutes les illustrations sont d'Alain Gerfaud à l'exception des figures suivantes (le premier numéro indique la fiche, le deuxième celui de la figure) :

- fig. 27.2, fig. 30.1, fig. 30.2, fig. 31.1, fig. 31.2, fig. 31.3, fig. 34.1, fig. 35.1, fig. 35.2, fig. 38.2, fig. 40.2, fig. 40.3, fig. 45.1, fig. 45.2, fig. 46.3, fig. 48.1, fig. 49.2, fig. 49.3, fig. 50.2, fig. 51.1, fig. 51.2, fig. 55.1, fig. 55.2, fig. 56.1, fig. 56.2, fig. 57.1, fig. 60.2, fig. 60.3, fig. 61.2, fig. 66.1, fig. 66.2 : Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit, Raymond Julien, *Biologie moléculaire*, Mini Manuel, Dunod, 4e édition, 2018
- fig. 3.3, fig. 5.1, fig. 5.2, fig. 11.1, fig. 12.2, fig. 13.3, fig. 16.1, fig. 16.2, fig. 17.1, fig. 18.2, fig. 27.1, fig. 56.3, fig. 59.2, fig. 80.2, fig. 80.3, fig. 84.2, fig. 95.1, fig. 105.2, fig. 114.2, fig. 114.3, fig. 123.1, fig. 127.2, fig. 129.1, fig. 129.2, fig. 135.1, fig. 139.1, fig. 156.1, fig. 158.3, fig. 193.3 : Daniel Richard, Patrick Chevalet, Nathalie Giraud, Fabienne Pradere, Thierry Soubaya, *Biologie Licence*, « Tout le cours en fiches », Dunod, 2010
- fig. 57.2, fig. 85.1, fig. 87.1, fig. 87.2, fig. 88.1, fig. 88.2, fig. 89.1, fig. 93.1, fig. 94.1, fig. 95.2, fig. 99.1, fig. 100.1, fig. 101.1, fig. 123.2, fig. 136.1, fig. 136.2, fig. 137.1, fig. 138.1, fig. 138.2, fig. 139.2, fig. 205.1, fig. 205.2 : Jean-Michel Petit, Sébastien Arico, Raymond Julien, *Biologie cellulaire*, Mini Manuel, Dunod, 4e édition, 2019
- fig. 38.1, fig. 53.2, fig. 58.1, fig. 58.2, fig. 61.1, fig. 62.1, fig. 63.1 : Jean-Michel Petit, Sébastien Arico, Raymond Julien, *Génétique,* Mini Manuel, Dunod, 5e édition, 2017
- fig. 11.3, fig. 24.3 : Pierre Peycru, Jean-François Fogelgesang, Didier Grandperrin, Bernard Augère, Jean-Claude Baehr, Christiane Perrier, Jean-Michel Dupin, Cécile Van Der Rest, *Biologie tout-en-un 1re année BCPST*, Dunod, 4e édition, 2019

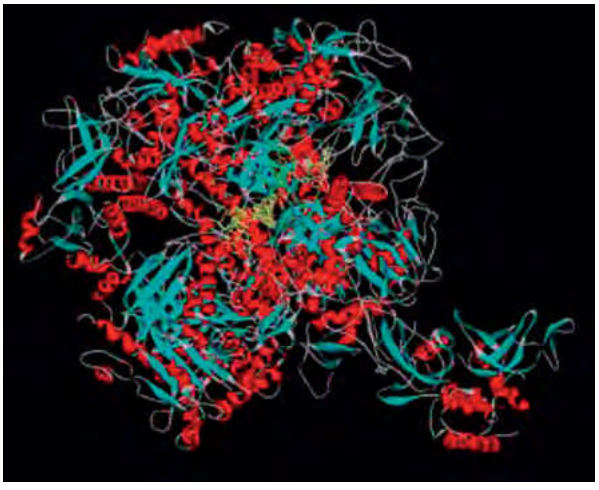
Structure 3D de quelques protéines liant l'ADN



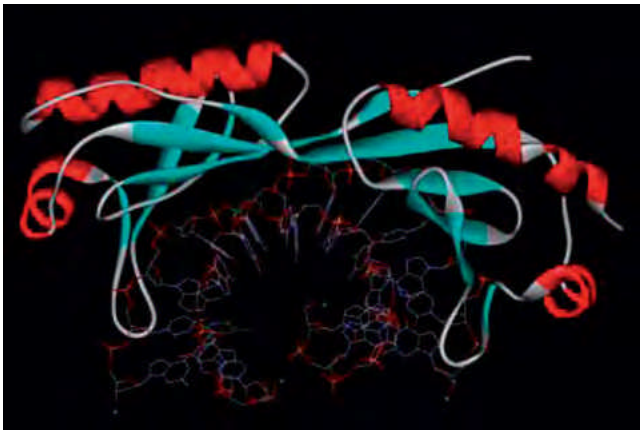
D'après Choi J. *et al*., 1999

Complexe entre l'ADN et l'endonucléase *EcoRI*. L'enzyme *EcoRI* est un homo dimère de deux sous unités de 31 kDa. Chaque sous unité est constituée de brins ß (couleur cyan) et hélices alpha (couleur rouge). Ces deux sous unités entourent la molécule d'ADN. Chaque sous unité contient une boucle (en gris) qui s'enroule autour de l'ADN lors de la fixation de l'enzyme. Cette structure est obtenue à partir de l'analyse par rayons X de cristaux du complexe ADN-protéine (fiche 41).

Structure du complexe ADN-ARNpolymérase II. Structure par analyse aux rayons X du complexe entre l'ARN polymérase et l'ADN lors de l'ouverture du double brin. L'ADN est représenté en jaune. Structure obtenue à une résolution de 3,5 A. Les éléments structuraux (hélices alpha et brins ß) des différentes sous-unités sont représentés en rouge et cyan respectivement (fiche 44).



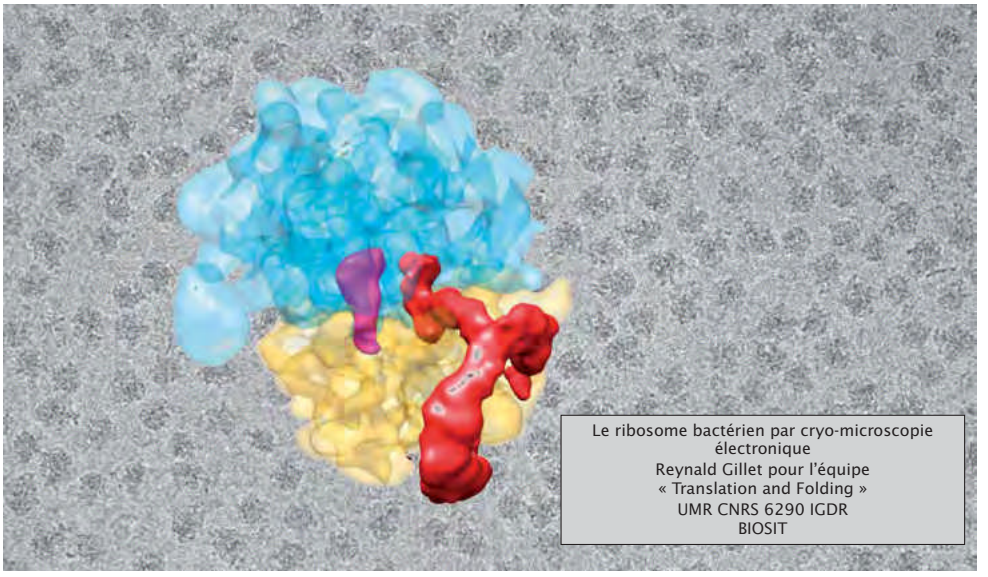
D'après Cheung J. *et al*., Structural basis of initial RNA polymerase II transcription. *Embo J*. 2011



D'après Juo, Z.S *et al*., How proteins recognize the TATA box., *J. Mol. Biol*., 1996

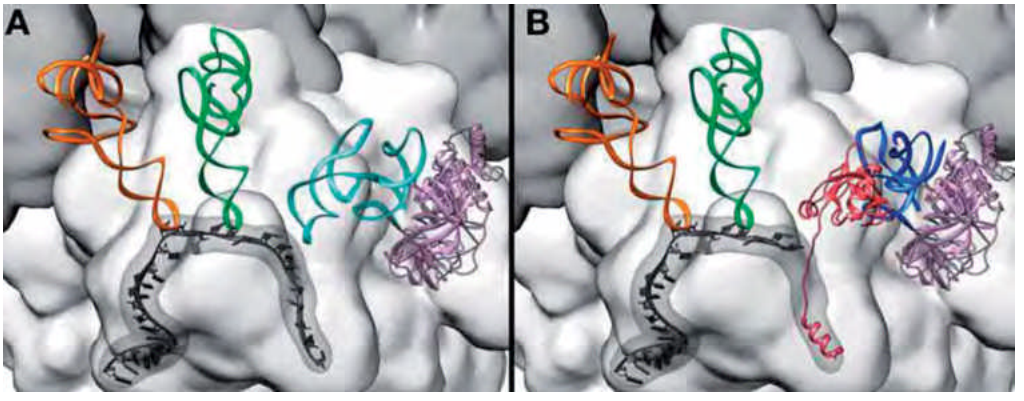
Interaction TATA Box Binding Protein et ADN. Cette structure cristallographique montre la forme particulière de la TBP (avec ses hélices en rouge et ses feuillets en cyan). Cette protéine en forme de « selle de cheval »va courber l'ADN pour permettre l'initiation de la transcription (fiche 45)

La structure 3D du ribosome peut être établie par cryomicrocopie électronique



Le ribosome bactérien par cryo-microscopie électronique
Reynald Gillet pour l'équipe « Translation and Folding »
UMR CNRS 6290 IGDR
BIOSIT

Carte tridimensionnelle d'un ribosome bactérien reconnu par un complexe ARN protéines qui bloque la traduction. Le complexe est coloré en rouge, l'ARN de transfert bloqué en violet, la petite sous-unité ribosomique en jaune et la grande sous-unité en bleu. En arrière-plan, une image de cryo-microscopie électronique à transmission permet de visualiser des ribosomes bactériens, mesurant en moyenne 25 nm de diamètre chacun. L'observation d'un grand nombre de ces particules permet de reconstituer la structure à l'échelle nanométrique © F. Weis, P. Bron, E. Giudice, J.-P. Rolland, D. Thomas, B. Felden, R. Gillet, *EMBO Journal* 2010.



Ces technologies permettent de visualiser les différentes étapes de la traduction au sein même du ribosome. Ici, sans rentrer dans les détails on peut voir la sous-unité 50S en gris foncé, la sous-unité 30S en gris clair, l'ARN messager en noir, l'ARNt du site E en orange, celui du site P en vert, l'Ef-Tu en violet et l'ARNt entrant en bleu clair (voir fiche 50) et comparer deux mécanismes différents de terminaison de la traduction.

Ultrastructure de la cellule d'un acinus pancréatique

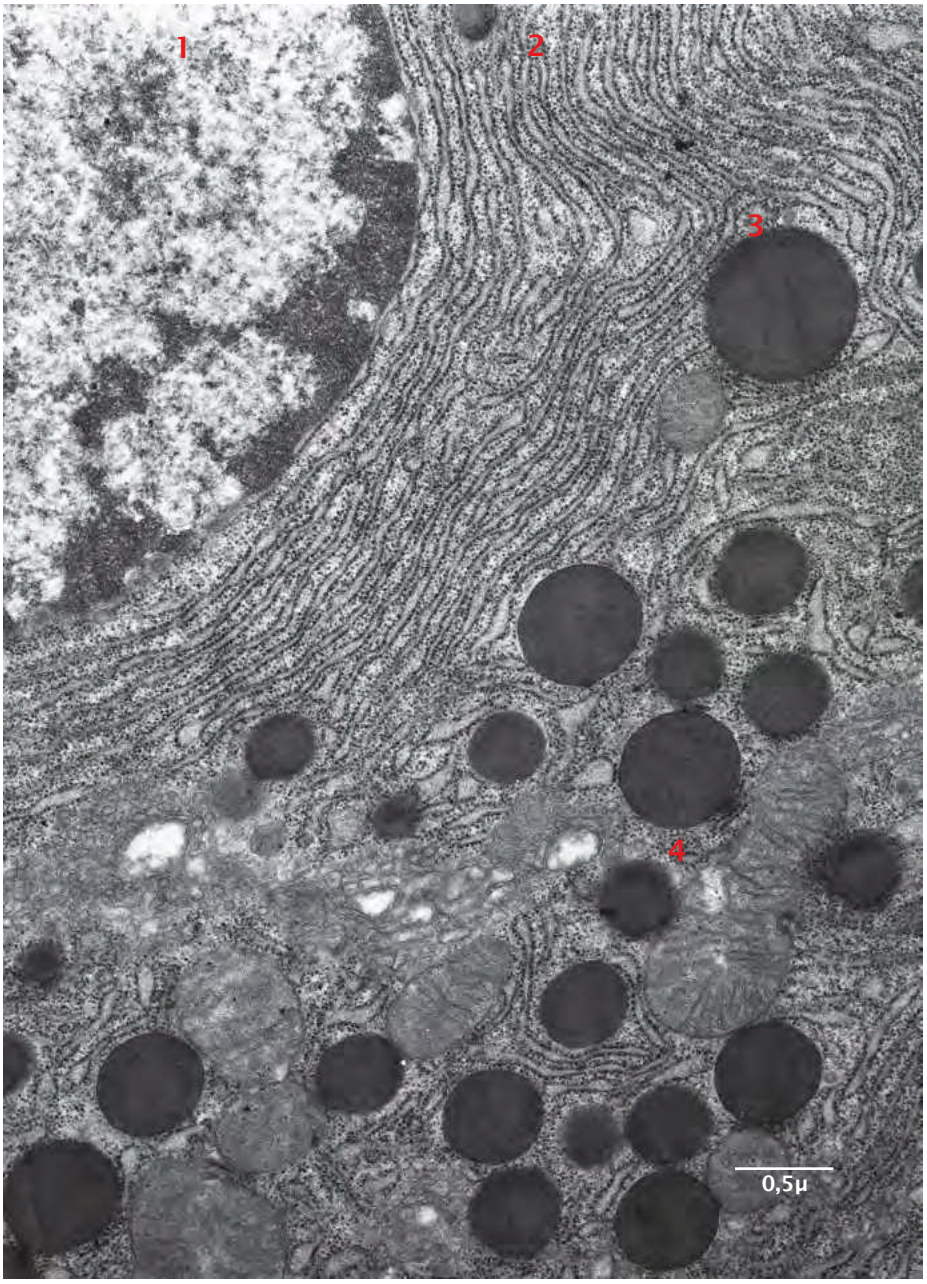
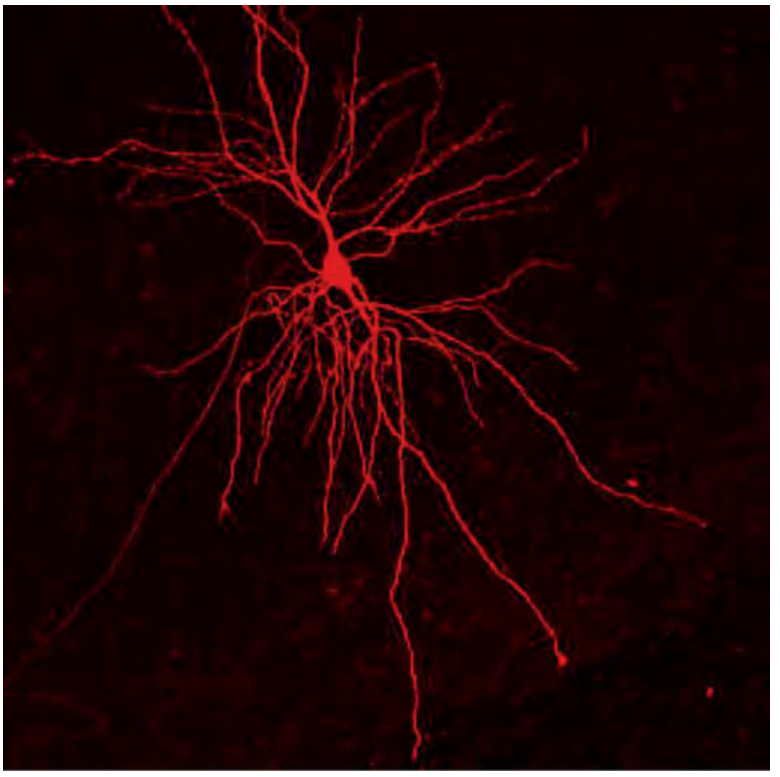


Photo : D. Thomas, CNRS/université Rennes 1

1 : Noyau délimité par l'enveloppe nucléaire. On distingue clairement la chromatine dense de la chromatine diffuse. 2 : Réticulum endoplasmique granulaire. Les ribosomes sont bien visibles côté cytoplasmique. La densité du réticulum témoigne de la forte activité sécrétrice de ces cellules. 3 : Grain de sécrétion. 4 : Mitochondrie.

Le potentiel d'action



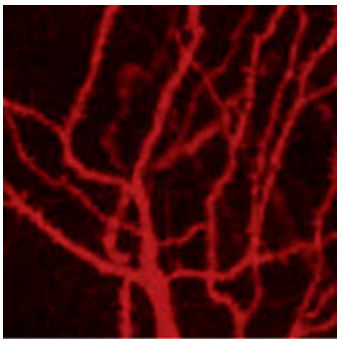
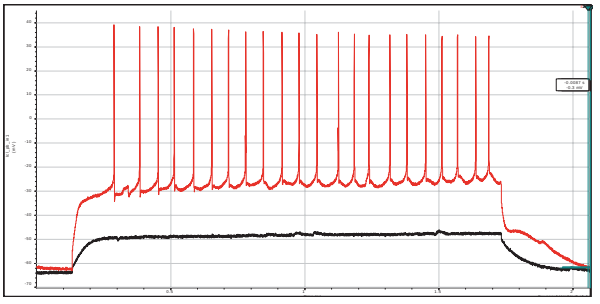


Photo : P. Benquet, université Rennes 1
Plate-forme PIXEL



Une électrode a été placée sur ce neurone d'hippocampe de rat. La courbe noire représente la réponse à une stimulation non efficace. La courbe rouge montre une salve de potentiel d'action déclenchée par une stimulation efficace. L'épaisseur d'un trait vertical représente une milliseconde.
À la fin de l'expérience, un colorant est injecté dans le neurone par l'intermédiaire de l'électrode de stimulation-enregistrement. Il est ainsi possible de visualiser la cytoarchitecture de la cellule étudiée. Le zoom montre un détail des arborisations de cette cellule et permet de distinguer les boutons synaptiques.

Visualiser les cellules par fluorescence

Accumulation de cibles
des petites protéines G de la famille Rho
dans un lamellipode

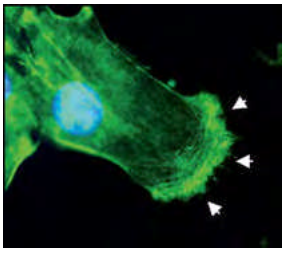


Photo : G. Baffet, IFR 140

Accumulation de la cyclin D1
dans le noyau de cellules stimulées
par un facteur de croissance

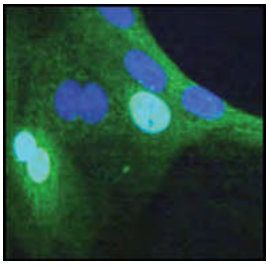
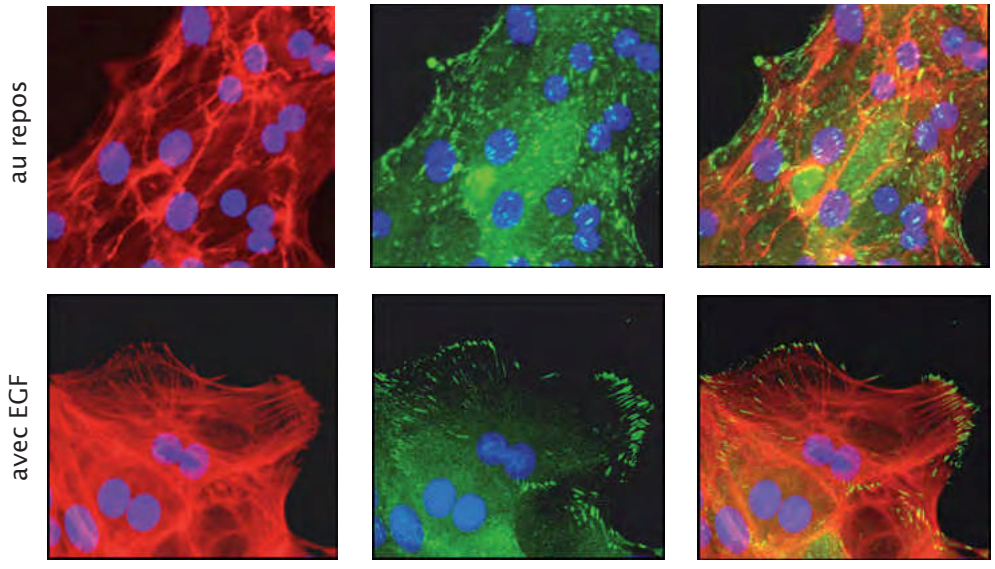


Photo : G. Baffet, IFR 140

Modification du cytosquelette en réponse à un facteur de croissance

Microfilament d'actine, noyau (DAPI), point d'adhésion focal (paxillin) superposition



Photos : G. Baffet, IFR 140

Analyse de la dynamique des protéines membranaires par FRAP

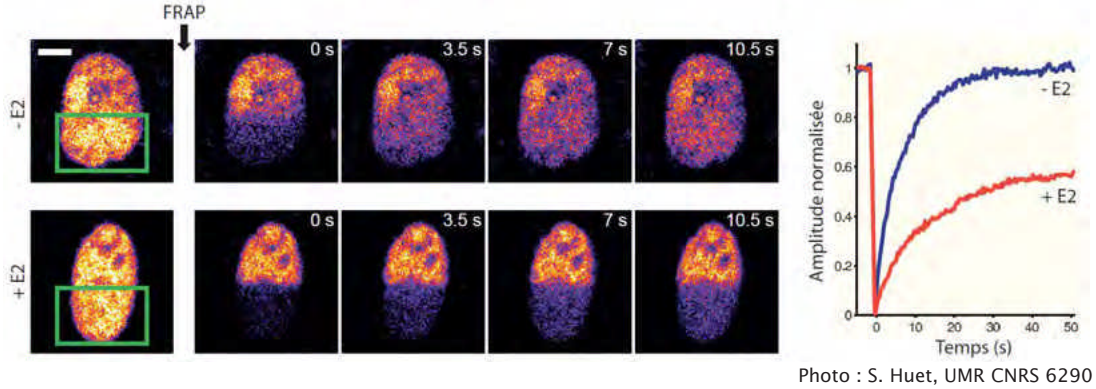
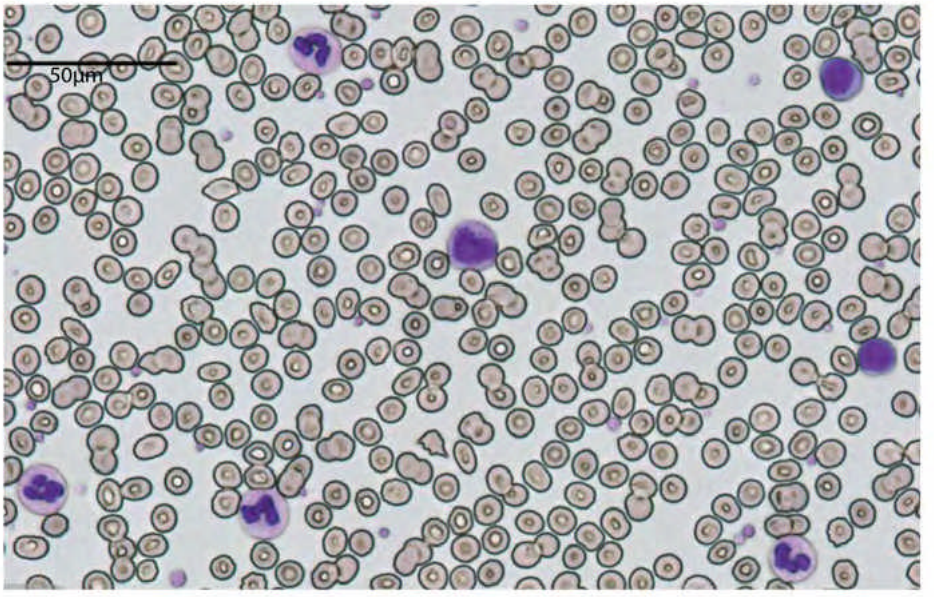
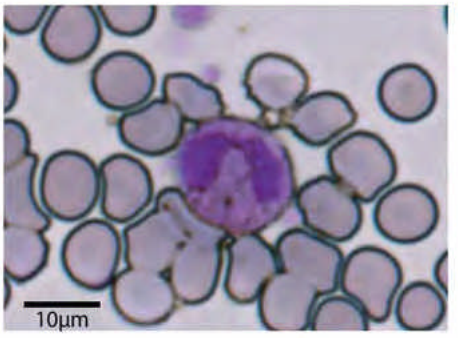


Photo : S. Huet, UMR CNRS 6290

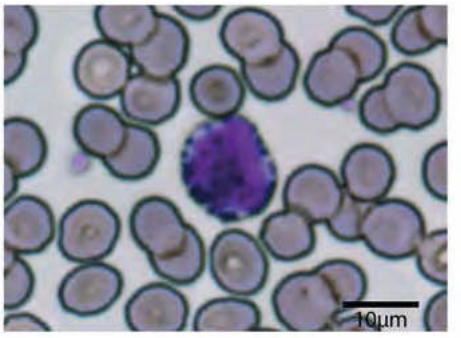
Vue d'ensemble et détails d'un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa



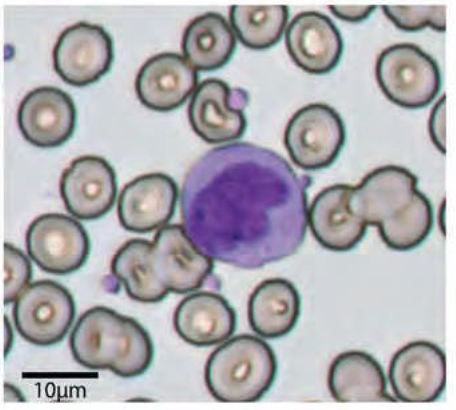
Éosinophile



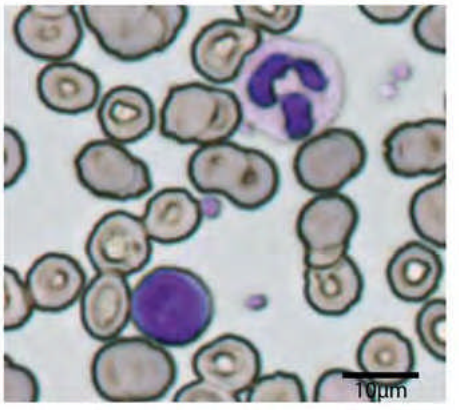
Basophile



Monocyte



Lymphocyte et Neutrophile



Organisation normale ou pathologique des tissus

Mise en évidence d'une fibrose hépatique (collagène)

Sans coloration, par génération
de photons de seconde harmonique (SHG)

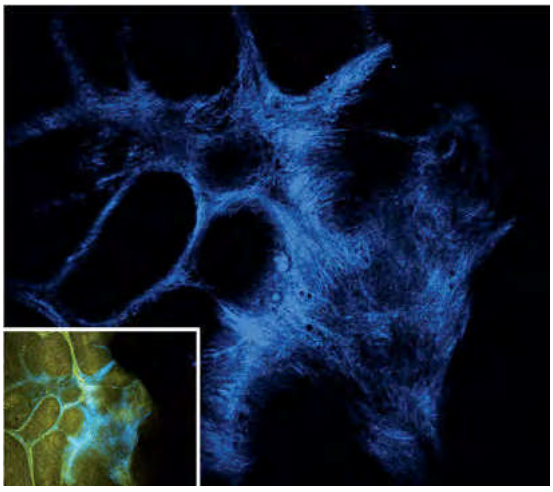


Photo : G. Baffet, IFR140

Coloration au rouge sinus

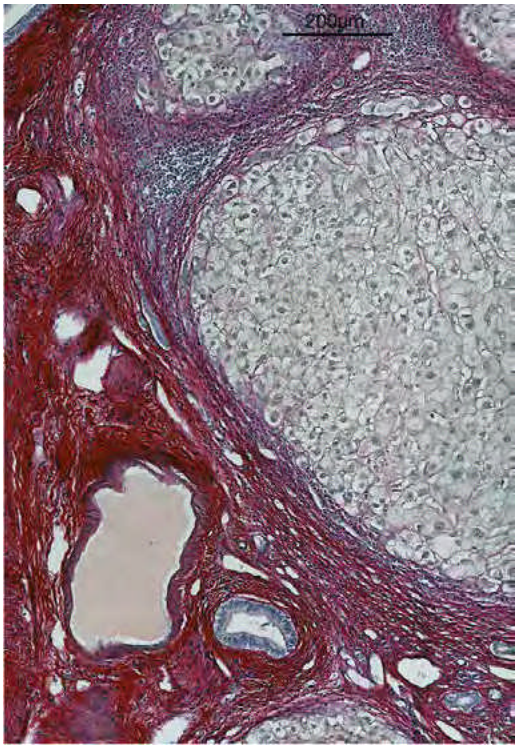
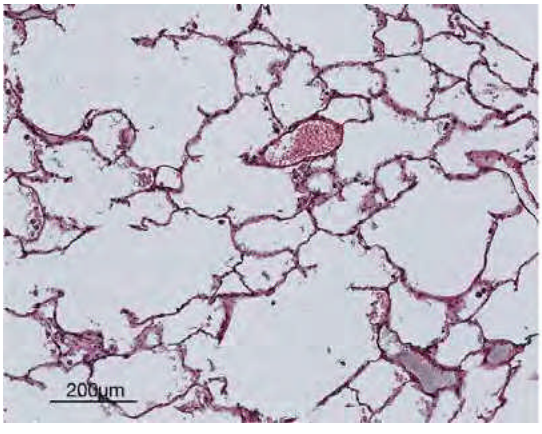


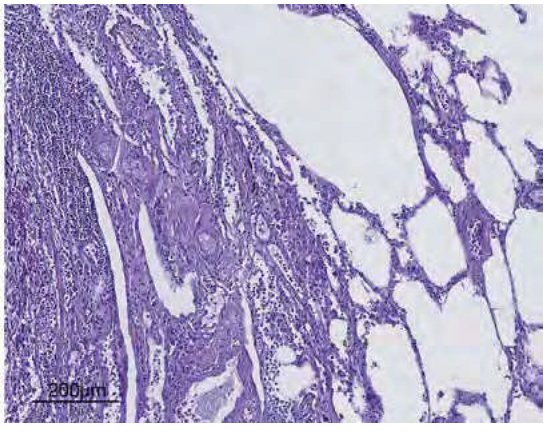
Photo : A. Fautrel, H2P2

Mise en évidence d'une inflammation chronique

Poumon normal



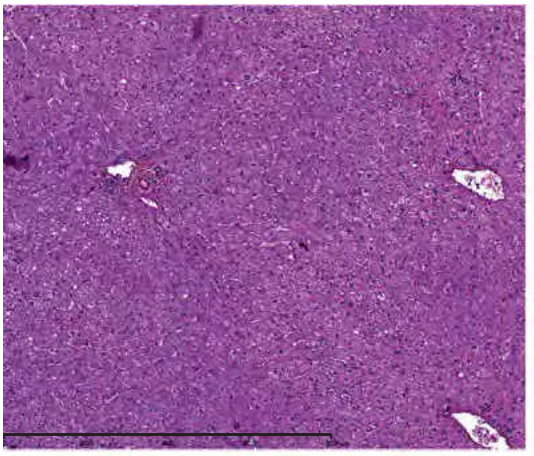
Mucoviscidose



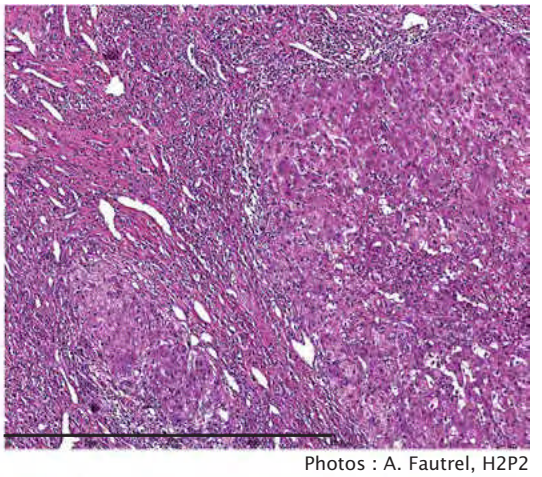
Photos : A. Fautrel, H2P2

Pathologies cancéreuses

Foie normal

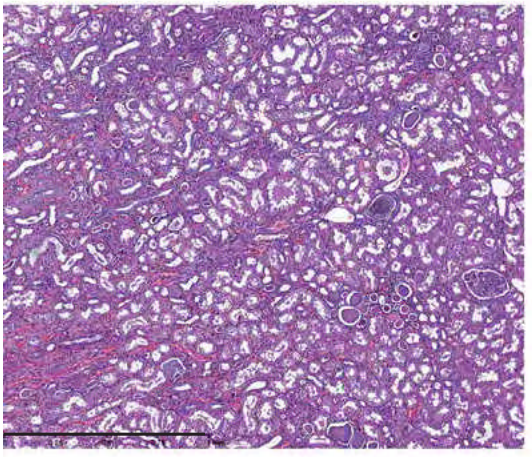


Carcinome hépatocellulaire (CHC)

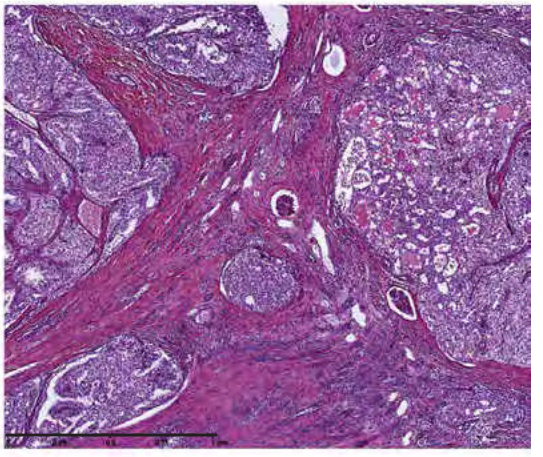


Photos : A. Fautrel, H2P2

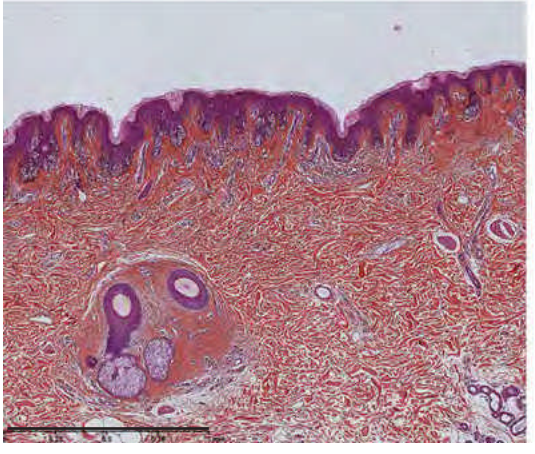
Rein normal



Rein tumoral



Peau normale



Mélanome