

COURS DE BIOLOGIE CELLULAIRE

PCEM 1 - PC K - Sages femmes

2006- 2007

Professeur B. Chauffert

Accès : [medecine.u-bourgogne/ressources pédagogiques/premier cycle/biologie cellulaire](http://medecine.u-bourgogne.fr/ressources/pedagogiques/premier_cycle/biologie_cellulaire)

Références :

L'essentiel de la biologie cellulaire. ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER. Ed FLAMMARION

Conseils de travail :

Ce polycopié n'est qu'un résumé des connaissances nécessaires.

Le lecteur profitera de la lecture des ouvrages de référence. Il portera une attention particulière aux schémas.

Les questions posées sous forme de QCM ne porteront que sur les sujets traités en cours par le Pr Chauffert (sauf cas d'interruption du cours liée au comportement des étudiants)

Les questions traitées par les Pr Teyssier et Jimenez feront l'objet de documents spécifiques. Les informations sur ces questions données dans le polycopié du Pr Chauffert ne sont qu'indicatives et ne servent pas de référence pour l'épreuve de Biologie Cellulaire du concours.

PROGRAMME DE BIOLOGIE CELLULAIRE 2006-2007

Introduction à la biologie cellulaire

Pr Teyssier

- * Théorie cellulaire; organismes uni- et pluricellulaires
- * Notion de compartimentation cellulaire
- * Evolution de la cellule. Procaryotes. Eucaryotes

Membrane plasmique

Pr Chauffert

- * Structure et composition
- * Transports membranaires
- * Processus de reconnaissance et d'adhésion cellulaire
- * Relation entre cellules et matrice extra-cellulaire

Signalisation et communication intercellulaire

Pr Chauffert

Cytosquelette et mouvements cellulaires

Pr Chauffert

Energétique cellulaire

Pr Teyssier

- * Phase cytoplasmique
- * Phase mitochondriale
- * Notion de radicaux libres

Système endo-membranaire

Pr Jimenez

- * Réticulum lisse et granuleux
- * Appareil de Golgi
- * Lysosomes
- * Peroxysomes

Méiose et gamétogenèse

Pr Jimenez

Noyau cellulaire

Pr Teyssier

EVOLUTION DE LA CELLULE.

Les organismes vivants unis ou pluricellulaires sont composés de cellules qui représentent leur unité structurale fondamentale (théorie cellulaire de Schwann, 1830). L'information biologique est contenue dans les gènes qui spécifient la structure des protéines et déterminent ainsi l'organisation des cellules, formant les organes et les organismes pluricellulaires:

gènes <-> protéines <-> organites <-> cellules <-> tissus <-> organes <-> organismes
ADN -> ARNm -> protéines -> structure, enzymes -> cellules -> signaux, hormones

Toutes les cellules sont entourées d'une membrane plasmique formée de protéines et d'une double couche lipidique. Elles sont constituées d'éléments chimiques communs (acides nucléiques, protéines, lipides..).

La vie a été précédée de la synthèse prébiotique de molécules complexes formées à partir de molécules simples. L'atmosphère et l'océan primitifs contenaient du méthane (CH₄), du CO₂, de l'eau, de l'ammoniac (NH₃), de l'hydrogène (H₂) et du CO. Ces molécules simples se sont assemblées en molécules plus complexes (acides aminés, nucléotides, sucres, acides gras) grâce à l'énergie fournie par les éclairs, le rayonnement ultraviolet solaire ou la chaleur d'origine volcanique (théorie de la soupe primitive océanique d' Haldane et d'Oparin, vers 1920). L'expérience de Miller qui mélange H₂, NH₃, CH₄ et H₂O soumis à une agitation, un chauffage et des décharges électriques permet d'obtenir de la glycine, de l'alanine, la valine et des purines et des pyrimidines. On sait que ces molécules peuvent se former hors de la Terre (spectre d'acides aminés détectées dans des météorites, dans les nuages interstellaires).

Nucléotides et acides aminés sont capables de former des polymères biologiques (polynucléotides et polypeptides). Les polynucléotides sont devenus autoréplicatifs: les molécules peuvent servir de moule pour diriger la synthèse d'autres polynucléotides grâce à l'appariement préférentiel des bases puriques et pyrimidiques (liaison adénine-uridine, adénine-thymine et guanine-cytidine). L'ARN, autoréplicatif, à fonction enzymatique d'auto-clivage (ribozyme) et capable d'être traduit immédiatement en protéines aurait précédé l'ADN dans l'évolution. ARN et ADN sont ordonnés pour constituer le code génétique, fait de triplets, qui assure la pérennité du message et sa traduction en protéines.

La première cellule s'est probablement créée dans la soupe primitive, il y a environ 3.5 milliards d'années, grâce à une membrane lipidique douée d'autofermeture qui entourait des acides nucléiques à propriété autorépllicative : c'était certainement une archéobactérie anaérobie. Sont apparues ensuite des bactéries photosynthétiques; l'enrichissement de l'atmosphère en O₂ s'est accompagné de l'apparition des bactéries aérobies. Les eucaryotes sont ensuite apparus et se sont diversifiés (plantes génératrices d'O₂, animaux). Les organismes pluricellulaires se sont constitués et ont évolué (Théorie de Darwin, L'origine des espèces, 1859). La biologie moléculaire moderne donne une base physico-chimique à cette théorie en montrant que l'ADN est une molécule adaptée à la conservation de l'information génétique et à son évolution par mutation et sélection. De nombreuses protéines fondamentales (histones, hémoglobine, actine etc...) ont conservé des séquences communes au travers des âges et des espèces.

NOTION DE COMPARTIMENTATION SUBCELLULAIRE

Différences entre cellules procaryotes et eucaryotes

Les eucaryotes comprennent les plantes, les animaux, les champignons

Les procaryotes sont des bactéries.

PROCARYOTES	EUCARYOTES
-----	-----
Absence d'enveloppe nucléaire	Présence d'une membrane nucléaire
Absence de nucléole	Présence d'un ou plusieurs nucléoles
Absence d'histones	Protéines histones associées à l'ADN
Gènes sans introns	Séquences de nucléotides ne codant pas pour des
Uniquement des exons	protéines à l'intérieur des gènes : introns
Un seul chromosome	Plusieurs chromosomes
Absence de système membranaire	Présence de systèmes membranaires
	Intracellulaires : organites
Absence de cytosquelette	Présence d'un cytosquelette : microfilaments, microtubules
Absence de cholestérol membranaire	Présence de cholestérol dans les membranes
-----	-----

Les cellules procaryotes : la membrane plasmique est le seul système membranaire de la cellule. La membrane plasmique isole l'intérieur de la cellule du monde extérieur, régule la composition du milieu intérieur et fournit l'énergie cellulaire. Les cellules procaryotes ne sont pas compartimentées.

Les cellules eucaryotes possèdent d'autres systèmes membranaires internes en plus de la membrane plasmique; ces systèmes membranaires délimitent des compartiments ou organites intracellulaires ayant un rôle spécialisé. Les organites ainsi définis baignent dans le cytosol. La moitié du volume cellulaire environ siège à l'intérieur de compartiments définis morphologiquement et fonctionnellement :

- Mitochondries : assurent le métabolisme énergétique
- Chloroplastes : assurent la photosynthèse chez les végétaux
- Réticulum endoplasmique lisse (synthèse lipidique) ou granuleux (synthèse protéique)
- Appareil du Golgi (glycosilation des protéines)
- Lysosomes (dégradation et recyclage des structures cellulaires)
- Peroxysomes (dégradation des peroxydes, synthèse et dégradation d'H₂O₂)

La compartimentation intracellulaire augmente le rapport $\frac{\text{surface membranaire}}{\text{volume cellulaire}}$ en particulier quand les cellules augmentent en taille.

Ce rapport doit être élevé car un grand nombre de réactions chimiques cellulaires ont lieu grâce à des enzymes immobilisées sur des membranes.

La compartimentation intracellulaire permet à la cellule d'effectuer simultanément de nombreuses réactions chimiques incompatibles (ex : synthèse et dégradation des protéines, des lipides, ...); elle permet d'établir des gradients électrochimiques (mitochondries, lysosomes).

Les molécules sont transportées d'un compartiment à un autre par des mécanismes de transports complexes (séquences signal, vésicules de transport et d'excrétion, transporteurs trans-membranaires)

On admet que les systèmes membranaires intracellulaires se sont développés par invagination de la membrane plasmique.

Seules les mitochondries auraient eu une évolution différente : capture d'une cellule procaryote par une cellule eucaryote avec symbiose entre les deux organismes. Cette théorie explique la présence d'ADN mitochondrial.

MOYENS D'ETUDES DE LA CELLULE

Sauf dans de rares cas (oeufs, axone géant de calmar) les cellules sont trop petites pour être observées à l'oeil nu. Les découvertes en biologie cellulaire dépendent des avancées technologiques : microscopie optique (découverte des protozoaires par Leeuwenhoek en 1674), microscopie électronique (vers 1940), microscopie confocale (1988).

1 - Microscopie optique ou photonique:

* Principes physiques

Le microscope est composé d'une série de lentilles qui agrandissent l'image d'un objet traversé (trans-illumination) ou illuminé (épi-luminescence) par un rayon lumineux (photons).

cf schéma du Lodish, p 149.

La lumière de la source lumineuse est concentrée par le condensateur, traverse l'objet immobilisé sur une lame de verre, est reprise par l'objectif puis agrandie encore par l'oculaire.

Le grossissement du microscope est le produit du grossissement de l'objectif et de celui de l'oculaire: 10 (oculaire) X 100 (objectif) = 1000: grossissement du microscope.

D, le pouvoir de résolution (capacité de distinguer deux points voisins; 75 µm pour l'oeil nu) des meilleurs microscopes optiques n'est pas inférieur à 0,2 µm:

$$D = \frac{0,61 \lambda}{N \sin a}$$

L = longueur d'onde de la lumière
N = indice de réfraction du milieu
a = ouverture de l'angle de l'objectif

Il est possible d'améliorer le pouvoir de résolution :

- en utilisant une faible longueur d'onde (ex bleu: 450 nm)
- en augmentant N : utilisation d'huile à immersion instillée entre l'objet et l'objectif
- en augmentant a : construction de l'objectif

* Préparation des échantillons

Les cellules vivantes sont des structures fragiles, non colorées et non contrastées. Les tissus sont épais. Pour étudier cellules et tissus, il faut réaliser des préparations cellulaires ou des coupes minces de tissus qui respectent au mieux les structures morphologiques et ne créent pas d'artéfacts.

Le prélèvement concerne des cellules isolées (spermatozoïdes, érythrocytes ...), des tissus animaux ou humains (biopsie sous anesthésie, prélèvement post mortem lors d'une autopsie). L'autolyse des tissus est très rapide sous l'action des enzymes tissulaires ou de la colonisation bactérienne, imposant une fixation rapide ou une congélation immédiate (congélateur à - 80 °C ou mieux azote liquide à - 178 °C).

La fixation consiste à immobiliser les structures cellulaires pour leur conserver une morphologie proche, sinon identique, de l'état vivant. Les fixateurs (éthanol, méthanol, formaldéhyde, glutaraldéhyde ...) tuent les cellules, les perméabilisent, déshydratent les protéines de structure et les précipitent en conservant leur forme. Le pH et l'osmolarité des fixateurs doivent être ajustés.

L'inclusion permet d'emballer les cellules ou les tissus dans une substance assez dure pour être coupée en tranches fines. On immerge l'échantillon fixé dans la paraffine chaude qui durcit en se refroidissant. Des résines (époxydes, araldite) sont utilisées pour la microscopie électronique.

Le bloc de paraffine est placé sur un microtome permettant de réaliser des coupes d'épaisseur désirée (2 - 20 µm). Ces coupes sont déposées sur une lame de verre. Elles sont colorées. Les colorants sont choisis en fonction de la structure à étudier: hématoxyline (acides nucléiques, protéines acides), noir soudan (lipides), orcéine (élastine). On utilise en routine des mélanges de colorants qui mettent en évidence la plupart des constituants cellulaires: HES (hématoxyline, éosine, safran), colorant de May-Grünwald-Giemsa. Après coloration, les sections sont montées dans une résine d'inclusion entre lame et lamelle.

* Coupes à congélation: certaines structures protéiques, notamment des antigènes, sont détruites par les fixateurs. On réalise alors des coupes de tissu congelé. L'échantillon est plongé dans l'azote liquide et inclus dans une résine synthétique qui polymérise au froid. Le bloc est coupé dans un cryostat (cryotome possédant une enceinte réfrigérée à - 20°C). L'échantillon est coloré par la toluidine. Cette technique très rapide permet de réaliser des examens histologiques extemporanés, très utilisés en cancérologie. Le médecin anatomo-pathologiste peut dire en quelques minutes au chirurgien si la lésion abordée est de nature cancéreuse et si les tranches de section passent en tissu sain. La moindre précision morphologique impose cependant une confirmation par la technique standard sur coupe fixée et incluse en paraffine.

* Techniques histochimiques et immuno-histochimiques :

Pour visualiser une enzyme dans un tissu (histochimie) ou dans des cellules isolées (cytochimie), on peut faire réagir l'enzyme avec un substrat qui change de couleur:

Ex: visualisation de l'activité acétylcholine-estérase dans la jonction neuro-musculaire. L'acétylcholine est le neuromédiateur libéré dans la fente synaptique. Après stimulation du récepteur à l'acétylcholine de la membrane musculaire, le médiateur est recapté par la terminaison nerveuse ou dégradé par l'acétylcholine-estérase présente dans la fente synaptique: acétylcholine ----> acide acétique + choline. L'enzyme permet aussi la destruction de l'acétylthiocholine ----> acide acétique + thiocholine. La thiocholine se combine avec un sel de cuivre, et sous l'action de sulfure d'ammonium, entraîne la précipitation de sulfure de cuivre (précipité noir et insoluble).

Pour détecter une protéine ou un composant antigénique, on peut appliquer un anticorps sur la coupe. Cet anticorps a été modifié par le greffage d'une molécule de biotine. Plusieurs molécules d'avidine viennent se fixer sur la biotine; l'avidine est couplée à une enzyme, la peroxydase, qui transforme un substrat incolore en un colorant orangé-brun. Cette technique très sensible permet des immunomarquages très utilisés en anatomo-pathologie (recherche de Prostate Specific Antigen : PSA; de récepteurs aux oestrogènes ou à la progestérone dans les cancers du sein etc...).

* Hybridation in situ :

Des séquences nucléotidiques d'ADN ou d'ARN peuvent être reconnues par des sondes complémentaires (A-T, A-U, G-C). Ces sondes sont marquées par la biotine et repérées par des complexes avidine-peroxydase.

* Autohistoradiographie :

Cette technique utilise des isotopes radioactifs (tritium, carbone 14) qui émettent un rayonnement β . Pour étudier la synthèse d'une protéine, par exemple une enzyme du pancréas, on injecte à des rats un acide aminé radiomarké (leucine tritiée), on sacrifie les animaux à des temps variables et on réalise des coupes histologiques de tissu pancréatique. On dépose sur les coupes colorées une fine pellicule d'émulsion photographique. Après incubation en chambre noire allant jusqu'à plusieurs semaines, on examine les coupes. A l'endroit où se trouvent les protéines néo-synthétisées, on observe des grains noirs, témoins de la réduction du bromure d'argent par les électrons. On peut ainsi suivre la synthèse et le cheminement des protéines jusqu'à leur sécrétion dans le canal pancréatique. Cette technique s'applique aussi bien à la microscopie optique qu'à la microscopie électronique.

On peut repérer les cellules qui prolifèrent. Pour ce faire, on incube les cellules ou on injecte à l'animal de la thymidine tritiée qui s'incorpore dans l'ADN. Les cellules qui répliquent leur ADN au moment de l'injection ou de l'incubation seront marquées par un précipité d'argent en regard de leur noyau.

* Analyse d'image et morphologie quantitative :

Le développement des systèmes informatiques permet de créer des programmes de reconnaissance de formes. Un dénombrement des cellules ou des structures est possible sans l'astreinte d'un comptage visuel: ex nombre de mitochondries d'une cellule, densité d'un récepteur membranaire repéré par un anticorps monoclonal... Une reconstruction tridimensionnelle du noyau peut être réalisée sur écran avec mouvement virtuel.

2 - Microscopie de fluorescence :

Une substance chimique est fluorescente quand elle absorbe une lumière d'énergie élevée de longueur d'onde courte (exemple ultra-violet à 240 nm) pour réémettre une lumière visible d'énergie plus faible ayant une plus grande longueur d'onde (vert: 500 nm, orange: 600 nm). Il s'agit souvent de substances possédant des penta- ou hexacycles carbonés non saturés.

La microscopie de fluorescence consiste à irradier la préparation par un rayonnement ultraviolet et à observer la lumière visible émise en filtrant les UV dangereux pour l'oeil par un système de filtres. Du fait de la faible longueur d'onde des UV, le pouvoir de résolution est élevé.

Sauf rares exceptions (catécholamines, quelques cytochromes), les molécules de la cellule ne sont pas spontanément fluorescentes. On peut les rendre fluorescentes en leur accrochant des anticorps spécifiques marqués de façon covalente par des colorants fluorescents (fluorescéine: vert; rhodamine: rouge) : c'est le principe de l'immunofluorescence (IF). En pratique, des coupes de tissu ou des cellules, fixées ou non (coupes à congélation pour les antigènes fragiles) sont incubées avec l'anticorps en solution puis observées après rinçage sous un microscope à fluorescence. L'anticorps peut être rendu fluorescent par greffe chimique d'un colorant : immunofluorescence directe. L'anticorps peut ne pas être fluorescent par lui-même; il est reconnu par un deuxième anticorps, fluorescent, qui se fixe sur les anticorps de l'espèce qui a servi à préparer le premier anticorps : immunofluorescence indirecte.

Ex : on veut repérer la myosine humaine dans une préparation de muscle. On obtient des anticorps anti-myosine en injectant de la myosine humaine purifiée à un lapin. Les anticorps anti-myosine sont isolés à partir du sérum du lapin. Ces anticorps peuvent être greffés par de la fluorescéine (IF directe) par méthode chimique; les anticorps anti-myosine non fluorescents peuvent aussi être mis à incuber sur la préparation de muscle humain puis détectés par des anticorps de cheval anti-anticorps de lapin (préparés à partir du sérum de cheval immunisé contre les anticorps de lapin); le deuxième anticorps est rendu fluorescent par greffe de fluorescéine (IF indirecte). L'avantage de l'IF indirecte est d'utiliser une très faible quantité d'anticorps tandis que la greffe chimique de fluorescéine demande des quantités importantes.

Certains colorants ne deviennent fluorescents que s'ils sont dans un environnement particulier : abondance en calcium ionisé (fura-2) ou en protons (BCECF). Ces colorants permettent d'apprécier les variations de calcium ou de pH sur des cellules vivantes soumises à des conditions expérimentales (ex : oeuf fécondé, fibre musculaire stimulée ...).

3 - Microscopie confocale

C'est un microscope à fluorescence de conception particulière. Des anticorps fluorescents ou des colorants spécifiques de certaines structures (ex acridine pour le noyau) sont appliqués sur la préparation. Un rayon laser provoque la fluorescence des points situés dans un même plan focal. L'image est enregistrée sur un ordinateur qui permet une reconstruction tridimensionnelle des images. On peut ainsi situer les structures les unes par rapport aux autres (*voir figure 5-15, p 155, Lodish*).

4 - Microscope à contraste de phase et microscope interférentiel

Ces microscopes jouent sur les différences d'indice de réfraction des milieux traversés par la lumière. Ces microscopes permettent de contraster les structures cellulaires sans nécessiter de fixation ou de colorant. On peut donc observer des cellules vivantes. Grâce à la microcinématographie, on peut visualiser leurs mouvements et leur déplacement.

5 - Microscopie électronique à transmission

Un faisceau d'électrons traverse l'échantillon biologique qui a été contrasté par un dépôt métallique. La longueur d'onde des électrons étant plus faible que celle des photons, la limite de résolution est augmentée (2-3 Å). Le faisceau d'électrons est focalisé par des lentilles électromagnétiques et chemine dans une enceinte au vide poussé (*cf schéma p 159, Lodish*). Les électrons frappent un écran fluorescent ou une plaque photographique. Les zones correspondant à celles qui ont arrêté les électrons (zones de dépôt des métaux) apparaissent en noir.

* Préparation des échantillons

Les échantillons sont fixés par le glutaraldéhyde ou l'osmium et inclus dans une résine (résine époxy). Les échantillons très petits sont coupés grâce à un ultramicrotome (épaisseur des coupes : 500 Å). Les coupes sont déposées sur de fines grilles métalliques puis colorées par des sels de métaux lourds (plomb, uranium) qui se fixent sur certaines structures cellulaires (membranes, noyaux, ribosomes...).

* Variantes

- Le microscope électronique à balayage :

Un fin pinceau d'électrons balaie la coupe qui a été ombrée par des sels métalliques (or, platine). On observe ici les électrons secondaires arrachés à la structure étudiée. Cette technique permet d'étudier le relief des objets : têtes d'insectes, fibres intracellulaires ou intercellulaires ...

- La cryofracturation :

L'échantillon biologique (ex cellule vivante) est congelé très rapidement dans de l'azote liquide pour éviter la formation de cristaux de glace qui abîmeraient la structure. L'échantillon est fracturé tangentiellement par un couteau métallique réfrigéré. L'échantillon est déshydraté sous vide (sublimation) puis ombré par vaporisation d'un dépôt métallique (or, platine). Cette technique permet d'étudier l'ultrastructure

des composants cellulaires en évitant une partie des artéfacts provoqués par la fixation (ex jonctions serrées intercellulaires, jonctions communicantes...).

- L'immunolocalisation :

Un anticorps spécifique de l'antigène étudié est déposé sur la préparation. Cet anticorps est lié à de petites sphères d'or opaques aux électrons. On peut faire réagir plusieurs anticorps portant des sphères de taille différente.

- Autoradiographie :

Le principe est le même que celui utilisé en microscopie photonique. La résolution est évidemment plus grande: ex visualisation de protéines en cours de synthèse dans les citernes du réticulum ou du Golgi.

6 - Cytofluorimétrie ou cytométrie de flux (Cell Sorter)

Ce dispositif permet l'analyse de cellules individuelles (cellules circulantes ou cellules mises en suspension à partir d'un tissu dissocié par des enzymes). Ces cellules sont marquées par un anticorps spécifique et fluorescent qui se lie sur leur membrane (ex anti CD 34 pour les cellules souches sanguines). Les cellules circulent une par une en suspension dans une fine colonne liquide et passent devant un faisceau laser accordé sur la fluorescence de l'anticorps (cf *Lodish, schéma 5-26, p 162*). Les cellules marquées émettant de la lumière sont dénombrées. Elles peuvent être triées: chaque cellule fluorescente est chargée négativement et déviée pour être collectée à part. Les cellules vivantes peuvent être remises en culture. Cette technique permet de compter et d'isoler quelques cellules particulières parmi des millions d'autres.

La cytofluorimétrie permet d'étudier la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. La quantité d'ADN d'une cellule diploïde varie de 2 N (phase G 0 : cellule au repos ou G 1: cellule en cycle mais n'ayant pas encore répliqué son ADN) à 4 N (cellule ayant répliqué son ADN: phase G2 et M - mitose). On colore les cellules par du iodure de propidium qui se lie stoechiométriquement à l'ADN. L'analyse de l'intensité de fluorescence permet de quantifier l'ADN dans chaque cellule et de repérer sa position dans le cycle cellulaire (cf *Lodish, p 179*). La cytométrie permet de détecter l'aneuploïdie des cellules cancéreuses: hypoploïdie, hyperploïdie ...

7 - Cultures cellulaires

Depuis Pasteur, on sait cultiver les micro-organismes et depuis Carrel (prix Nobel) les cellules animales. Les cultures permettent d'obtenir des cellules en grand nombre, au moment désiré par le chercheur et sans contaminant tissulaire. Les cultures permettent d'étudier l'influence du milieu (hormones, facteurs de croissance) et les interactions cellulaires (co-cultures ; ex : fibroblastes-cellules cancéreuses). Il est facile d'obtenir une colonie provenant d'une seule cellule (un clone) et donc de composition génétique homogène.

* Cultures de bactéries (procaryotes) et de levures (eucaryotes monocellulaires).

Ces organismes prolifèrent rapidement (une division toutes les 30 minutes pour la bactérie *Escherichia coli*) et ont des exigences de culture assez simples (glucose pour la fourniture d'énergie, NH_4Cl pour la synthèse d'acides aminés, eau et sels minéraux). Ils cultivent en boîte de Pétri, sur un support d'agar (gelée extraite d'algues) à température appropriée (37°C) dans une étuve. On peut isoler des colonies à partir d'un étalement d'une suspension sur la surface d'agar. Certaines bactéries présentent des mutations spontanées qui permettent d'isoler des clones intéressants (ex: possibilité de pousser sur un milieu sans arginine). On connaît maintenant la séquence nucléotidique (séquençage) et la carte génétique (endroits où se localisent les gènes et lieux des sites de coupure par les enzymes de restriction) d'*E. coli* (3000 paires de bases sur un chromosome unique). Les cultures de bactéries peuvent être infectées par des plasmides de séquence connue où sont insérés des gènes provenant de cellules eucaryotes: c'est le principe de base de la biologie moléculaire (voir cours du Pr Teyssier). La bactérie peut alors exprimer une protéine animale (ex : insuline).

* Cultures de cellules animales

Les cultures de cellules animales sont plus exigeantes. Le milieu de culture doit contenir des acides aminés essentiels, des vitamines, des sels minéraux, des oligo-éléments, des substances tampons pour maintenir un pH voisin de 7.4, du glucose ou de la glutamine pour fournir de l'énergie. La plupart des cultures nécessitent l'ajout de 5 à 20 % de sérum d'origine animale (souvent du sérum de fœtus bovin) qui apporte des facteurs d'attachement au support (fibronectine) et des facteurs de croissance (EGF, FGF, insuline ...). Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de CO_2 qui favorise la stabilité du pH en s'équilibrant avec les tampons dissous.

On isole les cellules à partir d'un tissu, du sang, de la moelle osseuse ou d'une tumeur. Pour dissocier les cellules d'un tissu, on utilise des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire (trypsine, collagénase). Les suspensions monocellulaires sont placées dans des flacons de culture ou des boîtes de Pétri dont le plastique a été greffé par des charges négatives (SO_3^-) qui facilitent l'ancrage au support indispensable pour la plupart des cellules (sauf certaines cellules cancéreuses). Des colonies se développent en 10-15 jours qui peuvent être repiquées par trypsinisation dans de nouvelles boîtes. Ces cultures primaires subissent plus ou moins rapidement une sénescence avec ralentissement du rythme de division (loi de Hayflick) puis mort.

Certaines cellules toutefois s'immortalisent et donnent des lignées établies (acquisition d'une activité télomérase). Les cellules cancéreuses sont naturellement immortalisées et expriment la télomérase. On peut conserver les cellules dans l'azote liquide pendant des années à condition d'utiliser un cryoprotecteur (glycérol, DMSO) qui empêche la formation de cristaux de glace intracellulaires.

* Hybridomes et production d'anticorps monoclonaux :

Les anticorps sont des protéines produites par les plasmocytes (forme mature des lymphocytes B) en réponse à l'introduction d'une substance étrangère à l'hôte; ex: l'introduction d'une toxine tétanique atténuée ou de *Salmonella typhi* tuée induit une réponse anticorps de type vaccinal.

Pour obtenir des anticorps contre des antigènes d'intérêt, la méthode classique consiste à injecter ces derniers à l'animal (souris, lapin, cheval...) en présence d'un adjuvant (aluminium ou adjuvant de Freund). Le sérum contenant les anticorps est prélevé par saignée. Inconvénient: la source s'épuise avec la mort de l'animal, la réponse est parfois aléatoire, les anticorps sont polyclonaux (mélange d'anticorps dirigés contre plusieurs épitopes de l'antigène).

Koehler et Milstein (prix Nobel) ont mis au point les hybridomes qui permettent de produire à l'infini un seul anticorps spécifique d'un épitope. On immunise une souris ou un rat contre une substance antigénique; les lymphocytes B de la rate sont prélevés et fusionnés en présence de polyéthylène glycol avec des cellules plasmocytaires cancéreuses et donc immortelles. On peut sélectionner un clone à partir d'un seul hybride et le cultiver indéfiniment: hybridome. Chaque hybridome sécrète un anticorps monoclonal de spécificité très étroite. Ces réactifs ont permis la localisation des protéines dans les tissus (immuno-histochimie ou immuno-fluorescence), la purification des protéines par chromatographie d'affinité ou la mise en évidence de l'interaction entre les protéines (immuno-précipitation). Certains anticorps monoclonaux humanisés (site de reconnaissance d'origine murine + reste de l'anticorps d'origine humaine) sont utilisés en thérapeutique contre les lymphomes et les cancers du sein.

8 - Fractionnement cellulaire et ultracentrifugation

Les cellules et tissus peuvent être délicatement broyés dans un appareil de Potter (piston de téflon dans un récipient de verre) pour isoler ensuite les organites subcellulaires par ultracentrifugation. Les particules les plus lourdes (noyaux) sédimentent aux vitesses les plus faibles, suivies des mitochondries, des lysosomes, des microsomes etc... La séparation est facilitée par l'utilisation de gradients de densité (saccharose, chlorure de césium). Les fractions subcellulaires sont distinguées par leur densité de flottaison (exprimée en unités svedberg) puis caractérisées par microscopie électronique et par des enzymes spécifiques de chaque fraction (ex : galactosyl transférase pour l'appareil de Golgi; phosphatase acide pour le lysosome)

9 - Méthodes d'étude des protéines cellulaires

La cellule contient des milliers de protéines qui participent à sa structure ou à son métabolisme (enzymes, facteurs de transduction et de contrôle). Différentes méthodes de chromatographie et d'électrophorèse permettent de séparer les protéines :

* Chromatographie sur colonne:

La solution de protéines est versée au sommet d'une colonne qui joue un rôle de filtre en fonction des caractéristiques chimiques de ses constituants:

- *chromatographie de filtration sur gel* : les petites molécules sont retardées par les mailles du gel tandis que les grosses passent rapidement.

- *chromatographie d'affinité* : les protéines sont retenues par des ligands (ex anticorps ou substrat) puis sont éluées par un solvant de force ionique élevée.

- *chromatographie par échange d'ions* : la colonne contient des résines échangeuses d'ions qui retiennent les protéines en fonction de leur pKa. Le solvant circulant dans la colonne varie selon un gradient de pH.

- *chromatographie liquide haute performance (CLHP)* : le solvant circule sous haute pression dans une colonne métallique remplie de très petites billes de silice qui retiennent plus ou moins les protéines ou les polypeptides et les relarguent bien séparés les uns des autres. La CLHP (HPLC en anglais) peut être couplée à un spectrographe de masse : les produits sont ionisés, évaporés puis accélérés et séparés selon leur masse par des champs électromagnétiques.

* Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS- PAGE) :

Le principe est de solubiliser les protéines dans un détergent le sodium dodécyl sulfate (SDS) qui les sépare des lipides. Les charges négatives du SDS permettent à la protéine de migrer dans un champ électrique. La migration s'effectue dans un gel de polyacrylamide de maillage plus ou moins serré. La vitesse de migration dépend de la taille et de la forme de la molécule qui est plus ou moins ralentie par le gel. Les protéines sont séparées sous forme de bandes et colorées par le bleu de Coomassie ou les sels d'argent.

Les protéines peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Western Blot) et repérées par des anticorps mono- ou polyclonaux portant des groupements enzymatiques ou luminescents.

- l'*électrophorèse en 2 dimensions* combine une focalisation isoélectrique selon un gradient de pH (les protéines s'immobilisent en fonction du pKa) et une électrophorèse de type SDS-PAGE. La coloration des taches se fait par les sels d'argent. Cette technique permet de séparer des milliers de protéines (*voir Alberts, p 171*).

* séquençage des protéines :

Les protéines sont clivées en polypeptides de taille moyenne. La composition et la position des acides aminés (séquence) de certains polypeptides peuvent être analysées sur un séquenceur automatique de protéides. On peut en déduire la séquence de l'ADN qui a codé le fragment polypeptidique, déduire ensuite la séquence nucléotidique du gène entier et donc connaître celle de la protéine entière en appliquant simplement les règles du code génétique et en utilisant des moyens informatiques pour traiter l'information contenue dans ces séquences de plusieurs milliers de paires de bases (génétique inverse).

* détermination de la structure secondaire et tertiaire des protéines :

On utilise la diffraction des rayons X sur des protéines cristallisées ou la résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des protéines en solution (*voir Alberts, p 175 et 176*).

10 - Méthodes d'étude des acides nucléiques (cf cours du Pr Teyssier)

MEMBRANE PLASMIQUE : STRUCTURE ET FONCTIONS (Chapitre actualisé le 22 Septembre 2005)

La stabilité de la composition du milieu intérieur de la cellule est indispensable au maintien des activités métaboliques. La cellule doit importer des molécules indispensables à sa structure et à son fonctionnement ; elle doit évacuer les produits toxiques dus au métabolisme. La membrane plasmique qui entoure toutes les cellules règle ce flux bidirectionnel grâce à sa perméabilité sélective.

Vers 1925 : isolement des membranes plasmiques de globules rouges par lyse osmotique et centrifugation (fantômes : ghost): la membrane plasmique est composée de lipides et de protéines

Vers 1950 : mise en évidence de la bicouche lipidique membranaire grâce à la microscopie électronique (images en rail), à la diffraction des rayons X et aux expériences sur les membranes artificielles de phospholipides Epaisseur 50 nm (environ 50 atomes).

1) Lipides membranaires

Les lipides membranaires sont des molécules amphiphiles qui forment spontanément des bicouches en milieu aqueux (amphiphile = molécule ayant une extrémité hydrophyle (polaire) et une extrémité hydrophobe (apolaire)). Les bicouches de lipides membranaires sont capables d'autoassemblage et d'autofermeture en présence d'un milieu aqueux (modèle de la bicouche de Singer et Nicholson). Ainsi une émulsion de phospholipides dans l'eau donne lieu à la formation de liposomes, petites sphères entourées par une bicouche lipidique (micelles = 1 seule couche).

*Les lipides membranaires sont les phospholipides, le cholestérol et les glycolipides :

- les phospholipides : exemple : la phosphatidyl-choline ; c'est une molécule complexe formée de choline (une substance basique), de phosphate, de glycérol et de deux chaînes d'acide gras. La choline et le phosphate forment l'extrémité hydrophile de la molécule, les deux chaînes d'acide gras forment l'extrémité hydrophobe. Il y a d'autres phospholipides (phosphatidyl-sérine, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-inositol).

Dans certains phospholipides (sphingomyéline), le glycérol est remplacé par une sphingosine, glycérol dont une fonction alcool est remplacée par une fonction amine). La base est la choline.

La longueur des acides gras des phospholipides est variable (14 à 24 atomes de carbone) . Dans la membrane des eucaryotes, chaque molécule de phospholipide possède un acide gras saturé et un acide gras insaturés avec une ou plusieurs liaisons cis. Les liaisons entre les queues d'acide gras sont le fait de liaisons hydrophobes et de force de Van der Waals.

- le cholestérol : cette molécule est très abondante dans les membranes plasmiques des eucaryotes (elle est absente chez les procaryotes; elle est remplacée par l'ergostérol chez les champignons de type candida) ; il peut y avoir jusqu'à une molécule de cholestérol par molécule de phospholipide.

La molécule de cholestérol a une extrémité polaire (radical OH du premier cycle carbonique), un noyau central rigide (la structure polycyclique) et une extrémité apolaire . Le cholestérol s'intercale entre les molécules de phospholipides. Le noyau stéroïde immobilise les régions des chaînes hydrocarbonées des phospholipides en regard.

Le cholestérol rigidifie la membrane.

Il diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles il empêche la gélification de la membrane en évitant la cristallisation des chaînes d'acides gras entre elles. Il permet de régler la température de transition gel-sol dans la membrane.

Des cellules mutantes qui sont incapables d'effectuer la synthèse du cholestérol se lysent rapidement sauf si du cholestérol est ajouté au milieu de culture.

- les glycolipides :

Ces molécules peu abondantes (moins de 5 % des lipides membranaires) sont composées d'une partie lipidique qui est insérée dans la bicouche et d'un groupement oligosaccharidique (un ou plusieurs sucres) qui pointe à l'extérieur de la membrane plasmique.

Ex : galactocérébroside, un constituant majeur de la myéline (gaine des nerfs formée par la cellule de Schwann).

Il n'y a pas de glycolipide dans le feuillet lipidique interne. Les glycolipides sont synthétisés par l'appareil de Golgi (à la différence des phospholipides et du cholestérol qui sont synthétisés par le réticulum endoplasmique) .

Le rôle des glycolipides est encore mal connu ; ils interviennent dans les interactions cellule-cellule (interaction myéline-axone pour le galactocérébroside) ; ils peuvent être des récepteurs pour des substances extracellulaires. Ainsi la toxine cholérique est captée par un glycolipide, le GM1, à la surface de la cellule intestinale.

- La mobilité des molécules de lipides à l'intérieur de la membrane plasmique est hyper-rapide à l'intérieur d'une même couche (10^7 fois/seconde). Ceci permet la diffusion latérale rapide des molécules insérées dans la membrane à l'intérieur de la même couche (ex: une molécule de protéine peut parcourir 2μ / seconde). De plus il existe une mobilité des molécules lipidiques autour de leur axe et des mouvements de flexion des acides gras. La bicouche se comporte comme un liquide bidimensionnel (modèle de la mosaïque fluide).

Par contre la mobilité des lipides est hyperlente d'une couche à l'autre (1 bascule toutes les 2 semaines: flip-flop) : il y a donc quasi absence de flip-flop des phospholipides. Ceci permet de conserver une asymétrie de composition phospholipidique dans les deux feuillettes de la bicouche. Cette asymétrie est importante sur le plan fonctionnel : ex: dans la membrane du globule rouge, le feuillet interne de la bicouche est plus fluide que le feuillet externe.

Dans le réticulum endoplasmique, lieu de synthèse des membranes cellulaires, il y a des enzymes qui favorisent le flip-flop des phospholipides : les translocateurs ou flippases.

Le cholestérol, molécule plus petite et moins polaire que les phospholipides, est par contre plus apte à basculer d'un feuillet à l'autre, il peut subir un flip-flop. Ceci permet d'équilibrer la fluidité membranaire entre les feuillettes de la bicouche.

- La fluidité de la membrane dépend de sa composition :

Une membrane biologique peut être considérée comme un liquide bidimensionnel qui possède une certaine fluidité. La polarisation de la lumière fluorescente émise par des sondes chimiques lipidiques insérées dans la membrane est un indicateur de la fluidité membranaire. La fluidité membranaire augmente :

* si les chaînes hydrocarbonées des phospholipides sont courtes (les chaînes d'acides gras forment moins d'interactions hydrophobes entre elles)

* si les chaînes hydrocarbonées ont des doubles liaisons (l'angulation formée par la ou les liaisons cis gênent les interactions entre acides gras)

La fluidité membranaire varie aussi avec le taux de cholestérol :

*si le taux est trop bas, les acides gras des phospholipides s'associent trop étroitement car ils ne sont plus séparés par les molécules de cholestérol: il y a "gélification" des acides gras et baisse de la fluidité.

* si le taux de cholestérol est élevé, il y a une rigidification de la membrane par les interactions cholestérol-phospholipides

La fluidité membranaire régule la perméabilité, la mobilité cellulaire, l'endocytose, et module l'activité de protéines membranaires (transporteurs, récepteurs...).

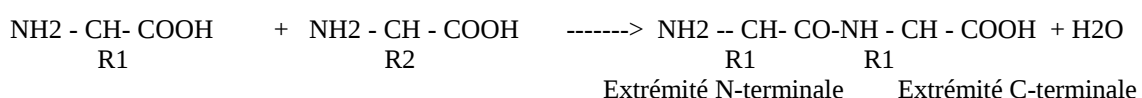
Chez certains animaux, la composition lipidique de la membrane plasmique se modifie afin de mieux résister au froid (augmentation des acides gras insaturés).

2) Protéines membranaires

Les protéines qui sont de grosses molécules, sont moins nombreuses que les molécules de lipides mais représentent 50-70 % de la masse de la membrane plasmique ; les lipides, plus nombreux en nombre, constituent 30 à 50 % de cette masse.

Les lipides servent de solvant pour les protéines membranaires. Les protéines membranaires flottent dans la bicouche de phospholipides: c'est le modèle de la mosaïque fluide (modèle de Singer et Nicholson). Lipides et protéines sont maintenus ensembles par des liaisons non covalentes.

- Caractéristiques chimiques des protéines: les protéines sont des polymères fabriqués à partir de 20 acides aminés enchaînés par la liaison peptidique (structure primaire).



Les chaînes latérales des acides aminés qui peuvent être de nature basique, acide, polaire (hydrophile), apolaire (hydrophobe) ou neutre expliquent la diversité des fonctions biochimiques des protéines (voir L'Essentiel en Biologie Cellulaire, pages 62-63).

Les protéines peuvent s'agencer en hélice α ou en feuillet β (structure secondaire). L'agencement des hélices, des feuillets β et des zones amorphes gouverne la forme des protéines dans l'espace (structure tertiaire). Les interactions entre 2 ou plusieurs chaînes de protéines sont responsables de la structure quaternaire. Structure secondaire, tertiaire et quaternaire sont gouvernées par les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés, donc par la structure primaire, elle-même codée par le code génétique d'après la séquence de l'ADN. Une mutation modifiant un seul acide aminé dans une protéine peut avoir des conséquences graves : exemple thalassémie pour les mutations de l'hémoglobine.

- Les protéines membranaires périphériques :

Ces protéines sont liées par des forces ioniques aux extrémités hydrophiles des phospholipides ou à des protéines intégrées dans la membrane ; les protéines périphériques sont facilement détachées de la membrane par des solutions hypersalines à force ionique élevée (NaCl ou bicarbonate). Les protéines périphériques peuvent être situées sur le versant interne (spectrine, actine) ou sur le versant externe de la membrane (glycoprotéines). Exemple la liaison cadhérine transmembranaire et caténine sous-membranaire.

- Les protéines trans-membranaires intégrées :

- elles représentent la majorité des protéines membranaires
- elles sont amphiphiles : elles possèdent des régions hydrophobes et hydrophiles. Les régions hydrophobes sont constituées d'acides aminés ayant des chaînes latérales hydrophobes (leucine, valine). Ce sont les zones d'insertion des protéines dans la bicouche lipidique hydrophobe. Les protéines sont orientées dans la membrane. L'enchaînement des acides aminés hydrophobes est replié en hélice α (structure secondaire); les chaînes hydrophobes des acides aminés sont orientées vers l'extérieur de l'hélice et contractent des liaisons hydrophobes avec les chaînes aliphatiques des acides gras des phospholipides. Les liaisons peptidiques, polaires, sont situées à l'intérieur de l'hélice; l'hélice α qui traverse la bicouche lipidique a une longueur de 16 à 18 acides aminés (épaisseur de la membrane = 5 nm).

- certaines protéines traversent plusieurs fois la membrane (ex de la glycoprotéine P 180, responsable de la résistance multidrogue) ; ces protéines possèdent plusieurs régions hydrophobes enroulées en hélice α insérées dans la bicouche lipidique ; les régions hydrophobes sont séparées par des régions hydrophiles situées à l'extérieur de la bicouche. Pour beaucoup de protéines en faible abondance, la preuve directe d'une insertion transmembranaire n'est pas apportée : ce passage probable est déduit de la séquence en ADN qui code pour 16-18 acides aminés hydrophobes (séquence consensus).

- la solubilisation des protéines membranaires intégrées nécessite des détergents (ex: sodium dodécylsulfate) ; les détergents sont des molécules amphiphiles dont les groupes hydrophobes viennent s'associer aux régions hydrophobes des protéines tandis que les groupements hydrophiles s'orientent vers le solvant . Les détergents solubilisent les lipides et libèrent les protéines de la bicouche. Il suffit ensuite d'enlever le détergent par dialyse pour récupérer des protéines membranaires purifiées.

- les chaînes hydrophiles extramembranaires sont tournées vers l'extérieur ou l'intérieur de la cellule. La chaîne extracellulaire peut être, par exemple, un récepteur pour une hormone. La fixation de l'hormone modifie la conformation spatiale du récepteur ; il y a ensuite transduction du signal vers le site actif de la protéine situé sur la chaîne hydrophile du versant cytoplasmique ; le site est activé, il y alors fixation et transformation du substrat si le site actif est doué d'une activité enzymatique.

- Protéines liées à des lipides membranaires par une liaison covalente :

Certaines protéines des cellules eucaryotes sont liées à la membrane par des acides gras ou des phospholipides situés à l'intérieur des feuillets lipidiques.

- * la protéine Thy-1, commune aux différentes classes de lymphocytes T est reliée à la membrane par un glycolipide (ancrage par un phosphatidyl-inositol) branché sur un glycérol et deux molécules d'acides gras intramembranaires.

- * la protéine P 60 v-src, mutée par rapport à la protéine normale c-src, est reliée à la membrane par une chaîne d'acide myristique. Cette protéine qui est une kinase située à la face endoplasmique a une activité transformante (permet la cancérisation). Si on remplace la glycine terminale par un autre acide aminé (mutation dirigée), la protéine ne peut plus se lier à la membrane et perd son activité transformante.

- * de même, la protéine p21 ras est liée par une liaison thioether à un résidu farnésyl intramembranaire. Si la liaison ne peut se faire à cause d'une mutation induite expérimentalement (mutagenèse dirigée) au niveau de la cystine terminale, la protéine perd son activité transformante. Des médicaments anticancéreux ciblent la farnésyltransférase avec le but de diminuer l'activité transformante de ras.

- Rôle des protéines membranaires :

Elles peuvent être :

- * des transporteurs
- * des enzymes catalytiques de réactions associées à la membrane
- * des protéines de liaison de cellules entre elles ou à la matrice extracellulaire
- * des récepteurs pour les hormones, lymphokines, facteurs de croissance

- L'activité des protéines de la membrane plasmique est modulée

* par la composition en phospholipides membranaires: certains groupements chimiques des phospholipides activent ou inhibent l'efficacité des protéines : ces mécanismes de régulation de proximité, très fins et encore mal connus, expliquent la nécessité de la diversité de la composition membranaire en phospholipides.

Exemple de la protéine kinase C : cette enzyme est liée à la face cytoplasmique de la bicouche; si elle est entourée des charges électro négatives portées par la phosphatidylsérine, l'activation de l'enzyme est favorisée.

* par la fluidité membranaire : la fluidité membranaire est plus élevée au niveau de la couche interne de la bicouche ; ceci est dû à la richesse de cette couche interne en phosphatidyléthanolamine et en phosphatidylsérine. La couche externe de la bicouche est moins fluide du fait de l'abondance en phosphatidylcholine et en sphingomyéline. Cette asymétrie de composition en phospholipides entre les deux versants de la bicouche est provoquée par des translocateurs de phospholipides; ces translocateurs sont des enzymes qui favorisent le " flip flop " des phospholipides au niveau de leur lieu de synthèse : le réticulum endoplasmique.

- Mobilité des protéines

Les protéines se déplacent dans la couche lipidique (diffusion latérale) en gardant toujours leur polarité (absence de flip-flop). La mobilité des protéines membranaires peut s'étudier en utilisant des anticorps liés à une particule d'or (microscopie électronique) ou des anticorps fluorescents.

exemple : la mobilité latérale des antigènes membranaires peut repérée par des anticorps fluorescents : phénomène de "patching" chez le lymphocyte et répartition progressivement homogène des antigènes dans les cellules hybrides homme-souris.

- Méthodes d'études des protéines membranaires:

Les protéines membranaires peuvent être étudiées grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

* les protéines de membrane sont solubilisées par du sodium dodécyl sulfate (SDS) qui chargent négativement les protéines

* on dépose la solution de protéines sur un gel de polycrylamide (ce gel forme un réseau polymérique à mailles plus ou moins serrées).

* les protéines migrent dans un champ électrique

* la vitesse de migration dépend du poids et de la forme de la molécule

* on colore les protéines par un colorant des protéines (bleu de Coomassie)

* on obtient des bandes.

On peut transférer les protéines sur une feuille de nitrocellulose grâce à un champ électrique (technique du Western Blot). Sur le Western Blot, on peut faire agir des anticorps spécifiques (monoclonaux ou polyclonaux) dont la présence est révélée grâce à la radioactivité, la fluorescence ou des réactions enzymatiques. Le western blot permet de caractériser et de quantifier la présence d'une protéine, même si elle est présente en faible quantité.

Exemple : électrophorèse des protéines de la membrane du globule rouge: on peut reconnaître trois protéines principales:

* la spectrine : c'est une protéine fibreuse de soutien située à la face interne de la membrane ; c'est un dimère associant une chaîne α et une chaîne β enroulées en double hélice. Ce dimère de spectrine est ancré de façon mobile à l'ankyrine , elle même liée à la bande III et à l'actine du cytosquelette intracellulaire . La spectrine assure par sa rigidité la forme biconcave du globule rouge ; l'ancrage mobile assure la déformabilité de la membrane et permet au globule rouge de se faufiler dans les capillaires. Une spectrine anormale; incapable de se fixer à l'ankyrine, est responsable de la microsphérocytose (maladie de Minkovski-Chauffard traitée par splénectomie).

* la bande III : c'est une protéine homodimère qui traverse 14 fois la membrane; cette protéine assure l'échange de l'ion HCO_3^- contre l'ion Cl^- . La partie intracytosolique arrime la bande III à l'ankyrine et à la spectrine.

- Dans les tissus périphériques, l'érythrocyte se charge en CO_2 qui diffuse librement à travers la membrane. Un enzyme, l'anhydrase carbonique dissocie le CO_2 en HCO_3^- et H^+ : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Le HCO_3^- est expulsé dans le plasma par la bande III. Le H^+ est capté par l'hémoglobine désoxygénée.

- Dans les capillaires pulmonaires, le HCO_3^- est repompé dans la cellule par la bande III en échange de Cl^- . Le proton est libéré par l'hémoglobine oxygénée. Du gaz carbonique est reformé par l'anhydrase carbonique puis expulsé dans les alvéoles pulmonaires.

Ce processus permet de transporter des quantités énormes de CO_2 sous la forme de HCO_3^- soluble dans le plasma, alors que le CO_2 gazeux est peu soluble dans les liquides. L'expulsion du HCO_3^- évite l'alcalinisation (augmentation du pH) intracellulaire qui serait délétère pour l'hémoglobine.

* la glycophorine: c'est une protéine qui ne traverse la membrane qu'une seule fois. La portion extracellulaire est fortement glycosylée ; elle porte en particulier des résidus d'acide sialique qui sont responsables de la charge de surface électronégative du globule rouge ; la répulsion des charges négatives de deux globules proches empêche la formation d'amas globulaires en rouleaux qui gêneraient la circulation dans les capillaires.

3) Glucides membranaires

Les cellules eucaryotes possèdent des glucides à la surface extracytoplasmique de la membrane (mais jamais à la face intracytoplasmique de la bicouche). Les glucides sont liés aux protéines membranaires (glycoprotéines) ou à certains lipides (glycolipides). Le poids des glucides dans la membrane varie de 2 à 10 % de son poids total.

Les principaux glucides membranaires sont: le galactose, le mannose, la galactosamine, la glucosamine, le glucose et l'acide sialique.

Les glucides peuvent être mis en évidence en microscopie électronique grâce au rouge de ruthénium. La microscopie électronique permet de mettre en évidence un feutrage pericellulaire de résidus glucidiques : le glycocalyx (manteau cellulaire = cell coat).

Les glucides complexes forment des chaînes polysaccharidiques complexes, plus ou moins ramifiées, liées de façon covalente aux protéines ou aux lipides. Il peut s'agir aussi de protéoglycanes (dans ce type de molécules la partie glucidique est plus abondante que la partie protéique ; dans les glycoprotéines, au contraire, c'est la protéine qui est plus abondante). Les protéoglycanes sont sécrétés puis adsorbés à la surface cellulaire sans liaisons covalentes. Les protéoglycanes appartiennent à la substance fondamentale de la matrice extracellulaire : la limite est donc floue entre les glucides de la membrane et ceux de la matrice extracellulaire.

Les glucides stabilisent la conformation des structures tertiaires de la portion extra-cytoplasmique des protéines membranaires. Ils facilitent l'hydratation des protéines par la rétention d'eau liée au contact de la cellule.

Les glucides jouent un rôle important dans les interactions cellules-cellules. La complexité des polysaccharides suggère qu'ils sont impliqués dans la reconnaissance cellule-cellule ; les lectines (exemple : la phytohématagglutinine extraite d'un haricot) sont des sucres capables d'activer des lymphocytes en se liant aux glycoprotéines de surface de cette cellule. Les sucres membranaires assurent la reconnaissance et l'arrimage du spermatozoïde sur l'ovaire. Les cellules sanguines vieillies qui ont perdu des résidus d'acide sialique sont reconnues puis détruites par macrophages du foie et de la rate qui ont des récepteurs membranaires à l'asialo-GM1.

Les glucides accroissent la solubilité et stabilisent la conformation tridimensionnelle des parties extracytoplasmiques des protéines ; ils participent à la création de la forme des récepteurs ce qui permet leur interaction avec le messager circulant (hormones ou facteurs de croissance).

L'acide sialique assume la négativité du potentiel électrique externe de la membrane ; cette charge joue un rôle dans la répulsion des cellules entre elles (cf supra).

Les charges négatives ont un rôle de filtre pour les substances chargées négativement (au niveau de la membrane basale glomérulaire, notamment) et facilitent l'adsorption de substances chargées positivement (héparan-sulfates)

Les antigènes de groupe sanguins ABO sont des glycolipides insérés dans la membrane plasmique des érythrocytes. Ils sont composés de sucres complexes reconnus par des anticorps naturels du plasma.

Le glycocalyx (manteau cellulaire) est en continuité avec les polysaccharides adsorbés à la surface de la cellule. Il a un rôle dans la protection des surfaces cellulaires. ex: le mucus des cellules intestinales, en continuité avec le glycocalyx des bordures en brosse.

4) Domaines membranaires

La membrane est organisée en macro-domaines spécialisés (exemple microvillosités intestinales) qui ont une composition particulière en protéines et en lipides ; ces macrodomaines spécialisés sont limités par des frontières (tight junctions) ou par l'organisation sous jacente du cytosquelette (villine des microvillosités). On distingue dans les cellules polarisées (exemple de la cellule intestinale) deux macrodomaines membranaires (domaine apical, domaine baso-latéral)

On note aussi des microdomaines de type raft (radeau) réalisant une différenciation locale de la membrane (taille 70–350 nm). Les phospholipides (sphingomyéline, glycosphingolipides à chaînes saturées) et les protéines des rafts sont particuliers (concentration de récepteurs de signalisation de type kinase pour la transduction de l'information).

Les cavéoles sont une autre variété de microdomaines caractérisée par la présence d'une protéine spécifique, les cavéolines (22 kDa). Les cavéoles interviennent dans pinocytose pour assurer le transport par transcytose et l'endocytose. La cavéoline 2 est un marqueur des rafts.

TRANSPORTS MEMBRANAIRES (Actualisé Novembre 2005)

1) Transports moléculaires

La partie centrale de la bicouche lipidique est hydrophobe. Cette hydrophobicité empêche la diffusion des substances polaires au travers de la membrane plasmique. La cellule a donc besoin de systèmes de transport pour faire pénétrer les nutriments, évacuer les déchets et régler la concentration ionique intracellulaire.

	Concentration Intracellulaire (mM)	Concentration Extracellulaire (mM)
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Ca ⁺⁺	10 ⁻²	1-2
(H ⁺): pH	7,2	7,4
Cl ⁻	5-15	110

I - Diffusion transmembranaire simple au travers de la bicouche :

Ce transport ne nécessite pas d'énergie (transport passif) ; il s'agit d'une diffusion simple des molécules au travers de la couche lipidique selon un gradient de concentration.

a) Perméabilité de la membrane plasmique à l'eau :

L'eau (18 daltons) est une molécule polaire et peu soluble dans l'huile. Cependant elle passe rapidement au travers de la bicouche grâce à sa petite taille. Dans certains tissus (vessie, tube rénal, colon), il y a des canaux à eau (aquaporines). La membrane plasmique est semi-perméable : elle laisse passer librement les molécules d'eau mais pas les plus grosses molécules.

Rappel biophysique sur la pression osmotique :

Une pression osmotique se crée entre deux compartiments lorsqu'ils sont séparés par une membrane semi-perméable et qu'ils contiennent un soluté à une concentration différente.

- exemple : si une membrane est perméable à l'eau mais pas au glucose, l'eau diffusera du compartiment ayant la concentration en glucose la plus faible vers le compartiment ayant la concentration la plus forte ; tout se passe comme si on exerçait une pression sur le compartiment le plus dilué: c'est la pression osmotique . L'eau se déplace du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique ; si les deux compartiments sont isotoniques, la pression osmotique est nulle et il n'y a pas de déplacement d'eau.

Importance des phénomènes osmotiques en physiologie cellulaire :

La membrane plasmique se comporte comme une membrane semi-perméable ou mieux à perméabilité sélective : elle laisse passer facilement l'eau mais pas ou peu les ions et les molécules hydrosolubles dissous. La diffusion de l'eau au travers de la membrane est passive car elle ne nécessite pas d'énergie.

- Importance des phénomènes osmotiques au niveau du globule rouge et de la cellule cérébrale :

* Les cellules humaines vivent en isotonie avec le plasma grâce à la composition constante de celui-ci en protéines et en sodium. L'hypotonie ou l'hypertonie du plasma due à certaines circonstances pathologiques sont source de perturbation cellulaire : déshydratation ou oedème cellulaire, hémolyse.

* Les cellules qui vivent en milieu hypotonique (algues ou bactéries ou plantes d'eau douce) ont une paroi rigide qui leur permet de résister à la pression osmotique. L'amibe et les protozoaires d'eau douce ont une vacuole contractile qui pompe l'eau en excès dans le cytoplasme et qui l'excrète à l'extérieur de la cellule.

* L'eau de mer est pratiquement isotonique aux organismes marins.

b) Perméabilité de la membrane aux petites molécules non chargées :

* Les petites molécules non polaires, non chargées pénètrent très rapidement à travers la membrane plasmique (ex. : O₂, N₂, CO, anesthésiques volatiles : par exemple l'halothane induit une anesthésie très rapide car il pénètre rapidement dans la membrane des cellules nerveuses grâce à sa lipophilie). La lipophilie d'un produit est déterminée par son coefficient de partage $K = \frac{C_{\text{lipide}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}}$

Ex : le diéthylurée ($K = 0,01$) diffuse 50 fois mieux dans la membrane que l'urée ($K = 0,0002$).

La membrane cellulaire est 100 à 1000 fois plus visqueuse que l'eau: la diffusion d'une molécule au travers de la membrane est moins rapide que dans l'eau.

* Les petites molécules non chargées pénètrent d'autant plus lentement que leur poids moléculaire est élevé : le CO_2 (44 d), l'éthanol (46 d) et l'urée (60 d) pénètrent plus rapidement que le glycérol (92 d). Le glucose (180 d) pénètre très difficilement par diffusion passive, il devra être pris en charge par des transporteurs spécifiques.

c) Perméabilité aux ions :

La membrane plasmique est extrêmement imperméable aux ions ; ceci est dû à la charge et à l'hydratation des ions. Il passe 1 ion Na^+ au travers de la membrane quand il passe 10^9 molécules d'eau.

II - Transports transmembranaires médiés par des protéines transmembranaires :

De nombreuses substances indispensables à la vie de la cellule (ions, oses, acides aminés, nucléotides...) sont incapables de pénétrer rapidement dans la cellule par diffusion passive. Leur pénétration intracellulaire nécessite des transporteurs : les **protéines de transport membranaire**. Chaque protéine transporteuse est spécifique d'une seule classe de molécules ou d'une seule molécule: c'est la stéréochimie du site de fixation du substrat sur le transporteur qui est responsable de la spécificité. Par exemple, le transporteur du D-glucose (hexose physiologique) ne peut pas transporter le L-glucose (isomère optique incapable d'être métabolisé par la cellule).

Dans certaines maladies génétiques, il y a une mutation d'une protéine transporteuse:

Ex: la cystinurie : les individus atteints ne peuvent réabsorber la cystine (un acide aminé soufré) au niveau du tubule rénal ---> création de lithiases intrarénales et dans les voies excrétrices

Certaines protéines véhiculent une seule molécule d'un côté de la membrane à l'autre : c'est un système **uniport**. D'autres protéines assurent le transport d'une molécule grâce à un couplage avec le transport d'une autre molécule: si les deux molécules sont transportées dans le même sens, il s'agit d'un système **symport** ; si les deux molécules sont transportées dans un sens opposé, il s'agit d'un système **antiport**.

Ex 1: le transport des glucides dans les bactéries s'effectue par un symport avec le proton H^+ ; l'énergie du transport est fournie par le gradient de protons.

Ex 2: la Na/K ATPase fait sortir le Na^+ en échange de la rentrée d'un K^+ ; il s'agit d'un antiport.

Les protéines de transport transmembranaire peuvent être :

* des **canaux ioniques** : ces protéines forment un canal hydrophile transmembranaire qui permet le passage des ions selon un gradient électrochimique. Ce type de transport ne nécessite pas d'énergie. Ces canaux peuvent être en conformation ouverte ou fermée. La durée d'ouverture d'un canal ionique est très brève (quelques centaines de milliers d'atomes en quelques millisecondes).

* **des protéines porteuses (perméases)** se lient de façon spécifique à une molécule et la font passer de l'autre côté de la membrane ; ceci réalise le processus de **diffusion facilitée**. La diffusion se fait dans le sens du gradient électrochimique et ne requiert pas d'énergie propre (**transport passif**). Les protéines de transport traversent une ou plusieurs fois la bicouche lipidique et forment des pertuis hydrophiles qui évitent le contact entre les molécules polaires et la partie hydrophobe de la bicouche.

=<

Le transport n'est pas assuré par le flip-flop des molécules protéiques mais plutôt grâce à un changement de conformation du transporteur (modèle ping-pong où la protéine oscille entre deux conformations stéréochimiques) . C'est un transport lent mais prolongé dans le temps (quelques milliers de molécules par seconde)

* **des protéines responsables d'un transport actif**: ces protéines fonctionnent comme des pompes qui entraînent spécifiquement une molécule contre un gradient électrochimique. Ce processus nécessite de l'énergie fournie par la dissociation de l'ATP en ADP et P_i .

Ex 1: la glycoprotéine P-180 est une protéine membranaire des cellules cancéreuses résistantes; cette protéine expulse certains médicaments anticancéreux hors de la cellule en consommant de l'énergie fournie par l'ATP. Elle traverse 14 fois la membrane en définissant des canaux par où passe le médicament. Cette protéine est trouvée à l'état physiologique dans les bordures en brosse des cellules intestinales ou rénales; elle permet de rejeter à l'extérieur des substances génotoxiques mutagènes. Elle est paradoxalement détournée par les cellules cancéreuses pour se protéger des médicaments antinéoplasiques.

Ex 2: Le canal CFTR (cystic fibrosis transporting receptor) est un canal pour les ions chlorures, appartenant comme la P-180 à la superfamille des transporteurs membranaires (famille ABC: ATP binding cassette). Sa mutation est responsable de la mucoviscidose en empêchant la protéine d'accéder à la membrane plasmique. La conséquence est un défaut d'hydratation du mucus qui s'accumule dans les bronches et le pancréas d'où une insuffisance respiratoire progressive et un défaut d'assimilation digestive des graisses.

Ex 3: le transport du glucose fait appel selon les cellules à des transporteurs actifs ou passifs qui peuvent coopérer:

- La cellule intestinale doit puiser le glucose dans le tube digestif où la concentration peut être faible: elle doit utiliser un système de transport actif. Le principe est identique à celui des acides aminés: c'est un cotransport avec le gradient sodique comme source d'énergie. La vitesse d'absorption du glucose dépend de la concentration de sodium dans la lumière intestinale.

L'absorption intestinale du glucose est permise par la polarisation de la cellule qui maintient une distribution asymétrique des protéines membranaires; des jonctions étanches séparent les domaines membranaires apical et basolatéral, empêchent la diffusion latérale des protéines transporteuses et maintiennent ainsi la polarisation de la cellule intestinale :

- Le symport glucose-Na est localisé dans la membrane apicale de l'entérocyte, face à la lumière intestinale; il permet l'entrée d'une molécule de glucose couplée à un ion Na^+ .

- La Na/K ATPase est localisée dans la membrane basolatérale de la cellule; elle expulse le Na pour maintenir un taux constant de Na^+ intracellulaire (maintien d'un gradient sodique entre la lumière intestinale et l'intérieur de la cellule); elle permet l'absorption du Na^+ par l'organisme.

- Une protéine transporteuse de la membrane basolatérale permet le transport du glucose de la cellule vers le milieu interstitiel et le sang par diffusion facilitée.

- Les autres cellules de l'organisme puisent le glucose dans le plasma ou dans le liquide interstitiel où la concentration est élevée (0,8 - 1 g/l) et constante. L'entrée du glucose se fera par des perméases assurant une diffusion facilitée selon le gradient de concentration. Ce sont des uniports appartenant à une même famille de protéines traversant 12 fois la membrane (GLUT 1, 2, 3 ...). Dans la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé en glucose-6-phosphate par une glucokinase: ceci permet de conserver le gradient de glucose et empêche le G-6-P de rétrodiffuser vers l'extérieur. La perméase au glucose de l'érythrocyte a été clonée. Il s'agit d'une protéine qui traverse 12 fois la membrane (12 hélices α). L'affinité de la perméase pour le D-glucose est supérieure à celle pour le mannose ou le galactose. Il n'y a pas d'affinité entre la perméase et le L-glucose. La perméase au glucose a pu être étudiée en l'isolant de la membrane plasmique par des détergents puis en l'incorporant dans des liposomes artificiels: la présence de la protéine est nécessaire pour le passage transmembranaire du glucose.

III - Modélisation d'un phénomène de transport :

A la différence de la diffusion membranaire simple, qui n'est pas saturable, un transport assuré par des protéines (diffusion facilitée ou transport actif) est saturable s'il y a un excès de substrat.

Ex : la réabsorption du glucose au niveau de la cellule du tubule rénal. La vitesse d'absorption est une fonction exponentielle variant selon la concentration du glucose. Ce type de fonction s'explique si on admet qu'il existe un nombre fixe de transporteurs à affinité variable qui sont recrutés à la demande. Le K_m est la concentration de glucose qui correspond à la vitesse demi-maximale de réabsorption. La capacité maximale de réabsorption du glucose par le tubule rénal est dépassée si la concentration du glucose dans l'urine dépasse 1,80 g/L.

IV - Un exemple de transporteur actif : la Na/K ATPase :

Toutes les cellules possèdent un potentiel électrique de membrane, plus ou moins marqué, qui représente la différence de charge électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'intérieur de la cellule est chargé négativement par rapport à l'extérieur.

Ce potentiel de membrane (- 75 mV) a été mis en évidence pour la première fois dans l'axone géant du calmar grâce au diamètre de cette cellule (1 mm qui permet l'insertion de microélectrodes. Le potentiel de membrane existe dans toutes les cellules vivantes. Les modifications du potentiel de membrane sont à l'origine de l'influx nerveux ou de la contraction des cellules musculaires.

La Na/K ATPase est une glycoprotéine transporteuse transmembranaire de type tétramère $\alpha 2\beta 2$ qui déborde sur les deux faces de la membrane plasmique. La Na/k ATPase expulse 3 Na^+ et fait rentrer 2 K^+ en consommant de l'énergie fournie par une molécule d'ATP. Il existe de plus un canal de fuite du K^+ indépendant de la Na/K ATPase alors que la membrane est imperméable dans l'autre sens au Na^+ ; il en résulte un excès de charges positives à l'extérieur de la cellule et donc une électronégativité relative de l'intérieur de la cellule.

La Na/K ATPase est présente dans toutes les cellules animales ; le maintien du gradient électrique consomme au moins 1/3 des besoins en énergie de la cellule. La NaK ATPase est phosphorylée et déphosphorylée de manière réversible par l'ATP. Si on traite les cellules par le dinitrophénol, un poison de la mitochondrie, les gradients disparaissent, le potentiel transmembranaire diminue et la cellule meurt. Dans les cellules nerveuses qui se dépolarisent et se repolarisent constamment, cette pompe consomme 70 % de l'énergie cellulaire. L'ouabaine (un médicament tonocardiaque) inhibe la Na/K ATP-ase en se fixant au site de liaison du K^+ . La diminution de la polarisation entraînée par l'entrée de sodium permet l'ouverture d'un canal calcique, voltage dépendant, qui facilite la contraction de la cellule cardiaque.

Rôles de la Na K⁺ ATPase :

- * Elle est "électrogène": elle contribue à la formation de la différence de potentiel transmembranaire. La membrane plasmique est un condensateur puissant: 200 000 V/cm.

- * Elle règle le volume cellulaire :

La Na/K ATPase expulse plus ou moins rapidement le sodium. Si le sodium s'accumule dans la cellule, le volume d'eau intracellulaire augmente pour compenser l'hyperosmolarité intracellulaire. On peut faire éclater des cellules animales en les traitants par l'ouabaine.

- * Elle maintient un gradient de Na entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule: ce gradient sera utilisé comme source d'énergie pour le transport intracellulaire de certaines substances (glucose, acides aminés ...).

- * Transport des acides aminés et du glucose

C'est un transport couplé avec le Na^+ (cotransport). Le Na^+ et l'acide aminé se fixent sur 2 sites du transporteur ; ceci induit une modification de la conformation du transporteur ; le sodium et l'acide aminé sont libérés ensemble à l'intérieur de la cellule.

Le moteur du transport est constitué par le gradient de concentration de Na entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ce gradient est entretenu par la Na/K⁺ ATPase. Il y a 9 transporteurs différents pour les 20 acides aminés indispensables à la synthèse des protéines.

26 X O6

V - La Ca²⁺ATPase

Cette protéine permet de maintenir une concentration cytosolique faible de calcium. Le gradient de Ca^{++} entre l'intérieur (10^{-6} à 10^{-7} M) et l'extérieur de la cellule (10^{-3} M) est très élevé dans la cellule au repos. La Ca-ATPase est logée au niveau de la membrane plasmique ou dans la membrane du réticulum lisse (sarcoplasmique) du muscle strié (CSC: Compartiment Séquestrant le Calcium contenant la calséquestrine, protéine fixant le Ca avec une haute affinité). La Ca-ATPase transporte 2 Ca^{2+} pour chaque molécule d'ATP hydrolysée. La présence de Mg^{2+} qui se lie au site ATPase est indispensable au bon fonctionnement de la Ca-ATPase. Dans la cellule activée (ex contraction musculaire), le Ca est libéré, se fixe transitoirement à la troponine, ce qui déclenche l'interaction actine-myosine, puis est repompé par la Ca-ATPase lors de la relaxation musculaire.

VI - Fonctionnement des canaux ioniques transmembranaires :

Les canaux ioniques peuvent être dans une configuration ouverte ou fermée. L'ouverture des canaux peut être réglée par un **ligand** (ex récepteur de l'acétylcholine ou autres neuromédiateurs) ou par **la tension (ou voltage)**. Canaux régulés par la tension et canaux régulés par un ligand sont successivement mis en oeuvre au cours d'un processus physiologique complexe, **la transmission neuromusculaire** (jonction ou synapse ou plaque neuro-musculaire).

La transmission de l'influx au niveau de la jonction neuromusculaire s'effectue en plusieurs étapes.

1. Le potentiel de repos d'un nerf est dû à la différence de potentiel entre l'extérieur de la membrane plasmique où règne un excès de charges positives et l'intérieur de la cellule où se trouve un excès de charges négatives. Ce gradient électrique est provoqué par l'action conjointe de la Na/K ATPase et d'un canal de fuite du potassium. La membrane plasmique forme donc un condensateur aux bornes duquel la DDP (différence de potentiel) est intense ($-70 \text{ mV}/3,5 \text{ nm} = 200\,000 \text{ V/cm}$). L'influx nerveux est une onde de dépolarisation qui diminue ou annule le potentiel électro négatif de la cellule; cette onde de dépolarisation se propage de proche en proche du corps neuronal vers l'extrémité axonale. Cette dépolarisation ouvre de façon brève des canaux sodiques voltage-dépendant.

Au niveau de l'extrémité synaptique, un canal calcique voltage-dépendant est ouvert lors de l'arrivée de l'influx. Comme il existe un gradient de Ca^{++} entre le milieu extracellulaire (10^{-3} M) et le cytosol (10^{-6} M), l'ouverture du canal calcique provoque une entrée massive du Ca^{++} dans la terminaison axonale; cet afflux de Ca^{++} provoque une fusion des vacuoles d'acétylcholine avec la membrane de l'extrémité axonale; le neuromédiateur est libéré dans l'espace synaptique.

2. L'acétylcholine se fixe à son récepteur spécifique situé au niveau de la membrane musculaire (canal réglé par un ligand). Par sa fixation, le neuromédiateur provoque une modification de la conformation du canal qui devient brusquement perméable au Na; le sodium pénètre à l'intérieur de la cellule musculaire en suivant son gradient électrochimique; la cellule musculaire commence à se dépolariser. **Le récepteur de l'acétylcholine** a été isolé de l'organe électrique du poisson torpille. Un inhibiteur spécifique du récepteur a été extrait d'un venin de serpent: la bungarotoxine. Le curare est un autre inhibiteur de ce récepteur. Le récepteur a été séquencé: c'est un pentamère ($\alpha\beta\gamma\delta$). La fixation de l'acétylcholine modifie transitoirement la conformation du récepteur et autorise la pénétration du Na. Très rapidement après son ouverture, le récepteur se relaxe et se referme; cette ouverture très brève du récepteur, qui s'effectue même si l'acétylcholine reste fixée, est un mécanisme de sécurité qui empêche une pénétration trop massive du Na dans la cellule. L'acétylcholine est relarguée dans la fente synaptique; elle est recaptée par les terminaisons nerveuses ou détruite par l'acétylcholine-estérase (enzyme inhibée par la prostigmine).

3. La dépolarisation membranaire initiée par l'ouverture du canal-récepteur à l'acétylcholine provoque l'ouverture d'autres canaux sodiques adjacents sensibles au voltage; l'afflux sodique intracellulaire augmente brusquement grâce à ce mécanisme d'amplification. Ceci donne naissance à une onde de dépolarisation de la cellule musculaire: le potentiel d'action.

4. Le potentiel d'action se propage à l'ensemble de la cellule musculaire, en particulier à un compartiment vésiculaire spécialisé issu du reticulum sarcoplasmique qui contient beaucoup de Ca^{++} en réserve (compartiment subcellulaire séquestrant le calcium: CSC). Des canaux transporteurs du Ca sont situés dans la membrane du CSC; l'ouverture de ces canaux est réglée par la tension; quand la membrane du CSC est dépolarisée par le potentiel d'action, les canaux s'ouvrent et laissent échapper le calcium au niveau des fibrilles musculaires. Le calcium se lie à la troponine qui permet la liaison de l'actine et de la myosine et provoque la contraction des myofibrilles.

Les récepteurs voltage- ou ligand-dépendants sont étudiés grâce à la technique du **Patch Clamp**. Cette technique permet d'isoler une petite fraction de membrane cellulaire à l'extrémité d'une fine pipette en verre; la membrane qui contient un ou quelques récepteurs peut être baignée au niveau de sa face interne ou externe par des milieux de composition déterminée par l'expérimentateur; ce dispositif expérimental permet de recueillir des signaux électriques provoqués par l'ouverture ou la fermeture des canaux membranaires sous l'influence d'un ligand (ou d'un médicament) ou de la variation du voltage.

VII - Régulation du pH intracellulaire par les protéines membranaires

Le pH intracellulaire est très strictement stable à 7,2. Il peut augmenter à 7,4 quand la cellule reçoit un signal de prolifération (facteur de croissance) ou lorsqu'un oeuf est fécondé.

Plusieurs systèmes biochimiques permettent la stabilité du pH intracellulaire:

* Les ions H^+ sont fournis par le métabolisme cellulaire (ex acide lactique résultant du métabolisme du glucose) et par la dissociation du CO_2 : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

* Les ions H^+ sont tamponnés par les protéines (hémoglobine, ...), les phosphates et les bicarbonates cellulaires.

* L'excrétion des ions H^+ est assurée par l'antiport Na/H . L'activité de ce transporteur est régulée par la liaison des H^+ à la partie intracytoplasmique de la protéine. Le Na^+ qui est entré en échange de H^+ est expulsé par la Na/K ATPase.

* L'échangeur Cl^-/HCO_3^- est également important pour éviter l'alcalinisation du milieu intracellulaire; cet échangeur est nommé bande III dans le globule rouge mais il existe dans toutes les cellules.

* Un autre transporteur combine les deux mécanismes (échangeur Na^+/HCO_3^-) : il fait entrer Na^+ et HCO_3^- en échange d'une sortie de H^+ et de Cl^- . Cet échangeur est régulé par la disponibilité en Cl^- . Il a l'avantage de neutraliser 2 protons : un qui sort, un qui se combine avec HCO_3^- .

Dans les cellules pariétales de l'estomac, il existe une H^+/K^+ ATPase, de structure proche de la Na/K ATPase, qui assure l'expulsion de protons dans la lumière gastrique et acidifie le contenu jusqu'à un pH de 1 (rôle dans la digestion des protéines et la stérilisation du bol alimentaire avant son transit dans l'intestin). Les médicaments inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) sont très efficaces pour le traitement des ulcères gastro-duodénaux.

Dans la paroi des lysosomes se trouve une H^+/K^+ ATPase qui permet l'acidification de ce compartiment cellulaire (pH 4-5).
=>2 XI 2006

2) Transports des substances macromoléculaires

Les cellules peuvent capter les substances macromoléculaires par **endocytose** :

- soit par pinocytose (particules < 150 nm non visibles en microscopie optique, macromolécules, protéines) : la cellule "boit"

- soit par phagocytose (particules visibles, virus, bactéries) : la cellule "mange"

Les cellules peuvent également excréter des substances vers l'extérieur : **exocytose** (protéines, hormones).

I - la pinocytose :

La pinocytose résulte de l'invagination de la membrane plasmique, avec formation de vésicules qui se séparent secondairement d'elle, se rassemblent en vésicules plus grosses et migrent dans le cytosol.

- L'amibe (protozoaire) mise en présence de substances inductrices chargées positivement (acides aminés, protéines, virus) migre dans le sens du gradient de concentration de ces substances. L'animal développe des pseudopodes qui se creusent d'un microtubule où pénètrent les substances nutritives ; par la suite, le tube se ferme et se fragmente en vésicules ; les vésicules fusionneront avec des lysosomes.

- la paramécie (autre protozoaire) possède une région spécialisée où se forment les vésicules de pinocytose : la région buccale .

- le fibroblaste (cellule du tissu conjonctif) est capable de se déplacer dans une boîte de culture. Au cours de cette migration, on observe la formation de vésicules de pinocytose. Les vésicules se forment à l'arrière de la cellule en mouvement et se déplacent à travers le cytosol grâce aux protéines du cytosquelette (tubuline) ; elles fusionnent avec la membrane plasmique à l'avant de la cellule ; on assiste donc à un recyclage membranaire permanent qui économise la synthèse de nouvelle membrane par le réticulum. Ce phénomène de recyclage membranaire peut être visualisé par des microbilles de carbone déposées à un endroit de la membrane cellulaire; les billes se déplacent comme sur un tapis roulant de l'avant vers l'arrière de la cellule.

En quelques heures, une cellule peut ingérer l'équivalent de son volume par le biais de la pinocytose (4 heures pour un macrophage).

Les puits recouverts

Les puits recouverts (coated pits) sont des zones spécialisées (2 % de la surface de la membrane plasmique) où s'effectue l'essentiel de l'activité de pinocytose. On peut observer la formation de 2 500 vésicules de pinocytose par minute au niveau des puits recouverts.

Les puits recouverts sont visibles en microscopie électronique sous la forme de petites dépressions membranaires doublées, à l'intérieur de la cellule, par un matériel dense aux électrons. Des récepteurs protéiques membranaires sont insérés dans la membrane des puits recouverts, ces récepteurs concentrent et captent les substances du milieu extracellulaire qui doivent être endocytées.

Une protéine responsable de la formation de la vésicule de pinocytose a été caractérisée : la **clathrine** (PM = 180 000). Chaque molécule de clathrine ressemble à une hélice à 3 branches (triskelions), mise en évidence grâce à la microscopie électronique avec ombrage. Les molécules de clathrine se lient entre elles pour former une cage polyédrique qui enferme la membrane de la vésicule (vésicules hérissées). L'adaptine lie le récepteur à la clathrine. La dynamine (protéine à activité GTPasique) coupe la vésicule du reste de la membrane plasmique. Une fois la vésicule formée et internalisée, les molécules de clathrine se dissocient et sont recyclées sous la membrane des puits couverts.

La vésicule lisse (endosome) est dirigée vers sa destination (le plus souvent un lysosome). Les processus d'initiation et de destruction de la cage de clathrine sont encore mal connus. Il existe des protéines déstabilisantes de la clathrine qui appartiennent à la famille des Heat Shock Proteins (HSP) et qui ont une activité ATPasique.

Exemple du récepteur aux lipoprotéines :

Les LDL (light density lipoprotein) sont la forme circulante du cholestérol dans le plasma. Ce sont des ensembles macromoléculaires (20-25 nm) formés par :

- une monocouche de phospholipides externes où est intercalé du cholestérol libre
- un centre contenant du cholestérol estérifié par des acides gras
- des protéines qui assurent l'organisation de l'agrégat moléculaire et qui servent de signal à la surface de la LDL (apo-B).

La protéine se fixe au récepteur des LDL situé sur les puits recouverts (le récepteur a une extrémité extracytoplasmique pour fixer la LDL et une partie hydrophobe qui traverse la membrane et une extrémité arrimant le récepteur à la clathrine par l'intermédiaire de l'adaptine AP-2). La fixation de la LDL induit la polymérisation de la clathrine et donc la formation d'une vésicule de pinocytose; la LDL est internalisée. La vésicule se sépare de la clathrine qui est recyclée vers le puits recouvert. La vésicule libérée fusionne avec une vésicule acidifiée (pH 5) par une H⁺/ATPase où le récepteur se sépare de la LDL (CURL: Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligand); les récepteurs de LDL sont recyclés vers la membrane plasmique du puits recouvert; la lipoprotéine est dégradée par les enzymes lysosomiales en cholestérol et en acides aminés.

Chez certaines personnes, il y a absence ou anomalie du fonctionnement des récepteurs aux LDL (absence de site de liaison au puits recouverts). C'est souvent une mutation dans une séquence Asp-Pro-X-Tyr qui est en cause; cette séquence est cruciale pour l'enfouissement de la vésicule.

La conséquence de ces défauts génétiques est l'hypercholestérolémie familiale qui entraîne un excès de cholestérol circulant; ce cholestérol trop abondant va s'accumuler dans les parois artérielles et provoquer l'athérome avec ses redoutables conséquences : infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, artérite des membres inférieurs. Les individus homozygotes meurent en bas âge de maladies cardiovasculaires; les hétérozygotes (1 homme sur 500) ont 50 % de récepteurs et présentent des complications plus tardives. Il y a plusieurs types de mutations pathogènes du récepteur: certaines mutations ne gênent pas l'endocytose mais empêchent le découplage de la LDL dans le compartiment acide du CURL, dans certains cas le récepteur est incapable de s'attacher à la membrane plasmique et il est sécrété, dans d'autres cas, le récepteur ne se localise pas au niveau des puits recouverts et il diffuse dans toute la membrane plasmique.

Exemple du récepteur de la transferrine :

Le fer ionisé, toxique, est transporté dans le plasma par une grosse protéine, la transferrine. Les cellules possèdent à leur surface un récepteur de la transferrine qui fonctionne sur le modèle précédent: intervention de la clathrine, découplage dans le CURL, recyclage du récepteur à la surface des puits recouverts et de la transferrine et libération intracellulaire du fer qui est repris en charge par des protéines porteuses intracellulaires.

Vésiculation sans intervention de la clathrine :

Dans certains cas, la formation des vésicules de pinocytose ne se fait pas par l'intermédiaire de la clathrine ; le mécanisme moléculaire n'est pas encore bien connu. C'est le cas des vésicules de **transcytose** qui assurent le transport des anticorps dans la cellule intestinale du nouveau-né. Chez le nouveau-né, la muqueuse intestinale capte les anticorps présents dans le lait grâce à un récepteur du fragment Fc des immunoglobulines. L'anticorps est internalisé dans une vésicule et traverse la cellule intestinale, sans dégradation, de la membrane apicale vers la membrane basale et les vaisseaux sanguins. Ce phénomène de transcytose des anticorps disparaît quand l'enfant grandit; les cellules intestinales deviennent presque totalement imperméables aux protéines.

La **cavéoline** est une autre protéine permettant la formation de vésicules d'endocytose, notamment au niveau des radeaux lipidiques (voir supra).

II- la phagocytose

Alors que la pinocytose existe dans toutes les cellules, la phagocytose n'existe que dans les cellules spécialisées: macrophages et polynucléaires.

Ces cellules émettent des pseudopodes qui englobent la proie (bactéries, virus, cellules vieilles, altérées ou cancéreuses) ; il y a formation d'une vacuole de phagocytose qui fusionnera avec les lysosomes. Le contenu de la vacuole sera partiellement ou totalement dégradé. Les pseudopodes se forment grâce à des modifications locales du cytosquelette où interviennent une interaction actine-myosine et la tubuline: la phagocytose est inhibée par les poisons de l'actine (cytochalasine) et ceux de la tubuline (colchicine, vincristine). Applications thérapeutiques: le traitement de la goutte et des purpuras thrombopéniques.

La phagocytose s'opère comme la pinocytose grâce à des **récepteurs membranaires**.

Le macrophage est une cellule du système immunitaire spécialisée dans la phagocytose. Le macrophage est attiré par des substances du métabolisme ou de la structure bactérienne (lipopolysaccharides) : c'est le chimiotactisme. Dans la membrane du macrophage, par exemple, il y a des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (anticorps) ; une cellule totalement recouverte d'anticorps sera phagocytée alors qu'une cellule partiellement couverte ne sera pas ingérée. La facilitation de la phagocytose du macrophage provoquée par les anticorps se nomme opsonisation. Le récepteur du Fc a été cloné; il s'agit d'une protéine de 231 AA, avec une partie intramembranaire hydrophobe et un segment extracytoplasmique où se trouve le site de reconnaissance pour Fc. Cette molécule appartient à la superfamille des immunoglobulines car certaines des séquences du récepteur sont semblables aux sites de reconnaissance des anticorps pour les antigènes. Le récepteur de Fc est couplé à un canal sodium; la fixation d'une extrémité Fc d'un anticorps provoque une entrée de Na, provoquant elle-même une dépolarisation membranaire et une activation cellulaire (phagocytose, production lysosomiale de H₂O₂). La phagocytose est un processus qui demande de l'énergie (100 molécules d'ATP par particule ingérée).

La pénétration intracellulaire de certains virus (VIH) se fait par phagocytose grâce à des récepteurs membranaires (CD4) et à une internalisation par des vésicules à clathrine.

III- l'exocytose

L'exocytose se fait par fusion de la membrane des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique.

La plupart des cellules excrètent des macromolécules vers l'extérieur. Les vésicules proviennent du reticulum ou du Golgi. Les vésicules s'accrochent à la membrane plasmique et des protéines facilitent la fusion entre les feuillettes membranaires.

Les vésicules sont excrétées :

- soit en continu (lors d'une sécrétion permanente : ex la salive)
- soit lors d'une stimulation cellulaire :

Ex. : libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire déclenchée par l'irruption de Ca⁺⁺ dans l'extrémité synaptique.

Ex. : libération brutale d'histamine par le mastocyte lorsqu'il y a fixation d'un antigène sur les immunoglobulines E (Ig E) fixées à sa surface : c'est le mécanisme du choc anaphylactique (ou allergique).

L'excrétion de particules virales se fait par les mêmes voies que l'exocytose (bourgeonnement viral); des protéines de fusion facilitent cette excrétion (virus de Sendai).

Les déchets cellulaires non totalement dégradés par les lysosomes pourront être excrétés par exocytose (défécation cellulaire) ou s'accumuler dans les macrophages (silice, amiante, goudrons de la fumée de cigarette).

PROCESSUS DE RECONNAISSANCE ET D'ADHESION INTERCELLULAIRE (mise à jour Novembre 2006)

1) Les molécules d'adhésion

1- Mise en évidence de molécules de reconnaissance et d'attachement sur les membranes cellulaires

Les cellules des organes embryonnaires peuvent être facilement dissociées par la trypsine (alors que les cellules des organes de l'adulte le sont difficilement). On opère dans un milieu sans calcium, ni magnésium, supplémenté en EDTA, un chélateur de ces deux ions divalents.

Si on dissocie du rein et du foie embryonnaire et que l'on mélange les suspensions cellulaires, les cellules rénales vont se réagréger entre elles, de même pour les cellules hépatiques; on en déduit qu'il existe des molécules de reconnaissance spécifiques au niveau de la membrane de chaque variété de cellules.

Si on dissocie des cellules de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme de l'embryon et qu'on les mélange, les cellules de chaque feuillet vont se réassocier entre elles dans un ordre précis : les cellules de l'ectoderme en périphérie, celles de l'endoderme au centre, celles du mésoderme au milieu. Il y a donc une hiérarchie précise dans les processus d'adhésion qui joue un rôle essentiel dans l'organisation de l'embryon.

2 - La protéine N-CAM (neuronal cell adhesion molecule; calcium-indépendante) :

Cette protéine a été mise en évidence dans la rétine embryonnaire ; la rétine est une expansion du cerveau.

On peut dissocier la rétine et fabriquer des anticorps monoclonaux contre les protéines de la membrane des cellules. Certains anticorps bloquent la réagréation des cellules entre elles. Ces anticorps (greffés sur des billes de silice dans une colonne de chromatographie d'affinité) permettent de purifier la protéine d'adhésion; la protéine purifiée peut être séquencée (on détermine une partie de l'enchaînement de ses acides aminés: la structure primaire); à partir d'une petite séquence de nucléotides, on peut isoler le cDNA complet et en déduire la séquence en nucléotides, et donc la séquence primaire des acides aminés de la protéine totale (génétique inverse).

N-CAM est composé d'un segment COOH terminal cytosolique, d'un segment transmembranaire

(hélice α) et d'un long segment extramembranaire (extrémité NH₂) comprenant 5 boucles fermées par des ponts S-S.

Il existe une analogie de structure de la protéine N-CAM avec les anticorps; ces molécules, spécialisées dans la reconnaissance, dérivent d'une famille de protéines très ancienne dans l'évolution: la **superfamille des immunoglobulines**.

Grâce au marquage par les anticorps, on montre que N-CAM est présente à la surface des cellules nerveuses (neurones) et des cellules gliales (la glie est le tissu de soutien du système nerveux ; les cellules gliales nourrissent les neurones). La protéine N-CAM assure la liaison étroite des deux types cellulaires.

La liaison de deux protéines N-CAM est homotypique (les deux molécules qui s'attachent sont identiques). La liaison est indépendante du calcium.

La protéine N-CAM joue un **rôle important au cours de l'embryogenèse** :

- * les anticorps anti N-CAM empêchent le développement de l'oeil
- * les cellules de la crête neurale, initialement adhérentes au tube neural, expriment N-CAM à leur surface. Par la suite, ces cellules ne synthétisent plus N-CAM, elles se détachent du tube neural et migrent à distance ; lorsque les cellules sont arrivées à destination, le programme de synthèse de la protéine N-CAM reprend ; les cellules qui possèdent à nouveau N-CAM à leur surface se réagrégent pour former la glande mésentérique et les ganglions nerveux d'où naissent les nerfs sympathiques.

3 - Les cadhérines (Calcium-dépendantes) :

C'est une autre famille de molécules d'adhésion (glycoprotéines), différentes des CAM par leur structure et nécessitant la présence de calcium pour assurer la liaison intercellulaire (une trentaine). On peut distinguer notamment:

- la E-Cadherine (épithélium)

- la N-Cadherine (système nerveux, cristallin)
- la P-Cadherine (placenta)

La E-Cadhérine est aussi dénommée L-CAM (liver cell adhesion molecule) car elle a été isolée du foie embryonnaire. Elle est aussi nommée uvomoruline car elle assure la compaction de l'embryon au stade morula. La L-CAM est également la protéine qui unit les faisceaux d'actine entre deux cellules au niveau des ceintures d'adhésion.

Les cadhérines se lient au cytosquelette (actine essentiellement) par des protéines de couplage dont l' α -caténine.

Lorsque les cellules du tube neural se séparent du neur ectoderme, les cellules perdent E-cadhérine et se mettent à exprimer de la N-Cadhérine selon le déroulement d'un programme morphogénétique très précis. Les cellules cancéreuses perdent l'expression de la E-cadhérine ; elles deviennent alors mobiles, traversent la lame basale et envahissent la matrice extra-cellulaire.

4 - Les intégrines

Cette famille de protéines contribue à l'attachement des cellules à la lame basale et à la matrice extracellulaire; elles se comportent comme des récepteurs de signaux de l'environnement. Elles sont abondantes mais leur affinité au ligand est relativement faible (différence avec les récepteurs hormonaux). Elle forme un véritable tissu Velcro.

Les intégrines (plus de 20) sont composées de chaînes α (14 types) et β (9 types) qui s'assemblent indépendamment (ex $\alpha 2 \beta 4$, $\alpha 5 \beta 6$ etc...). Les intégrines se lient à des protéines (laminine, fibronectine, collagène IV..) ou des constituants polysaccharidiques (protéoglycanes, heparan sulfate...) de la matrice. La liaison au ligand est dépendante du calcium ou du magnésium. Chaque intégrine possède une spécificité pour un ligand:

Ex : - $\alpha 5 \beta 1$ est un récepteur de la fibronectine; $\alpha 6 \beta 1$ est un récepteur de la laminine

- $\alpha L \beta 2$ ou LFA1 (lymphocyte function associated) permet au lymphocyte d'adhérer aux cellules endothéliales et de traverser la paroi des vaisseaux. La perte de LFA1 entraîne un déficit immunitaire.

- des intégrines à chaînes $\beta 3$ servent pour l'adhésion de la plaquette sanguine au fibrinogène (début de l'hémostase plaquettaire). La thrombasthénie de Glanzmann, une maladie hémorragique, est liée à une mutation des chaînes $\beta 3$.

16 XI 2006

Les intégrines sont des adaptateurs transmembranaires: l'extrémité β se lie à l'actine du cytosquelette par la taline et l'actinine, initiant la formation de points de contact focaux. Les intégrines permettent l'orientation du cytosquelette selon celle des fibres de la matrice extracellulaire.

La phosphorylation de la chaîne $\beta 1$ précède la mitose; la cellule est moins adhérente au support et s'arrondit; ceci permet la séparation des deux cellules filles. Dans certaines cellules cancéreuses, la chaîne $\beta 1$ est phosphorylée en permanence; la cellule migre plus rapidement dans les tissus adjacents ce qui permet les phénomènes d'invasion et la formation de métastases.

5 - Les sélectines

Certaines cellules sanguines doivent sortir par diapédèse du compartiment vasculaire (lymphocytes, polynucléaires, macrophages) pour débarrasser les tissus des bactéries et des virus. Les cellules ralentissent en se liant faiblement à des protéines des cellules endothéliales, les sélectines. Ces protéines sont des lectines (glycoprotéines) qui reconnaissent une séquence glucidique d'une autre glycoprotéine ou d'un glycolipide située sur la cellule sanguine. La liaison dépend du calcium. Les sélectines ne sont exprimées à la surface de la membrane que dans les cellules endothéliales des zones inflammatoires (rôle des cytokines: interleukine 1, TNF α ...). Il y a coopération entre sélectines (arrêt cellulaire) et intégrines (attachement et coopération avec la cellule endothéliale pour le passage intercellulaire)

2) Les structures d'adhésion

L'organisme est constitué d'organes (coeur, foie, rein...) ; chaque organe est constitué de différents tissus; les tissus sont composés de différentes variétés de cellules différenciées (exemple l'épithélium intestinale comporte des entérocytes, des cellules mucipares, des cellules neuro-endocrines).

- Le tissu épithélial ou épithélium: dans un feuillet épithélial, les cellules sont fortement attachées les unes aux autres ; il y a très peu de substance intercellulaire. On peut appeler ce tissu une feuille épithéliale car elle est fine et résistante. Les cellules ayant une même fonction doivent s'associer entre elles par des mécanismes d'adhésion intercellulaire spécifiques.

- Les cellules conjonctives sont dispersées dans une matrice extracellulaire et forment le tissu conjonctif. Dans le tissu conjonctif, l'espace est occupé principalement par un réseau de fibres (le collagène, l'élastine) qui supporte les contraintes mécaniques imposées au tissu. Les cellules sont rares, dispersées et accrochées aux fibres. Il y a peu de contacts intercellulaires. Néanmoins certains éléments des tissus conjonctifs sont différenciés (muscle, tendons).

- Les cellules des épithéliums doivent rentrer en contact avec la matrice extracellulaire du tissu conjonctif sous-jacent grâce à des mécanismes précis de jonction cellules-matrice.

Les jonctions cellulaires sont difficiles à étudier en microscopie optique. Par contre elles peuvent être visualisées par la microscopie électronique (technique standard ou cryofracture). Ces techniques ont montré que les régions d'adhésion des membranes plasmiques étaient des structures hautement spécialisées. On distingue trois types de jonctions intercellulaires :

- Les jonctions étanches qui assurent l'imperméabilité de la feuille épithéliale.
- Les jonctions adhérentes qui assurent la cohésion mécanique des cellules. Ce sont les ceintures adhérentes, les desmosomes ponctuels et les hémidesmosomes.
- Les jonctions communicantes qui assurent le passage de molécules d'une cellule à l'autre .
- De plus, les membranes cellulaires sont imbriquées en de multiples interdigitations.

1) Les jonctions étanches (ou jonctions occlusives ou serrées, ou tight junctions ou zonula occludens)

Les épithéliums servent de barrière très sélective entre milieux de composition différente (ex: air et peau, lumière digestive et sang, urine et sang).

Les cellules épithéliales sont polarisées : le pôle apical est tourné vers la lumière, le pôle latérobasal est tourné vers le compartiment sanguin. Les liquides et les substances sont "pompés" ou captés au niveau du pôle apical des cellules. Les jonctions intercellulaires doivent être étanches pour éviter l'absorption non contrôlée des substances de la lumière entre les cellules. Il ne faut pas non plus que les éléments circulants dans le compartiment sanguin puissent repasser vers la lumière.

La microscopie électronique montre que les jonctions étanches sont dues à l'accolement très serré des feuillet phospholipidiques extérieurs de la bicouche des cellules adjacentes. Les protéines permettant l'adhésion sont les occludines, parmi lesquelles ZO-1 (zonula occludens 1).

Les jonctions étanches sont organisées en un réseau anastomosé qui fait le tour de la cellule. Les jonctions étanches sont situées près du pôle apical des cellules. Elles séparent deux domaines membranaires distincts par leur composition en lipides et en protéines: les domaines apicaux et baso-latéraux. Les enzymes sont différentes entre les deux domaines (par exemple localisation exclusive de la Na/K ATPase dans le domaine baso-latéral de la cellule intestinale). Les phospholipides peuvent diffuser rapidement à l'intérieur de chaque domaine membranaire mais pas d'un domaine à l'autre.

Dans certains cas la perméabilité des jonctions étanches peut être régulée :

ex : les jonctions serrées de l'épithélium vésical peuvent laisser plus ou moins passer l'eau qui peut être réabsorbée de la vessie vers le sang.

Ex : les jonctions étanches de l'intestin peuvent laisser passer partiellement des acides aminés ou des monosaccharides: transport paracellulaire

Les jonctions étanches peuvent être rendues perméables par un chélateur du calcium et du magnésium (EDTA) ou par l'action d'enzyme protéolytique (trypsine). L'imperméabilité des jonctions est mesurée en chambre bi-compartmentée où passe un courant électrique. La résistance augmente si le feuillet épithélial est strictement imperméable.

2) Les jonctions adhérentes (ou jonctions d'ancrage ou zonula adherens ou anchoring junctions)

Ces jonctions existent sous plusieurs formes. Leur rôle est d'assurer la solidité et la cohésion du feuillet épithélial. Elles connectent aussi l'épithélium à la matrice extracellulaire sous-jacente.

Dans les épithéliums on peut mettre en évidence une **ceinture d'adhésion** située sous la zone des jonctions étanches. C'est une sorte de desmosome qui serait continu tout autour de la cellule; en fait la ceinture d'adhésion diffère d'un desmosome par sa composition biochimique : la ceinture est formée de faisceaux d'actine qui font le tour de la cellule ; une glycoprotéine d'adhésion intercellulaire (la E-

cadhérine) assure la cohésion entre les faisceaux d'actine de deux cellules adjacentes. La cohésion des zonula adherens est dépendante du calcium.

La contraction des faisceaux d'actine de la ceinture d'adhésion joue un rôle au cours de la morphogenèse de l'embryon (formation du tube neural).

La cohérence des cellules est renforcée par les interdigitations qui emboîtent les cytoplasmes les uns dans les autres.

* Les **desmosomes** :

Ce sont des points de contact entre les cellules (rôle de rivets ou de "boutons-pression"). Ils sont abondants dans les tissus soumis à des contraintes mécaniques (épithéliums, en particulier la peau). Les desmosomes servent de point d'ancrage pour les filaments intermédiaires (kératine dans les épithéliums, desmine dans la coe, vimentine dans le tissu nerveux). Les faisceaux de filaments se correspondent d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire des desmosomes ; ceci forme des travées transcellulaires qui rigidifient l'épithélium selon des lignes de tension.

En microscopie électronique, les desmosomes sont constitués d'une plaque dense sous-membranaire (la desmoplakine) et de matériel intercellulaire protéique filamenteux (la desmoglérine, en fait des cadhérines). Les filaments intermédiaires viennent s'insérer de façon latérale dans la plaque dense.

Dans la maladie de peau nommée pemphigus, on observe un décollement de l'épiderme et la formation de bulles cutanées ; cette maladie est due à des autoanticorps dirigés contre les glycoprotéines filamenteuses des desmosomes.

* Les **hémi-desmosomes** ont la même fonction que les desmosomes mais ils sont différents sur le plan chimique. A la différence des desmosomes où les faisceaux de kératine s'attachent de façon latérale à la plaque dense, les faisceaux de kératine s'attachent de façon terminale dans les hémi-desmosomes. Les hémi-desmosomes sont situés au pôle basal de la cellule et servent de point d'ancrage sur la lame basale du tissu conjonctif (treillis de fibres de collagène IV et de laminine). Les molécules d'attachement sont des intégrines ($\alpha 6 \beta 4$).

3) Les jonctions communicantes (ou jonctions ouvertes ; gap junctions en anglais)

* Ces jonctions permettent aux petites molécules hydrophiles de passer directement d'une cellule à l'autre. Ces jonctions assurent le couplage métabolique et électrique des cellules.

L'existence de ce type de jonction a été mise en évidence par des expériences électrophysiologiques ou par injection de traceurs fluorescents. Les jonctions gap assurent un couplage électrique rapide entre les cellules adjacentes.

Les molécules doivent avoir un poids moléculaire < 1500 daltons pour passer au travers des jonctions gap. Le diamètre des jonctions est donc au maximum égal à 1,5 nm. Les molécules passant au niveau des gap sont les ions, les oses, les acides aminés, les nucléotides.

Les macromolécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides) ne peuvent pas traverser les jonctions gap.

* En microscopie électronique de transmission, les gap sont des zones où les membranes de deux cellules sont très étroitement accolées.

En coupe sagittale (cryofracture), on observe des structures protéiques rondes, avec un canal dense au centre (structure de type pore). Il y a quelques centaines de pores par plaque. Chaque pore est constitué de deux structures protéiques (connexons), insérées dans la membrane plasmique; les connexions s'accrochent entre eux quand la jonction cellulaire s'établit. Chaque connexon est formé de 6 molécules de protéines identiques: la connexine.

* les jonctions gap permettent des **échanges métaboliques** entre cellules adjacentes

- exemple des mutants déficients en thymidine kinase. Cette enzyme catalyse la phosphorylation de la thymidine en thymidine triphosphate (qui sera utilisée pour la synthèse d'ADN). Les cellules mutantes, déficientes en thymidine kinase, meurent. Si les cellules mutantes sont cocultivées avec les cellules de phénotype sauvage (non mutées), elles peuvent survivre et incorporer de la thymidine. On en déduit que la thymidine triphosphate (à laquelle la membrane plasmique est normalement imperméable) est passée dans les cellules mutantes par des jonctions de type gap.

* Les jonctions gap jouent un rôle essentiel dans la **synchronisation des contractions cardiaques** en assurant le couplage ionique des cellules. Un flux de Ca^{++} passe d'une cellule cardiaque

à l'autre par les jonctions gap; ce type de transmission de l'influx est bien plus rapide qu'une transmission provoquée par une substance chimique (tel que celui de la jonction neuromusculaire).

* Les jonctions gap permettent la **survie des cellules embryonnaires** avant que ne se développe la vascularisation. Les jonctions permettent également la diffusion de "molécules informatrices" qui sont des signaux de position pour les cellules; l'embryon se polarise selon le gradient de concentration de ces signaux de position; cette **polarisation** joue un rôle essentiel dans la différenciation ultérieure des tissus et organes. L'injection dans l'embryon d'anticorps anti-jonctions gap perturbe l'organisation embryonnaire.

23 XI 2006

*** La perméabilité des jonctions gap est régulée :**

- Grâce à l'injection de colorant fluorescent, on montre que l'ouverture des jonctions gap est régulée rapidement. Ainsi la baisse du pH cytosolique ou l'augmentation du Ca^{++} intracellulaire (caractéristiques des cellules souffrantes) ferment immédiatement les jonctions gap; ceci permet d'exclure immédiatement les cellules mortes et d'éviter la diffusion éventuelle d'une substance toxique d'une cellule à l'autre.

- Dans le foie le glycogène peut être dépolymérisé en glucose sous l'influence du glucagon. La fixation du glucagon sur un récepteur membranaire entraîne la formation d'AMP cyclique (AMPC) à partir de l'ATP. L'AMPC a deux impacts :

- il accélère le catabolisme du glycogène en activant l'enzyme responsable

- il active la phosphorylation des protéines des jonctions gap, ce qui augmente leur perméabilité à l'AMPC; ainsi la diffusion du messenger est facilitée : il y a amplification du signal hormonal du glucagon

4 - Coopération entre structures et molécules d'adhésion :

Les mécanismes jonctionnels sont les desmosomes, la ceinture d'adhésion, les jonctions étanches et les jonctions gap.

Les mécanismes non jonctionnels sont représentés par les molécules d'adhésion intercellulaires qui ne forment pas de structure définie individualisable en microscopie électronique.

Le rôle de ces deux mécanismes est différent ; les processus jonctionnels relativement fixes et solides sont prédominants dans les tissus adultes; les processus non jonctionnels, plus labiles, sont prédominants dans l'embryon ; ils permettent des contacts cellulaires transitoires et remodelables; ils peuvent initier l'adhésion cellule-cellule avant l'établissement des processus jonctionnels définitifs.

MATRICE EXTRACELLULAIRE **(mise à jour Décembre 2006)**

Dans un organe ou dans un tissu les cellules sont en relation les unes avec les autres et avec la matrice extracellulaire (MEC).

- Un épithélium est un tissu constitué de cellules jointives (épithélium de revêtement, épithélium glandulaire) unies par des protéines et structures de jonctions (cadhérines, desmosomes, jonction adhérentes...).

- Un tissu conjonctif est constitué de cellules relativement isolées dans une substance fondamentale et un réseau de fibres collagènes ou élastiques.

1 - Le fibroblaste

C'est la cellule qui élabore la substance fondamentale et les fibres. Il est fusiforme avec des prolongements cytoplasmiques (aspect fibroblastique) et un noyau unique central. Il est peu mobile et quiescent sauf s'il est activé (cicatrisation, inflammation, cancer, fibrose); il est alors capable de mitose et de déplacement (myofibroblastes contenant de l'actomyosine).

Le fibroblaste est soit indifférencié (tissu conjonctif simple), soit différencié en ostéoblaste, chondroblaste, adipocyte...

2- La substance fondamentale

C'est un gel amorphe très hydraté composé de protéoglycanes, de glycoprotéines et d'eau. La diffusion des molécules du métabolisme et la mobilité cellulaire (fibroblastes, polynucléaires, macrophages, lymphocytes) y sont faciles.

Les protéoglycanes résultent de la fixation covalente de glycosaminoglycanes (GAG) sur une chaîne protéique. Les GAG sont des polymères non ramifiés de disaccharides dont l'un des sucres est aminé. Certains sont sulfatés (chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, héparane sulfate), d'autres non (hyaluronane ou acide hyaluronique). De un à plusieurs milliers de GAG sont fixés sur une protéine; ces sucres adsorbent l'eau et permettent la formation d'un gel.

Les glycoprotéines assurent la cohérence de la matrice

- * la fibronectine est un dimère de grande taille formant un V. Elle comporte des sites de fixation pour le collagène et l'héparane sulfate. Les intégrines membranaires se fixent sur la fibronectine au niveau de séquences RGDS (Arg-Gly-Asp- Ser).

- * la tenascine, la laminine, l'agrane sont d'autres glycoprotéines qui interagissent avec les intégrines.

3 - Les fibres

Les fibres sont visibles en microscopie optique sous forme de trousseaux et de faisceaux qui parcourent le tissu conjonctif. Les fibres sont éparées ou orientées dans les ligaments, les tendons et les aponévroses.

- * les collagènes sont très abondants (25 % des protéines de l'organisme). L'unité élémentaire est un trimère de chaînes α , rigides et linéaires, enroulées en super-hélice ; ces trimères (procollagène) s'associent en molécules de collagène qui elles mêmes forment des fibrilles. Le décalage régulier des molécules de collagène donne un aspect de striation périodique (60 nm) en microscopie électronique. Les fibrilles s'associent enfin en fibres de collagène. Le fibroblaste synthétise du procollagène dont une partie est clivée par une collagénase dans la matrice avant l'association en fibrilles.

Douze familles de collagènes sont connues. Le collagène de type I (collagène fibrillaire) est le plus abondant (derme, os, tendons...). Des mutations du collagène I sont responsables de l'ostéogénèse imparfaite (maladie des os de verre). Le collagène IV (collagène plan) forme l'armature des lames basales des épithélia. La vitamine C est le coenzyme d'enzymes qui hydroxylent les résidus lysyl et prolyl (synthèse de la lysine et de la proline très abondantes dans le collagène); les radicaux OH participent à la formation de la triple hélice; un déficit en vitamine C (scorbut) fragilise les ligaments dont le ligament alvéolo-dentaire (perte des dents) et provoque des hémorragies (diminution de l'adventice, tissu collagène péri-vasculaire).

* les fibres élastiques sont abondantes dans les tissus élastiques (peau, poumon, artères). Elles sont visibles en microscopie optique après coloration à l'orcéine sous forme d'un réseau plus fin que celui des collagènes. L'élastine est une protéine non glycosylée; les molécules d'élastine sont reliées entre elles en un réseau anastomosé et aux faisceaux collagènes par des molécules de liaison (fibrilline, anormale dans le syndrome de Marfan)

4 - Différents aspects des tissus conjonctifs

Les cellules et la matrice subissent une différenciation locale :

** Lamelle basale*

Les cellules épithéliales reposent sur une lame basale faite d'un réseau de fibres densifié. Elles sont unies à ces fibres par les intégrines et par les hémidesmosomes. On trouve aussi une lame basale autour des fibres musculaires et le long des fibres nerveuses.

Les lames basales ont un rôle de soutien, de barrière (le franchissement de la lame basale par les cellules cancéreuses montre qu'un cancer in situ devient invasif) et de filtre (la lame basale des podocytes des glomérules rénaux est épaisse de 400 nm; son atteinte entraîne une fuite de l'albumine plasmatique: syndrome néphrotique). Elles induisent la polarité et la différenciation des cellules épithéliales.

La lame basale est principalement constituée de collagène IV, de laminine, de fibronectine, de nidogène et d'héparane sulfate. Le collagène IV possède une structure en triple hélice qui s'associe par ses extrémités aux molécules de collagène IV adjacentes. Il se forme un treillis moléculaire plan. La lame basale est reliée au tissu conjonctif sous-jacent par du collagène VII. La laminine est une protéine cruciforme qui unit certaines intégrines, le collagène IV et les protéoglycanes ; la laminine est d'origine épithéliale. La fibronectine est aussi d'origine épithéliale; elle unit d'autres intégrines au collagène IV. Le nidogène est une protéine qui renforce la liaison de la laminine, du collagène IV et de l'héparane sulfate.

** Matrices spécialisées*

Les ostéoblastes synthétisent une matrice protéique (ostéocalcine) sur laquelle viennent se déposer des phosphates de calcium (hydroxyapatites).

La matrice des cartilages est sécrétée par les chondroblastes. Elle est riche en protéoglycanes sulfatés (chondroïtine sulfate) qui en s'hydratant forment une structure souple mais très résistante à la pression.

** Pathologie*

La synthèse anormale de collagène dans les tissus est responsable d'une fibrose. La fibrose succède souvent à une inflammation ou à une destruction tissulaire. C'est un processus cicatriciel (cirrhose du foie, fibrose pulmonaire, fibrose articulaire....).

CYTOSQUELETTE **(B Chauffert, chapitre actualisé janvier 2006)** **(voir fichier figures joint)**

Les cellules se déforment passivement ou activement (muscle), se déplacent (spermatozoïdes, macrophages), résistent à des contraintes de pression (cartilage, os) ou de tension (peau, tendon) ou émettent des expansions plus ou moins mobiles (pseudopodes, villosités, cils et flagelles). Ces propriétés mécaniques sont liées à des adaptations du cytosquelette, un système de microfibrilles protéiques, qui existe dans toutes les cellules.

Le cytosquelette est un réseau interne très dense formé de :

- microfilaments d'actine d'un diamètre de 5 à 8 nm
- filaments intermédiaires, notamment les kératines, de 8-10 nm
- microtubules de tubuline : 24 nm

Les filaments et tubules résultent de la polymérisation dans le cytosol de monomères de forme globulaire (actine, tubuline) ou allongée (kératines). Le cytosquelette est en perpétuel remaniement avec des phases successives de polymérisation et de dépolymérisation contribuant à la déformabilité de la cellule.

1- les microfilaments d'actine :

* C'est une protéine abondante (de 2 à 5 % de la masse protéique cellulaire dans la plupart des cellules, 10 % dans les cellules musculaires), qui se répartit dans tout le cytosol en formant un réseau très dense. Elle est facilement marquée par de la phalloïdine couplée à de la fluorescéine. Elle est codée par 6 gènes chez l'homme, de séquence très conservée au travers des espèces.

* Les monomères d'actine globulaire (actine G) sont associés à l'ATP ou à l'ADP et au Mg^{++} qui se logent au sein d'une crevasse centrale. Les polymères d'actine fibrillaire (actine F) forment une double hélice torsadée. La polymérisation d'actine G en actine F est influencée par l'ATP, par la concentration en Mg^{++} et par la force ionique du milieu. La cytochalasine est un poison qui empêche la polymérisation de l'actine; la phalloïdine empêche la dépolymérisation de l'actine. Le microfilament d'actine est polarisé et croît par une seule extrémité. L'hydrolyse de l'ATP en ADP favorise la dépolymérisation.

* Les fibrilles d'actine s'arrangent parallèlement pour former des faisceaux ou se rejoignent par des contacts à angle large ou droit (réseau). Des protéines de pontage lient les structures d'actine :

- la fascine crée les faisceaux
- la filamine réticule les faisceaux
- la spectrine du réseau cortical lie l'actine à l'ankyrine et à la bande III de la membrane plasmique

- la villine et la fimbrine lient les faisceaux d'actine dans les microvillosités des bordures en brosse des épithéliums d'absorption (intestin, tubule rénal).

- la dystrophine, une protéine de la famille des spectrines, lie l'actine à un complexe glycoprotéique de la membrane plasmique du muscle, lui-même lié à des protéines de la matrice extracellulaire (laminine, agrine). Son absence secondaire à une mutation du gène provoque la maladie de Duchenne (une myopathie progressive).

- la profiline favorise la polymérisation de l'actine en facilitant l'échange de l'ADP par de l'ATP. Le complexe profiline-actine est abondant dans le front de migration du fibroblaste en migration (ruffle)

- la gelsoline, au contraire, fragmente les filaments d'actine et favorise la transition gel --> sol, d'où une fluidification locale du cytosol permettant la déformation et la mobilité cellulaire.

- les myosines se déplacent le long des filaments d'actine en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (fonction ATPasique de la myosine favorisée par l'actine). Ce déplacement nécessite du calcium. La myosine I (une tête globulaire) est le moteur des mouvements du cytosol (pseudopodes, endocytose ou exocytose); la tête s'attache à l'actine; la queue à la membrane plasmique ou à celle des vésicules. La myosine II (2 têtes globulaires) est responsable de la contraction musculaire (*cf cours de physiologie*); les têtes réagissent avec l'actine; les queues forment les filaments épais des cellules musculaires striées.

* L'actine liée aux myosines (I, II) joue de multiples rôles :

- L'actine constitue les fibres de stress des fibroblastes qui s'orientent selon les contraintes imposées à la cellule. Les faisceaux d'actine et de myosine (actomyosine) sont reliés aux points de

contact focaux (ou plaques d'adhérence) qui les arriment à la membrane plasmique et par delà aux protéines de la membrane extracellulaire. Des protéines adaptatrices (α -actinine, vinculine...) assurent l'arrimage de l'actomyosine aux parties intracytoplasmiques des cadhérines et des intégrines. La polymérisation de l'actine et la formation des plaques d'adhérence sont régulées par des petites protéines G (Ras, Rac, Rho), elles mêmes activées par des signaux de transduction impliquant la PKC (protein kinase C):

Ex: les macrophages sont attirés par la N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine, un tripeptide d'origine bactérienne (chimiotactisme). Cette substance se lie à un récepteur membranaire, active une protéine G avec pour résultante des mouvements orientés de l'actomyosine et la formation de points de contact avec le support dans le sens du gradient chimique. Le gradient de calcium intracellulaire oriente aussi le sens de déplacement de la cellule.

- Un faisceau continu d'actine ceinture les cellules épithéliales polarisées au niveau des jonctions adhérentes.

- L'actomyosine sous corticale renforce la rigidité de la membrane plasmique et modifie la répartition des protéines intramembranaires (impossibilité du patching provoqué par un anticorps si la myosine II est inhibée ou absente).

- Un anneau d'actine réagissant avec la myosine I provoque la cytodierèse (ou cytokynèse) c'est à dire la séparation des cytoplasmes de deux cellules en fin de mitose.

2- les filaments intermédiaires (FI) :

Ils sont particulièrement abondants (x 10 fois l'actine) dans certaines cellules spécialisées (cellules épidermiques, axones). La disposition de leur réseau est proche de celle des microtubules et différente de l'actine.

Ils représentent des polymères protéiques plus stables que l'actine ou la tubuline; ils jouent surtout un rôle structurel (phanères) et ne participent pas à la motilité cellulaire.

Ils proviennent de la polymérisation de protomères associant une hélice centrale encadrée de domaines N et C-terminaux globulaires. Cette polymérisation ne requiert pas d'ATP. Les protomères s'associent en un dimère de deux hélices torsadées. Les dimères s'associent eux mêmes avec un décalage pour former des tétramères qui se mettent bout à bout en formant un protofilament. Enfin les protofilaments se rassemblent en un filament intermédiaire dont la section est composée de 32 protomères (structure en câble).

Les FI varient par leur structure primaire à la différence des isoformes très conservées de tubuline et d'actine; ce sont les extrémités N et C qui diffèrent alors que la structure hélicoïdale qui forme un bâtonnet de 40 nm est très conservée :

- * les kératines : Il y en a une trentaine de types dont les cytokératines des épithélia de revêtement. Le typage de la cytokératine prédominante par des anticorps spécifiques permet de reconnaître le tissu d'origine d'une métastase (ex la cytokératine 20 est caractéristique d'une origine gastro-intestinale). Les kératines forment un réseau flexible mais résistant qui soutient la forme cellulaire et s'ancrent dans les desmosomes et hémidesmosomes. Les faisceaux de kératine sont en continuité par l'intermédiaire des desmosomes ce qui permet la résistance aux forces de traction. La mutation d'une cytokératine est à l'origine d'une maladie génétique: l'épidermolyse bulleuse.

- * la vimentine : elle est caractéristique des cellules issues du mésoderme (fibroblastes, cellules pseudo-épithéliales des séreuses). Les anatomopathologistes utilisent des anticorps antivimentine pour prouver qu'une tumeur est d'origine conjonctive (sarcome)

- * la desmine : elle relie les filaments contractiles entre eux et à la membrane dans les cellules musculaires assurant la coordination et la transmission du mouvement.

- * la GFAP (glial fibrillary acidic protein) : ce sont les FI des cellules gliales.

- * les neurofilaments : participent avec les microtubules à la constitution du squelette des prolongements neuronaux (axones et dendrites).

- * les lamines (A, B, C) : sont représentées dans toutes les cellules. Ce sont les FI qui compose la lamina, un réseau qui soutient l'enveloppe nucléaire. La lamine B est fixée à la bicouche phospholipidique par un résidu isoprényle. Au moment de la mitose, les lamines sont phosphorylées par le MPF (mitotic promoting factor - cf cours du Pr Teyssier). Le réseau de lamines est déstructuré; les lamines sont dépolymérisées et l'enveloppe nucléaire est fragmentée en vésicules. Le réseau de lamine se reconstitue en fin de mitose.

La spécificité tissulaire des FI (sauf les lamines) est utilisée en anatomie pathologique pour déterminer l'histogenèse des tumeurs.

3 - les microtubules

Un microtubule est un ensemble de protomères de tubuline α et β arrangés en un tube creux de 24 nm de diamètre et long d'une fraction de μm à quelques μm . La structure tubulaire assure une grande rigidité. La section du tubule comporte de 10 (tubules en paire ou en triplet) à 13 (tubule isolé) monomères. La structure tubulaire peut être stable (cils) ou transitoire (cytoplasme, fuseau mitotique).

Dans la cellule interphasique, les microtubules convergent au niveau du centre organisateur ou centrosome, situé près du noyau et de l'appareil de Golgi. Dans les cellules animales, le centre organisateur comprend deux centrioles perpendiculaires. Chaque centriole est constitué de 9 triplets de microtubules et d'un anneau de gamma tubuline. Les tubules centriolaires restent toujours polymérisés même en présence de colchicine et au cours de la mitose. Les microtubules sont polarisés, avec une croissance qui s'effectue en s'éloignant du centrosome.

Dans les hétérodimères ab, il y a deux sites de liaison aux nucléotides: le site a fixe du GTP qui n'est pas échangeable; au niveau de l'unité b, le site peut fixer du GTP ou du GDP. Le GTP favorise la polymérisation des dimères ab. L'hydrolyse du GTP en GDP favorise la dépolymérisation. Polymérisation et dépolymérisation sont en équilibre instable avec des phases de croissance ou de résorption des microtubules selon la prédominance de l'une ou l'autre.

Des protéines sont associées aux microtubules (MAP: microtubule associated protein). Certaines MAP stabilisent le réseau microtubulaire et relient les microtubules entre eux (MAP 2 des corps neuronaux et des dendrites, protéine tau des axones). D'autres MAP (kinésines, dynéines) assurent les mouvements des organites et des vésicules le long des microtubules; ces MAP ont une activité ATPasique, elles se fixent par une extrémité au microtubule et par l'autre à l'élément à transporter. Les kinésines assurent un mouvement vers l'extrémité +, les dynéines vers l'extrémité -.

Le réseau microtubulaire est indispensable au rassemblement des vésicules membranaires du réticulum et du Golgi qui perdent leur forme et leurs fonctions en présence de nocodazole, un poison des microtubules.

- Fuseau mitotique

Les centrioles se dupliquent avant le début de la phase S du cycle cellulaire. Pendant la prophase chaque centrosome se place à un pôle de la cellule pour servir d'origine de nucléation au fuseau mitotique. Certains microtubules (kinétochoriens) s'arriment au centromère des chromosomes par le kinétochore, d'autres (polaires) forment le cadre où se meuvent les chromosomes, d'autres (astraux) insèrent le centrosome dans le cytosol des deux nouvelles cellules. C'est le fuseau mitotique qui capture les chromosomes, les arrange sur la plaque équatoriale métaphasique et les sépare ensuite en deux jeux égaux. Les mouvements du chromosome résultent de moteurs protéiques (plusieurs KRP : kinesine related protein) et sur la dynamique des tubules (polymérisation et dépolymérisation). Des KRP siègent au niveau des kinétochores ; d'autres assurent le glissement des tubules l'un par rapport à l'autre. La dynéine insère les microtubules astraux à la membrane plasmique et contribue ainsi au rapatriement des chromosomes.

La colchicine (antigoutteux) et la vinblastine (anticancéreux) se lient à la tubuline libre et empêche sa polymérisation. Au contraire, le taxol (anticancéreux extrait de l'if) empêche la dépolymérisation du réseau microtubulaire. En perturbant la déstructuration du réseau microtubulaire interphasique et en gênant la formation du fuseau mitotique, ces agents bloquent la mitose en métaphase.

- Flux axonal :

L'axone d'un neurone périphérique peut mesurer près d'un mètre (nerf sciatique). Le corps neuronal où sont confinés les ribosomes, le réticulum et le Golgi synthétise des matériaux (protéines, membranes) qui doivent être acheminés vers les terminaisons nerveuses par un transport ou flux axonal. Le transport se fait sous forme de vésicules membranaires rapides (250 mm/jour) ou d'organites entiers (mitochondries). Ces déplacements sont guidés par les microtubules et se produisent dans les sens centrifuge et centripète; c'est la kinésine qui est le moteur moléculaire du flux; cette protéine se fixe par ses deux têtes globulaires à la tubuline et par sa queue à la vésicule transportée; la liaison réversible de la kinésine et de la tubuline nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Dans l'extrémité terminale, c'est la réaction myosine-actine qui prend le relais pour le transport vésiculaire.

La perturbation de la polymérisation de tubuline par des poisons du fuseau (vinblastine, taxol ...) compromet la viabilité de l'axone et provoque une neuropathie périphérique.

- *Cils et flagelles*

Ces structures sont responsables d'un mouvement visible en microscopie optique déplaçant la cellule par rapport au milieu (flagelle des spermatozoïdes) ou le milieu par rapport à la cellule (cils de la muqueuse trachéo-bronchique ou de la trompe de Fallope).

Le mouvement des flagelles est lié à une ondulation quasi sinusoïdale. Celui des cils est orienté par l'alternance d'un battement de poussée et d'un battement de récupération.

Cils et flagelles comportent un faisceau central de microtubules, l'axonème. L'axonème est constitué de 9 doublets externes (un tubule complet de 13 tubulines + un tubule incomplet de 9) entourant une paire centrale de tubules complets. Chaque doublet est relié à son voisin par un bras de nexine (protéine d'amarrage) et par deux bras de dynéine ciliaire (protéine motrice) qui assure le glissement des microtubules les uns par rapport aux autres. Ce glissement exige de l'ATP. Des protéines radiaires relient les microtubules périphériques à la paire centrale, elle-même rigidifiée par des protéines de liaison. La paire centrale assure la solidité de la structure et l'orientation du mouvement.

Cils et flagelles sont insérés dans le cellule au niveau des corpuscules basaux dont la structure est faite de 9 triplets sans axe central. Deux des microtubules du triplet se prolongent dans les doublets du cil ou du flagelle. Les corpuscules basaux se formeraient à partir des centrioles dont la structure est très semblable et s'insèrent dans le cytosquelette sous-cortical; cils et flagelles naissent ou régénèrent à partir des corpuscules basaux.

ENERGETIQUE CELLULAIRE

(non révisé; ce cours sera assuré par le Pr Teyssier)

L'énergie de la cellule est fournie par un apport extérieur ou provient de réserves intracellulaires (glycogène, vacuoles lipidiques). L'énergie consommée par les êtres vivants est d'origine solaire à l'exception des bactéries chimiotrophes des fosses sous marines qui oxydent le soufre.

L'ATP est la molécule clé du métabolisme énergétique : (petite monnaie du métabolisme)

ATP $\rightarrow$ ADP + Pi + Energie (7,3 Kcal/M).

ATP $\rightarrow$ AMP + P-P (pyrophosphate) + Energie (7,3 Kcal/M)

* L'ATP - fournit l'énergie chimique du mouvement (cils; flagelles, muscles) ou des transporteurs membranaires (ex : Na/K ATPase)

- active des molécules au cours des réactions métaboliques:

ATP+UMP (uridine monophosphate) $\rightarrow$ ADP + UDP

ATP + UDP $\rightarrow$ ADP + UTP ; l'uridine triphosphate est un précurseur de l'ARN

ATP + glucose $\rightarrow$ ADP + glucose-6 -P (le glucose 6P est la première étape nécessaire de la glycolyse)

ATP + acide aminé $\rightarrow$ ADP + AA-P activé ; l'AA activé peut s'ajouter à une chaîne protéique en cours de synthèse

- régule l'activité des protéines enzymatiques en les phosphorylant:

ATP + Prot $\rightarrow$ ADP + PROT-P

- Production de l'ATP par chimiotrophie

Les plantes, les algues et certaines bactéries sont phototrophes; elles produisent l'ATP en utilisant l'énergie solaire par le processus de la photosynthèse. Elles accumulent l'énergie sous forme de molécules de réserve (glucose puis amidon et cellulose); elles assurent aussi la synthèse des acides aminés, des nucléotides et des acides gras. Les autres cellules vivantes (protozoaires, champignons, cellules animales, autres bactéries) sont chimiotrophes; elles utilisent l'énergie chimique accumulée par les cellules phototrophes en catabolisant les sucres et les graisses.

La cellule chimiotrophe dégrade les sucres (glucose, fructose) par une série d'étapes successives qui sont couplées à la synthèse de l'ATP:

$C_6H_{12}O_6$ (glucose) + 32 ADP + 32 Pi (H_2PO_4) + 6 O_2 $\rightarrow$ 6 CO_2 + 6 H_2O + 32 ATP

La dégradation du glucose est scindée en 2 phases :

* une phase anaérobie cytosolique : la glycolyse anaérobie

* une phase aérobie mitochondriale : la respiration cellulaire

1 - Etapes Cytosoliques

La glycolyse anaérobie (voie d'Embden-Meyerhoff) se déroule en 10 étapes chimiques successives dans le cytosol où sont localisées les enzymes nécessaires:

1 glucose ($C_6H_{12}O_6$) + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD^+ $\rightarrow$ 2 Pyruvates ($C_3H_4O_3$) + 2 ATP + 2 NADH + 2 H^+

Le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) est un transporteur d'électron. La forme oxydée (NAD^+) est un accepteur de proton et d'électron pour aboutir à la forme réduite:

$2 H^+ + 4 e^- + 2 NAD^+ \rightarrow 2 NADH_2$

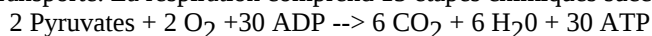
Certains eucaryotes (levures) sont capables de vivre en aérobiose ou en anaérobiose. En l'absence d'oxygène, elle dégrade le pyruvate en éthanol et en CO_2 .

Le muscle squelettique peut travailler en anaérobiose relative lors d'un effort prolongé. Le métabolisme du pyruvate est dévié vers la formation d'acide lactique. Ce composé est responsable d'une acidose cellulaire (crampes). Rejeté dans la circulation; il est réoxydé en pyruvate et dégradé en CO_2 par la respiration cellulaire au niveau du foie et du coeur.

2 - Mitochondries

Les mitochondries ont été visualisées par la microscopie optique dès la fin du XIX siècle. Elles sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception de certains parasites unicellulaires (trichomonas). Leur rôle a été mis en évidence au cours des années 40: du foie a été broyé et la fraction mitochondriale a été récupérée par centrifugation; seule cette fraction cellulaire est capable de consommer de l'O₂ et de rejeter du CO₂ ---> les mitochondries assurent la respiration cellulaire et fournissent l'énergie en produisant plus de 95 % de l'ATP.

La dégradation oxydative du glucose (respiration) s'achève dans la mitochondrie où le pyruvate a été transporté. La respiration comprend 15 étapes chimiques successives dont le bilan global est :



- *Aspect en microscopie optique:*

Elles ont la forme de bâtonnets ou d'ellipses mesurant 2 X 1 µ. Leur abondance est variable:

- * les globules rouges mûres n'en possèdent pas ; l'apport énergétique est fourni uniquement par la glycolyse anaérobie

- * le foie est riche en mitochondries (environ 1000 par cellule; 20 % du volume cytosolique); les muscles sont encore plus riches, en particulier le cœur ou les muscles alaires des insectes. On peut dénombrer jusqu'à 500 000 mitochondries chez l'amibe où elles sont situées près de la zone d'ingestion des nutriments.

- * dans la levure cultivée en condition anaérobie, il y a peu de mitochondries; elles prennent une forme de vésicule avec très peu de crêtes au niveau de leur membrane interne. Si on apporte de l'O₂, le nombre de mitochondries augmente et la membrane interne présente de nombreuses crêtes.

- * Les mitochondries changent de forme et de place en permanence; elles peuvent se scinder ou fusionner; elles sont associées au cytosquelette (surtout la tubuline) qui assure leur déplacement intracellulaire.

- * Les mitochondries sont abondantes près des zones où l'énergie est consommée: myofibrilles des muscles, base des flagelles dans le spermatozoïde ou base des cils chez la paramécie.

- *Aspect en microscopie électronique et composition :*

La mitochondrie est un compartiment subcellulaire clos, isolé du cytosol par sa membrane externe.

- * La membrane externe est une bicouche lipidique correspondant au modèle général des membranes biologiques. Elle est composée de 50% de protéines et de 50% de lipides. Elle contient de nombreuses copies de porine; cette protéine forme des canaux hydrophiles qui permettent le passage de molécules ayant un PM < 10 000 d. Il existe des protéines de reconnaissance pour des séquences signal de protéines d'origine cytosolique qui seront importées aux niveaux de complexes d'importation (zones d'accolement entre membrane externe et membrane interne) permettant l'entrée dans la matrice de protéine de PM > 10 000.

- * l'espace intermembranaire est étroit (100 Å); sa composition chimique est proche de celle du cytosol. Il contient beaucoup d'ion H⁺ dont le gradient est élevé par rapport à la matrice.

- * la membrane interne est caractéristique de la mitochondrie. C'est aussi une bicouche phospholipidique mais elle contient plus de protéines (80%) que de lipides (20%). Elle est repliée en de multiples crêtes qui augmentent sa surface. On peut visualiser en ME des complexes sphériques de 90 Å situés à la face interne de la membrane interne; ces complexes contiennent des enzymes de la respiration cellulaire. Dans la membrane interne, on trouve une ATP synthétase et des protéines de transport. La membrane interne est peu perméable aux ions; un lipide à 4 acides gras, particulier à la membrane interne (le cardiolipide), contribue à la faible perméabilité aux ions de la membrane interne et facilite le maintien des gradients électro-chimiques (ex : gradient de protons).

- * la matrice : c'est le compartiment interne de la mitochondrie ; elle contient des centaines d'enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à l'oxydation des acides gras. La matrice contient également de l'ADN mitochondrial d'une longueur de 16 kilobases, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA des rRNA et des enzymes nécessaires pour l'expression du DNA.

L'ADN mitochondrial est circulaire, ne possède pas d'introns ni d'histones. Ses 16 569 bases ont été séquencées. Chaque mitochondrie possède 5 à 10 copies d'ADN qui codent pour 13 enzymes de la matrice (cytochrome b, NADH-déshydrogénase, ATP-synthase, cytochrome-oxydase entre autres). Les autres protéines mitochondriales (environ 500) sont codées par l'ADN génomique et importées. L'ADN mitochondrial code pour 2 ARNr et 22 ARNt.

Le code génétique de la mitochondrie est un peu différent du code génétique universel (ex : UGA -> tryptophane dans la mitochondrie, codon stop dans le code universel; AGA -> codon stop dans la mitochondrie, -> arginine dans le code universel). La différence entre ADN mitochondrial et ADN génomique est expliquée par la théorie endosymbiotique : la mitochondrie serait une cellule procaryote capturée par les cellules eucaryotes primitives.

Les mitochondries se reproduisent par fission; toutes les mitochondries d'un organisme proviennent de l'ovule : l'hérédité mitochondriale est matrilineaire ; le patrimoine génétique mitochondrial n'est pas remanié à chaque génération. L'analyse de la fréquence de mutations de l'ADN mitochondrial est très utile en génétique des populations: localisation d'Eve en Afrique Orientale, proximité génétique des amérindiens et des mongoles.

- Fonctionnement Mitochondrial

Dans la mitochondrie, le pyruvate entre dans l'espace intermembranaire par une porine. Il est importé dans la matrice par un symport pyruvate/proton dépendant du gradient d'ions H⁺. Le pyruvate est capté dans la matrice par un complexe enzymatique macromoléculaire qui a approximativement la taille d'un ribosome; ce complexe contient des copies multiples de 3 enzymes, de 5 coenzymes et de 2 enzymes de régulation; l'enzyme principal est la pyruvate deshydrogénase qui convertit le pyruvate en acétylCoA:



La dégradation des lipides fournit aussi une part substantielle du métabolisme énergétique. Les réserves lipidiques sont essentiellement sous la forme de triglycérides (une molécule de glycérol associée à 3 molécules d'acide gras) qui forment des gouttelettes dans le cytosol. Dans le muscle cardiaque, on visualise des triglycérides entourant les mitochondries, elles même situées près des myofibrilles.

Les triglycérides sont hydrolysés; les acides gras sont acheminés par des transporteurs (symports acides gras/proton) vers la matrice mitochondriale. Les acides gras vont entrer dans le cycle d'oxydation des acides gras; 2 carbones seront dégradés à chaque cycle en produisant une molécule d'acétylCoA, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH (hélice de Lynen).

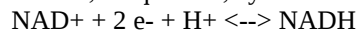
L'acétylCoA est la voie finale commune du catabolisme des glucides et des acides gras. Il va être "brûlé" dans le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs).

Pour chaque molécule d'acétylCoA entrant dans le cycle de Krebs, il se forme 2 CO₂, 1 ATP et surtout 4 paires d'électrons de haute énergie qui seront transférés sur les coenzymes (3 NADH et 1 FAD-H₂).

Rappel : Un oxydant est un accepteur d'électron; un réducteur est au contraire un donneur d'électron.

NAD⁺, ubiquinol, cytochrome c (Fe⁺⁺⁺), 1/2 O₂ + 2 H⁺, sont des oxydants.

NADH, ubiquinone, cytochrome c (Fe⁺⁺), H₂O sont des réducteurs.



La respiration cellulaire se poursuit au cours du processus de la phosphorylation oxydative

La dégradation d'une molécule de glucose a entraîné jusqu'ici la formation de 6 CO₂, de 10 NADH (2 au cours de la glycolyse, 2 au moment de la formation d'acétylCoA à partir du pyruvate et 6 au cours du cycle de Krebs), de 2 FADH₂ (cycle de Krebs) et de 4 ATP. Il y a eu accumulation d'énergie électrochimique sous la forme de 12 paires d'électrons captées par les coenzymes FAD et NAD. C'est le transfert par étape des électrons vers l'O₂, molécule finale acceptrice des électrons qui constitue la phosphorylation oxydative. Ce transfert est couplé à la synthèse de l'ATP (d'où le terme phosphorylation).

Les électrons vont passer successivement du NADH --> Ubiquinone/Ubiquinol (complexe I)--> Complexe Cytochrome b-c (complexe III) --> Cytochrome oxydase (complexe IV) --> 1/2 O₂ + 2 H⁺ --> H₂O .

Les cytochromes sont des protéines qui possèdent un atome de fer sous forme ferrique ou ferreuse: $\text{Fe}^{+++} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{++}$

- Le complexe I est la NADH deshydrogénase; il est composé de 20 chaînes polypeptidiques insérées dans la membrane interne (PM: 800 000). Il s'agit d'une protéine fer-soufre où les atomes de fer accepteurs des électrons sont liés à des atomes de soufre liés aux protéines. Il fait passer 4 H⁺ de la matrice dans l'espace intermembranaire.

- Le complexe II (succino-déshydrogénase) accepte et transfère à l'ubiquinone les électrons provenant de FADH₂. C'est aussi une protéine fer-soufre.

- Le complexe III (ubiquinol-cytochrome c réductase ou complexe bc₁) est constitué de 8 chaînes polypeptidiques insérées dans la membrane; il pompe 2 H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire; c'est aussi une protéine fer-soufre. Il comprend une sous-unité immobile (cytochrome b₁) et une navette (cytochrome c).

- Le complexe IV (cytochrome c oxydase) est constitué de 13 chaînes polypeptidiques. Il contient du fer et du cuivre. Il pompe 2 H⁺ vers l'espace intermembranaire.

$\text{NADH}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{Energie}$ pour pomper les protons dans l'espace intermembranaire. Il s'agit d'un couplage chimiosmotique.

Les complexes sont de gros assemblages polypeptidiques enchassés dans la membrane interne mitochondriale. L'ubiquinone et le cytochrome c sont des molécules plus petites et plus mobiles qui servent de navettes en transportant les électrons au niveau de la face interne de la membrane mitochondriale mais qui ne jouent pas de rôle dans la translocation des protons.

Outre le pompage des protons, la chaîne respiratoire permet d'amener les électrons de haute énergie des nucléotides NADH et FADH₂ à un niveau suffisamment bas pour permettre leur captation par l'oxygène.

L'ATP est synthétisée par l'ATP synthase grâce au gradient protonique

Le passage des électrons des coenzymes FAD-H₂ et NADH vers l'O₂ a permis la formation d'un gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice. Ces protons vont rentrer dans la matrice au niveau des granulations de 90 Å; ce passage de proton est couplé à la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase. Il faut 3 H⁺ pour fabriquer une molécule d'ATP. Il s'agit d'un couplage osmochimique. L'hypothèse d'un couplage chimio-osmotique et d'un couplage osmo-chimique nécessaires de façon simultanée pour la synthèse mitochondriale d'ATP constitue la théorie chimio-osmotique de Mitchell (prix Nobel de chimie en 1978).

L'ATP-synthase est un complexe protéique formé de deux sous-unités F₁ et F₀. La sous-unité F₁ est composée de 3 chaînes α, deux chaînes β et de chaînes γ, δ et ε. F₁ possède l'activité ATP-synthase. F₀ (chaînes αβγ) possède une fonction canal à protons.

On peut détruire le gradient protonique par le dinitrophénol; cette molécule est un ionophore à proton qui équilibre la concentration des H⁺ entre la matrice et l'espace intermembranaire; le dinitrophénol découple la phosphorylation oxydative: la synthèse d'ATP s'arrête tandis que le transfert d'électrons vers l'O₂ se poursuit; il y a alors formation de chaleur sans accumulation d'énergie chimique. On a mis en évidence chez les animaux qui hibernent une protéine de la membrane mitochondriale interne qui laisse passer les protons; cette protéine assure un découplage physiologique de la phosphorylation oxydative et permet la production de chaleur chez l'animal endormi à partir des réserves lipidiques (graisse brune).

L'ATP synthétisée s'accumule dans la matrice mitochondriale; elle va être échangée avec de l'ADP grâce à un transporteur membranaire de type antiport qui assure la diffusion facilitée des deux molécules en sens inverse l'une de l'autre. S'il n'y a pas hydrolyse de l'ATP dans le cytosol, il n'y a pas d'ATP disponible au niveau du transporteur et l'ATP nouvellement synthétisé reste dans la matrice mitochondriale (régulation autonome du système).

Le cyanure se fixe sur la cytochrome-oxydase et bloque le transfert d'électron entre la cytochrome oxydase et l'eau; la chaîne respiratoire s'arrête.

Les cytopathies (ou myopathies) mitochondriales sont dues à des mutations au niveau des complexes transporteurs d'électrons. Ces maladies se traduisent par une fatigabilité anormale à l'effort.

Le rendement énergétique de la cellule n'est pas total:

Le bilan énergétique de la dégradation d'une molécule de glucose par la glycolyse et la respiration cellulaire est 38 molécules d'ATP (2 au cours de la glycolyse, 2 au cours du cycle de Krebs et 34 au cours de la phosphorylation oxydative).

Si on faisait brûler une molécule de glucose en calorimètre, l'énergie obtenue correspondrait à celle d'une centaine de molécules d'ATP; le rendement énergétique de la cellule est donc de l'ordre de 38%. Ce rendement est à comparer à celui des meilleures machines thermiques fabriquées par l'homme dont le rendement maximal n'excède pas 10 %.

RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Chapitre révisé en février 2003

Les cellules eucaryotes possèdent un réticulum (réseau) endoplasmique fait de citernes et tubules réalisant des cavités étroites communicant entre elles. Le réticulum représente environ 50% de la totalité des membranes de la cellule. La lumière interne du réticulum occupe 10% du volume cellulaire. La membrane du réticulum est une bicouche lipidique de même structure que la membrane plasmique. Le réticulum est en continuité fonctionnel avec l'enveloppe nucléaire qui est une région différenciée du réticulum. Le réticulum permet à la cellule de séparer du cytosol certaines molécules néosynthétisées.

*1 - Structure du réticulum

Le réticulum n'est pas visible en microscopie optique ; par contre les vésicules sont bien individualisables en microscopie électronique. Le fractionnement cellulaire et la centrifugation préparatives sur gradient de saccharose permettent de séparer les microsomes de 2 fractions du réticulum :

- le réticulum lisse (REL) ; il forme des tubules anastomosés entre eux et avec le REG
- le réticulum granuleux (ou rugueux : REG) où sont attachés des ribosomes sur la face cytosolique; le REG forme des citernes aplaties, empilées en feuillets lorsqu'il est très abondant (plasmocytes).

*2 - Rôles du REL

- Le REL est le lieu de synthèse des membranes lipidiques de la cellule et assure le renouvellement des membranes de tous les organites. Les membranes sont exportées du REL vers les organites cibles par des vacuoles de transport. Les molécules de phospholipides et de cholestérol non hydrosolubles sont synthétisées en phase lipidique et se mettent en place directement dans la membrane du réticulum. Il n'y a pas de formation *ex nihilo* de nouvelles citernes mais par bourgeonnement continu à partir des membranes existantes: ex : la phosphatidyl-choline est synthétisée à partir de glycérolphosphate, de choline et d'acides gras provenant du cytosol; la synthèse est catalysée par des enzymes incluses dans la membrane même du réticulum; le site actif des enzymes fait face au cytosol. La biosynthèse des lipides est asymétrique et se fait dans la bicouche externe de la membrane; toutefois des enzymes de transfert (translocateurs ou flippases) facilitent un certain basculement des phospholipides (flip-flop) d'une couche à l'autre pour former la bicouche interne du réticulum. Les flippases favorisent plus le passage de la choline que celui de l'éthanolamine, de l'inositol ou de la sérine, d'où une asymétrie des phospholipides membranaires. L'asymétrie de composition lipidique et protéique des bicouches du RE se maintient dans les vacuoles de bourgeonnement et dans la membrane des organites cibles avec lesquels fusionnent les vacuoles. La bicouche externe du REL se retrouvera à la face interne de la membrane plasmique.

- Le REL est abondant dans les cellules qui sécrètent des substances lipidiques telles que les hormones stéroïdiennes (cellules de Leydig, cellules cortico-surréaliennes...). Le RE assure d'abord la synthèse du cholestérol à partir de l'acétyl-CoA. Le cortisol est le point de départ pour la synthèse de toutes les autres hormones stéroïdes (progestérone, cortisol, testostérone, oestradiol, aldostérone...) qui seront sécrétées dans le plasma, accrochées à des protéines porteuses (ex testostérone binding protein: TBP).

- Le REL est abondant dans les cellules qui assurent la détoxification de métabolites ou de médicaments. Quand on soumet un rat à un traitement par le phénobarbital (un barbiturique liposoluble), le poids du foie augmente du fait de l'hypertrophie du REL des hépatocytes. Le foie contient un système d'enzymes très oxydantes ancrées dans la membrane du REL, appelé cytochrome P 450. Ce complexe protéique est une hémoprotéine contenant du fer qui utilise l'O₂ et NADPH. Le cytochrome P450 détoxifie le phénobarbital et de nombreuses autres molécules hydrophobes (alcool) incluses dans la membrane de la face cytosolique du REL en leur ajoutant un radical OH ; ceci augmente leur solubilité et permet leur élimination biliaire. Ce système detoxificateur augmente jusqu'à 10 fois son niveau de base en présence de xénobiotiques (substances étrangères potentiellement toxiques) et permet l'élimination des substances hydrophobes qui autrement s'accumuleraient dans les membranes ou les vésicules lipidiques des animaux (médicaments, insecticides, hydrocarbures polycycliques). Après la fin de l'exposition au médicament, le foie reprend sa taille normale, une partie du REL est soumise à l'autophagocytose par les lysosomes. L'expression de cytochrome P 450 est inhibée.

- Le REL et le cytochrome P 450 peuvent activer des médicaments (cyclophosphamide) ou des substances cancérogènes comme le benzopyrène qui formeront des métabolites hydrosolubles et électrophiles allant se lier sur l'ADN. Les préparations microsomiales sont des outils intéressants pour étudier les capacités métaboliques du réticulum; des microsomes hépatiques sont commercialisés pour différentes études: activation ou dégradation de drogues ...

- Le REL est le principal site de stockage du calcium intracellulaire (Calcium Sequestering Compartment) -voir cours sur le calcium comme second messenger.

*** 3 - Rôle du REG**

Le REG est abondant dans les cellules qui sécrètent des protéines: cellules acineuses pancréatiques, plasmocytes. Les citernes dilatées contiennent les protéines nouvellement synthétisées. Une cellule contient 10^{10} molécules de protéines de 10^4 sortes. Ces protéines devront gagner les compartiments cellulaires où elles exerceront leurs fonctions.

* les protéines à destination cytosolique : les ribosomes libres du cytosol, attachés au cytosquelette, forment des polysomes lorsqu'ils sont reliés par un ARN messager. Ils vont synthétiser les protéines du cytosol (enzymes) et du cytosquelette cytosolique ou sous-membranaire. Les protéines cytosoliques sont accompagnées de protéines chaperons (chaperonines) qui assurent le repliement correct de la protéine en utilisant de l'ATP. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines de choc thermique (HSP) dont l'expression augmente en cas de choc thermique ou d'agression chimique pour restaurer les structures protéiques fonctionnelles ou pour assurer leur destruction.

* les protéines mitochondriales codées par le noyau et synthétisées dans le cytosol sont importées par un transport post-traductionnel grâce à une séquence signal spécifique.

* les protéines nucléaires (histones, lamine, mais aussi facteurs de transcription) passent par des pores nucléaires grâce à des signaux de reconnaissance spécifiques (NLS : nuclear signalization signal).

* les protéines sécrétées et les protéines intramembranaires passent par le REG. La synthèse débute dans le cytosol sur les polysomes qui seront arrimés sur le REG par des protéines d'attachement : les ribophorines. Il existe des zones du REG capables d'arrimer la grosse sous unité du ribosome (SRP: Signal Recognition Particules). Les protéines sécrétées sur la face cytosolique du REG doivent traverser la bicouche lipidique; ainsi les protéines nouvellement synthétisées sont elles immédiatement séparées du cytosol (à la différence des protéines synthétisées sur les polysomes libres dans le cytosol). Les protéines ont un cheminement différent selon qu'elles sont sécrétées ou qu'elles restent dans les membranes:

- protéines sécrétées (hormones peptidiques, enzymes intestinales et pancréatiques, protéines de la matrice extra-cellulaire, collagène, laminine...): les protéines se faufilent dans la bicouche lipidique dans un tunnel hydrophile avant d'acquies leur structure tertiaire. Une séquence signal située sur la partie amino-terminale de la protéine (lieu de début de la synthèse) se lie à une particule ribonucléoprotéique (Signal Recognition Particle) qui arrime le ribosome à la face cytosolique de la membrane du REG. Le ribosome est aussi arrimé par un récepteur de la grosse sous-unité. La connaissance des séquences signal a beaucoup évolué grâce au technique de biologie moléculaire qui permettent de préparer des protéines hybrides contenant une séquence signal d'adressage (longueur 16 à 30 AA hydrophobes) et une protéine marqueuse à activité enzymatique (luciférase, β -galactosidase). Le transport de la protéine a lieu en même temps que sa traduction: transfert co-traductionnel. Une fois dans la citerne, la protéine est prise en charge par une protéine chaperon de la famille des HSP (BIP: binding protein). La protéine prend sa conformation spatiale définitive, perd sa séquence signal qui est excisée par une enzyme spécifique et subit des modifications biochimiques post-traductionnelles (glycosylation, sulfatation...). Les protéines sont empaquetées dans des vacuoles pour transiter vers l'appareil de Golgi puis vers l'extérieur de la cellule par exocytose.

- protéines membranaires : la traversée de la membrane du REG n'est pas complète ; la traversée s'arrête quand la protéine possède une séquence d'acides aminés hydrophobes enchaînés en hélice alpha (séquence d'arrêt de translocation). Il peut y avoir plusieurs signaux de début et de fin de translocation pour les protéines qui passent plusieurs fois (souvent 7) la membrane. Ces protéines enchassées sont exportées vers la membrane plasmique ou les membranes topologiquement identiques;

ainsi l'intérieur du réticulum est topologiquement identique à l'extérieur de la cellule. Ces processus constituent le transport vectoriel qui dirige les protéines vers tous les organites intracellulaires.

* Dans le RE, s'effectuent les N-glycosilations (voir suite appareil de Golgi)

APPAREIL DE GOLGI

Chapitre révisé en février 2003

1- Structure de l'appareil de Golgi :

L'appareil réticulaire interne de Golgi (1898) est appelé dictyosome chez les plantes (fabrication de la cellulose et de la pectine) ; il est coloré par les sels d'argent. Il est situé près du noyau et près de la région du centrosome. Il est composé d'un empilement en pile d'assiettes de saccules (6 à 8 en général) limités par une membrane classique de type bicouche lipidique. Il y a en règle un seul Golgi par cellule sauf dans des cellules spécialisées comme la cellule à mucus du tube digestif. Il peut être périnucléaire ou dirigé vers un pôle de la cellule. L'appareil de Golgi est polarisé : on distingue une face *cis* tournée vers le réticulum endoplasmique, une région médiane et une face *trans* tournée vers la membrane plasmique, en continuité avec un réseau de vésicules trans-golgien. Entre le RE et le Golgi on décrit une région spécialisée, le CGN: cis Golgi Network. Entre le Golgi et la membrane, on décrit également le TGN: trans Golgi Network où s'accumulent des grains de sécrétion de protéines destinées à l'exportation.

Les saccules golgiens donnent naissance à des vésicules qui bourgeonnent à partir de leur bord ; les vésicules peuvent être très nombreuses et petites ou plus grosses (vacuoles) notamment dans les cellules sécrétantes.

2 - Fonctions de l'appareil de Golgi :

L'appareil de Golgi reçoit en permanence du matériel provenant du réticulum, il le modifie puis l'exporte vers la membrane ou les lysosomes dans un flux vectoriel permanent.

* activation de protéines : certaines protéines sont sécrétées par le réticulum sous forme inactive ; elles s'activent en perdant une séquence peptidique (rôle d'une endopeptidase et d'une carboxy-peptidase). ex: la préproinsuline donne la proinsuline par établissement de ponts SH (disulfure isomérase); la proinsuline donne ensuite de l'insuline en perdant le peptide C. Les protéines glycosylées sont largement modifiées au niveau de leur partie glucidique dans le Golgi.

* concentration des protéines : ex : concentration des proenzymes dans les cellules des acini pancréatiques (trypsinogène, chymotrypsinogène, proamylase, prolipase, DNase etc..) dans les vésicules de sécrétion ; ces vésicules sont stockées puis sécrétées lors d'une stimulation chimique ou nerveuse. Le marquage de la synthèse protéique par la leucine tritiée montre que ces protéines sont d'abord synthétisées dans le réticulum avant de gagner le Golgi et les granules de stockage (Palade; prix Nobel 1974). La concentration des protéines peut aboutir à leur cristallisation ou à leur précipitation dans les granules.

* sulfatation : cette réaction fait appel à des sulfo-transférases; elle permet la synthèse de glycoprotéines ou de protéoglycanes sulfatés fortement électro-négatifs (chondroïne-sulfate, dermatane-sulfate) qui constituent la substance fondamentale du cartilage et de l'os.

* glycosilation :

La glycosylation est la greffe d'un résidu polysaccharidique sur une protéine par des liaisons covalentes. Les protéines du cytosol ne sont pas glycosylées ; seules les protéines qui transitent par le réticulum et l'appareil de Golgi sont susceptibles d'être glycosylées. Seules les cellules eucaryotes assurent la glycosilation (problème de la traduction des protéines dans E Coli avec nécessité d'utiliser des levures ou des cellules d'insectes pour fabriquer des protéines recombinantes glycosilées).

On distingue deux types de glycosilation :

- la N-glycosilation qui s'effectue dans le RE sur une séquence d'AA spécifique Asparagine-X-Thréonine. Une N-acetylglucosamine est fixée par une liaison amide sur l'asparagine. La N-glycosilation est co-traductionnelle, débute dans le réticulum et se poursuit dans le Golgi.

- la O-glycosilation qui s'effectue uniquement dans le Golgi sur un groupement OH d'une sérine, d'une thréonine ou d'un hydroxyllysine. Elle est post-traductionnelle et s'effectue sur des protéines déjà repliées.

- *Rôles de la glycosylation des protéines :*

- * modification et stabilisation de la conformation spatiale des protéines les résidus glycosilés aident au repliement des protéines. Les résidus glucidiques sont toujours orientés vers l'extérieur de la

cellule qui est topologiquement identique à la lumière des vésicules du réticulum et du Golgi.

* augmentation de la résistance aux agressions physico-chimiques. Les glycoprotéines et protéoglycanes du film de mucus sont adsorbés sur les glycoprotéines insérées dans la membrane plasmique (glycocalyx ou cell coat). Ce film glucidique forme une protection très efficace contre l'agression acide, alcaline, osmotique, chimique ou enzymatique de la cellule. La destruction du mucus entraîne un ulcère (estomac, duodénum, intestin).

* augmentation de la solubilité. Certaines protéines fabriquées par génie génétique sont insolubles si le vecteur d'expression est une bactérie qui n'assure pas la glycosylation. Elles sont solubles sous forme glycosylée si le vecteur d'expression est un eucaryote (levure, cellules d'insecte).

* orientation des protéines : les parties glucidiques des glycoprotéines sont toujours situées sur la face externe de la membrane plasmique et jamais sur la face cytosolique.

* charge électrique : l'acide sialique est responsable de la charge électro-négative de surface cellulaire externe (permet par exemple la répulsion mutuelle des globules rouges).

* rôle dans la reconnaissance des messages extra-cellulaires ou intercellulaires. Les lectines sont des glycoprotéines d'origine végétale qui peuvent provoquer des réactions cellulaires en se liant aux sucres de glycoprotéines réceptrices membranaires : ex. la phytohémataglutine extraite d'un haricot entraîne une stimulation explosive de la prolifération des lymphocytes humains. L'enchaînement de sucres constitue le déterminant antigénique des groupes sanguins (ABO, rhésus...) et tissulaires (HLA). L'altération des sucres des glycoprotéines de surface des érythrocytes favorise leur destruction par le foie et la rate.

- Processus biochimiques de la glycosylation.

La N-glycosylation des protéines débute dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi .Ce cheminement des protéines glycosylées a été mis en évidence grâce à l'autoradiographie au mannose tritié. Dans le R.E., il y a d'abord synthèse du groupement polysaccharidique ; cette synthèse débute par l'activation d'une molécule lipidique de la membrane, le dolichol : dolichol + ATP $\rightarrow$ dolichol-P. Les sucres sont activés par un nucléotide diphosphate (ex UDP-glucose) dans le cytosol. La liaison du premier résidu glucidique au dolichol se fait par un pont pyrophosphate : dolichol-P + UDP-N-Acétyleglucosamine $\rightarrow$ dolichol-P-P-N-acétyleglucosamine + UMP. Un antibiotique, la tunicamycine, empêche la fixation de la N-acétyleglucosamine sur le dolichol et inhibe donc la N-glycosylation. Les sucres activés vont se fixer de manière successive et ordonnée sur les sucres déjà fixés grâce à des enzymes présents dans le RE pour former un polysaccharide primaire.

Ce polysaccharide primaire est synthétisé sur la face cytosolique du RE. Ce polysaccharide subit une bascule trans-membranaire qui le fait passer sur la face luminale du RE.

Il n'y a pas de code pour l'agencement des sucres; cet agencement est dépendant de certaines séquences d'AA sur la protéine, de la disponibilité d'enzymes (glycosyl-transférases) et de l'encombrement stérique des sucres. L'agencement des sucres est très variable selon l'organite ou le type cellulaire. Un polysaccharide primaire composé par exemple de 8 molécules de mannose, 3 molécules de glucose et de 2 molécules de N-acétyl-glucosamine permettra l'acheminement de la glycoprotéine vers les lysosomes. Un polysaccharide comportant du galactose, de l'acide sialique et du fucose sera associé à une glycoprotéine de la membrane plasmique dans la cellule intestinale.

Le précurseur polysaccharidique se greffe ensuite sur la protéine en cours de traduction au niveau d'un groupement NH₂ de l'asparagine. Le groupement polysaccharidique primaire va être greffé sur l'asparagine grâce à l'énergie du pont pyrophosphate : dolichol-P-P-polysaccharide + asparagine $\rightarrow$ dolichol + asparagine-polysaccharide + 2 Pi . Le greffage du polysaccharide est co-traductionnel et contribue au repliement correct de la protéine. Il est facilité par une N-oligosaccharide-glycosyl transférase.

Le polysaccharide primaire composé d'un noyau central et d'une partie périphérique va ensuite être élagué par des enzymes spécifiques dans le RE puis dans le Golgi (glucosidases). Le polysaccharide perd d'abord ses glucoses ; en fait, les glucoses traduisent simplement l'achèvement de la synthèse de la glycoprotéine et signalent que la protéine peut être exportée vers le Golgi.

Dans le Golgi, il y a *maturation des protéines N-glycosylées*. Le polysaccharide primaire va être modifié par élagage de sa partie périphérique; le degré de l'élagage dépend de l'accessibilité des enzymes au polysaccharide. Il y aura ensuite greffe de nouveaux résidus glucidiques spécifiques permettant la formation d'un polysaccharide définitif (actions successives de mannosidases et de galactosyltransférases).

Dans le Golgi, il y a aussi O-glycosylation: les sucres sont complexés avec l'UDP dans le cytosol puis importés par le biais d'une perméase de la membrane golgienne. Les sucres sont accrochés successivement sur la protéine par des O-oligosaccharide-protéine transférase. L'accrochage se fait au niveau d'un OH d'une sérine ou d'une thréonine.

* Le Golgi est spécialisé dans l'adressage des protéines vers des destinations différentes (tour de contrôle). Les protéines cheminent du RE, vers le CGN (cis-golgi network), la partie médiane du Golgi puis dans le TGN (trans-golgi network). Le transport entre ces compartiments est assuré par des vésicules à clathrine (TGN) ou par les coatomères. Le manteau des vésicules est composé de protéines globulaires α , β , γ , δ - COP (coat protein). La polymérisation des COP est sous la dépendance de l'ARF, une petite protéine G monomérique fixant le GTP. L'ARF échange un GDP avec un GTP, il se fixe alors sur la membrane du Golgi et recrute les COP. L'hydrolyse du GTP permet à la vésicule de se débarrasser de son manteau. Un antibiotique, la bréfeldine, empêche l'assemblage des coatomères et dissocie le Golgi en quelques minutes. Les vésicules portent à leur surface un signal v-SNARE qui va être reconnue par un récepteur t-SNARE de la membrane du compartiment cible.

Entre le réticulum et le Golgi, on distingue une voie aller (bloquée par la bréfeldine) et une voie retour bloquée par le nocodazole (un inhibiteur des microtubules). Au delà du Golgi, il y a une voie stimulée ou régulée (vésicules à clathrine) et une voie constitutive par défaut (flux vectoriel permanent ; vésicules à COP).

LES LYSOSOMES

1- Mise en évidence (De Duve - 1949)

L'activité enzymatique de type phosphatase acide est plus élevée dans un broyat d'hépatocytes si le fractionnement est effectué avec de l'eau distillée que s'il est pratiqué avec précaution dans un tampon isoosmotique. L'activité enzymatique est contenue dans des vésicules qui restent intactes si le broyage est ménagé. L'activité enzymatique est localisée dans des vésicules bien mises en évidence en microscopie électronique.

2- Morphologie et contenu

La taille et la forme des lysosomes est variable (environ 0.2-0,5 μ). Le contenu est homogène et dense aux électrons. Les phosphatases acides lysosomales précipitent le phosphate de plomb ; ceci permet un repérage précis des lysosomes dans la cellule en ME. Les lysosomes sont limités par une membrane simple de type bicouche lipidique.

On distinguait classiquement

- des lysosomes primaires ou néoformés, plus petits et peu perméables, situés dans le TGN.
- des lysosomes secondaires, générés par la fusion des lysosomes primaires et de vacuoles d'endocytose provenant de la membrane plasmique ; ces lysosomes sont plus gros et plus perméables car leur membrane doit laisser sortir le contenu dégradé par les enzymes. Les lysosomes sont présents dans toutes les cellules sauf les hématies mais en abondance variable. Les lysosomes se déplacent en permanence dans la cellule grâce à leur liaison avec le cytosquelette.

Le contenu du lysosome est acide (pH de 4 à 5) alors que le pH cytosolique est de 7,2. Ce pH acide est entretenu par une Na/H ATPase qui fait rentrer le proton dans la vésicule lysosomale en échange d'un Na, au prix d'une dépense énergétique sous forme de consommation d'ATP.

La membrane du lysosome contient aussi des transporteurs protéiques membranaires qui importent les protéines devant être dégradées ou exportent les produits de dégradation enzymatique pour qu'ils soient réutilisés par la cellule.

Les protéines situées à l'intérieur de la vésicule lysosomale (essentiellement des enzymes hydrolytiques ou hydrolases qui agissent en ajoutant une molécule d'eau à une molécule organique) sont porteuses de nombreux résidus glucidiques (glycoprotéines) qui augmentent leur résistance à l'action du pH bas et à celle des autres hydrolases: $A-B + H_2O \rightarrow AH + BOH$

On dénombre plus de 40 hydrolases acides (capables de résister et de fonctionner au pH acide du lysosome). Ces hydrolases sont inactivées à pH 7; ceci limite les conséquences néfastes d'une éventuelle fuite dans le cytosol. Les hydrolases dégradent les composants cellulaires glucidiques, lipidiques, protéiques ou les acides nucléiques:

- phosphatases acides: coupe une liaison ester phosphorique et entraîne une déphosphorylation
- sulfatase
- nucléases : RNase, DNase
- polysaccharidases: élaguent des résidus polysaccharidiques (mannosidases, glucosidases, galactosidases)
- lipases, phospholipases, estérases qui ont pour substrat les acides gras estérifiés
- protéases: collagénase, cathepsines B et D
- lysozyme : cette enzyme lysosomale dégrade les mucopolysaccharides des parois bactériennes ; il est sécrété dans la salive et dans les larmes et agit comme un antibiotique naturel.
- hyaluronidase : cette enzyme est sécrétée par le macrophage dans la substance fondamentale du tissu conjonctif; il dépolymérise l'acide hyaluronique de la substance intercellulaire et facilite la migration des cellules inflammatoires.

3 - Formation des lysosomes

Les lysosomes bourgeonnent sous forme de vésicules de la face trans de l'appareil de Golgi ; la clathrine facilite la vésiculation. Les lysosomes sont la conséquence de la fusion de plusieurs vésicules golgiennes; en permanence, le lysosome reçoit un apport de matériel membranaire et enzymatique d'origine golgienne. La paroi du lysosome contient des récepteurs d'arrimage pour les vésicules golgiennes.

L'orientation des glycoprotéines vers leur destination lysosomale se fait grâce à un signal chimique constitué par le mannose-6-phosphate. Le récepteur au mannose-6-P a été isolé et purifié ; il

lie les polysaccharides spécifiques à pH 7 et les libère à pH 5 ; le récepteur est recyclé vers le Golgi par des vésicules à clathrine.

4 - Rôle des lysosomes

- rôle de nettoyage cellulaire: autophagie. Les organites subcellulaires sont en permanent renouvellement : la durée de vie d'une mitochondrie dans le foie est de 10 jours environ ; au delà elle est enveloppée dans une membrane provenant probablement du réticulum (autophagosome) ; le phagosome fusionne ensuite avec les lysosomes pour donner un autophagolysosome; des fantômes de mitochondries sont visibles dans les lysosomes en ME. Quand un rat est traité par du phénobarbital, le réticulum lisse des cellules hépatiques s'hypertrophie ; dès que la stimulation cesse, le réticulum en excès est dégradé par les lysosomes. Les lysosomes assurent un remodelage cellulaire permanent. Quand le têtard subit sa transformation en grenouille suite à la sécrétion des hormones thyroïdiennes, les cellules de la queue sont détruites suite à un message programmé dans le code génétique grâce aux lysosomes qu'elle contiennent: phénomène d'apoptose. Ce phénomène débute par l'activation d'endonucléases qui tronçonnent l'ADN (formation d'échelles - ladder- sur l'électrophorèse), la chromatine se condense, les noyaux deviennent pycnotiques et se fragmentent. La membrane plasmique est détruite en dernier et le fantôme cellulaire est digéré par les cellules voisines. Le phénomène d'apoptose (différent de la nécrose) est très ubiquitaire (mort des cellules privées de nourriture, mort induite par les agents anticancéreux ou la radiothérapie, privation hormonale du tissu prostatique...)

- cellules spécialisées dans la phagocytose: Les lysosomes sont très abondants dans les macrophages et polynucléaires. Si on stimule des macrophages par des endotoxines (composant des parois bactériennes) ou du BCG, le nombre des lysosomes augmente. Les bactéries sont ingérées dans des phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes. Les lysosomes des macrophages dégradent en partie les antigènes ingérés; certaines parties des antigènes seront recyclées vers la membrane plasmique où elles seront en contact avec les lymphocytes ----> rôle majeur dans l'établissement de la mémoire immunitaire (cellules présentatrices de l'antigène: CPA).

- nourriture de la cellule: endocytose et pinocytose les lysosomes assurent la digestion cellulaire des substrats captés par endocytose et libèrent les molécules élémentaires dans le cytosol pour les synthèses ultérieures. Les substances à ingérer sont captés par des récepteurs membranaires au niveau des puits recouverts (coated pits); les vésicules sont internalisées et fusionnent avec les lysosomes ; sous l'influence du pH lysosomal acide, les récepteurs se séparent du ligand qui subit l'action des hydrolases ; les récepteurs sont recyclés vers la membrane sous forme de vésicules (ex: capture des lipoprotéines plasmiques, endocytose et dégradation lysosomale qui assure la fourniture de la cellule en cholestérol).

- tri des substances qui transitent dans la cellule : Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) sont accumulées dans les vésicules thyroïdiennes liées à une énorme protéine, la thyroglobuline. Lors de la stimulation de la thyroïde par la TSH hypophysaire, la thyroglobuline et les hormones sont endocytées à nouveau dans la cellule puis dégradées par les lysosomes qui permettent la libération des hormones à l'autre pôle de la cellule. Les immunoglobulines traversent facilement la cellule intestinale de la muqueuse du nouveau-né sans être dégradées. Par contre, d'autres molécules protéiques (ex : peroxydase de raifort) sont dégradées par les lysosomes dès qu'elles pénètrent dans la cellule. Les mécanismes exacts qui conduisent une protéine à sa destruction ou à son transit sans modification ne sont pas encore bien connus (rôle des ubiquitines et heat shock protéin). La non dégradation de certaines protéines par le tube digestif et leur passage dans l'organisme serait à l'origine de certaines allergies digestives (maladie coeliaque par intolérance au gluten, allergie aux protéines du lait de vache...)

- rôle des lysosomes dans l'infection virale : Les virus se lient à la membrane plasmique sur un récepteur et sont internalisés ; les vésicules membranaires contenant les virus se lient aux lysosomes qui pèlent le virus de ses enveloppes et libèrent l'acide nucléique viral dans la cellule.

- rôle des lysosomes dans le remodelage osseux: les ostéoclastes sont des cellules spécialisées dans la destruction osseuse qui dérivent des macrophages; ces cellules excrètent le contenu de leurs lysosomes dans l'espace qui les sépare de l'os. Une action excessive des ostéoclastes provoque une surdestruction osseuse avec risque de fractures et d'hypercalcémie (hyperparathyroïdie, myélome, métastases osseuses des cancers). Les biphosphonates inhibent efficacement l'activité ostéoclastique.

- La fonction des lysosomes peut être perturbée par des bases faibles qui s'accumulent dans la lumière lysosomale (chloroquine); ces bases élèvent le pH et perturbent l'action des hydrolases ou le largage des enzymes apportées par les vésicules à récepteurs mannose-6-P. Quand une substance ne peut être dégradée par les lysosomes, elle s'accumule sous la forme de grains denses de pigments (lipofusine) ou de phospholipides (figures myéliniques). Ces grains peuvent être éliminés par exocytose (défécation cellulaire) ou persister jusqu'à la mort cellulaire (abondance des lipofuscines dans les cellules sénescents)

5 - Pathologie de la fonction lysosomale

- Déficit du transfert des hydrolases du Golgi vers les lysosomes: les hydrolases sont acheminées vers le lysosome grâce à un message chimique constitué par le mannose-6-P. En fait le résidu mannose-6-P n'est pas greffé de façon directe dans le Golgi sur le polysaccharide des glycoprotéines; il y a d'abord greffe d'un glucide activé (UDP-N-acétylglucosamine) sur un mannose grâce à une N-acetylglucosamine phosphotransférase ; le résidu N-acetylglucosamine est élagué par une phosphoglucosidase ce qui aboutit à la création du mannose-6-P. Si un individu est déficient en N-acetylglucosamine phosphotransférase , la formation du mannose-6-P ne peut se réaliser ; le transfert des hydrolases vers les lysosomes ne s'effectue pas; du matériel non dégradé par les lysosomes s'accumule dans la cellule : maladie des inclusions intracellulaires ; c'est une maladie récessive rare qui ne s'exprime que chez les homozygotes.

- Déficit enzymatique en hydrolases lysosomales. Ces maladies sont appelées maladies de surcharge ou thésaurismoses:

* maladie de Tay - Sachs : déficit génétique en β -hexosaminidase qui dégrade le ganglioside GM2 ; ce ganglioside est normalement produit dans la membrane plasmique des cellules nerveuses et dégradé par les lysosomes: le Ceramide-glucose-galactose-N-acetyl-Neuraminique(NANA) est dégradé normalement par une β -hexosaminidase. La maladie lysosomale provoque une accumulation de ganglioside GM2 conduisant à la débilité et à la mort vers l'âge de 5 ans.

* maladie de Hurler : déficit en alpha-iduronidase (enzyme qui dégrade un composant mucopolysaccharidique ou glycosaminoglycane de la substance fondamentale du tissu conjonctif) ; le polysaccharide non dégradé s'accumule dans les lysosomes du tissu conjonctif (fibroblastes) et provoque des malformations osseuses, un retard de croissance et une débilité.

* il existe de nombreuses autres maladies liées à un déficit en hydrolase lysosomale : déficit en glycosidase (glycogénose cardiomyoculaire de Pompe) , déficit en phospholipase (maladie de Nieman-Pick) , déficit en cérébrosidase (maladie de Gaucher).

- Dans la maladie de Chediak-Higashi, le contenu enzymatique est normal mais il y a une modification de la membrane lysosomale; les lysosomes fusionnent entre eux pour former des lysosomes géants et irréguliers peu fonctionnels qui provoquent un déficit immunitaire sévère et la mort.

- Certaines substances ne peuvent pas être dégradées par les lysosomes même chez les sujets normaux :

*silice : silicose des mineurs ; la silice détruit la membrane des lysosomes et permet la fuite des enzymes qui provoque une réaction destructrice et inflammatoire des poumons.

*acide urique: ici aussi réaction inflammatoire due à la lyse des lysosomes par les cristaux d'acide urique --> crise de goutte.

*médicaments : amiodarone (accumulation pulmonaire)...

* bacille de Koch du fait de sa résistance à l'acidité lysosomale.

- La membrane lysosomale est détruite par de nombreux facteurs : anoxie (syndrome d'écrasement des membres, infarctus), chaleur, médicaments, toxines bactériennes: les streptocoques entraînent la lyse de la paroi lysosomale. Les corticoïdes agissent en partie en stabilisant la membrane lysosomale.

PEROXYSOMES

1 - Structure (De Duve):

Les peroxysomes sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ils sont constitués d'une membrane simple de type bicouche lipidique. A la différence de la mitochondrie, ils ne possèdent pas d'acides nucléiques, ni de ribosomes. Comme pour les mitochondries, les protéines des peroxysomes sont importées du cytoplasme par un mécanisme d'import post-traductionnel. Les peroxysomes se forment par autoréplication et non à partir du Golgi comme les lysosomes.

Ils sont visibles uniquement en microscopie électronique (diamètre: 0,15 à 0,5 micron) et comprennent parfois un corps dense nommé cristalloïde fait d'une enzyme cristallisée. Les peroxysomes sont abondants dans les cellules végétales où ils sont responsables de la photorespiration et dans les cellules hépatiques et rénales qui ont un rôle de détoxification.

Ces corpuscules (microbodies) contiennent des enzymes oxydatives spécifiques: urate oxydase, catalase et aminoacide oxydase mises en évidence par des colorations histochimiques.

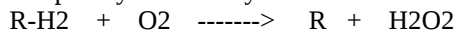
2 - Rôles :

Les microsomes sont caractérisés par leur activité peroxydasique et catalasique.

* utilisation et détoxification de l'oxygène moléculaire :

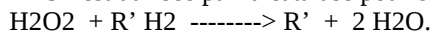
Le peroxysome est peut être le vestige d'un organelle qui protégeait la cellule primitive des effets nocifs oxydants de l'oxygène ; son rôle est devenu moindre quand est apparue la mitochondrie qui utilise, elle aussi, l'oxygène mais qui à l'avantage de produire de l'énergie.

Les peroxydases catalysent la formation d'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène



L'eau oxygénée est très réactive; elle est utilisée par le polynucléaire pour détruire les bactéries.

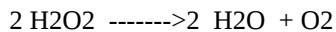
H₂O₂ est utilisée par la catalase pour oxyder certaines substances toxiques :



R' peut être un groupement phénol, de l'acide formique, du formaldéhyde ou un alcool.

L'alcool éthylique est transformé dans le foie en acétaldéhyde qui est détruit par la catalase.

La catalase détruit l'excès d'H₂O₂ produit dans la cellule :



Le nombre des peroxysomes s'adapte aux besoins de la cellule :

- si la levure (*S cerevisiae*) est cultivée sur du glucose, il y a peu de peroxysomes
- si la levure est cultivée sur du méthanol, le nombre et la taille des peroxysomes augmentent pour oxyder l'alcool; de même, si la levure est cultivée en présence d'acides gras, les peroxysomes les convertissent en acétylCoA.

* catabolisme de l'acide urique :

Les purines (adénine, guanine) constituant des acides nucléiques sont catabolisées en acide urique. Chez la plupart des animaux, l'acide urique est dégradé par les peroxysomes en allantoin soluble dans les urines grâce à l'urate oxydase. Cette enzyme n'existe pas chez l'homme, l'acide urique produit en excès provoque la goutte, la lithiase urique ou les insuffisances rénales au cours de la chimiothérapie des leucémies. On utilise l'urate oxydase dans les circonstances aiguës pour lutter contre l'accumulation néfaste d'acide urique.

* β-oxydation des acides gras à très longues chaînes :

Les acides gras à longue chaîne (C₁₀ à C₁₈) sont combinés au coenzyme A qui va traverser la membrane du peroxysome et gagner la mitochondrie pour participer au cycle de Krebs. Le peroxysome assure également la dégradation des acides gras et des lipides insaturés (prostaglandines). Les médicaments qui stimulent la formation des peroxysomes (fibrates) sont utilisés comme hypolipémiants (médicaments faisant proliférer les peroxysomes).

ADRESSAGE ET DEVENIR DES PROTEINES CELLULAIRES

Routage intracellulaire des protéines

Une cellule de mammifère contient 10^{10} molécules de 10^4 sortes différentes. Toutes ces protéines sont synthétisées par les ribosomes dans le cytosol ou sur la face cytosolique du réticulum granuleux et sont ensuite distribuées spécifiquement vers les compartiments cellulaires adéquats.

Le cheminement intracellulaire des protéines peut être suivi par autoradiographie en utilisant des acides aminés radioactifs (leucine marqué au C^{14} , méthionine marquée au S^{35}). Les cellules sont incubées pendant un temps bref avec l'acide aminé marqué puis remises en contact avec l'acide aminé froid (pulse chase); les cellules sont fixées après un temps de culture variable ; la préparation contrastée pour la microscopie électronique est recouverte d'une couche de pellicule photographique.

Ex de la sécrétion pancréatique : la radioactivité est d'abord localisée dans le réticulum endoplasmique, puis dans le Golgi avant de se situer dans les granules de sécrétions.

Cytosol -----> cytosol

-----> mitochondries, peroxysomes , noyau (import post traductionnel)

Reticulum (import co-traductionnel) -----> Réticulum

-----> Golgi

-----> Membrane plasmique

-----> Lysosomes

-----> Vésicules de sécrétion

Dans leur parcours intracellulaire, les protéines peuvent :

- soit passer à travers une bicouche lipidique (réticulum, mitochondrie..); une protéine réceptrice et translocatrice assure le déroulement de la protéine transportée et son passage à travers la bicouche lipidique hydrophobe .

- soit cheminer d'un compartiment subcellulaire à l'autre en étant empaquetées dans des vésicules de transport (flux membranaire).

Des signaux chimiques de reconnaissance permettent d'adresser les protéines vers leur compartiment de destination ; ce sont :

- soit des séquences d'acides aminés situés à l'extrémité ou à l'intérieur de la protéine ; ces séquences sont étudiées grâce aux méthodes de la biologie moléculaire qui permettent de faire exprimer ou d'empêcher l'expression de la séquence d'intérêt; ces modifications de structure entraînent des changements dans la distribution cellulaire des protéines.

Ex :

- * Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala est une séquence hydrophobe qui permet l'adressage vers la membrane du réticulum

- * Lys-Asp-Glu-Leu-COO⁻ permet à la protéine de rester dans la lumière du réticulum

- * Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val est une séquence d'acides aminés à charge positive qui permet le transfert de la protéine vers le noyau. Ce signal de localisation nucléaire (NLS : nuclear localization signal) est reconnu par un récepteur de protéine à NLS (NBP) qui facilite son passage à travers les pores de la membrane nucléaire. A l'intérieur du noyau NBP libère la protéine et est exporté dans le cytoplasme.

- Soit des zones signales : ces zones sont formées par le rapprochement dans l'espace de certaines séquences d'acides aminés sur la protéine repliée; ces zones sont actuellement très difficilement étudiables.

- Les protéines destinées aux lysosomes bénéficient de l'addition d'un groupement phosphate sur un résidu mannose en position 6. Le mannose-6-P est un signal d'adressage spécifique vers le lysosome. Des portions spécialisées de la membrane du Golgi contiennent des récepteurs pour le mannose-6P; à ces endroits se forment les vésicules, entourées de clathrine, qui se dirigeront vers les lysosomes ; ces vésicules fusionnent avec le lysosome et y déversent leur contenu sous l'influence du pH acide ; les récepteurs au mannose-6-P ainsi que les membranes retournent à vide vers le Golgi; cette navette assure les processus de recyclage pour limiter le travail de synthèse de membranes et de récepteurs de la cellule

- Pour les protéines destinées à la membrane plasmique : une mannosidase coupe un mannose et greffe à la place une N-acétyl-glucosamine : ce résidu est un message chimique d'adressage spécifique pour la membrane plasmique. Il s'agit d'une sécrétion permanente (ou constitutive) qui assure le renouvellement des protéines et des lipides membranaires.

- Pour les protéines devant être sécrétées à l'extérieur de la cellule, des enzymes ajoutent un résidu galactose ou une molécule d'acide sialique. La clathrine permet la formation de vacuoles de sécrétion qui s'accumulent et seront libérées lors d'un stimulus impliquant un mécanisme de transduction du signal. Il s'agit d'une sécrétion intermittente et contrôlée. Pour pouvoir fusionner à la membrane plasmique, les vésicules doivent être "compétentes" et être dotées de protéines de fusion. Certains virus possèdent des protéines de fusion similaires pour faciliter leur exocytose; ces protéines sont utilisées en biologie pour faciliter la fusion cellulaire (protéine de capsule du virus de Sendai).

Dégradation des protéines

La quantité d'une protéine dans une cellule résulte d'un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation. Les variations du taux cellulaire de protéines jouent un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire: ex dégradation périodique des cyclines au cours du cycle cellulaire, dégradation ou synthèse du cytochrome P450 en fonction des besoins (induction enzymatique), synthèse ou dégradation des enzymes du métabolisme glucidique après les repas ou au cours du jeûne, dégradation de I-kB, une protéine qui bloque la transcription des cytokines, au cours du processus inflammatoire. Certaines enzymes sont remplacées en quelques dizaines de minutes; les protéines du coeur ou du cerveau sont plus stables (quelques jours). La synthèse et la dégradation protéique représentent environ 280 g/ jour pour un adulte. Les protéines dégradées (pertes de la structure tertiaire ou quaternaire) ou vieilles doivent être détruites en acides aminés qui sont réutilisés pour la synthèse de protéines intactes.

On distingue deux voies de dégradation des protéines :

- la voie lysosomale : les protéines sont intégrées avec l'organite auquel elles appartiennent dans les phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes (dégradation des lipoprotéines, destruction des mitochondries, dégradation des récepteurs hormonaux...). Dans d'autres cas, les protéines sont importées, liées à des protéines de choc thermique (HSP70), dans le lysosome par des transporteurs de la famille ABC (ATP-binding cassette)

- la voie ubiquitine-protéasome: cette voie se déroule dans le cytosol. Elle requiert de l'énergie fournie par l'ATP. Dans un premier temps, l'ubiquitine est activée par le facteur E1, puis transférée sur le facteur E2. Le facteur E2-ubiquitine est transféré sur la protéine à dégrader. Cinq ou plus résidus ubiquitines sont fixés (poly-ubiquitinylation). La protéine ubiquitinylée est reconnue par la sous-unité 19s du protéasome puis dégradée par le core du protéasome (sous-unité 20s) en petits peptides et acides aminés.

COMMUNICATIONS ET SIGNAUX INTERCELLULAIRES

Révisé le 21 décembre 2006. Cours assuré par le Pr Chauffert

1)- Généralités

Les cellules d'un organisme pluricellulaire doivent communiquer les unes avec les autres pour assurer le développement et l'organisation des tissus, pour contrôler leur croissance et pour réguler leurs fonctions. Ces facteurs extérieurs influent sur la survie, la mort ou la prolifération des cellules.

On reconnaît 3 types de communications intercellulaires :

- les communications à distance par des molécules sécrétées
- les communications par contact grâce à des molécules liées aux membranes
- les communications intercytoplasmiques par les jonctions gap

Seules les communications par signaux chimiques seront abordées dans ce chapitre.

On reconnaît 3 stratégies de communication par messagers chimiques :

1- la sécrétion endocrine : des cellules spécialisées sécrètent des hormones qui sont larguées dans le torrent circulatoire et se distribuent dans tout l'organisme; il s'agit d'un mécanisme relativement lent (délai d'action de plusieurs secondes à plusieurs heures); compte tenu de la dilution des hormones, les cellules cibles doivent posséder des récepteurs de haute affinité (10^{-8} M)

1-1 Exemple d'un système de sécrétion endocrine à plusieurs étages : la sécrétion thyroïdienne :

- sous l'influence de circuit nerveux de contrôle provenant de l'encéphale, l'hypothalamus sécrète le TRH (TSH Releasing Hormone)
- le TRH est acheminé vers l'antéhypophyse par le système porte hypothalamo-hypophysaire où il stimule la sécrétion de TSH (Thyroid Stimulating Hormone)
- la TSH est libérée dans le système circulatoire
- la TSH atteint la thyroïde et stimule la sécrétion des hormones thyroïdiennes : triiodothyronine (T3) et tetraiodothyronine ou thyroxine (T4)
- T3 et T4 sont déversées dans le torrent circulatoire pour atteindre leurs cibles cellulaires (muscles, coeur, tissu adipeux)

On connaît deux grandes classes d'hormones différant par leurs propriétés chimiques :

1-2 Les hormones hydrophiles : exemple : TSH , adrénaline , glucagon

- elles sont souvent de nature peptidique mais pas toujours (adrénaline)
- elles sont transportées sous forme libre dans le plasma
- elles ne peuvent pas traverser la membrane plasmique hydrophobe
- elles doivent se lier à un récepteur spécifique membranaire
- elles ont généralement une durée d'action courte

1-3 Les hormones hydrophobes :

- elles sont souvent de nature lipidique (stéroïdes, vitamine D -> absorption du calcium, vitamine A- développement) mais pas toujours (hormones thyroïdiennes). Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir du cholestérol. Ce sont des petites molécules hydrophobes (PM environ 300 d) ; ce sont les hormones femelles (oestradiol, progestérone), mâles (testostérone) ou corticosurréniennes (cortisol, aldostérone).

- ces hormones ont une durée de vie longue ; elles régulent de façon lente des processus métaboliques

- elles ne peuvent être transportées sous forme libre et sont donc liées à des protéines transporteuses plasmatiques spécialisées (carrier protein ou binding protein). Le complexe hormone-protéine porteuse se dissocie près de la cellule cible ; l'hormone traverse facilement la membrane plasmique grâce à sa lipophilie.

- l'hormone se lie avec une haute affinité à un récepteur cytosolique ou nucléaire de nature protéique (environ 10 000 molécules de récepteurs par cellule). La plupart de ces récepteurs ont été

caractérisés; leur séquence d'acides aminés et la séquence de nucléotides codant pour la protéine sont connues. Ils sont constitués d'une seule chaîne d'acides aminés (800 environ) divisée en 3 domaines :

- un site de fixation de l'hormone (extrémité COOH). Il contient aussi une séquence de localisation nucléaire et un site de dimérisation.
- un site de fixation à l'ADN dans la partie médiane de la molécule. Cette partie présente une structure associant deux "doigts de gant à zinc: zinc finger" qui permettent la fixation à l'ADN (arrangements de 4 cystéines fixant le Zn)
- un site régulateur à l'extrémité NH₂ (domaine de transactivation).

A l'état de repos (hormone non fixée sur le récepteur), une protéine inhibitrice est fixée à l'endroit du site de liaison récepteur-ADN (Heat Shock Protein 90).

Lors de l'activation (hormone liée au site de liaison), la protéine inhibitrice HSP 90 se détache du récepteur; le complexe hormone-récepteur est transféré dans le noyau (translocation), se dimérise avec une molécule homologue et se fixe à l'ADN sur une séquence de reconnaissance de 8 nucléotides (HRE : hormone responsive element); le site régulateur est situé en amont des gènes à transcrire et active la transcription d'un ou plusieurs gènes (facteur de transcription) impliqués dans la prolifération, la différenciation, les sécrétions, la survie ou l'apoptose (hormone thyroïdienne chez le têtard).

En cas d'anomalie du récepteur, l'hormone n'exerce plus ses effets physiologiques (syndrome du testicule féminisant). Des médicaments anti-hormonaux prennent la place des hormones naturelles sur les récepteurs (anti-progestérone: avortement précoce, anti-androgène: cancer de la prostate, anti-oestrogène: cancer du sein...).

2- la sécrétion paracrine : les médiateurs sont sécrétés à proximité de la cellule cible (< 1 mm); les médiateurs sont très rapidement détruits ou recaptés (ex : facteurs de croissance, prostaglandines)

* *Les prostaglandines* sont des médiateurs chimiques de nature lipidique à action locale. Les prostaglandines sont sécrétées de façon continue par de nombreux tissus (prostate, utérus, estomac, intestin, cellules de l'inflammation...).

Elles sont synthétisées à partir d'un précurseur phospholipidique membranaire ; la phospholipase libère un acide gras polyinsaturé de 20 carbones, l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique subit une cyclisation (cyclooxygénases: COX I et II) et des oxydations (lipooxygénases) pour former la famille des eicosanoïdes. Cette famille comprend

- les prostaglandines: une vingtaine de composés jouant un rôle dans le déclenchement de l'accouchement, dans la protection de la muqueuse gastrique contre l'acidité, dans la contraction des muscles lisses, dans la douleur et dans l'inflammation...

- les leucotriènes qui jouent un rôle dans l'inflammation et dans l'asthme

- le thromboxane qui est un puissant vasoconstricteur et un inducteur de l'aggrégation plaquettaire

- la prostacycline qui est un vasodilatateur et un antiagrégant plaquettaire.

Les médicaments corticostéroïdes (corticoïdes) inhibent la phospholipase membranaire; ce sont de puissants anti-inflammatoires et des anti-allergiques.

L'aspirine et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent les cyclooxygénases ; ce sont des antalgiques et des antiagrégants plaquettaires qui empêchent l'initiation de la coagulation.

* *communications par des médiateurs gazeux*

Des gaz peuvent être des médiateurs de la communication intercellulaire (monoxyde d'azote: NO; oxyde de carbone : CO). Ces molécules traversent facilement les membranes cellulaires et agissent sur des molécules cibles.

Le NO est synthétisé à partir d'un acide aminé, l'arginine, grâce aux NO-synthases. Il diffuse très facilement de cellule à cellule et passe facilement la membrane plasmique. Le NO est produit par les NO-synthases. Il active une guanylate cyclase en se liant au fer du groupement hémique de ces enzymes. Le GMP cyclique synthétisé est le second messager du NO. NO intervient dans la vasodilatation des vaisseaux (stimulation de sa synthèse par l'acétyl-choline d'origine nerveuse, rôle vasodilatateur de la nitroglycérine dans l'angor), dans la relaxation des fibres musculaires lisses (érection). Le Viagra est un inhibiteur de la dégradation du GMPc. Le NO produit par le macrophage intervient dans la cytotoxicité de cette cellule vis à vis des cellules cancéreuses.

3 - la voie synaptique : ce mode de communication est le fait du tissu nerveux et de la jonction neuromusculaire. La cellule émettrice libère un neuromédiateur qui diffuse dans la fente synaptique (largeur < 50 nm). La cellule cible possède un récepteur spécifique ; la voie synaptique est plus rapide et plus précise que la voie endocrine. La constante d'affinité du récepteur pour le ligand n'est pas très élevée (10^{-4} M) du fait de la forte concentration du neuromédiateur dans l'espace restreint de la fente synaptique. Cette constante d'affinité basse évite l'excitation du récepteur pour de faibles variations de la concentration locale du médiateur. Quant le médiateur est libéré du récepteur, il est détruit ou recapté dans la terminaison présynaptique. Ce processus assure la précision temporelle du signal.

2 - Transduction transmembranaire du signal :

2 - 1 Généralités sur les récepteurs membranaires

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires. Ils possèdent une ou plusieurs portions transmembranaires, un domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire. Ils peuvent être monomériques ou dimériques (dans ce cas, c'est la fixation du ligand qui entraîne la dimérisation). Le ligand (hormone hydrosoluble) se fixe au site récepteur extramembranaire par des combinaisons de forces faibles (Van der Waals, interactions hydrophobes, interactions polaires ou ioniques). La fixation du ligand entraîne une modification allostérique de la molécule du récepteur; cette modification se transmet à travers les portions transmembranaires et démasque des fonctions chimiques au niveau du domaine intramembranaire (activité enzymatique de type kinase, ouverture d'un canal ionique ou liaison à une protéine G). La liaison d'un récepteur et de son ligand est hyperaffine (reconnaissance du ligand parmi des millions de molécules de l'environnement), spécifique (liaison très préférentielle pour les ligands, leurs agonistes ou leurs antagonistes) et réversible (ce qui permet la désactivation du récepteur). Il peut y avoir plusieurs récepteurs ayant des actions ou des spécificités tissulaires différentes pour une même hormone (ex récepteurs α , β_1 ou β_2 adrénergiques).

L'étude des interactions entre une hormone et son récepteur est facilitée par l'emploi d'hormone radioactive servant de traceur. L'affinité d'un récepteur (R) pour l'hormone (H) se caractérise par une constante de dissociation :

$$K_d = \frac{(R) \times (H)}{(R-H)}$$

On peut en déduire la formule de la fonction

$$\frac{(R-H)}{R_t} \quad \begin{matrix} \text{(Nombre de récepteurs liés)} \\ \text{(Nombre de récepteurs totaux)} \end{matrix} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{(H)}}$$

Le tracé de la fonction $R-H/R_t$ en fonction de la concentration d'hormone disponible tend vers l'asymptote R_t quand (H) augmente vers l'infini. On peut ainsi calculer le nombre total de récepteurs pour une hormone donnée dans un type cellulaire donné: ainsi, on dénombre environ 40 000 récepteurs pour l'insuline par cellule hépatique. Pour $(H) = K_d$, 50 % des récepteurs sont liés par l'hormone. Dans l'organisme, la concentration circulante des hormones est proche de K_d , dans la partie pentue de la courbe de dissociation.

2-2 L'AMP cyclique: un second messager intracellulaire

C'est le système de transduction du signal utilisé par les hormones peptidiques (TSH, ACTH, LH) ou les catécholamines (adrénaline). Ces hormones agissent par le biais de l'augmentation du taux cytosolique d'AMP cyclique.

2-2-1 Le système Protéine G- Adénylate Cyclase

L'hormone circule sous forme libre dans le plasma et se lie à un récepteur membranaire; la liaison du ligand sur le récepteur entraîne une modification de la conformation allostérique du récepteur qui démasque alors un site de liaison pour la protéine G. La protéine G est un trimère formé de 3 sous unités α , β , γ . Le rôle des protéines G a été éclairci par Rodbell et Gilman (Prix Nobel 1994).

- à l'état de repos, la sous unité α est liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate) et aux sous unités β et γ

- après activation du récepteur, l'unité α de la protéine G va se lier au site actif du récepteur; elle se dissocie des unités β et γ ; le couplage du récepteur à la sous unité α permet la libération du GDP; une molécule de GTP (guanosine triphosphate) vient se fixer à la place du GDP

Le complexe sous unité α - GTP se lie à l'adénylate cyclase membranaire et l'active; l'adénylate cyclase activée fabrique de l'AMP cyclique (adénosine 3'-5' monophosphate = AMPc) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate); l'AMPc est le second messenger intracellulaire, responsable de l'effet métabolique de l'hormone.

Le système va ensuite se désactiver; le GTP va être progressivement hydrolysé ($\text{GTP} \rightarrow \text{GDP} + \text{P}$); la sous unité α se découple alors de l'adénylate cyclase qui se désactive; la synthèse d'AMPc s'arrête. Le complexe sous-unité α -GDP reforme un trimère avec les sous-unités β et γ ; le système est de nouveau prêt à être activé par la fixation d'une nouvelle molécule d'hormone.

La toxine cholérique (toxine pathogène du *Vibrio cholerae*, agent du choléra) se comporte comme une enzyme qui permet la fixation d'une molécule d'ADP-ribose (ADP-ribosylation) sur la sous unité α de la protéine G; la fixation de l'ADP-ribose empêche l'hydrolyse de GTP en GDP; le système est activé en permanence même en l'absence d'hormone; la synthèse d'AMPc devient inépuisable. Dans l'intestin, l'AMPc en excès provoque une hypersécrétion de sodium et d'eau, responsable d'une diarrhée catclysmique provoquant la mort de l'individu par déshydratation. La toxine cholérique est utilisée en biologie cellulaire pour savoir si le système de la protéine G est impliqué dans la transduction d'un signal étudié.

Le système apparemment complexe de la transduction transmembranaire du signal par l'intermédiaire de la protéine G a plusieurs avantages :

- * c'est un système amplificateur: un seul complexe hormone-récepteur peut activer plusieurs protéines G

- * le système prolonge l'effet de l'hormone; la fixation de l'hormone peut être courte (1 sec) mais l'effet sur la synthèse d'AMPc est long (15 sec)

Il faut noter que les procaryotes n'utilisent pas le système de la protéine G; dans ces organismes, l'adénylate cyclase est directement couplée au complexe récepteur-ligand activé.

La réponse d'une cellule à l'activation d'un récepteur est variable :

ex : l'adrénaline agit sur les récepteurs α_2 des vaisseaux en inhibant la formation d'AMPc et sur les récepteurs β du coeur en stimulant la synthèse d'AMPc.

La différence entre ces deux formes de réponse cellulaire est liée au type de sous-unité α de la protéine G couplée au récepteur :

- une protéine de type G_s stimule la synthèse d'AMPc; G_s est constituée d'une sous unité $\beta\gamma$ et d'une sous unité α stimulatrice ($G_s \alpha$) qui stimule l'adénylate cyclase.

- une protéine de type G_i inhibe la synthèse d'AMPc; ce type de protéine G possède une sous unité $\beta\gamma$ identique à celle précédemment étudiée; par contre la sous unité α est différente ($G_i \alpha$); $G_i \alpha$ activée inhibe l'adénylate cyclase.

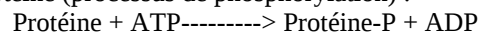
La toxine de *Bordetella pertussis* (bacille de la coqueluche) permet la fixation d'un ADP-ribose sur $G_i \alpha$ et empêche l'hydrolyse du GTP; l'activité inhibitrice de $G_i \alpha$ est inhibée et il y a accumulation d'AMPc. Cette toxine est utilisée pour savoir si une protéine G_i est impliquée dans une réponse hormonale inhibitrice.

2-2-2 Mode d'action intracellulaire de l'AMPc

- * L'AMPc produite par l'adénylate cyclase va se fixer sur une protéine réceptrice : la protéine kinase A (PKA : A pour AMPc dépendante) .

- La PKA est une protéine tétramère (4 chaînes protéiques) formée de 2 unités catalytiques et de 2 unités régulatrices. La fixation de l'AMPc sur les unités régulatrices induit un changement de conformation qui active les unités catalytiques.

- La PKA est une kinase : elle catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers une protéine (processus de phosphorylation) :



- Le groupement phosphate se fixe sur un radical OH de la chaîne latérale d'un des acides aminés suivants : sérine, thréonine, tyrosine (on parle de sérine-kinases, thréonine-kinases ou tyrosine-kinases).

- La phosphorylation de la protéine cible modifie son activité enzymatique en l'induisant

ou en l'inhibant.

Exemple du métabolisme du glycogène dans la cellule musculaire :

Stress ----> SNC ----> libération d'adrénaline dans le plasma par la glande médullo-surrénale ----> liaison sur un récepteur β adrénergique de la membrane plasmique de la cellule musculaire ----> activation de l'adénylate cyclase via la protéine G -----> production d'AMPc ----> activation de la PKA dont la conséquence est double :

- * activation par phosphorylation d'une phosphorylase-kinase -----> activation par phosphorylation de la glycogène phosphorylase -----> phosphorylation et dépolymérisation du glycogène : glycogène + ATP ----> glucose-1-phosphate qui peut s'engager dans la voie de la glycolyse.

- * inhibition par phosphorylation de la glycogène synthétase -----> la synthèse de glycogène à partir du glucose est inhibée.

- * L'AMPc inhibe les protéine-phosphatases

La déphosphorylation des protéines est assurée par des protéines-phosphatases :

Protéine-P -----> Protéine + phosphate inorganique

L'AMPc se fixe sur les protéines phosphatases et inhibe leur activité; ce mécanisme amplifie l'efficacité de l'AMPc via l'activation de la PKA .

- * L'AMP cyclique est dégradée en AMP par la phosphodiesterase. Cette enzyme est inhibée par des substances toxiques ou médicamenteuses (caféine, théophylline utilisée dans l'asthme) qui accroissent donc le stock d'AMPc intracellulaire

2 - 3 Le calcium: un autre second messenger

2 - 3 - 1 le calcium dans la cellule :

- La concentration de calcium libre dans le cytosol d'une cellule au repos est très basse (10^{-7} M) alors que la concentration de Ca extracellulaire est élevée (10^{-3} M). Quand la cellule est activée, la concentration s'élève jusqu'à 5×10^{-6} M.

- Le Ca se fixe sur une protéine cytosolique: la calmoduline. La fixation du Ca entraîne une modification de la conformation spatiale de la calmoduline qui permettra sa fixation à la protéine kinase C; c'est la fixation du complexe Ca-calmoduline qui provoque l'activation de l'enzyme (cf infra). Les protéines activées par la calmoduline sont CaM/kinases (ex : CaM/kinase II permet la production d'une tyrosine hydroxylase --> synthèse des catécholamines -adrénaline)

- Le calcium intracellulaire est séquestré pour la grande partie dans un compartiment spécialisé fait de citernes entourées d'une membrane de type bicouche lipidique. Ce compartiment est fonctionnellement différent du réticulum lisse auquel il ressemble morphologiquement. Dans ce compartiment, le Ca^{++} se fixe sur une protéine, la calsequestrine . Le compartiment séquestrant le Ca (CSCa) peut être visualisé en microscopie grâce à des molécules (FURA-2, aequorine) qui sont fluorescentes en présence de Ca à forte concentration. Le CSCa est très développé dans le muscle et dans le coeur où il prend le nom de réticulum sarcoplasmique; dans ces organes le Ca est alternativement libéré puis recapté pour assurer la contraction et la relaxation des fibres musculaires (intervention du Ca dans la liaison actine-myosine).

- Le Ca est pompé en permanence du cytosol vers le CSCa par une Ca/ATPase qui consomme de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

- Le Ca est également transporté du cytosol vers le milieu extracellulaire par une Ca/ATPase de la membrane plasmique et par une protéine antiport qui fait rentrer du Na dans la cellule en échange du Ca.

- Si le niveau de Ca augmente dangereusement dans le cytosol (10^{-5} M), une pompe mitochondriale se met en route.

2-3-2 Rôle du Ca^{++} comme second messenger intracellulaire :

- L'injection de Ca (ou l'utilisation d'un ionophore spécifique du Ca^{++}) dans une cellule peut provoquer son activation : contraction musculaire, sécrétion , prolifération (oeuf fécondé)....

- L'augmentation du Ca dans le cytosol se fait selon 2 modalités:

- * dans l'extrémité axonale des cellules nerveuses, c'est l'influx nerveux qui ouvre un canal calcique voltage-dépendant; le Ca extracellulaire pénètre dans la cellule; l'augmentation du Ca cytosolique provoque la fusion des vésicules synaptiques contenant le neuromédiateur avec la membrane plasmique; le neuromédiateur est libéré dans la fente synaptique.

* dans les autres cellules, c'est la fixation d'un ligand à un récepteur membranaire qui déclenche la libération du Ca à partir du CSCa. Le médiateur entre le récepteur membranaire et le CSCa est l'inositol triphosphate (InsP3). L'InsP3 se fixe sur un canal calcique ligand dépendant. L'InsP3 est ensuite rapidement déphosphorylé par une phosphatase qui l'inactive. Le calcium ionophore A 23187 permet l'entrée massive du calcium dans le cytosol et mime ainsi l'action de l'InsP3 .

- Formation de l' InsP3:

*Tout commence par la fixation d'une molécule signal sur un récepteur protéique membranaire. Cette fixation provoque l'activation d'une protéine G qui elle même active la phospholipase C.

*L'InsP3 est formé à partir d'un phospholipide de la couche interne de la membrane plasmique: le phosphatidylinositol (PI). L'inositol est phosphorylé 2 fois par des kinases pour former le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2).

* PIP2 est hydrolysé par la phospholipase C en InsP3 qui migre dans le cytosol et en diacylglycérol (DAG) qui reste dans la membrane.

- Rôles du DAG:

* c'est un précurseur de l'acide arachidonique (cf cours sur les prostaglandines)

* il active la protéine kinase C en association avec le Ca fixé sur la calmoduline (PKC : protéine kinase calcium-dépendante). La PKC activée phosphoryle des protéines cibles sur leurs résidus sérine ou thréonine et régule ainsi leur activité dans le sens d'une activation ou d'une inhibition.

* La PKC peut être activée directement par les esters de phorbol (triphorbol-ester : TPA) ; ces produits extraits de l'huile de croton (un arbuste oriental) sont des inducteurs de la prolifération cellulaire; ce sont de puissants agents promoteurs des tumeurs: formation de tumeurs sur la peau du lapin par le goudron et l'huile de croton. Le TPA mime l'action du DAG (action successive d'un mutagène et d'un promoteur) .

- Le système de la PKC est un système de transduction du signal à travers la membrane indépendant de la PKA AMPc dépendante. La PKC intervient par exemple dans :

* la sécrétion d'insuline par le pancréas sous l'influence du système nerveux par l'intermédiaire de l'acétylcholine.

* l'activation plaquettaire par la thrombine, une enzyme qui joue un rôle dans la coagulation du plasma.

* l'activation de certains gènes régulateurs ou codant pour la synthèse des protéines; on explique ainsi l'action du TPA sur la prolifération ou la différenciation cellulaire.

* la régulation du pH intracellulaire car la PKC active la Na/H ATPase.

* la contraction des muscles lisses sous l'influence de l'acétylcholine

* la sécrétion d'histamine par le mastocyte : Un mastocyte est une cellule réservoir, située dans différents tissus (peau, intestin, poumon...), qui contient des substances vaso-actives comme l'histamine dans ses granules cytoplasmiques. Le mastocyte peut éclater et libérer ses granules dans la circulation quand la cellule rentre en contact avec un antigène qui est reconnu par l'organisme. L'antigène vient se fixer sur un anticorps (Ig E) présent à la surface du mastocyte. La fixation de l'antigène provoque une modification de l'extrémité intracytoplasmique de l'anticorps et l'activation d'une protéine G qui conduit à l'activation de la PKC; la PKC provoque dégranulation du mastocyte et à la libération massive d'histamine entraînant un choc allergique (ou anaphylactique, exemple de la piqûre d'abeille) .

Les systèmes d'activation de la PKC et celui de la PKA peuvent agir conjointement pour réguler l'activité de milliers de protéines intracellulaires (cross talk). Les systèmes sont organisés en réseaux (cascade de signalisation) permettant l'intégration des signaux (analogie aux microprocesseurs) provenant de récepteurs différents. L'activité de ces réseaux fait l'objet d'une régulation complexe.

2-4 Les récepteurs enzymes

Ces récepteurs assurent par eux mêmes la transduction du signal sans l'aide d'un second messenger (récepteurs de EGF, PDGF, IGF-1, NGF, insuline...). Ils n'ont qu'un domaine trans-membranaire. Ils se dimérisent lors de la fixation du ligand et s'auto-phosphorylent --> démasquage de l'activité enzymatique au niveau du domaine intramembranaire qui porte une activité enzymatique (tyrosine-kinase)

Exemple 1 : le récepteur à l'insuline est un dimère constitué d'une sous-unité α et β . L'activation aboutit à la dimérisation par l'intermédiaire de ponts disulfures.

Exemple 2 : le récepteur à l'EGF est dimérisé et autophosphorylé sur de nombreux résidus tyrosine par sa propre activité tyrosine kinase. Une des tyrosines phosphorylée est reconnue par le complexe Grb2-Sos. Ce complexe est situé à proximité de Ras (une petite protéine G monomérique) sous la membrane plasmique. Sos promeut l'échange du complexe Ras-GDP (forme majoritaire au repos) en Ras-GTP (forme activée). Ras-GTP attire Raf sous la membrane plasmique et favorise sa phosphorylation par la PKC. Raf activé phosphoryle à son tour MEK (MAP enhancing kinase ou MAP kinase-kinase). MEK activé phosphoryle MAP (Mitogen Activated Protein). MAP phosphorylé pénètre dans le noyau et phosphoryle Elk-1 ou Sap-1. Ces protéines (Ternary Complex Factors) augmentent la transcription du proto-oncogène c-fos. Il y a formation d'un complexe entre c-fos et c-jun (facteur de transcription) qui stimule la synthèse de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN (dihydrofolate réductase, thymidine kinase, thymidine synthase).

Dans de nombreuses cellules cancéreuses, le gène ras est muté et constamment activé => production non régulée de la protéine ras et activation de la prolifération cellulaire. La protéine ras doit être insérée dans la membrane plasmique par un lipide (farnésyl) pour être active ; des médicaments inhibiteurs de la farnésylation ont été développés et sont actifs sur la prolifération des cellules cancéreuses in vitro (mais malheureusement pas in vivo).

Des anticorps monoclonaux humanisés bloquent la partie extra-membranaire de certains récepteurs à l'EGF et sont des médicaments anticancéreux ciblés (herceptin pour les cancers du sein, cétuximab pour les cancers du colon et ORL). D'autres médicaments inhibent les kinases intracellulaires (Gleevec pour la leucémie myéloïde et les GIST, tumeurs gastro-intestinales).

2-5 Transduction des cytokines

Les cytokines sont des petites protéines (4 hélices α reliées par des maillons non structurés) qui règlent la prolifération, la différenciation, l'activité ou la mort (apoptose) des cellules hématopoïétiques (érythrocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes, plaquettes) et des cellules immunitaires (lymphocytes, plasmocytes, macrophages):

- interleukines (IL 1, IL2, IL3, IL 4, IL5, IL6 etc... jusqu'à IL 12) agissent sur les lymphocytes et macrophages
- le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) favorise la multiplication et la maturation des polynucléaires
- GM-CSF (granulocyte-macrophage) pour les polynucléaires et les monocytes
- érythropoïétine pour les érythrocytes
- le produit du gène c-mpl pour les plaquettes
- les interférons α , β , γ interviennent dans la défense des cellules contre les virus et possèdent des propriétés antitumorales
- les TGF α et β (tumor growth factor) interviennent dans la croissance de nombreuses cellules normales ou cancéreuses
- TNF α (tumor necrosis factor) qui intervient dans la vascularisation des tumeurs et peut faire qu'elles se nécrosent.

Les récepteurs membranaires des interleukines possèdent des chaînes communes et des chaînes spécifiques à chaque cytokine. La fixation du ligand provoque une dimérisation des chaînes du récepteur. Ce récepteur n'a pas d'activité tyrosine kinase par lui même mais provoque le recrutement sous membranaire de plusieurs types de tyrosine kinases:

*Jak1, Jak2, Jak3, Tyk qui aboutissent à l'induction transcriptionnelle de c-myc, c-fos et c-jun

* Src qui interagit avec le système Ras.

Après son activation, le récepteur est phosphorylé par des tyrosines kinases qu'il a activées; il se crée des points de fixation pour les groupements SH2 d'une tyrosine phosphatase qui éteint la transmission du signal.