



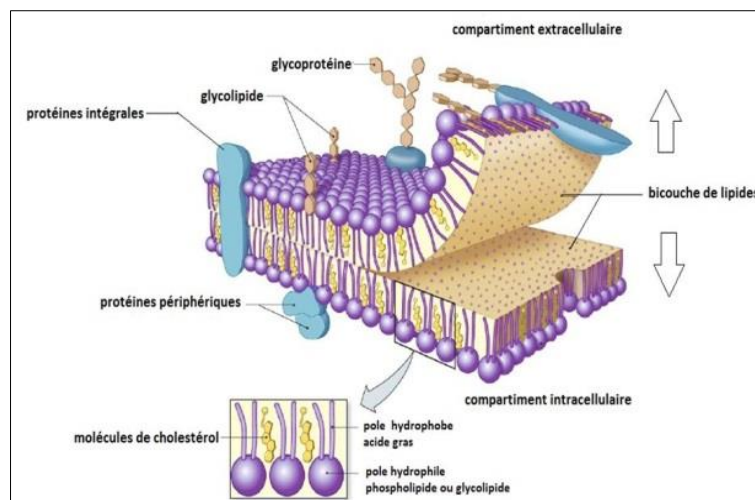
Université 8 Mai 1945, Guelma

Faculté des sciences de la nature et de la Vie et des Sciences de la terre et de l'Univers
Département de Biologie

Polycopie pédagogique

Les biomembranes

Cours destiné aux étudiants de 3^{ème} année
Licence Immunologie



Elaboré par :
Dr. BOUDEN Ismail

Année universitaire 2020/2021

AVANT-PROPOS

Le cours intitulé « Biomembrane » et son sommaire « les grands chapitres » sont en relation avec le référentiel national des unités d'enseignements fondamentales « UEF ». Ceci a été établi par le comité pédagogique national du domaine des sciences de la nature et de la vie (CPND/MERS).

Ce polycopié est destiné principalement aux étudiants en licence : Immunologie aux Sciences de la nature et de la vie. Il contient l'essentiel en biologie cellulaire. Ce support de cours apporte une aide aux étudiants et permettra d'approfondir leurs connaissances, améliorer leurs compétences en biologie cellulaire et moléculaires.

Le présent cours est réparti en quatre chapitres : organisation générale et fonctions des membranes biologiques, échanges de matière entre cellule et milieu extérieur, la communication cellulaire, la signalisation cellulaire et cancer. Chaque chapitre est subdivisé en un certain nombre de sous chapitres.

Le cours ne renvoie à aucune référence particulière, il a fait l'objet d'une compilation de plusieurs ouvrages parmi lesquels nous citons : S. Dupont, M. A. De Ménorval, R. Jacques, C. Jean-Claude, P. Roland, B. Joël, G. Philippe, C. Yves, O. Stéphanie, M. Mahé.

Afin d'enrichir et d'améliorer de façon continue ce support pédagogique, toutes les remarques seront utiles et prises en considération.

Veillez contacter :
bouden.ismail@univ-guelma.dz

Table des matières

AVANT-PROPOS

Chapitre 1 : Composition et organisation des membranes biologiques

Généralité	1
1. Composition chimique des membranes	1
1.1. Premières données expérimentales	1
1.2. Différents types de lipides membranaires	2
1.2.1. Phospholipides	3
1.2.2. Glycolipides	4
1.2.3. Cholestérol	6
1.3. Diversité et spécialisation des protéines membranaires	7
1.4. Composants glucidiques des membranes	7
2. Organisation moléculaire des membranes.....	8
2.1. Structures d'autoassemblage des lipides membranaires.....	8
2.1.1. Monocouches	9
2.1.2. Micelles.....	9
2.1.3. Bicouches	9
2.2. Le modèle actuel de la « mosaïque fluide »	10
2.3. Caractéristiques particulières des protéines membranaires	11
2.3.1. Des outils importants : les détergents	12
2.3.2. Approche expérimentale de la topographie des membranes.....	13
2.3.3. Disposition des protéines membranaires intrinsèques au sein de la bicouche.....	16
2.3.4. Cas des protéines liées de manière covalente à des acides gras ou des lipides	17
3. Propriétés générales des membranes.....	18
3.1. Asymétrie membranaire	18
3.1.1. Asymétrie liée aux lipides.....	18
3.1.2. Asymétrie liée aux protéines et aux glucides.....	19
3.1.3. Origine et maintien de l'asymétrie membranaire.....	20
3.2. Fluidité membranaire.....	22
3.2.1. Limitations à la diffusion latérale des protéines et des lipides dans les membranes biologiques.....	23
3.2.2. Facteurs influençant la fluidité.....	24

3.2.4. Régulation de la fluidité membranaire.....	25
---	----

Chapitre 2: Échanges de matière entre cellule et milieu extérieur

1. Perméabilité et transporteurs membranaires	27
1.1. Généralités	27
1.2. Données anciennes relatives à la perméabilité à l'eau et aux substances non électrolytes ..	28
1.3. Transports à travers les bicouches artificielles	29
1.4. Transport de l'eau à travers la membrane cytoplasmique	30
1.5. Transport des ions et des petites molécules.....	33
1.5.1. Considérations générales.....	33
1.5.2. Transports passifs par diffusion simple	34
1.5.3. Transports passifs par diffusion facilitée : les perméases et les canaux ioniques.....	35
1.5.4. Transports actifs primaires.....	39
1.5.5. Transports actifs secondaires	44
1.5.6. Les ionophores et leur utilisation	48
2.1. Notions d'endocytose et d'exocytose	49
2.2. Phénomènes de pinocytose	50
2.2.1. Formation des vésicules de pinocytose.....	50
2.2.2. Intervention de récepteurs membranaires au cours de l'endocytose.....	52
2.2.3. Devenir des molécules absorbées et de leurs récepteurs. Le compartiment endosomal	55
2.2.4. Phénomène de transcytose.....	56
2.3. Phénomène de phagocytose.....	57
2.4. Phénomènes d'exocytose et de bourgeonnement	58
2.4.1. Exocytose.....	58
2.4.2. Bourgeonnement	59
2.5. Passage direct de protéines à travers la membrane cytoplasmique chez les Bactéries.....	59

Chapitre 3: La communication cellulaire

1. Les différents types de communications intercellulaires	61
1.2. Jonctions perméables (ou communicantes)	61
1.3. Connexines et connexons	61
1.4. Interactions membranaire	64
1.4.1. Cadhérines.....	64
1.4.2. Protéines d'adhésion apparentées aux immunoglobulines : CAM	66

1.4.3. Sélectines	66
1.4.4. Intégrines.....	67
1.4.5. Les éphrines et leurs récepteurs	68
1.4.6. Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et TcR	68
2. Structures et mécanismes d'action des récepteurs membranaires	69
2.1. Les récepteurs membranaires	70
2.1.1. Les récepteurs canaux ioniques.....	72
2.1.2. Les récepteurs enzymes	73
2.1.3. Les récepteurs couplés aux protéines G (R-CPG)	74
2.1.4. Les récepteurs de la superfamille des cytokines	77
2.1.5. Les récepteurs des cellules B	78
2.1.6. Les récepteurs des cellules T	80
2.2. Régulation du nombre des récepteurs.....	83
2.3. Internalisation des complexes récepteurs-hormones polypeptidiques.....	84
2.4. Les différents types de messagers chimiques impliqués dans la communication intercellulaire	85
2.4.1. Les hormones	85
2.4.2. Les pro-hormones	85
2.4.3. Les facteurs de croissance.....	86
2.4.4. Les parahormones	86
2.4.5. Neuromédiateurs	86
3. Traduction membranaire des messages chimiques	87
3.1. Les seconds messagers	87
3.1.1. L'AMP cyclique.....	87
3.1.2. Le GMP cyclique	89
3.1.3. L'ADPR cyclique.....	89
3.1.4. Les inositols phosphates et le diacylglycérol.....	90
3.1.5. Les céramides.....	92
3.1.6. Le calcium.....	93
3.1.7. L'acide arachidonique et ses dérivés	95
3.2. Traduction des messagers capables de diffuser au travers des membranes.....	96
3.2.1. Les récepteurs hormonaux nucléaires	96
3.2.2. Interactions entre les différents systèmes activés par les messagers chimiques	99

Chapitre 4: La signalisation cellulaire et cancer

1. La signalisation intracellulaire ou réseau de protéines intracellulaire de signalisation	101
2. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs couplés aux enzymes	103
2.1. Signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G	103
2.2. Signalisation par les récepteurs couplés aux enzymes	104
3. Les voies de signalisation intracellulaires	105
3.1. Les voies des MAP kinases	105
3.2. La voie de PI3 kinase/Akt	107
3.3. La voie de NF- κ B	107
3.4. La voie JAK/STAT	109
3.5. La voie des récepteurs TLR	111
3.6. La voie des récepteurs intracellulaires NOD et de l'inflammasome NLRP3	111
4. La signalisation intracellulaire et cancer	114
4.1. Altérations oncogéniques des récepteurs a activité tyrosine kinase	114
4.2. Altérations oncogéniques de la voie des mitogen activated protein kinases	115
4.3. Altérations oncogéniques de la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase	117
4.4. Altérations oncogéniques des récepteurs et l'activation des kinases JAK	118
4.5. Altérations oncogéniques de la voie du TGF β	119
4.6. Altérations oncogéniques des voies des récepteurs couplés aux protéines G	120
4.7. Altérations oncogéniques de la voie des chimiokines	121
4.8. Altérations oncogéniques des récepteurs toll-like, l'interleukine 1 et le NF κ B	121
4.9. Altérations oncogéniques des récepteurs des cellules B	122
4.10. Altérations oncogéniques des récepteurs des cellules T	123

Généralité

Le rôle fondamental des membranes est d'assurer une compartimentation métabolique et chimique en permettant le maintien de compositions et de concentrations différentes dans les espaces qu'elles délimitent. Cependant, celles-ci ne peuvent constituer des barrières absolues car la vie des cellules et le fonctionnement de leurs organites nécessitent des échanges continuels et **contrôlés de matière, d'énergie et d'information**. Ces deux propriétés, qui semblent antinomiques, sont en fait dues à l'assemblage des deux types de constituants majeurs de toutes les membranes biologiques : les lipides et les protéines.

La connaissance de la composition chimique globale des membranes est ancienne tandis que celle de son architecture détaillée et du fonctionnement des diverses familles de protéines qui les constituent. La mise au point des techniques de fractionnement cellulaire, le renouvellement des approches cytologiques permettant de visualiser des surfaces, et la puissance de méthodes analytiques telles que l'électrophorèse ont permis, en quelques dizaines d'années, de se faire une idée très précise de l'organisation fonctionnelle des membranes.

Deux propriétés essentielles caractérisent les membranes : l'**asymétrie**, c'est-à-dire le fait que leurs deux faces ne sont jamais identiques (c'est vrai pour toutes les membranes connues), d'une part, et la **fluidité**, liée à une organisation relativement lâche, non covalente, des différents composants membranaires, d'autre part. Cette dernière autorise une grande mobilité moléculaire, condition sine qua non d'un nombre important de fonctions. La question de la perméabilité membranaire et des échanges sera traitée dans le chapitre 2. La diversité des membranes, brièvement présentée dans la dernière partie de ce chapitre, sera décrite dans le détail lors de l'analyse des multiples activités cellulaires et des organites qui y sont associés.

Une première façon de mesurer l'importance des fonctions membranaires consiste à examiner, par exemple, les surfaces représentées par les différents organites au sein de quelques types de cellules eucaryotiques.

1. Composition chimique des membranes

1.1. Premières données expérimentales

Dès le début du siècle, à la suite de travaux sur la perméabilité cellulaire vis-à-vis de diverses substances organiques, plusieurs auteurs ont proposé que la membrane plasmique soit essentiellement constituée de lipides. Ils avaient en effet observé une relation étroite entre le

caractère **liposoluble** d'un composé et sa capacité à pénétrer dans les cellules. Certaines substances, telles que les cétones ou les éthers (qui sont des solvants des lipides), ou d'autres qui sont elles-mêmes solubles dans ces solvants, s'accumulent beaucoup plus rapidement dans le cytoplasme que celles plus solubles dans l'eau. Ce résultat semblait paradoxal dans la mesure où les cellules présentent surtout des besoins nutritifs en composés hydrosolubles tels que les sucres ou les acides aminés. De fait, certaines exceptions (le méthanol ou l'éthylèneglycol, par exemple), conduisaient à penser que la membrane n'était pas homogène sur toute sa surface et qu'elle devait pouvoir laisser passer de tels composés, peu liposolubles.

En 1926, un autre type de résultats était obtenu par une approche chimique directe sur une catégorie de cellules qui s'avère être, depuis lors, un « système-modèle » pour l'étude des membranes : les **hématies** de Mammifères. Ces cellules, non nucléées, sont également dépourvues de tout système membranaire interne et la membrane cytoplasmique entoure un hyaloplasme essentiellement constitué d'hémoglobine. L'hémolyse de ces cellules (**Figure 1**) permet de les vider de leur contenu et de purifier aisément, après centrifugation, leur seule membrane limitante ; on obtient alors ce qu'on appelle des fantômes d'hématies. L'analyse chimique de ces structures a montré qu'elles contenaient une proportion importante de lipides (40 % de la masse), associés à des protéines et des glucides. Des expériences élégantes, utilisant la propriété propre aux lipides de constituer des monocouches moléculaires à la surface de l'eau, ont conduit à suggérer que la membrane était constituée d'une double couche lipidique. En effet, la surface de la monocouche, obtenue à partir de la totalité des lipides membranaires purifiés provenant d'une quantité connue d'hématies, correspondait à peu près au double de la surface de leurs membranes cytoplasmiques !

D'autres arguments, tels qu'une forte résistance électrique (mesurée sur des axones géants de calmar), ou une grande sensibilité des membranes vis-à-vis des agents lipolytiques : solvants, détergents, certaines enzymes (phospholipases), renforçaient l'idée qu'une composante lipidique jouait un rôle majeur dans l'organisation membranaire.

1.2. Différents types de lipides membranaires

On distingue trois catégories principales de lipides membranaires : les phospholipides, les glycolipides et les stérols ; ces derniers ne répondent pas exactement à la définition classique des lipides mais sont des molécules apparentées au plan physicochimique.

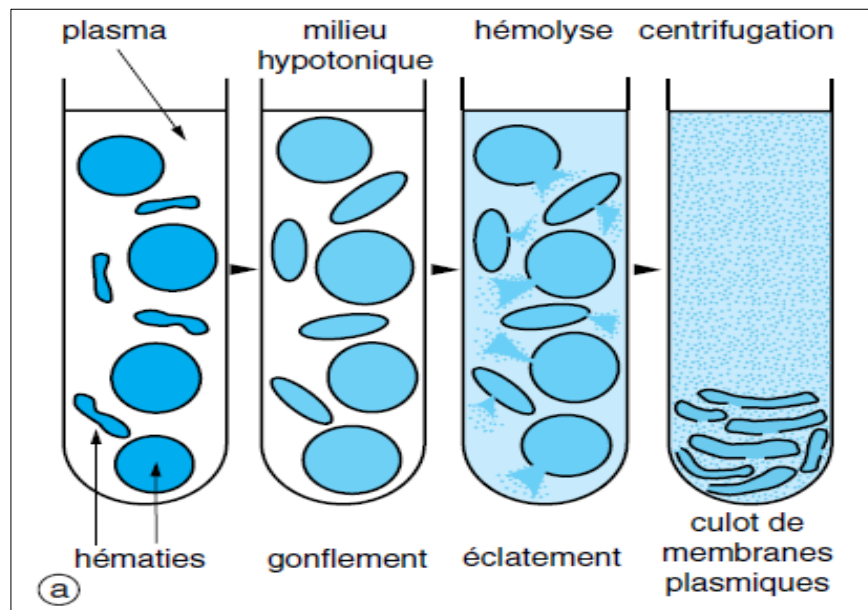


Figure 1. Protocole permettant de réaliser l'hémolyse (= lyse osmotique) des hématies.

1.2.1. Phospholipides

Ce sont des molécules complexes contenant, outre C, H et O, du phosphore et éventuellement de l'azote. L'alcool, qui est lié à un ou deux acides gras, est soit le **glycérol**, soit un alcool aminé à chaîne grasse : la **sphingosine**. On parle donc, selon le cas, de **glycérophospholipide** ou de **sphingophospholipide**.

La structure de base des premiers est la suivante:

- une molécule de glycérol : $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$;
- deux molécules d'acide gras, saturés ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$) ou insaturés ;
- une molécule d'acide phosphorique : H_3PO_4 ;
- une molécule supplémentaire liée à l'acide phosphorique.

C'est cette dernière molécule qui confère son identité au lipide en question. Les trois fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par deux acides gras et l'acide phosphorique, constituant ainsi l'acide phosphatidique. La molécule supplémentaire peut être un alcool (le glycérol, l'inositol, la choline, l'éthanolamine) ou un acide aminé (la sérine) ; ces trois derniers composés contiennent de l'azote. La molécule finale porte, suivant les cas, le nom de **phosphatidyl-glycérol**, **phosphatidyl-inositol**... (**Figure 2**). La **phosphatidylcholine**, trouvée en abondance dans le jaune d'oeuf, est la plus connue et porte aussi le nom de **lécithine** ; le diphosphatidyl-glycérol (ou **cardiolipide**), caractéristique de la membrane interne des mitochondries et de la membrane plasmique des Procaryotes est aussi une de ces molécules. On notera que la molécule supplémentaire apporte, ou pas, selon sa nature, une ou deux charges

électriques au phospholipide (en plus de celle liée à l'acide phosphorique). La principale caractéristique physicochimique de tous ces phospholipides est l'**amphiphilie**.

La composition de base des sphingophospholipides est très différente de celle des molécules précédentes mais la structure finale obtenue s'en rapproche étonnamment ; elle comprend :

- une molécule de sphingosine (alcool aminé à longue chaîne grasse) ;
- une molécule d'acide gras ;
- une molécule d'acide phosphorique ;
- une molécule supplémentaire (de même nature que celles vues plus haut et liée de la même façon à l'acide phosphorique).

La liaison amide de l'acide gras sur la fonction NH_2 de la sphingosine donne la céramide (**Figure 3**). L'encombrement et les propriétés physicochimiques de ces molécules sont identiques à ceux des glycérophospholipides vus plus haut. La sphingomyéline, qui contient de la choline, est un représentant typique de cette catégorie ; on la trouve en abondance dans le système nerveux.

1.2.2. Glycolipides

Leur organisation rappelle celle des lipides précédents, à la différence près qu'ils ne possèdent pas d'acide phosphorique ; ils sont construits à partir de glycérol (**glycéroglycolipides**) ou de sphingosine (**sphingoglycolipides**), mais la troisième fonction alcool du premier ou la fonction alcool terminale du second sont directement estérifiées par un sucre ou un dérivé de sucre qui constituent le groupement polaire « de tête » (**Figure 4**). L'identité de ces molécules est conférée par cette partie glucidique qui varie en fonction de la nature et du nombre des motifs osidiques ; les plus simples contiennent un seul ose. On distingue les glycolipides neutres (porteurs d'oses seuls : glucose ou galactose) et ceux qui sont électriquement chargés (porteurs en particulier d'acide sialique ou acide N-acétylneuraminique).

Chez les Bactéries ou les Végétaux, on ne trouve que des glycolipides neutres à glycérol, tandis que ceux à sphingosine sont très abondants chez les animaux, en particulier dans les cellules nerveuses. Parmi ceux-ci, on doit citer le **galactocérébroside** (neutre), contenant du galactose seul et trouvé presque exclusivement dans la gaine de myéline entourant les axones des vertébrés (cette gaine est formée par des couches concentriques de membrane plasmique de cellules spécialisées entrant en contact avec l'axone), et les gangliosides (chargés), qui portent des chaînes plus ou moins ramifiées riches en acide sialique ; ces derniers sont abondants dans la membrane

plasmique des cellules du système nerveux, où l'on en a identifié plusieurs dizaines d'espèces différentes.

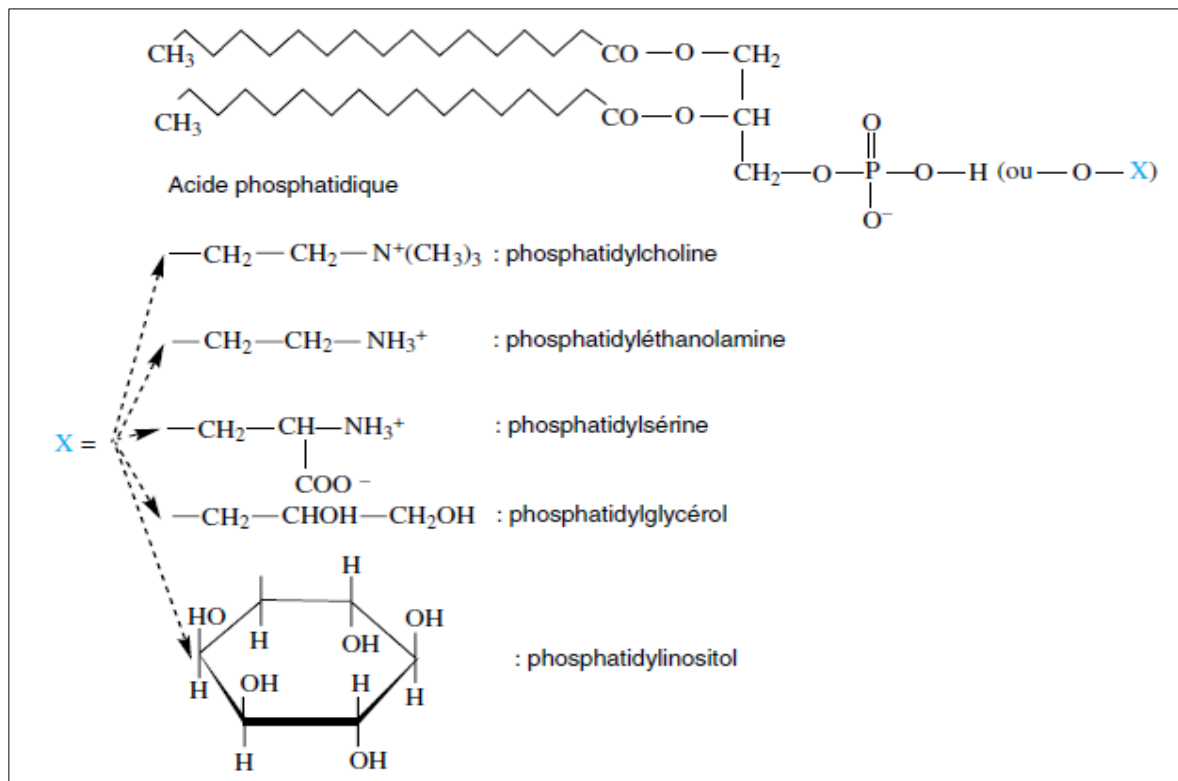


Figure 2. Formules de quelques glycérophospholipides (diacylphosphoglycérides)

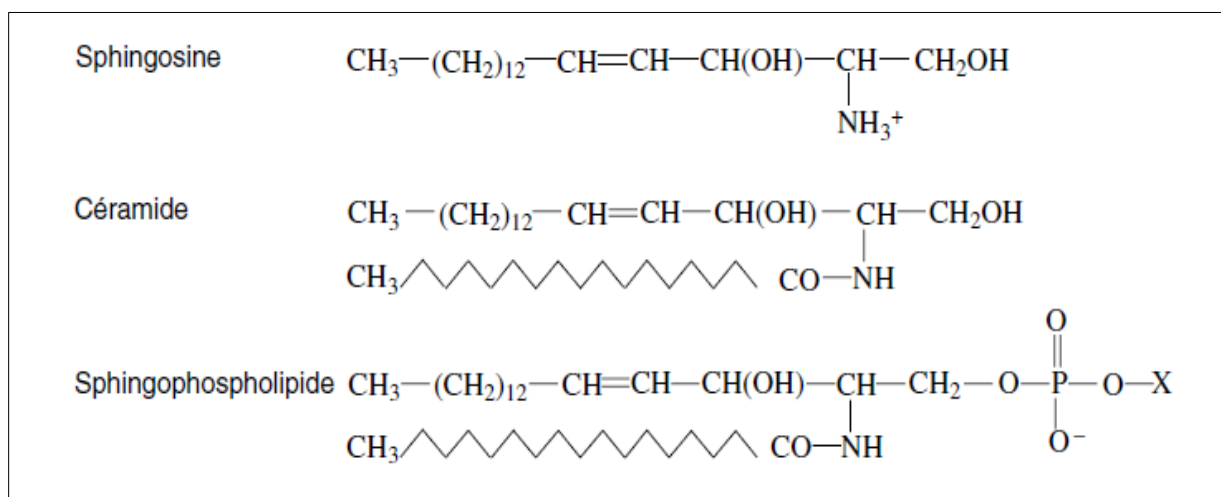


Figure 3. Formules de la sphingosine, de la céramide et d'un sphingophospholipide. Si X est constitué de choline, on obtient la sphingomyéline.

parmi les lipides membranaires car, pour des raisons physicochimiques, il joue le même rôle qu'eux au sein des membranes plasmique ou internes, où il est parfois très abondant.

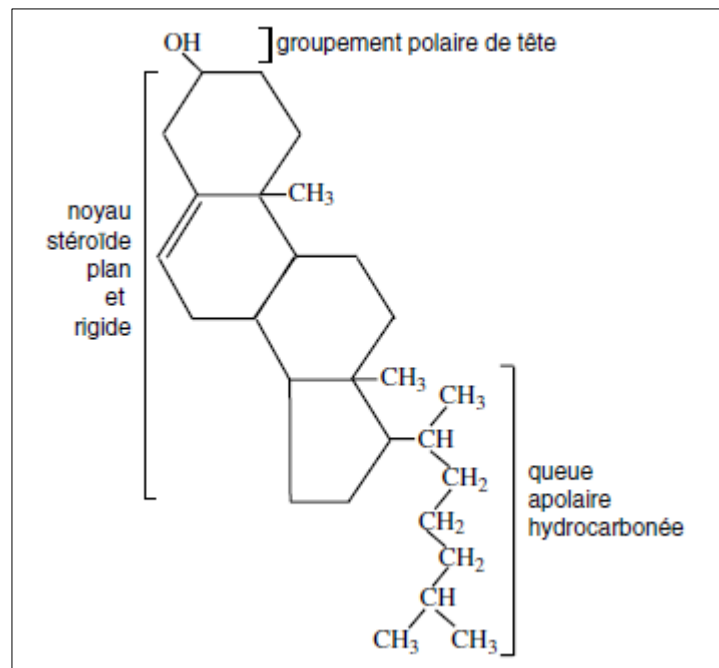


Figure 5 .Formule du cholestérol

1.3. Diversité et spécialisation des protéines membranaires

Bien que les lipides membranaires présentent une certaine variété, la diversité des membranes cellulaires et la spécificité de leurs fonctions, au moins chez les eucaryotes, sont essentiellement liées à celles des protéines qui y sont associées. Elles y jouent des rôles de **récepteurs** et de **transporteurs** (de matière ou d'information), des rôles de reconnaissance et d'adhérence entre cellules, d'accrochage aux cellules voisines ou à la matrice extracellulaire, de capture d'énergie physique (la lumière), ou tout simplement de catalyse enzymatique... Un premier aperçu de ces fonctions sera examiné, à travers quelques exemples, à la fin de ce chapitre.

1.4. Composants glucidiques des membranes

L'analyse chimique de très nombreuses membranes cellulaires montre la présence constante, bien qu'en quantité très variable, de molécules de nature glucidique. En fait, celles-ci n'existent pas à l'état libre mais sont toujours associées, de façon **covalente**, aux autres molécules constitutives de la membrane. Nous avons déjà vu que des glycolipides peuvent être trouvés dans les membranes, mais leur contribution à cet égard reste faible ; la plus grande partie de la masse des glucides membranaires est liée aux protéines. Nous verrons plus loin que les motifs

glucidiques associés à ces dernières sont souvent très nombreux et parfois de très grande taille. Les protéines de ce type sont dites **glycosylées** et se répartissent, en fonction de la masse relative de ces motifs, en **glycoprotéines** ou en **protéoglycanes** (chez ces dernières, la masse des sucres ou dérivés peut dépasser 90 % de leur masse totale).

2. Organisation moléculaire des membranes

2.1. Structures d'autoassemblage des lipides membranaires

Tous les lipides décrits précédemment ont en commun la propriété remarquable d'être **bipolaires** et **amphiphiles** : une partie de la molécule (la plus importante en volume) est très **hydrophobe**, en raison de la présence des chaînes d'acides gras ou des cycles d'hydrocarbure (cas du cholestérol), tandis que l'autre pôle est **hydrophile**, en raison de la présence de l'acide phosphorique et/ou des motifs glucidiques riches en groupements polaires, des fonctions amines ou des fonctions acides des molécules associées (choline, sérine, acide sialique...).

Toutes ces molécules peuvent être représentées par une « tête » hydrophile munie d'une queue hydrophobe, généralement constituée de deux « jambes » hydrocarbonées. Il est connu, depuis longtemps, que de telles molécules, mises en présence d'eau, se disposent de façon très précise et régulière, en raison des propriétés physicochimiques mixtes qu'on vient de décrire. Trois types de structures s'assemblant spontanément (dites d'autoassemblage.), qui sont obtenus à partir de mélanges de phospholipides purifiés et d'eau, peuvent être schématiquement décrits (**Figure 6**).

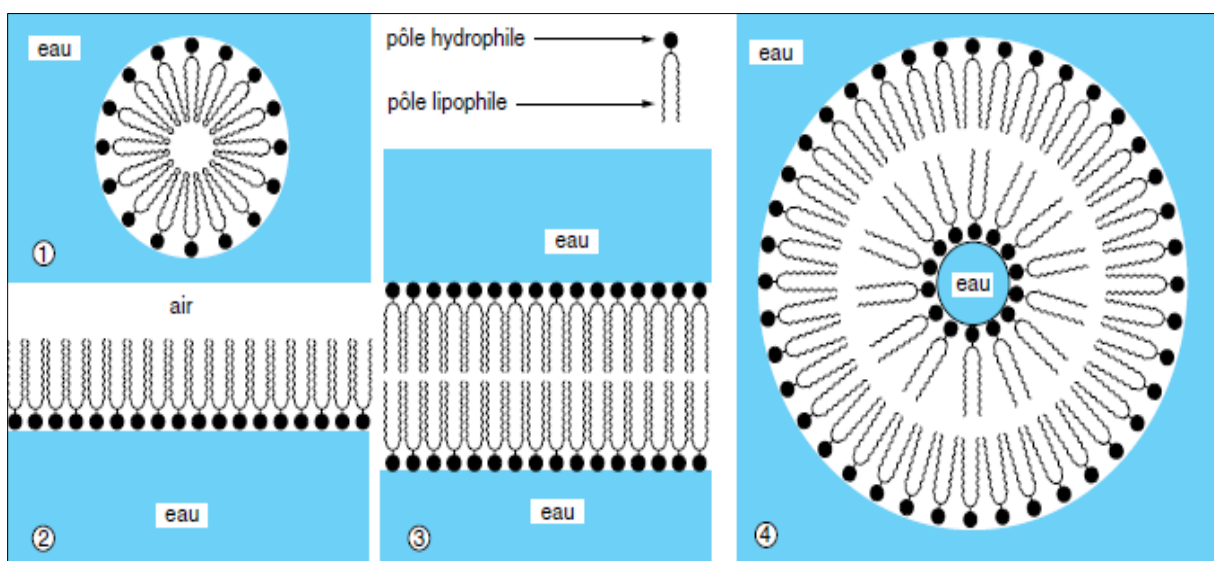


Figure.6 .Schémas des différentes structures d'autoassemblage des lipides membranaires. 1) Micelle. (2) Monocouche. (3) Bicouche plane simple. (4) Liposome unilamellaire.

2.1.1. Monocouches

Lorsqu'on dépose une goutte d'une solution organique de phospholipides (ou d'acides gras) à la surface de l'eau, ceux-ci forment, après évaporation du solvant, une couche monomoléculaire (**monocouche**) à l'interface air/eau. Ce film occupe le maximum de surface disponible et est constitué de molécules, toutes orientées de la même façon, les groupements hydrophiles plongeant dans l'eau, les chaînes hydrophobes faisant saillie au-dessus de la surface, vers l'air. L'étude biophysique de tels films artificiels est d'un intérêt considérable pour la compréhension de la structure et des propriétés des membranes biologiques (en particulier leur cohésion).

2.1.2. Micelles

Ces structures sont obtenues lorsqu'on agite violemment un mélange d'eau et de lipides. Étant insolubles, ces derniers ne peuvent se disperser individuellement ; en revanche, ils forment des microgouttelettes constituées de centaines ou de milliers de molécules, dont le coeur est formé des chaînes hydrophobes et dont la surface entre en contact avec l'eau environnante grâce aux têtes hydrophiles ; ce sont les **micelles**. Leur taille n'excède jamais quelques nanomètres de diamètre (en fait, le double de la longueur des acides gras).

2.1.3. Bicouches

Dans certaines conditions expérimentales, il est possible d'obtenir, au lieu de micelles, des structures constituées de deux couches de lipides opposées par leurs domaines hydrophobes. Ces bicouches peuvent être planes ou bien, lorsqu'on disperse mécaniquement les phospholipides dans l'eau (de façon assez violente), s'organiser en vésicules closes appelées **liposomes**.

Les bicouches planes obtenues à partir de lipides connus sont très utiles pour étudier les phénomènes de perméabilité membranaire car on sait séparer, grâce à elles, deux compartiments aqueux dont la composition en solutés est contrôlable. De plus, des bicouches asymétriques (dont la composition lipidique est différente pour les deux monocouches juxtaposées) sont aisément réalisables.

Enfin, des édifices constitués de plusieurs bicouches planes superposées, rappelant certaines structures membranaires biologiques (par exemple, les gaines de myéline des axones), ont permis de mieux comprendre leur architecture fine. Les liposomes se classent en deux catégories :

- Ceux dits **multilamellaires**, formés de plusieurs membranes concentriques limitant une cavité (ou lumière) de faible diamètre ;
- Ceux dits **unilamellaires**, dont la taille peut varier de 20 nm à près d'1 μm .

Tous ces assemblages moléculaires sont analysables par la microscopie électronique : coloration négative, cryofracture, ou par les méthodes de diffraction des rayons X. L'utilisation de mélanges de plus en plus complexes de lipides, et dont la composition se rapproche de celles des membranes biologiques, a permis de mieux comprendre l'organisation de ces dernières. La possibilité de construire des protéoliposomes, en ajoutant des protéines hydrophobes à ces mélanges, permet d'étudier la façon dont elles s'insèrent éventuellement au sein des bicouches artificielles et les propriétés nouvelles qu'elles leur confèrent. Outre leur intérêt fondamental lié à l'existence d'une cavité aqueuse interne, ce qui autorise de nombreuses études sur la perméabilité des membranes phospholipidiques, les liposomes constituent potentiellement des structures ayant de nombreuses applications de type thérapeutique et cosmétologique.

2.2. Le modèle actuel de la « mosaïque fluide »

La structure trilaminaire des membranes biologiques, qui est systématiquement vue lorsque les techniques histologiques classiques sont mises en œuvre, est donc un artefact. Son origine est, somme toute, aisée à comprendre. Les traitements chimiques imposés par la fixation et l'inclusion des échantillons conduisent à la dénaturation des protéines membranaires globulaires enchâssées dans la bicouche lipidique. Ceci a pour conséquence la perte des relations étroites établies normalement entre les deux constituants de la membrane, les protéines dénaturées étant alors exclues de la bicouche et s'étalant, de part et d'autre, pour former un sandwich. Ce qui n'avait aucune importance lorsque les analyses cytologiques se faisaient au moyen du microscope photonique, devenait crucial à l'échelle des ultrastructures et des édifices supramoléculaires vus en microscopie électronique.

La **Figure 7** décrit l'organisation des membranes telle qu'elle est actuellement admise ; il s'agit du modèle de SINGER et NICOLSON (1972). On définit diverses catégories de protéines en fonction de leurs relations plus ou moins étroites avec la bicouche lipidique.

- Les protéines dites **intrinsèques** ou **intégrales** contractent des liens forts et stables, bien que non covalents, avec les lipides. Elles traversent la bicouche et peuvent présenter des domaines dépassant, de façon importante, de part et d'autre de celle-ci : elles sont alors transmembranaires. Dans certains cas, seul un domaine dépasse significativement d'un côté ou de l'autre : elles sont dites intrinsèques externes ou internes, suivant leur disposition (par rapport à la cellule ou

à la lumière d'un organite). Certaines de ces protéines sont accrochées à la bicouche par un dispositif d'ancrage particulier qui sera examiné dans le prochain paragraphe.

- Les protéines dites **extrinsèques** ou **périphériques** n'entrent pas directement en contact avec la bicouche, mais sont accrochées par des liaisons faibles aux protéines précédentes (liaisons du type de celles stabilisant les structures quaternaires des protéines). On distingue aussi celles qui sont internes et celles qui sont externes.

L'identification de ces catégories est essentiellement opérationnelle, c'est-à-dire qu'elle a d'abord une base technique. Nous qualifierons tout de suite ce modèle de mosaïque fluide, car l'édifice ainsi construit n'est stabilisé que par des liaisons faibles (aussi bien entre les lipides eux-mêmes qu'entre les lipides et les protéines), de sorte qu'il manifeste des propriétés caractéristiques de mobilité latérale de ses constituants, de souplesse et de fluidité globales, que nous mettrons en évidence et dont nous analyserons les divers paramètres.

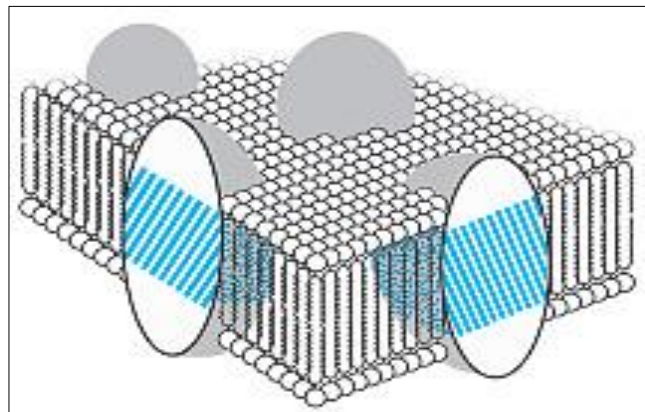


Figure 7. Modèle de la mosaïque fluide proposé par SINGER et NICOLSON en 1972

2.3. Caractéristiques particulières des protéines membranaires

Les protéines membranaires possèdent des caractéristiques physicochimiques très différentes selon qu'elles sont du type extrinsèque ou intrinsèque.

- Les protéines du type extrinsèque, en raison de leur localisation en dehors de la bicouche, ont des propriétés classiques de protéines solubles dans l'eau. Les interactions protéines/membrane (qui sont en fait de type protéine/protéine) sont facilement rompues par de simples modifications de force ionique ou de pH du milieu, qui interviennent essentiellement au niveau des liaisons électrostatiques. L'étude de la structure et des fonctions de ces protéines est conduite, après

qu'elles aient été facilement décrochées de la membrane, exactement de la même façon que pour les autres protéines cellulaires hydrosolubles.

- Les protéines du type intrinsèque sont au contraire des protéines très particulières en ce sens qu'elles doivent, pour se maintenir en place, contracter des relations stables avec une composante hydrophobe (le cœur de la bicouche phospholipidique) ; elles comportent donc elles-mêmes de larges domaines hydrophobes leur permettant de se « dissoudre » dans cette bicouche. Les méthodes classiques de purification ne peuvent s'appliquer à ces protéines car elles sont, d'une part, difficiles à extraire de la composante lipidique non hydrosoluble et, d'autre part, en l'absence de celle-ci, elles ont tendance à se dénaturer et à s'agréger, ce qui conduit à la perte de leurs fonctions et à leur précipitation.

Seul l'usage relativement récent de détergents appropriés a permis de résoudre ce double problème et d'analyser les protéines membranaires. De plus, la reconstitution *in vitro* de vésicules artificielles porteuses de ces molécules purifiées (protéoliposomes) autorise, grâce à eux,

2.3.1. Des outils importants : les détergents

Les détergents sont, comme les lipides, des molécules amphiphiles ; ils peuvent être chargés électriquement ou neutres (**Figure 8**). Ce sont des molécules naturelles : sels de Na⁺ ou K⁺ d'acides gras (savons), ou bien artificielles, dont la chimie fournit une grande variété ; elles forment naturellement des micelles en présence d'eau. On rappelle que le pouvoir dégraissant des détergents tient au fait que ces composés sont capables de piéger des molécules lipidiques au sein de leurs micelles et donc de les extraire de leur support et ainsi de les solubiliser (ce qui permet de les éliminer). Ce pouvoir général des savons est utilisé par les biochimistes pour dissoudre les bicouches lipidiques et extraire les protéines intrinsèques sans les détériorer.

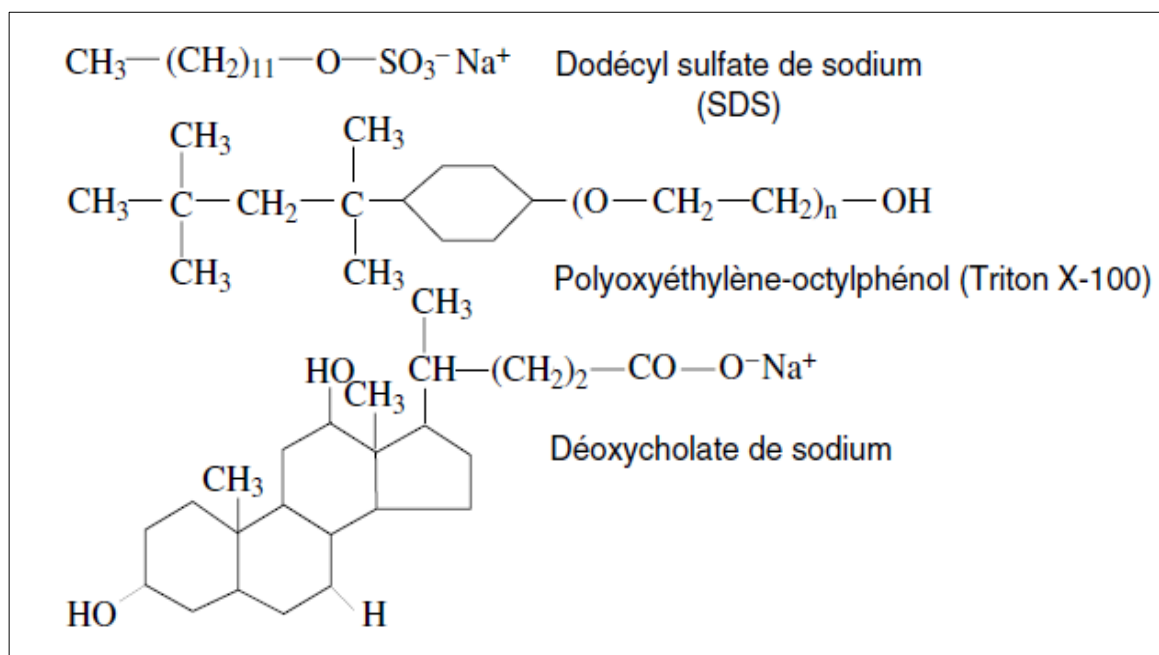


Figure 8. Formules de quelques détergents classiques utilisés dans l'étude des membranes et dans la purification de leurs protéines constitutives.

Les détergents chargés électriquement (ou ioniques, comme le SDS), sont très efficaces et solubilisent les protéines les plus hydrophobes, mais conduisent à leur dénaturation, souvent irréversiblement (c'est vrai pour toutes les protéines en général, d'ailleurs). Il existe des détergents plus doux (non ioniques), comme le Triton X-100, le Tween ou le déoxycholate de Sodium, qui se fixent seulement sur les domaines hydrophobes des protéines membranaires ; en formant un manchon localisé autour d'elles, ils les solubilisent sans les dénaturer.

De très nombreuses protéines membranaires ont pour fonction de transférer un composé d'un compartiment à un autre, situé de part et d'autre de la membrane.

Cette fonction ne peut se concevoir en dehors d'une structure et ne peut donc s'étudier en « phase soluble » et de façon simple, comme c'est le cas, par exemple pour les enzymes classiques.

2.3.2. Approche expérimentale de la topographie des membranes

L'utilisation des détergents suivie de l'électrophorèse des protéines donne accès à la composition globale des membranes, mais pas à leur architecture précise, c'est-à-dire la disposition de ces molécules par rapport à la bicouche elle-même et par rapport à l'intérieur ou l'extérieur de la cellule ou du compartiment analysés. Diverses méthodes, directes ou indirectes, fournissent des renseignements à ce sujet.

Une première technique consiste à marquer radioactivement les protéines en place dans la bicouche au moyen d'un système enzymatique : ce système utilise une enzyme, la lactoperoxydase, capable de fixer un atome d'iode radiomarqué (^{125}I) sur un résidu tyrosine accessible, en présence d' H_2O_2 . Mis en présence d'une cellule ou d'une vésicule porteuse de protéines, ce système ne peut marquer que les résidus Tyr appartenant aux domaines externes des protéines car l'enzyme ne peut pénétrer à l'intérieur des cellules ou des vésicules ; tout résidu Tyr situé dans la bicouche ou appartenant à un domaine interne de la protéine est donc inaccessible à l'enzyme. Après le marquage, on solubilise les protéines membranaires et on les soumet à l'électrophorèse. Une autoradiographie permet ensuite de savoir quelles sont, parmi elles, celles qui possèdent un domaine externe (et possédant évidemment de la tyrosine à ce niveau). Le découpage des protéines marquées et purifiées par des protéases et l'étude des fragments obtenus complètent cette analyse en permettant de localiser exactement le ou les résidus le long de la chaîne polypeptidique.

Certains modèles favorables comme les hématies de Mammifères autorisent une étude topographique plus poussée car il est, à partir de fantômes de ces cellules traités par un protocole approprié, possible d'obtenir des vésicules retournées (**Figure 9**). Le marquage de ces vésicules retournées par la lactoperoxydase, et l'analyse des protéines radioactives permettent donc d'identifier les protéines transmembranaires (accessibles des deux côtés de la membrane par le marquage) et celles qui ont des domaines seulement tournés vers l'intérieur de la cellule.

Une approche indirecte, liée au développement récent des techniques du génie génétique et à la multiplication des séquences de protéines qui n'ont été ni isolées ni purifiées, permet de tenter de localiser les domaines hydrophobes le long des chaînes polypeptidiques. On sait que les chaînes latérales des acides aminés sont plus ou moins hydrophobes et il est possible de quantifier ce degré d'hydrophobicité à partir d'études biophysiques directes ou bien, par analogie, à partir d'études statistiques concernant des protéines connues (solubles ou membranaires) dont la structure tridimensionnelle a été établie.

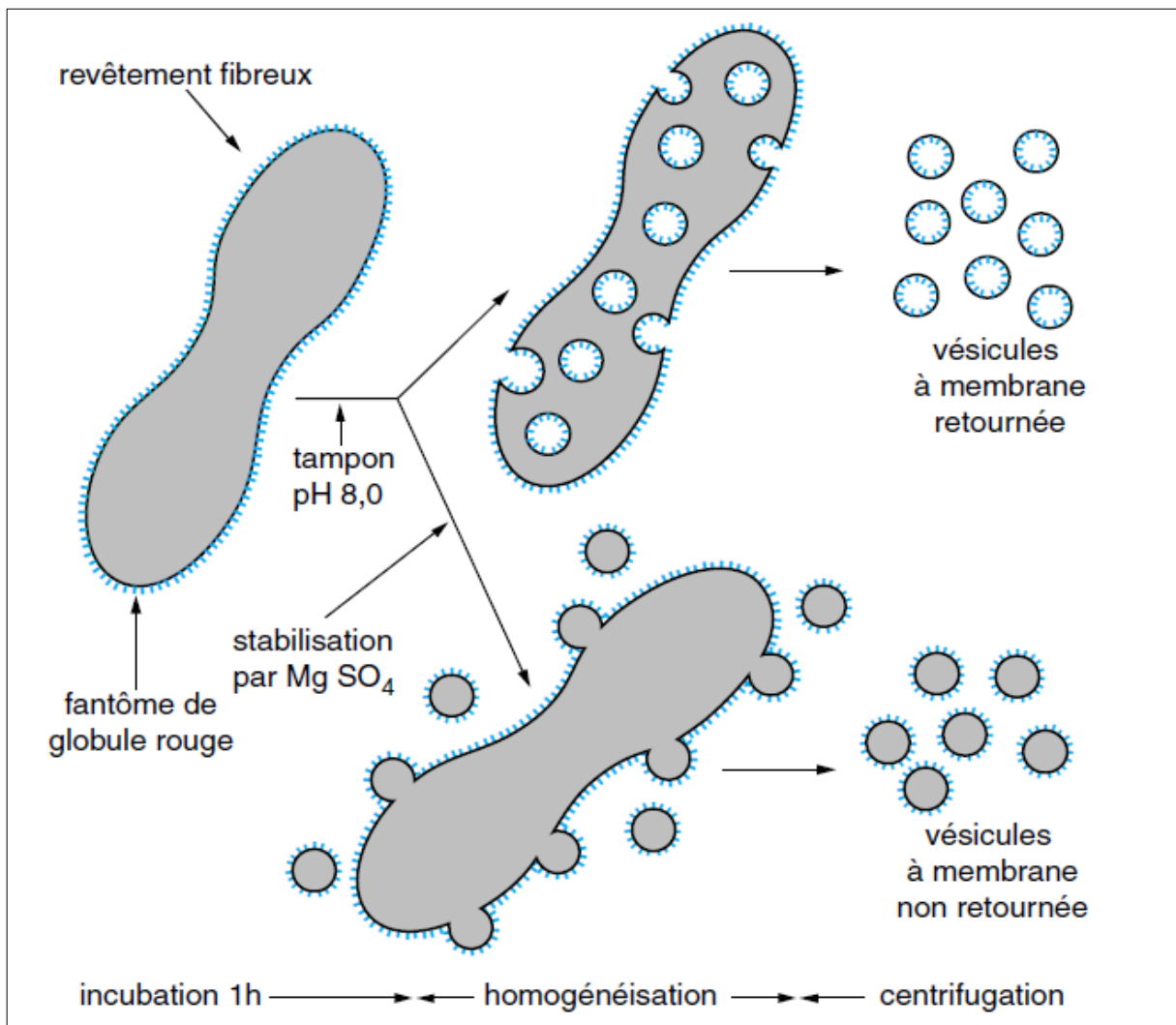


Figure 9. Protocole d'obtention de vésicules normales ou retournées, à partir de fantômes d'hématies de Mammifères.

On rappelle à ce sujet que les protéines hydrosolubles enfouissent leurs segments hydrophobes au cœur de la molécule. Une échelle d'hydrophobicité ayant été déterminée, on recherche dans la séquence des séries d'acides aminés hydrophobes successifs (une vingtaine, au moins) qui sont susceptibles de former des segments hélicoïdaux transmembranaires. Le diagramme résultant d'une telle analyse est nommé profil d'hydrophobicité ; il montre clairement la disposition générale théorique de la protéine par rapport à la bicouche (**Figure 10**). Des exemples de plus en plus nombreux de protéines analysées par diverses techniques (diffraction électronique, diffraction des rayons X, mesures spectroscopiques...) démontrent le caractère prédictif de cette approche.

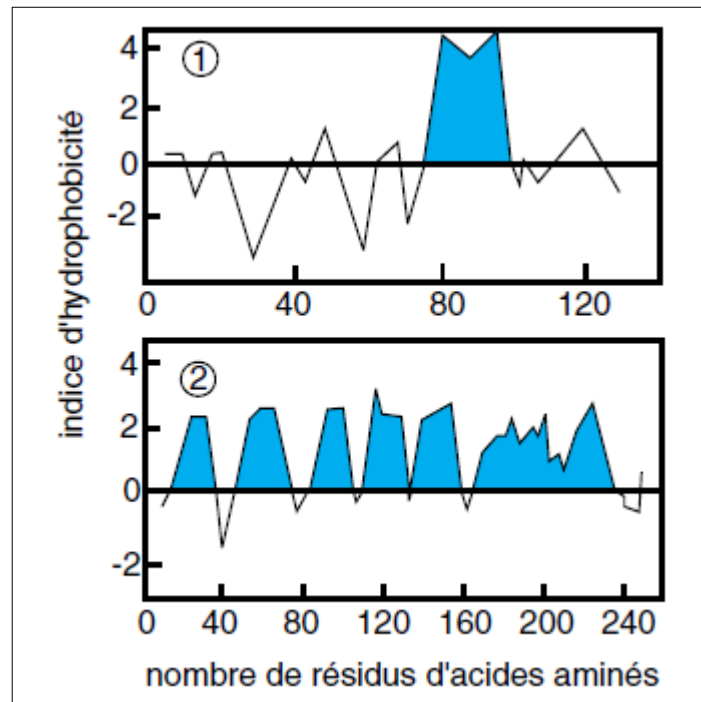


Figure 10. Profils d'hydrophobicité de deux protéines membranaires (1) La glycophorine : protéine à un seul segment hydrophobe. (2) La bactériorhodopsine : protéine à 7 segments hydrophobes.

2.3.3. Disposition des protéines membranaires intrinsèques au sein de la bicouche

La structure tridimensionnelle des protéines est constituée à partir de deux types de structures élémentaires : l'hélice α et les chaînes (ou feuillets) β . On rappelle que ces motifs sont stabilisés par des liaisons H établies entre les groupes $-\text{CO}$ et les groupes $-\text{NH}$ des liaisons peptidiques. Les protéines membranaires doivent maintenir des liens forts avec un environnement hydrophobe et nous venons de voir que ceci est très souvent réalisé grâce à des segments entiers constitués d'acides aminés eux-mêmes hydrophobes. Il a été établi que ces segments adoptent au sein de la bicouche une disposition en hélice α dont l'avantage thermodynamique est de maintenir vers l'extérieur les résidus hydrophobes et d'immobiliser vers l'intérieur les groupes $-\text{CO}$ et $-\text{NH}$ (eux-mêmes polaires) sous forme de liaisons H. L'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche (les deux chaînes « grasses » opposées des acides gras) mesurant environ 3 nm, on calcule aisément que ceci représente 20 acides aminés. Un tour d'hélice α , en effet, un pas de 0,54 nm pour 3,6 résidus. La démonstration de l'existence de segments d'une telle longueur a été régulièrement établie dans les protéines membranaires.

Certaines d'entre elles ont un seul segment de ce type et un domaine de chaque côté de la membrane : elles sont dites bitopiques ou « à traverser unique » ; d'autres traversent plusieurs fois

(n) la bicouche et présentent donc $n+1$ domaines hydrophiles : elles sont dites polytopiques ou « à traversées multiples ». Divers exemples sont illustrés dans la **Figure 11**.

Il existe également des protéines à traversées multiples bâties sur un principe assez différent. Deux segments hélicoïdaux proches au sein de la bicouche peuvent être stabilisés latéralement par des interactions ioniques ou polaires ; cette disposition implique qu'une demi-hélice de chaque hélice soit hydrophobe et l'autre hydrophile pour que toutes les exigences et contraintes physicochimiques soient respectées. On appelle hélice amphiphile de tels segments dans lesquels alternent, avec une périodicité adéquate, des acides aminés polaires et non polaires et qui se présentent comme des cylindres à deux faces. Des hélices jointives de ce genre sont susceptibles de constituer des sortes de canaux hydrophiles au sein des protéines intrinsèques transmembranaires. De fait, de nombreux transporteurs d'ions minéraux ou de solutés organiques sont organisés selon ce modèle.

Enfin, on peut imaginer que des feuilletts β amphiphiles puissent être construits sur ce principe dans les protéines polytopiques ; quelques cas de cette situation ont effectivement été décrits : la porine des Bactéries Gram- est un « tonneau » formé de 16 feuilletts β antiparallèles.

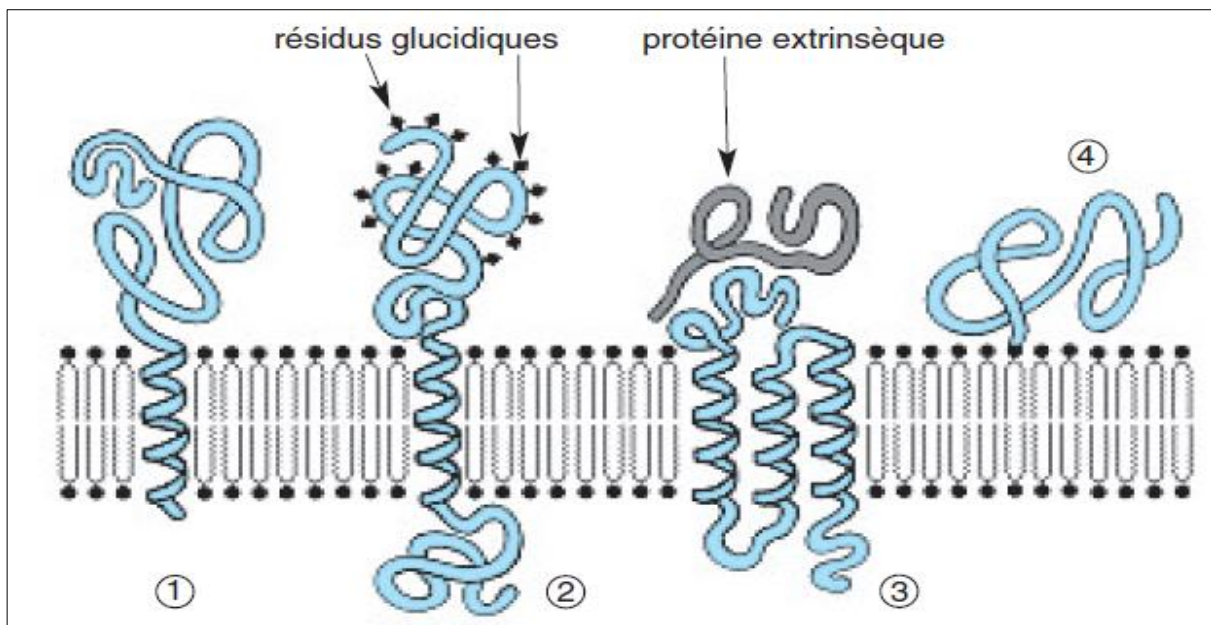


Figure 11. Divers types de protéines membranaires intrinsèques.

2.3.4. Cas des protéines liées de manière covalente à des acides gras ou des lipides

Pour terminer ce développement, il faut signaler l'existence, longtemps restée anecdotique, de protéines hydrosolubles (comme les extrinsèques) retenues à la bicouche par un acide gras ou un lipide, qui leur sont liés de façon covalente, et les ancrent littéralement dans celle-ci (elles se

comportent donc comme des intrinsèques). Ces molécules de liaison hydrophobes (acide palmitique ou myristique ; phosphatidyl-inositol) sont le plus souvent liées en position terminale du polypeptide. De nombreuses protéines ainsi ancrées dans la bicouche seront décrites lors de l'étude des processus de signalisation cellulaire. Certaines protéines authentiquement transmembranaires intrinsèques, comme celles vues plus haut, peuvent en outre renforcer leur accrochage à la bicouche par un dispositif de ce type.

3. Propriétés générales des membranes

3.1. Asymétrie membranaire

3.1.1. Asymétrie liée aux lipides

Toutes les membranes biologiques possèdent une bicouche dont la composition en lipides est différente pour chaque monocouche (ou face) ; on parle ainsi d'asymétrie membranaire ou de polarité de structure des membranes. Seuls le cholestérol et quelques rares lipides se trouvent en quantités équivalentes dans chacune d'elles, car ils ont la possibilité de basculer aisément d'une monocouche dans l'autre, en raison de l'importance relative de leur domaine hydrophobe.

Deux exemples illustrant cette notion, relatifs à des types différents de membranes de cellules animales, sont présentés à la **Figure 12**. On constate que la répartition des phospholipides majeurs est fortement asymétrique : la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine sont très abondantes sur les faces dites hyaloplasmiques (monocouche interne de la membrane plasmique et externe des vésicules intracellulaires nommées microsomes), tandis que la sphingomyéline (et la phosphatidyl-choline, dans le cas des hématies) est essentiellement présente sur la face exoplasmique des membranes. Nous verrons plus loin que la lumière d'une vésicule interne à la cellule est topologiquement équivalente au milieu extracellulaire.

À cette asymétrie liée aux molécules « supplémentaires » qui confèrent leur identité aux phospholipides, il faut ajouter celle due à une composition différente en acides gras. Le degré de saturation différent de ces derniers dans les deux monocouches entraîne une fluidité variable ; la signification physiologique de ce fait n'est pas entièrement comprise. On rappelle enfin que les glycolipides se rencontrent uniquement dans les monocouches non hyaloplasmiques. Une conséquence prévisible de cette différence de composition chimique est que les deux faces d'une membrane n'ont pas la même charge électrique car les molécules supplémentaires ne sont pas toutes ionisables de la même façon : l'inositol est neutre, la sérine est amphotère, la choline ou l'éthanolamine sont chargées positivement et l'acide sialique des glycolipides est chargé

négativement (**Figures 2 et 4**). Il faut cependant préciser que toutes ces charges électriques sont neutralisées par des ions de charge contraire.

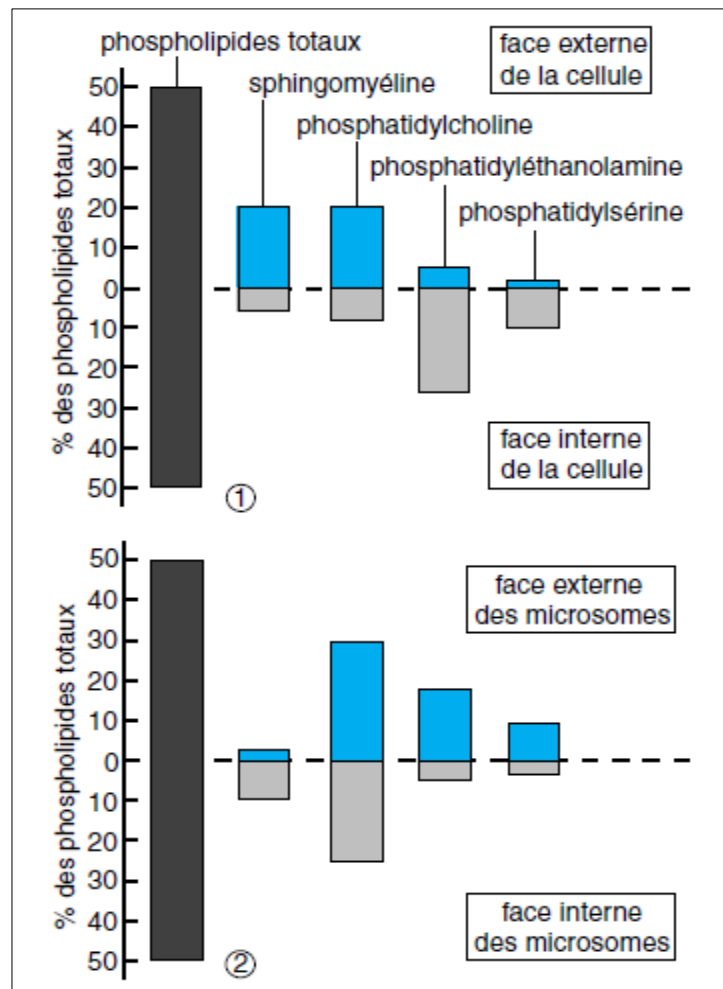


Figure 12. Diagrammes montrant la différence de composition en phospholipides des deux faces de la bicouche, pour deux types de membranes de cellules eucaryotiques. (1) Membrane cytoplasmique d'érythrocyte. (2) Membrane de microsomes de foie de rat.

3.1.2. Asymétrie liée aux protéines et aux glucides

L'asymétrie inhérente aux protéines est une caractéristique fondamentale des membranes biologiques; toutes leurs propriétés physiologiques reposent sur elle. L'analyse des rapports structure/ fonction au niveau de la membrane plasmique et des divers organites le prouvera de façon constante ; nous en aurons un premier aperçu à la fin de ce chapitre. L'asymétrie due aux protéines tient au fait que ces molécules ont une organisation et une orientation bien précises dans

la bicouche lipidique, cette dernière étant fixée une fois pour toutes lors de leur mise en place en son sein.

L'asymétrie liée aux glucides est un phénomène « secondaire », en ce sens qu'il n'est qu'un d'aspects de celle liée aux deux autres catégories de molécules auxquelles ils sont associés (les glycoprotéines et les glycolipides). L'étude de la membrane cytoplasmique, où elle est particulièrement marquée, nous fournira une illustration claire de cette polarité de structure.

3.1.3. Origine et maintien de l'asymétrie membranaire

L'asymétrie de composition chimique d'une membrane (dite transversale) est, dans une certaine mesure, le reflet des compositions des deux milieux qu'elle sépare. Cette remarque est vraie, en particulier, pour les protéines extrinsèques. En fait, cette asymétrie traduit surtout, comme on vient de le voir, des différences spécifiques de composition en lipides des deux monocouches et résulte de la disposition orientée des protéines enchâssées dans la bicouche. Cette asymétrie caractéristique doit d'abord pouvoir exister, puis ensuite se maintenir au cours du temps. On peut imaginer pour cela une origine double :

- soit elle est le résultat d'une situation figée, tous les constituants membranaires, une fois mis en place, étant dans l'impossibilité absolue de passer d'une monocouche dans l'autre : situation d'équilibre strict ;
- soit elle est le résultat d'une situation dynamique dans laquelle tout constituant peut basculer d'un côté à l'autre, mais dans le cadre d'un contrôle conduisant à un état stationnaire.

Les deux situations existent dans les cellules vivantes ; l'étude des membranes artificielles a permis de faire, une fois de plus, la part des choses dans cette question.

La possibilité de basculement (diffusion transversale ou **flip-flop**) des phospholipides ou des glycolipides dans des bicouches artificielles a été analysée dans des liposomes après marquage chimique des molécules de la monocouche externe et étude de leur passage progressif sur la face interne.

Il apparaît que ce phénomène est très rare (moins d'une fois par mois pour une molécule donnée de lipide) car les parties polaires relativement importantes des lipides membranaires ne peuvent, pour des raisons physicochimiques évidentes, franchir le cœur hydrophobe des bicouches. Seuls les stérols (le cholestérol, en particulier), le diacylglycérol et la céramide, qui ont, au contraire, des domaines polaires très réduits, peuvent basculer aisément et équilibrer passivement leurs concentrations dans les deux monocouches (phénomène de symétrisation). Au

sein des cellules vivantes eucaryotiques, les choses sont bien plus complexes et l'on doit considérer, de ce point de vue, deux types de membranes :

- celles qui sont le siège de la synthèse des lipides membranaires et de leur incorporation simultanée dans leur propre structure, grâce à des enzymes incluses dans la bicouche, et qui s'accroissent donc constamment en surface. Il s'agit du réticulum endoplasmique (lisse, pour l'essentiel) ; on parle de membrane biogénique ;
- celles qui ne fabriquent pas de lipides mais qui dérivent des premières, plus ou moins directement. Il s'agit de toutes les membranes autres que celles du réticulum : appareil de Golgi, lysosomes, membrane plasmique, organites semiautonomes... ; on parle alors de membranes non biogéniques.

Chez les Procaryotes, la membrane cytoplasmique (la seule le plus souvent représentée) appartient évidemment à la première catégorie.

Les membranes biologiques doivent, pour se maintenir à l'état de bicouche, posséder impérativement des mécanismes actifs assurant un basculement très rapide (en quelques minutes) de certains des phospholipides néosynthétisés sur la seule face hyaloplasmique. On connaît en fait au moins une protéine-transporteur (ou facteur de translocation), faisant elle aussi partie de la membrane du réticulum endoplasmique, qui assure spécifiquement le basculement d'un phospholipide à choline (la phosphatidyl-choline) de la face hyaloplasmique (où il est fabriqué et où il tendrait à s'accumuler) vers la face luminale de l'organite. Ce mécanisme de diffusion transversale facilitée (car se faisant dans le sens d'un gradient de concentration) conduit donc à une homogénéisation des concentrations de ce composé dans les deux monocouches (**Figure 13**). L'absence d'un tel transporteur pour la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine fait que ces dernières restent confinées à la face externe (**Figure 12**). Des facteurs de translocation existent aussi dans la membrane cytoplasmique des Bactéries, chez qui la synthèse lipidique a lieu sur la face de la membrane tournée vers le hyaloplasme.

Dans les membranes non biogéniques, déjà constituées, la diffusion transversale des lipides est spontanément très lente mais non nulle ; on peut calculer que, compte tenu de la durée de vie moyenne des cellules, ces membranes devraient, à terme, perdre leur asymétrie, ce qui n'est pas observé. On a démontré, dans le cas de la membrane plasmique des hématies et de celle des lymphocytes de Mammifères, qu'il existait une protéine catalysant (grâce à l'hydrolyse de l'ATP) le passage actif de la phosphatidyl-sérine et de la phosphatidyl-éthanolamine de la monocouche externe vers celle interne. Ceci explique la présence, à peu près exclusive, de ces deux lipides sur

la face hyaloplasmique de la membrane ; on parle alors de diffusion transversale active, car elle se réalise dans le sens contraire du gradient de concentration (il est à noter que le terme de « diffusion » est ici assez inapproprié). Dans ces conditions, l'asymétrie inverse liée aux deux autres phospholipides majeurs (phosphatidyl- choline et sphingomyéline), serait le résultat passif de ce phénomène, ceux-ci étant exclus de la face interne du fait de la diffusion active des deux précédents vers cette face.

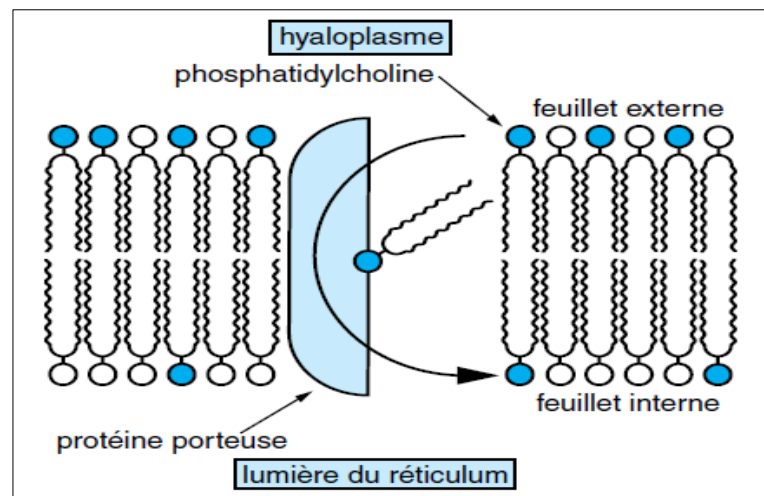


Figure 13. Schéma illustrant le principe de la diffusion transversale facilitée, au niveau du réticulum endoplasmique.

La morphologie discoïde des hématies serait également due (en partie, au moins) à ce mécanisme actif car l'appauvrissement en ATP du cytoplasme conduit au maintien de la phosphatidyl-sérine et de la phosphatidyl-éthanolamine sur la face externe. Un surplus de lipides à ce niveau serait responsable de la forme crénelée de la membrane plasmique qui est une conséquence directe de cet appauvrissement.

En ce qui concerne les protéines intrinsèques, on comprend aisément, compte tenu de leurs relations avec la bicouche lipidique et de la taille généralement importante de leurs domaines polaires, qu'il leur soit impossible de basculer dans la membrane.

3.2. Fluidité membranaire

Les membranes sont, par nature des milieux anisotropes, c'est-à-dire qu'elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques dans toutes les directions de l'espace. On peut à leur sujet parler de fluidité, mais seulement par rapport au plan qu'elles définissent. Cette fluidité traduit la possibilité, manifestée par leurs différents constituants, de bouger sur place ou de se déplacer,

parfois sur de relativement grandes distances. Cette propriété est une condition nécessaire pour de nombreuses activités cellulaires ; elle est fonction de plusieurs paramètres, propres à la membrane elle-même, mais aussi à certaines conditions extérieures.

3.2.1. Limitations à la diffusion latérale des protéines et des lipides dans les membranes biologiques

La comparaison des vitesses de diffusion mesurées dans des protéoliposomes et dans les membranes biologiques, pour une protéine donnée qui a pu être purifiée, montre qu'elle est environ dix fois plus rapide dans les protéoliposomes. Divers mécanismes de résistance à la diffusion sont envisageables :

- des interactions stables avec d'autres protéines de surface, identiques ou différentes, par l'intermédiaire de domaines polysaccharidiques (cas des glycoprotéines) peuvent conduire à la formation d'agrégats de grande taille et diffusant difficilement ;
- des phénomènes de « cristallisation » de protéines, comme c'est le cas dans la membrane pourpre des Halobactéries, dans les plaques électriques de certains poissons, pour le récepteur à l'acétylcholine, ou dans certaines jonctions intercellulaires dites communicantes ;
- des interactions indirectes, au sein même de la cellule, avec des constituants du cytosquelette, en particulier les microfilaments ou les filaments intermédiaires (points de contact focaux et jonctions intercellulaires). Certaines protéines intrinsèques entrent même en contact à la fois avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire, ce qui constitue alors un double système d'immobilisation.

Dans certains types de cellules, en particulier au sein des épithéliums, il existe des dispositifs membranaires qui restreignent la diffusion des protéines (et peut-être celle des lipides) à des territoires ou des domaines spécifiques de la surface cellulaire. Ceci est très important car c'est le seul moyen de maintenir une polarité structurale et donc une spécialisation fonctionnelle à ces cellules. Le cas le plus typique est celui des cellules absorbantes (les entérocytes, par exemple), qui doivent posséder deux « faces » ayant des caractéristiques de perméabilité différente pour qu'un transfert unidirectionnel de molécules ou d'ions ait lieu à travers elles. On parle de barrières de diffusion pour désigner ces dispositifs (comme les jonctions intercellulaires dites « serrées») qui empêchent une homogénéisation complète des constituants membranaires.

Compte tenu de tout ce qui précède, on comprend aisément que les lipides eux-mêmes ne puissent se déplacer dans ces membranes riches en protéines (dont certaines sont bloquées) aussi librement que dans des bicouches artificielles exclusivement lipidiques.

3.2.2. Facteurs influençant la fluidité

Le degré de fluidité des membranes est conditionné par des facteurs externes, parmi lesquels le plus important est la température. En effet, la conformation des chaînes d'acides gras des lipides est très sensible à l'agitation thermique ; une élévation de la température entraîne une mobilité accrue et des déformations des chaînes qui ne sont étirées au maximum et en contact étroit qu'à basse température. L'expérience courante montre bien que les corps gras sont solides à basse température et liquides au-delà d'une température caractéristique, qui est fonction de leur nature chimique ; on parle de transition de phase pour désigner ce changement d'organisation moléculaire. De même, dans les membranes, les phospholipides et les glycolipides peuvent adopter des dispositions plus ou moins serrées, et contracter des liaisons (hydrophobes) par conséquent plus ou moins stables.

À une température élevée, l'expansion latérale des chaînes d'acides gras s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la bicouche et d'une augmentation globale de sa surface ; la fluidité est alors maximale. À l'inverse, on peut considérer que les membranes biologiques ont tendance à figer aux basses températures. Il est important de garder à l'esprit que les cellules sont adaptées à vivre à une température donnée, et que la composition de leurs membranes est forcément fonction de celle-ci ; nous en verrons des exemples plus loin. Lorsque des cellules de Mammifère cultivées normalement à 37-40 °C sont brutalement portées à une température de 0-4 °C, leurs membranes deviennent instantanément solides et toutes les activités qui leur sont associées (indépendamment du ralentissement de l'activité chimique générale) sont supprimées.

La composition en acides gras des lipides membranaires et la richesse en cholestérol sont des facteurs internes déterminant de façon importante la fluidité. Tout d'abord, la longueur des acides gras entre en jeu car la solidité des interactions hydrophobes latérales entre leurs chaînes est, on le comprend aisément, une fonction directe de celle-ci. De plus, la présence ou l'absence de doubles liaisons (acides gras insaturés ou saturés) conditionne directement la conformation et la mobilité des chaînes et influe ainsi sur la fluidité ; on rappelle que la différence de comportement entre les huiles et les graisses, qui se distinguent par leur température de fusion, est basée sur cette même différence chimique. En résumé, plus une bicouche est riche en acides gras courts et

insaturés, plus elle constitue un assemblage souple et fluide, dont la température de transition « gel/liquide » est basse.

La proportion de cholestérol dans les bicouches, qui peut être élevée et atteindre parfois 25 % des lipides totaux, est un paramètre important de la fluidité. Par sa conformation (rigide au niveau du noyau tétracyclique, souple au niveau de la chaîne hydrophobe) et sa position par rapport aux autres lipides, il peut moduler la fluidité liée à ces derniers (**Figure 14**). Son effet varie en fonction de la composition globale de la membrane ; son encombrement tend à écarter les chaînes rigides d'acides gras saturés (et donc à augmenter la fluidité) et au contraire à stabiliser les chaînes insaturées, qui sont au départ moins tassées les unes sur les autres (diminution de la fluidité). Par rapport à l'action de la température, il présente aussi un effet tampon puisqu'il tend à empêcher les acides gras d'entrer en contact étroit et d'établir des liens solides lorsque la température de transition est atteinte, et au contraire à les maintenir associés aux températures élevées.

Il faut enfin rappeler que les membranes très riches en protéines, telle la membrane mitochondriale interne, semblent présenter une faible fluidité.

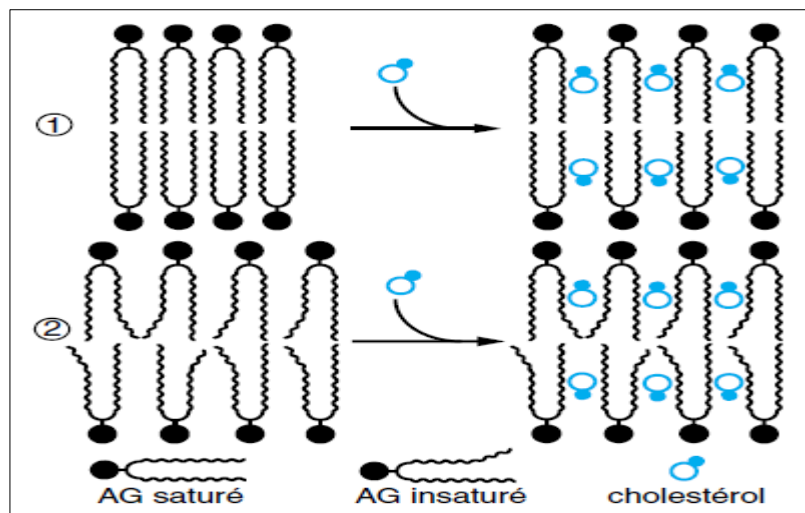


Figure 14. Importance du cholestérol dans le contrôle de la fluidité membranaire

3.2.4. Régulation de la fluidité membranaire

On a vu que toutes les cellules, y compris les plus simples d'entre elles, les Bactéries, sont capables de réguler et d'adapter la composition lipidique de leurs membranes en fonction des conditions du milieu, afin de maintenir une fluidité optimale (on parle d'adaptation homéovisqueuse). Lorsqu'*Escherichia coli*, dont la température de croissance est normalement de 37 °C, est cultivée à 27 °C, on observe que la quantité relative des chaînes hydrocarbonées

insaturées contenues dans ses lipides membranaires augmente significativement ; la fluidité est ainsi conservée. De la même façon, on observe une telle adaptation chez les Animaux poïkilothermes ou les Plantes, qui sont directement soumis aux variations de température du milieu extérieur. Le cas des Animaux supérieurs hibernants est également très remarquable à cet égard.

1. Perméabilité et transporteurs membranaires

1.1. Généralités

Les mouvements d'ions ou de molécules à travers les membranes, chez les êtres vivants, sont régis par des mécanismes spécifiques, mais ils obéissent d'abord, bien évidemment, aux lois fondamentales de la physique. La première d'entre elles est celle de la diffusion, qu'il faudra prendre en considération dans tous les mécanismes de transport qui seront décrits. Ce phénomène physique concerne les gaz et les substances dissoutes dans un liquide : les molécules de gaz ou de soluté présentent une certaine agitation spontanée, liée à l'agitation thermique générale, qui provoque leur déplacement désordonné sur place (mouvement brownien). Ceci tient au fait qu'elles sont continuellement soumises à des collisions avec d'autres molécules de gaz, de solvant ou de soluté.

Cette agitation désordonnée est à l'origine d'un flux spontané net de substance sans qu'aucune source d'énergie, autre que la chaleur, soit mise n'en œuvre. Si l'on considère le cas d'un liquide au sein duquel on distingue deux « points » contenant un même soluté, mais à des concentrations différentes, il y aura diffusion à partir de ces deux points. Le phénomène sera plus intense à partir du point où la concentration est au départ la plus élevée, mais les deux participeront au phénomène, et tout plan virtuel situé entre eux sera traversé par des molécules allant dans les deux sens. Ce système tend inéluctablement vers une homogénéisation complète, ce qui illustre le phénomène d'augmentation d'entropie, qui est la loi générale dans l'Univers.

Le système envisagé jusqu'ici est le plus simple, car il n'existe pas de barrière physique au mouvement des ions ou des molécules. Lorsqu'on s'intéresse au franchissement d'une membrane, biologique ou pas, l'analyse est plus compliquée : l'épaisseur de la membrane est généralement mal connue, et on ignore comment se passent les événements dans son épaisseur. La diffusion en son sein étant beaucoup plus lente que dans les deux compartiments délimités, on peut admettre qu'une homogénéisation rapide s'établit dans chacun d'eux (qui est donc caractérisé à tout instant par une concentration donnée). Dans ces conditions, la valeur x définie plus haut représente l'épaisseur de la membrane, au sein de laquelle le gradient de concentration dû à ΔC s'établit. On associe habituellement le coefficient D au facteur $1/x$ pour définir un nouveau coefficient, caractéristique du mélange « solvant + soluté » et de la membrane elle-même, qui a comme dimensions des $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$; on parle alors de coefficient de perméabilité, ou coefficient P (équivalent à une vitesse). Quelques exemples de valeurs caractéristiques de P pour les bicouches lipidiques artificielles sont donnés plus loin ; ces valeurs vont de 10^{-1} à 10^{-13} $\text{cm}\cdot\text{S}^{-1}$, en fonction des composés étudiés. La valeur du flux net entre deux compartiments est calculée en multipliant la

différence de concentration qui existe entre eux (en mol. M^{-3}) par le coefficient P (m. s^{-1}) ; on obtient bien une valeur exprimée en moles par m^2 et par seconde.

1.2. Données anciennes relatives à la perméabilité à l'eau et aux substances non électrolytes

Peu de temps après les premiers travaux sur les échanges d'eau à travers des membranes hémiperméables artificielles, effectués par TRAUBE en 1867, il fut montré par PFEFFER et DUTROCHET que les lois de l'osmose s'appliquaient correctement aux cellules vivantes. Les premiers résultats concernant les substances dissoutes non électrolytes (non ionisées) datent d'un siècle environ. Cet auteur utilisait comme matériel une Algue d'eau douce possédant des cellules géantes : *Chara*, dont le contenu vacuolaire pouvait être analysé précisément avec les techniques disponibles à cette époque ; grâce à ce matériel de choix, il a établi une corrélation entre une vitesse de pénétration à travers la membrane cytoplasmique et une caractéristique chimique des molécules dissoutes.

Le **tableau 2** montre qu'il existe, pour une gamme de composés dont les masses moléculaires vont seulement de 59 à 342 Da, des variations considérables de perméabilité. La masse moléculaire n'est visiblement pas le facteur important ; il existe par contre une corrélation nette entre le degré de liposolubilité des composés (traduit ici par le coefficient de partition huile/eau) et leur vitesse de pénétration dans les cellules. Overton avait ainsi observé que, de façon paradoxale, des substances comme les éthers ou les cétones, qui sont des solvants des lipides, franchissent plus rapidement la membrane cytoplasmique que le glycérol ou le saccharose. Or, ces derniers, très solubles dans l'eau, jouent un rôle physiologique au sein des cellules, contrairement aux premiers. Cet auteur avait donc émis une théorie selon laquelle la membrane plasmique était essentiellement de nature « lipoïdique », et prévu que le mécanisme de base de toute pénétration était la diffusion.

Tableau 1. Coefficients de perméabilité de quelques composés organiques vis-à-vis de la membrane plasmique d'une Algue à cellules géantes (*Chara*), en rapport avec leur coefficient de partition entre l'huile et l'eau

Substance analysée (MM)	Coefficient de perméabilité ($\times 10^5 \text{ cm. sec}^{-1}$)	Coefficient de partition huile/eau (10^{-2})
Triméthyl citrate (234)	6,7	4,7
Propionamide (73)	3,6	0,36
Glycol (62)	1,2	0,049
Méthylurée (74)	0,19	0,044
Glycérol (92)	0,021	0,007
Malonamide (102)	0,0039	0,008
Saccharose (342)	0,0008	0,003

1.3. Transports à travers les bicouches artificielles

La connaissance de la nature phospho(glyco)-lipidique du composant dit «lipoidique» des membranes et celle de l'organisation de ces molécules en une bicouche stable a conduit à l'élaboration relativement récente de modèles expérimentaux permettant d'étudier la perméabilité de membranes artificielles. On utilise à cet effet des liposomes), ou des films noirs (ou membranes noires) qui se forment au niveau d'orifices pratiqués dans une cloison séparant deux compartiments aqueux contenant des phospholipides en suspension, tels que la phosphatidylcholine. Ce dispositif permet de distinguer aisément ce qui relève de la perméation par diffusion à travers la seule phase lipidique d'une membrane de ce qui est dû à un quelconque composant hydrophile transmembranaire (**Figure 16**).

Les valeurs des coefficients de perméabilité pour la diffusion de diverses molécules et ions sont données dans la **Figure 17** ; les principaux résultats sont les suivants :

- pratiquement toutes les molécules organiques sont susceptibles de diffuser à travers les bicouches lipidiques, mais avec des vitesses très variables. Seules les molécules électriquement chargées sont presque absolument exclues du processus : leur coefficient P est inférieur à $10^{-10} \text{ cm.s}^{-1}$;
- les bicouches lipidiques sont totalement imperméables aux ions minéraux, malgré leur taille minuscule (coefficient P inférieur à $10^{-12} \text{ cm.s}^{-1}$) ;

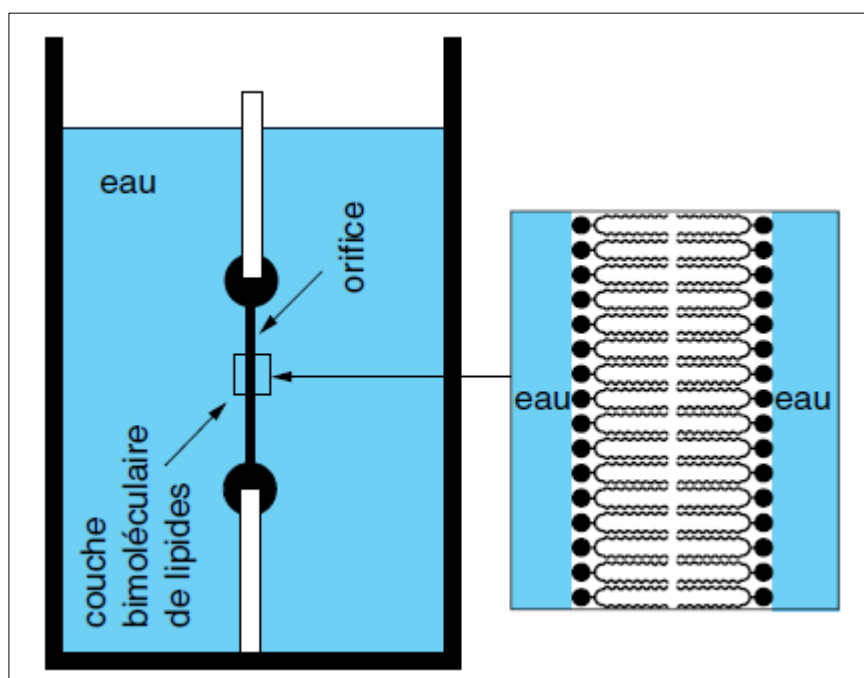


Figure 15. Réalisation d'une « membrane noire » phospholipidique au niveau d'un petit orifice séparant deux compartiments aqueux.

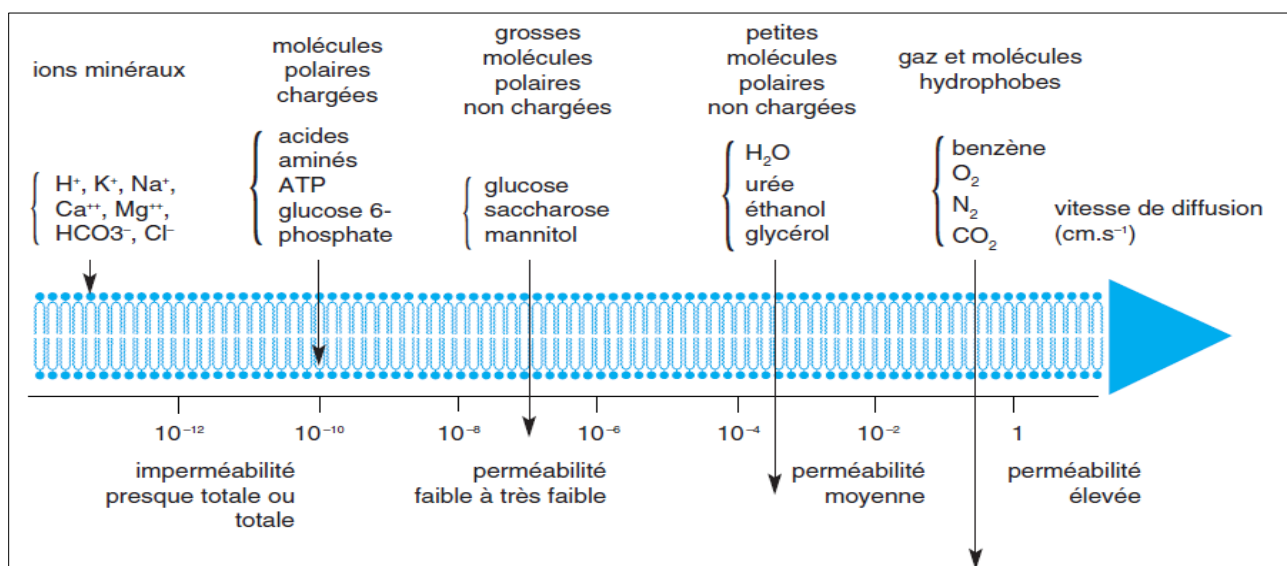


Figure 16. Diagramme montrant l'étendue des valeurs des coefficients de perméabilité (cm.s^{-1}) pour le passage de diverses catégories de molécules et d'ions à travers les bicouches lipidiques artificielles.

– deux paramètres importants sont mis en évidence pour les composés qui diffusent significativement : l'hydrophobicité et la taille des molécules.

Quelques règles de base relatives à la diffusion à travers les bicouches lipidiques peuvent donc être énoncées :

- plus une molécule est petite et hydrophobe, plus elle diffuse rapidement ;
- pour les molécules polaires non chargées, seules celles de petite taille diffusent avec une vitesse significative. Les plus grosses d'entre elles, même biologiquement importantes, sont pratiquement exclues ;
- l'eau, de façon assez étonnante, traverse aisément les bicouches (voir plus loin) ; son coefficient P est voisin de $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$.

Ces résultats confirment globalement ceux d'OVERTON et COLLANDER, et soulignent le fait que la perméation rapide de composés hydrophiles de grande taille (les sucres, par exemple) doit impliquer des mécanismes autres que la simple diffusion.

1.4. Transport de l'eau à travers la membrane cytoplasmique

La possibilité d'échanges d'eau à travers la membrane cytoplasmique, ou phénomène d'osmose, est facilement démontrée grâce aux expériences classiques suivantes.

- Mises dans une solution saline (NaCl, pH 7,4), des hématies de Mammifère ne conservent leur taille et leur forme que si elles sont en présence d'une concentration bien précise, dite isotonique (0,9 %). Pour une concentration inférieure (solution hypotonique), les hématies

gonflent et absorbent de l'eau ; c'est la turgescence, qui se termine par l'hémolyse et la fuite de l'hémoglobine. Pour une concentration supérieure, le mouvement de l'eau est inverse et les hématies se recroquevillent, car leur volume hyaloplasmique diminue (elles prennent un aspect crénelé typique) ; la solution environnante est qualifiée d'hypertonique, et on dit que la cellule est plasmolysée. Le mouvement de l'eau à travers la membrane se fait du milieu le plus dilué en substances dissoutes vers le milieu le plus concentré. La loi de l'osmose n'est qu'une simple application de la loi générale de la diffusion appliquée à l'eau : son mouvement se fait du lieu où elle est elle-même la plus concentrée vers celui où elle est la plus diluée.

• Un phénomène semblable est aisément mis en évidence dans des cellules végétales dont la vacuole est naturellement colorée par des anthocyanes, ou de façon artificielle (grâce au rouge neutre), ou qui possèdent des organites bien visibles, comme les chloroplastes. En fonction de la concentration du milieu dans lequel les cellules sont placées, leurs vacuoles se remplissent ou se vident de leur eau, ce qui se traduit par des changements d'aspect classiques. Lorsque la cellule est turgescence, son cytoplasme est plaqué contre la paroi ; lorsqu'elle est plasmolysée, son cytoplasme est décollé de celle-ci, sa vacuole plus vivement colorée (son contenu étant plus concentré) et ses organites rassemblés de façon compacte (**Figure 18**).

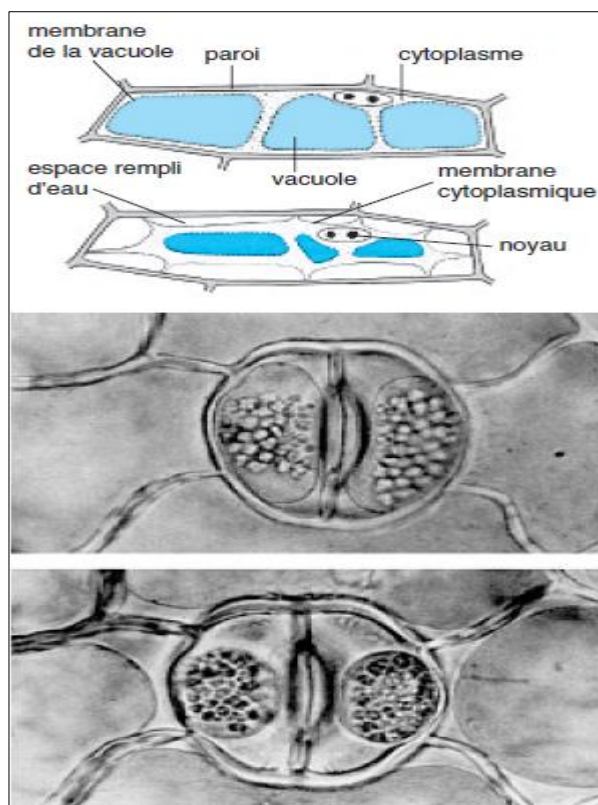


Figure 17 .Phénomènes de turgescence et de plasmolyse chez les cellules végétales.

Si les substances hydrophobes franchissent aisément les membranes biologiques, en se dissolvant dans la bicouche, la structure de ces dernières paraît en revanche peu propice aux échanges d'eau ; en raison de ses propriétés physicochimiques, elle semble a priori devoir être exclue de la bicouche hydrophobe. Aussi longtemps que l'on a imaginé cette structure continue, la question des échanges d'eau a été difficile à résoudre : des pores aqueux étaient supposés perforer la bicouche, leur taille étant considérée comme trop petite pour pouvoir être vus, même en microscopie électronique. Cependant, on a appris depuis deux choses importantes à cet égard :

- les bicouches phospholipidiques artificielles, complètement dépourvues de protéines, sont légèrement perméables à l'eau. L'agitation moléculaire déforme sans cesse les chaînes aliphatiques des acides gras qui rompent momentanément leurs interactions hydrophobes, et ainsi les molécules d'eau, en raison de leur petite taille et de leur absence nette de charge, peuvent se frayer un chemin entre elles ;
- les bicouches lipidiques naturelles sont traversées par des protéines intrinsèques transmembranaires servant de lieu privilégié de diffusion des molécules d'eau (**diffusion facilitée**).

Le rôle des protéines dans les échanges d'eau a été mis en évidence sur un modèle biologique simple : celui de la vessie de grenouille soumise à l'hormone antidiurétique. Cet organe est constitué par un épithélium simple doublé par une lame basale à fonction de filtration. Avec cette fine membrane, représentant en fait deux membranes plasmiques, on peut construire un dispositif expérimental permettant d'étudier les échanges d'eau se réalisant à travers elle. En présence d'hormone antidiurétique, le flux d'eau qui traverse l'épithélium est considérablement augmenté ; le sens de ce flux est tel que, in vivo, le mouvement d'eau conduit à récupérer le liquide de la vessie, ce qui diminue la diurèse. Si une analyse cytologique des membranes est menée en parallèle de ces expériences, au moyen de la technique de cryodécapsulation, on note une corrélation étroite entre l'intensité du flux aqueux et la disposition des protéines intrinsèques, visualisées par des granules à la surface de la bicouche. Lorsque le flux est faible, ces protéines apparaissent éparses et régulièrement réparties ; lorsqu'il est élevé, sous l'action de l'hormone, les protéines sont regroupées en paquets serrés. Il est clair que le rapprochement de protéines transmembranaires peut favoriser considérablement, sinon provoquer, le passage des molécules d'eau.

Depuis une quinzaine d'années, on sait que des protéines transmembranaires forment des canaux assurant un transport passif, mais très spécifique de l'eau (excluant celui des ions ou des métabolites), à travers la membrane plasmique. Ces protéines, collectivement nommées

aquaporines, se rencontrent aussi bien chez les Animaux que chez les Végétaux. Chez les premiers, on les trouve en abondance dans la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires connus depuis longtemps pour être particulièrement perméables à l'eau, tels que les hématies ou les cellules des tubules proximaux du rein (dans les néphrons) ; chez les seconds, on les trouve aussi dans la membrane de la vacuole (tonoplaste). L'étude de la structure des gènes et l'établissement des profils d'hydrophobicité correspondant à ces petites protéines originales (28 kDa) suggèrent qu'elles comportent 6 hélices α transmembranaires.

1.5. Transport des ions et des petites molécules

1.5.1. Considérations générales

Les bicouches phospholipidiques étant diversement perméables aux petites molécules et parfaitement imperméables aux ions minéraux ou organiques, des mécanismes spécifiques de perméation doivent être mis en œuvre pour assurer efficacement leur transport ; ce sont en fait des **protéines porteuses** ou des **canaux protéiques** qui en sont chargés. Tous les systèmes de transport connus (canaux, perméases, pompes, etc.) sont constitués de protéines intrinsèques, transmembranaires et à traversées multiples, formant une voie continue à travers la bicouche. L'orientation de toutes ces protéines, au sein de cette dernière, est donc fondamentale afin qu'elles assurent convenablement leur fonction de transfert orienté de solutés ; la question de leur mise en place dans la membrane est traitée lors de l'étude du réticulum endoplasmique rugueux. Avant de les présenter en détail, il est bon de définir quelques termes relatifs aux modalités d'échange à travers les membranes :

- lorsqu'un seul composé est transporté, on parle d'**uniport** ;
- lorsque deux solutés (ou plus) sont transportés simultanément (phénomène de **couplage**), on parle de **cotransport** ;
- lorsque le transport de deux solutés se fait dans le même sens, on parle de **symport** ; s'il se fait dans des directions opposées (échange), on parle d'**antiport**.

Par ailleurs, il faut envisager deux situations différentes, selon la nature des molécules ou des ions transportés. Dans le cas des molécules non chargées, la loi physique première déterminant le sens du transport est celle de la diffusion. Ce mouvement spontané ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieure et se fait du compartiment le plus concentré vers le compartiment le plus dilué ; on dit que le mouvement s'effectue dans le sens du **gradient de concentration**. Les cellules peuvent cependant s'opposer à la diffusion en consommant de l'énergie, généralement sous la forme d'une réaction d'hydrolyse de l'ATP, hautement exergonique. Elles sont ainsi susceptibles de transporter des ions ou des molécules à contre-courant du mouvement lié au simple gradient de

concentration, grâce à un mécanisme que l'on nomme pompage. Sur la base de cette distinction fondamentale on décrira des mécanismes de transport passif, ou spontanés, et des mécanismes de transport actif, nécessairement couplés à une source d'énergie.

Quand il s'agit de substances dissoutes électriquement chargées (ions), il faut prendre en compte, en plus de leur concentration, la différence de potentiel électrique existant entre les deux points. De façon générale, il existe une différence de potentiel de part et d'autre de toutes les membranes plasmiques : l'intérieur des cellules est négatif par rapport à l'extérieur. On comprend donc que les ions chargés (+) soient attirés par l'intérieur des cellules et que les ions chargés (-) soient repoussés vers l'extérieur ; dans les deux cas, ces ions tendent de toute façon à franchir la membrane plasmique. Le mouvement de tout ion à travers un pore ou un canal est couplé à ce qu'on appelle le gradient électrochimique de cet ion ; ce dernier se déplace à la fois en fonction de la différence de concentration existant de part et d'autre de la membrane et du champ électrique qui la caractérise. Si les deux forces s'exercent dans des directions opposées, le flux ionique net atteindra une valeur nulle lorsque le potentiel de membrane aura atteint lui-même une valeur telle que la force électromotrice de l'ion sera exactement équilibrée par celle due à son gradient de concentration.

1.5.2. Transports passifs par diffusion simple

Lorsqu'on analyse la diffusion simple de substances dissoutes non chargées, le seul paramètre à considérer, pour calculer le flux, est la concentration du soluté : dans la loi de Fick seule la différence des concentrations entre deux points donnés intervient (outre le coefficient de diffusion). On distingue classiquement deux types de transport s'effectuant par **diffusion simple** à travers la membrane plasmique (**Figure 19**) :

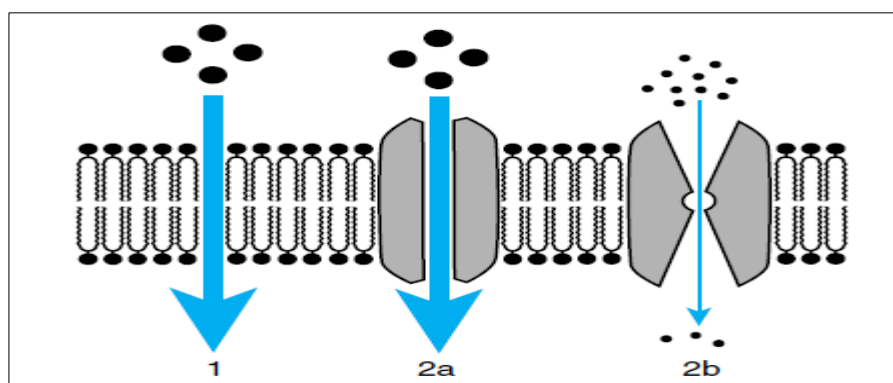


Figure 18. Représentation schématique des deux types de transports passifs impliquant la diffusion (1) Diffusion directe à travers la bicouche lipidique (dite diffusion lipophile) (2) Diffusion facilitée impliquant un canal spécifique, pour le transport de l'eau (2a : aquaporines) ou des ions (2b).

– la **diffusion dite lipophile**, qui concerne un nombre limité de molécules capables de se dissoudre dans la bicouche lipidique des membranes plasmiques, et donc de les franchir aisément : les gaz (N_2 , O_2 , CO_2), les hormones stéroïdes (apparentées au cholestérol) et les hormones thyroïdiennes, elles aussi relativement hydrophobes ;

– la **diffusion directe** de l'eau à travers la bicouche (outre celle, facilitée, impliquant les **aquaporines**).

1.5.3. Transports passifs par diffusion facilitée : les perméases et les canaux ioniques

De très nombreux composés organiques hydrosolubles franchissent la membrane cytoplasmique beaucoup plus rapidement que ne le laisse prévoir leur coefficient de perméabilité mesuré grâce aux bicouches artificielles (10^2 à 10^4 molécules par seconde). De plus, le processus de perméation mis en œuvre présente plusieurs caractéristiques ne pouvant pas être expliquées dans le seul cadre de la diffusion simple. On observe tout d'abord un phénomène de **saturabilité du transport**, c'est-à-dire que sa vitesse n'est pas toujours proportionnelle à la concentration du soluté transporté, alors que c'est le cas pour la diffusion simple. Au-delà d'un certain seuil de concentration, celle-ci reste en effet constante, et la courbe traduisant la variation de la vitesse en fonction de la concentration présente un plateau (**Figure 20**). On peut enfin démontrer qu'il existe, dans ce cas, des composés organiques capables d'inhiber le transport des molécules normalement échangées.

Ces trois observations : vitesse de diffusion élevée, saturabilité et inhibition, traduisent l'existence d'une famille de transporteurs protéiques qui agissent en accélérant la diffusion de divers composés à travers la bicouche phospholipidique : on parle alors de **diffusion facilitée** et de **perméases**. Les protéines porteuses de ce type fonctionnent passivement et il n'y a pas de consommation d'énergie ; seul un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane doit exister. Une perméase fonctionne de telle sorte qu'elle ne présente jamais simultanément le site de fixation du soluté des deux côtés de la bicouche. À la différence des canaux protéiques aqueux qui permettent un passage de soluté (ion ou molécule de petite taille) au sein d'une veine liquide, il existe dans le cas des perméases un mécanisme de liaison entre le composé transporté et la molécule porteuse. Ceci a pour conséquence un **changement de conformation** de cette dernière (ou phénomène d'allostérie, classique en enzymologie), et le passage du soluté de l'autre côté de la membrane.

La fixation et le transfert du soluté par la perméase sont des processus semblables à ceux mis en œuvre dans une réaction classique de type enzyme/substrat. La protéine possède en effet un ou plusieurs sites de reconnaissance et de fixation spécifiques du soluté ; lorsque, pour une surface

de membrane donnée, tous ces sites sont occupés, on atteint la saturation et la vitesse est maximale (V_{max}). Dans ces conditions, on peut définir une constante d'affinité (K_M) et trouver des **inhibiteurs compétitifs**, c'est-à-dire des molécules de forme voisine de la molécule à transporter et prenant sa place au niveau du site de fixation... Le formalisme classique établi en enzymologie (dit Michaelien) s'applique parfaitement à ce mécanisme de transport. La seule différence avec les enzymes est que le « substrat » n'est pas ici chimiquement modifié, mais transporté d'un compartiment à un autre.

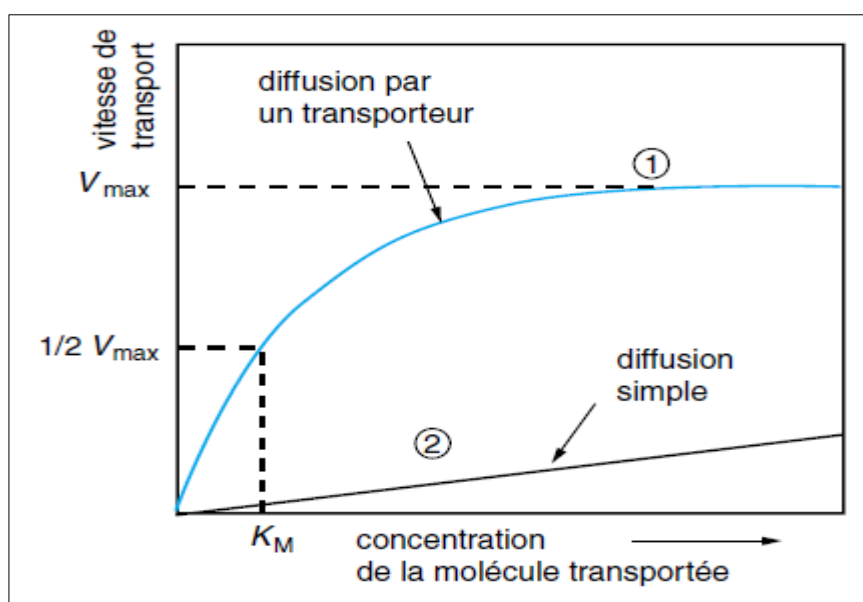


Figure 19. Comparaison entre les vitesses de transport observées dans la diffusion facilitée par une perméase, et dans la diffusion simple.

À titre d'exemple, on peut décrire le mode de pénétration facilitée du glucose dans l'hématie humaine. Le coefficient de perméabilité de cette molécule vis-à-vis d'une simple bicouche phospholipidique est voisin de $10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ alors que vis-à-vis de la membrane de l'hématie il est supérieur à $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette différence importante est expliquée par la présence d'une **perméase du glucose**, dont le rôle est très clair : le glucose sanguin est la seule source d'énergie des hématies, et elles en consomment beaucoup car, dépourvues de mitochondries, elles ne pratiquent que la fermentation (qui est énergétiquement peu efficace). La spécificité de ce transporteur (dit **GLUT1**) est élevée car seules des molécules chimiquement très voisines du glucose peuvent être transportées : D-galactose, fructose, mannose... ; d'autres composés, tels que le mannitol ou le méthyl-glucose, ne sont pas reconnus. En outre, il fait la différence entre les isomères D et L, ces derniers étant exclus du transport. Les solutés reconnus de la même famille

agissent les uns vis-à-vis des autres comme des inhibiteurs compétitifs ; la perméase ne peut en effet en prendre en charge qu'un seul à la fois au cours d'un acte de transport, son choix ne se faisant que sur la base des concentrations relatives des composés mis en compétition. Chez les Mammifères, on connaît 6 formes distinctes des transporteurs GLUT, spécifiques de certains tissus et contrôlées de manière différente ; la forme GLUT4, par exemple, spécifique des muscles et du tissu adipeux, est sensible à l'action de l'insuline.

En ce qui concerne le mécanisme moléculaire du transport, les choses ne sont pas totalement éclaircies mais on connaît maintenant l'organisation générale de ces transporteurs, qui comportent douze hélices α transmembranaires. Compte tenu de ceci, il est exclu qu'un phénomène de basculement complet de la protéine soit mis en jeu, comme on l'a cru un moment. Il se produit un changement de conformation de la chaîne polypeptidique qui «ouvre» alternativement la protéine d'un côté ou de l'autre de la membrane ; à la suite de sa fixation, le substrat à transporter se trouve donc libéré sur la face opposée. Ce mécanisme est parfois décrit par l'expression imagée dite du «ping-pong» (**Figure 21**). Le fonctionnement de ce transporteur est réversible, le sens du transport n'étant commandé que par les concentrations relatives de part et d'autre de la membrane. La plupart des cellules animales possèdent en fait ce type de molécule, grâce à laquelle elles absorbent le glucose, qui se trouve en concentration relativement élevée dans les fluides extracellulaires.

De même que pour les enzymes, on connaît des substances bloquant complètement ou partiellement, de façon non compétitive, le transport assuré par les perméases ; ce sont les poisons du transport. Dans le cas de la perméase au glucose, la **phloridzine**, par exemple, est capable de se fixer au site de reconnaissance de la protéine, en raison de sa formule qui contient une molécule de glucose, mais ce composé ne peut lui-même être transporté, sans doute à cause de sa taille importante.

Les **canaux ioniques** constituent une vaste catégorie de protéines porteuses fonctionnant sur le principe du simple canal aqueux, c'est-à-dire un pore rempli d'eau, placé en travers de la bicouche lipidique, et au niveau duquel des ions plus ou moins strictement sélectionnés peuvent diffuser. Bien que mal connue, cette sélectivité est sans doute liée à la présence, au sein du canal, d'une chicane étroite telle que seule une catégorie précise d'ions passe facilement. On pense même que ceux-ci doivent se débarrasser de la plupart de leurs molécules d'eau associées, constituant un nuage d'hydratation périphérique. Malgré cela, les canaux ioniques représentent des systèmes très efficaces d'échange puisqu'on calcule que 10^6 à 10^8 ions les traversent à chaque seconde (c'est 10^3 à 10^4 fois plus rapide que pour n'importe quelle autre protéine porteuse). Ce

type de transport est purement passif : il se fait nécessairement dans le sens du gradient de concentration et du gradient de charges électriques préexistant (gradient électrochimique), et ne consomme pas d'énergie.

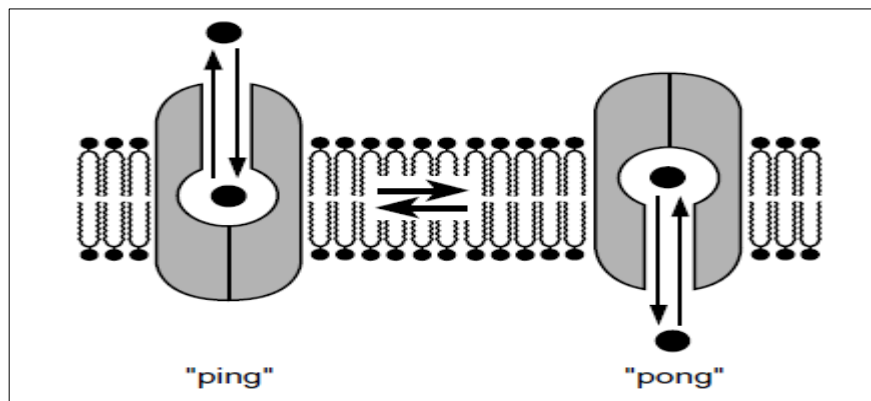


Figure 20. Modèle schématique illustrant le changement de conformation d'un transporteur de type perméase, et ses deux états alternatifs notés «ping» et «pong».

Les canaux ioniques possèdent une caractéristique fondamentale : il s'agit de «portes» en général fermées, dont l'ouverture brève est commandée par un signal extérieur. Il existe plusieurs types de canaux : 1) les canaux s'ouvrant sous l'action d'une modification du champ électrique transmembranaire (on parle de **canaux régulés par le potentiel membranaire**), 2) les canaux sensibles à la fixation d'un ligand qui peut être un ion, un neurotransmetteur, un nucléotide ou même une protéine (**canaux régulés par un ligand**), et 3) les canaux sensibles à des phénomènes mécaniques (canaux régulés mécaniquement).

Toutes les cellules animales, végétales ou bactériennes possèdent de tels canaux ioniques mais les premières sont les plus riches, et en particulier les cellules nerveuses et musculaires (**cellules dites excitables**). Une seule cellule nerveuse contient au minimum dix espèces distinctes de canaux ioniques et on en connaît plus d'une centaine, dont un grand nombre dans les cellules banales. Les canaux les plus répandus, et présents dans la membrane plasmique de presque toutes les cellules animales, sont paradoxalement des canaux toujours ouverts (non réglés) perméables au K^+ ; ce sont les **canaux** dits de **fuite du K^+** , qui interviennent dans le maintien du potentiel de membrane typique de toutes les membranes plasmiques. La **Figure 22** montre comment on peut se représenter un canal ionique à ouverture contrôlée dans ses deux états alternatifs, ouvert ou fermé.

Le plus connu de ces canaux est le **canal cationique réglé par l'acétylcholine**, rencontré dans les cellules du muscle squelettique, au niveau des jonctions neuromusculaires. Il transforme un signal chimique : la libération d'acétylcholine au niveau de la terminaison nerveuse, en un

signal électrique transitoire, par l'intermédiaire d'un mouvement d'ions. Ce signal est lui-même perçu par des canaux réglés par la tension, qui sont à l'origine d'un potentiel d'action propagé le long de la membrane plasmique de la cellule musculaire.

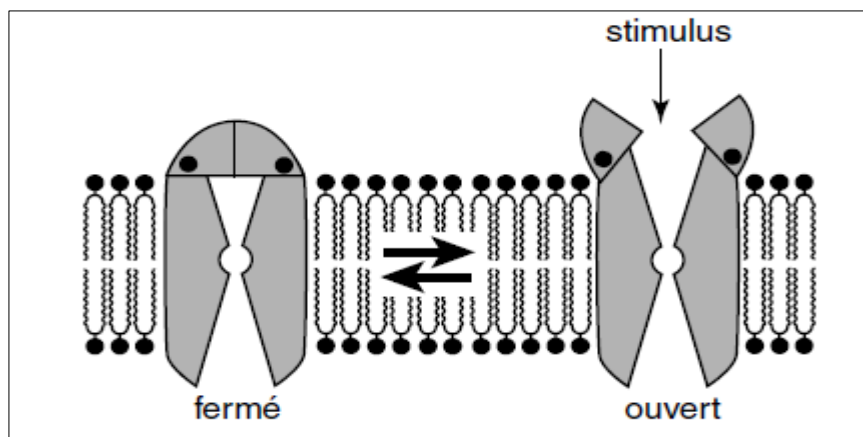


Figure 21. Représentation schématique des deux états possibles d'un canal ionique

1.5.4. Transports actifs primaires

Ils sont assurés par des complexes protéiques, appelés **pompes**, qui utilisent en général l'énergie d'hydrolyse de l'ATP, de façon directe, pour propulser uniquement des ions à travers les membranes, contre leur gradient de concentration. Il en existe un grand nombre, de types très différents, qui transportent un ou plusieurs ions ; nous étudierons tout d'abord en détail le fonctionnement de la pompe la mieux connue : la pompe Na^+/K^+ de la membrane plasmique des cellules animales.

- La pompe Na^+/K^+ des cellules animales. Le **tableau 2** montre que la concentration en ions K^+ est environ 30 fois plus élevée à l'intérieur des cellules qu'à l'extérieur, alors que la situation est inverse pour les ions Na^+ (d'un facteur 10 à 15). La raison de ces déséquilibres ioniques est due à la présence de la pompe Na^+/K^+ , située dans la membrane plasmique, qui chasse les ions Na^+ vers l'extérieur et concentre simultanément les ions K^+ dans le hyaloplasme, « luttant » sans cesse contre les gradients de concentration de ces ions. Le caractère actif de ce système transporteur est aisément démontré chez les hématies de Mammifères, en raison de leur simplicité d'organisation et de manipulation, déjà mentionnées. Tout facteur conduisant à une diminution interne de la fourniture d'ATP entraîne à bref délai la disparition du déséquilibre ionique ; l'absence de substrat énergétique (ici, le glucose), ou la présence de certaines drogues affectant le métabolisme énergétique ont le même résultat. On considère que près du tiers de l'énergie cellulaire dépensée dans une cellule animale banale sert en fait à faire fonctionner cette pompe.

Nous verrons plus loin l'importance capitale du maintien de ces gradients, en particulier celui du Na^+ , comme source d'énergie potentielle utilisable pour d'autres transports.

Tableau 2 Concentrations ioniques (ions libres seulement) typiques du cytoplasme des cellules de Mammifères et du milieu intérieur (plasma sanguin) dans lequel elles vivent.

Ions	Cytoplasme (mM)	Milieu intérieur (mM)
Na^+	10 – 15	145
K^+	140 – 150	4-5
Mg^{2+}	0,6 – 0,8	1 – 2
Ca^{2+}	$1 - 2 \cdot 10^{-4}$	1,5 – 2
Cl^-	4 – 6	110 – 120
HCO_3^-	8 – 12	28
p^-	140	9

La pompe Na^+/K^+ fut tout d'abord identifiée comme une enzyme hydrolysant l'ATP (ATPase), seulement en présence d'ions Na^+ et K^+ . Il fut montré par la suite qu'elle était inhibée par une drogue nommée **ouabaïne**, qui était par ailleurs connue pour supprimer le transport membranaire de ces ions. Sa localisation spécifique dans la membrane plasmique permit enfin de conclure que l'ATPase et la pompe supposée exister ne constituaient qu'une seule et même entité. D'élégantes expériences réalisées sur les membranes des hématies ont conduit à bien caractériser cette activité. Après hémolyse ménagée, on peut faire se « refermer » la membrane autour d'un milieu de composition contrôlée, aussi bien du point de vue ionique (on peut alors utiliser des ions radioactifs pour faciliter l'analyse) que de la concentration en ATP ou en inhibiteurs. Après centrifugation, le transfert des cellules dans un autre type de milieu est suivi de l'étude des flux ioniques. Les observations suivantes sont faites : 1) les transferts de Na^+ et K^+ sont obligatoirement couplés à l'hydrolyse de l'ATP, 2) la présence simultanée d'ions K^+ à l'extérieur des cellules et d'ions Na^+ à l'intérieur est indispensable à la mise en route des échanges, 3) la ouabaïne n'agit comme inhibiteur que si elle est à l'extérieur des cellules, où elle entre en compétition avec les ions K^+ au niveau d'un site de liaison commun, et 4) pour chaque ATP hydrolysé, 3 Na^+ sont échangés contre 2 K^+ .

Le lien précis existant entre l'hydrolyse de l'ATP et les étapes de transfert des ions est maintenant bien compris ; ce mécanisme en 6 étapes est illustré dans la **Figure 23**. L'échange de deux ions (+) contre trois ions (+), au cours d'un même événement (cotransport de type antiport),

conduit à un déséquilibre de charges électriques entre les deux faces de la membrane ; on dit que la **pompe** est **électrogénique**. C'est une composante du potentiel électrique caractérisant la membrane plasmique de toute cellule vivante (**potentiel de membrane**). En chassant les ions Na^+ qui ont tendance à entrer dans la cellule, la pompe Na^+/K^+ tend aussi à abaisser la pression osmotique interne et à assurer un volume constant au hyaloplasme. En effet, lorsque des cellules animales sont traitées par l'ouabaïne, le flux entrant d'eau augmente et elles ont tendance à gonfler (elles peuvent même éclater).

Cette pompe est un tétramère constitué de deux types de sous-unités, la plus grosse des deux (appelée α) possédant toutes les activités que l'on vient de décrire : il s'agit d'une chaîne longue de 1 000 acides aminés environ, qui traverse 10 fois la bicouche phospholipidique. Le rôle de la petite sous-unité (dite β) est mal connu ; il s'agit d'une glycoprotéine, qui a donc un domaine tourné vers l'extérieur de la cellule (**Figure 24**). La position de ce complexe par rapport à la bicouche est déterminante pour son fonctionnement polarisé. À côté de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante, il existe des pompes ayant un fonctionnement apparemment plus simple et ne transportant qu'un seul ion à la fois (uniport). Les exemples les plus connus sont ceux des pompes à calcium et des pompes à protons.

- Les pompes à Ca^{2+} . Dans toutes les cellules eucaryotiques, la concentration hyaloplasmique en Ca^{2+} libre est très faible (environ 10^{-7} M), alors que celle du milieu extérieur est 10^4 fois plus élevée. Le gradient de Ca^{2+} est maintenu grâce à une pompe ATP dépendante localisée dans leur membrane cytoplasmique, et qui a pour rôle de chasser le calcium libre intracellulaire. Cette pompe existe aussi dans la membrane d'un compartiment vésiculaire interne, de type réticulum endoplasmique lisse, appelé **compartiment de rétention du calcium**. Ce dernier semble être un constituant normal de toute cellule, mais il est particulièrement développé dans les cellules musculaires striées, où il porte le nom de **réticulum sarcoplasmique**. Dans ce cas, les pompes Ca^{2+} ATP dépendantes ont comme fonction de séquestrer et accumuler les ions Ca^{2+} au sein de vésicules spécialisées ; on connaît le rôle de ces derniers dans le déclenchement de la contraction musculaire. L'intérêt de maintenir une concentration très faible en Ca^{2+} dans les cellules banales tient au fait que cet ion est un «messenger secondaire», et tout signal conduisant à son afflux dans le hyaloplasme entraîne une cascade d'événements et l'activation d'un grand nombre de mécanismes physiologiques.

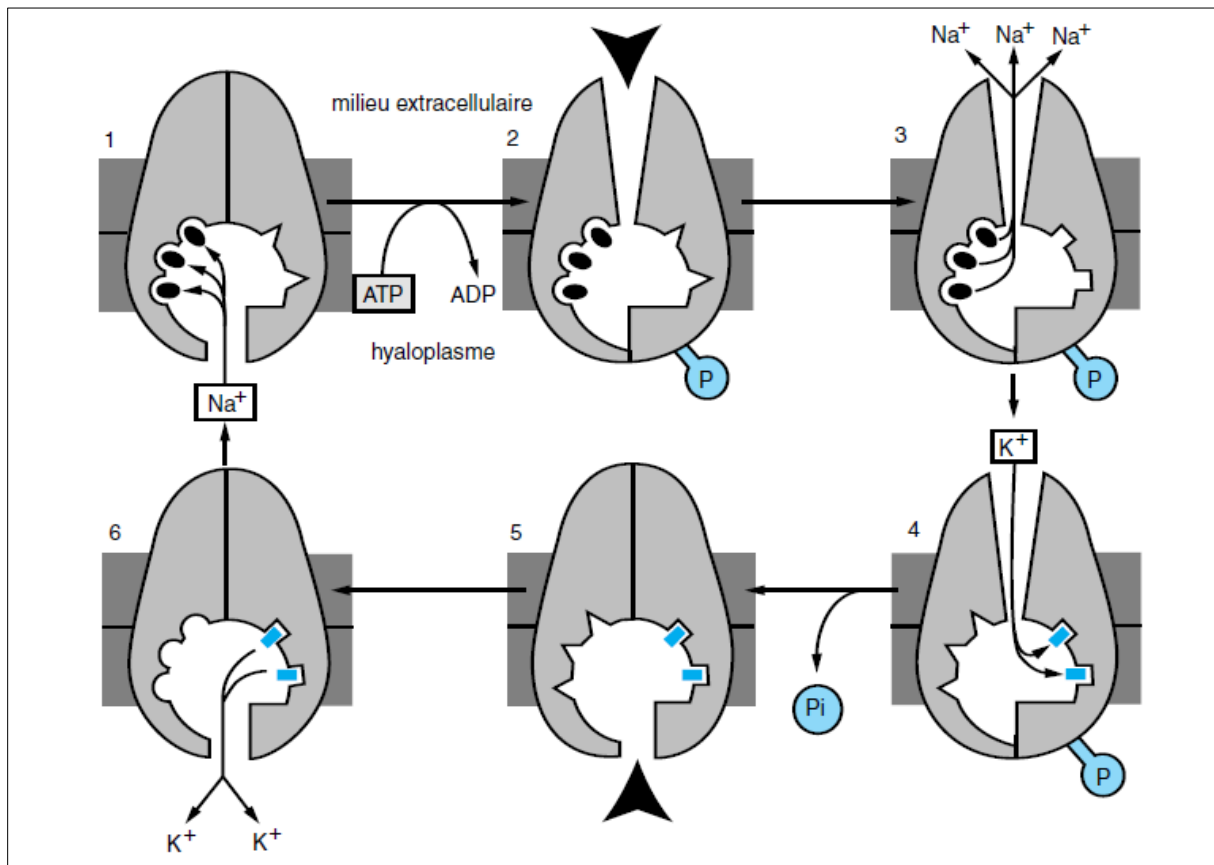


Figure 22. Modèle schématique illustrant le fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante des cellules animales.

- (1) Trois ions Na^+ se fixent sur la face interne de la protéine, qui est ouverte vers l'intérieur de la cellule. Les sites de fixation des ions K^+ sont fermés.
- (2) L'ATP phosphoryle le domaine protéique tourné vers le hyaloplasme. Un changement de conformation de la protéine a lieu, qui s'ouvre vers l'extérieur.
- (3) Les trois ions Na^+ préalablement fixés sont en conséquence exposés à l'extérieur, où ils sont libérés. Ce phénomène fait alors s'ouvrir deux sites de fixation des ions K^+ .
- (4) Deux ions K^+ se fixent à leur tour, ce qui a pour conséquence la déphosphorylation de la protéine (P_i : phosphate inorganique), et la fermeture des sites Na^+ .
- (5) Un nouveau changement de conformation, conduisant à un «basculement» en sens inverse, ouvre la protéine vers l'intérieur.
- (6) Les ions K^+ sont exposés à l'intérieur où ils sont libérés ; les sites de fixation des ions Na^+ réapparaissent. Le cycle recommence avec une nouvelle fixation des ions Na^+ et une phosphorylation par l'ATP.

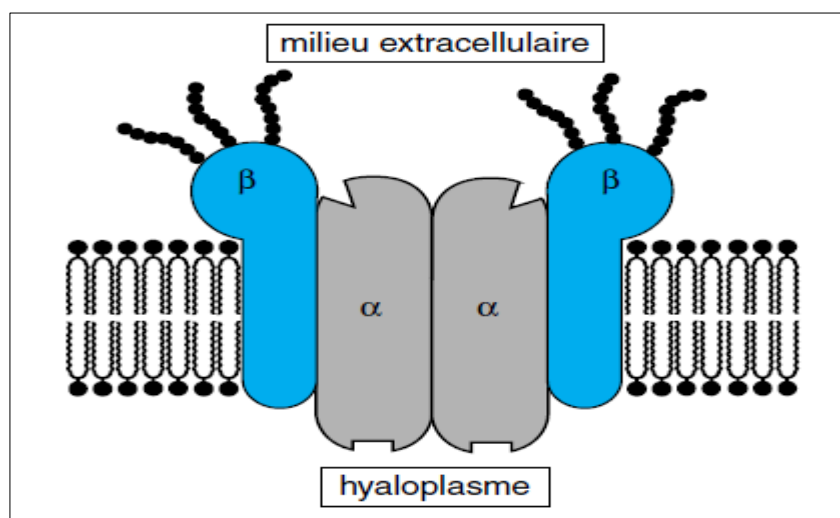


Figure 23. Organisation schématique de la pompe Na^+/K^+ ATP dépendante

- Les pompes à protons. Ces transporteurs sont rencontrés dans la membrane plasmique des cellules végétales et des Champignons, et chez quelques Bactéries ; ils permettent d'expulser uniquement des ions H^+ , grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Leur rôle physiologique, qui consiste à maintenir un gradient ionique transmembranaire, est équivalent à celui décrit plus loin pour la pompe Na^+/K^+ des cellules animales. On trouve également des pompes à protons dans le compartiment vacuolaire des Végétaux (au niveau du tonoplaste) et dans le compartiment endosomal des cellules animales (voir plus loin) ; dans ce cas particulier, les pompes fonctionnent en accumulant les ions H^+ à l'intérieur de la lumière des vésicules, qui s'acidifient rapidement. La concentration en protons y atteint plus de 100 fois celle du hyaloplasme. Cette acidification entraîne l'activation des hydrolases acides libérées dans les vésicules issues du compartiment endosomal, après fusion avec les lysosomes primaires d'origine golgienne.

Malgré l'unité de fonction qui rassemble ces différents transporteurs, les spécialistes distinguent trois grandes familles de molécules, en fonction de la disposition et du nombre de chaînes polypeptidiques, et de leur mode d'action au niveau moléculaire. Les pompes Na^+/K^+ et Ca^{2+} , qui ont une organisation très voisine et relativement simple, sont évolutivement apparentées et leurs gènes dérivent d'un même gène ancestral. En revanche, les pompes à protons appartiennent à trois types distincts et leur complexité peut égaler celle des gros complexes nommés **ATP synthétases**, trouvés par exemple dans les membranes internes des mitochondries. Ces derniers sont classés dans la famille des pompes, mais ils fonctionnent normalement en sens inverse du sens habituel, car ils fabriquent en fait de l'ATP, à partir d'un gradient de protons préexistant !

De façon générale, toutes les pompes sont réversibles ; en effet, si on impose, d'une manière ou d'une autre, un gradient ionique transmembranaire supérieur à celui qu'elles peuvent créer, elles laissent passer les ions dans le sens du gradient et fonctionnent alors en synthétisant l'ATP, et non pas en l'hydrolysant. La membrane plasmique de nombreuses Bactéries contient de gros complexes transmembranaires capables d'expulser des protons du cytoplasme en utilisant comme source d'énergie des **réactions d'oxydoréduction**. Ces complexes, qui sont typiquement des pompes, bien que non mues par l'ATP, sont semblables à ceux rencontrés dans les organites semi-autonomes : mitochondries et plastes. Il faut enfin mentionner l'existence d'une pompe à protons tout à fait unique dans le monde vivant, et qui est mue par la lumière ; cette curiosité se rencontre chez une Archéobactérie halophile : *Halobacterium halobium*.

- Les **transporteurs ABC**. Ces transporteurs, dits « ABC » pour ATP binding cassette, sont très répandus chez tous les êtres vivants, des Bactéries à l'Homme. On en a déjà identifié plusieurs centaines de formes et leur nombre ne cesse de croître. Ces protéines originales hydrolysent l'ATP pour transporter spécifiquement des ions, mais aussi des sucres, des acides aminés, des polysaccharides ou des protéines. Leur organisation générale est la suivante : douze hélices transmembranaires hydrophobes, organisées en deux ensembles, et deux domaines hydrophiles cytosoliques liant l'ATP et l'hydrolysant pour assurer un transport actif, par changement de conformation des premiers.

Chez les Mammifères, ces transporteurs sont localisés dans la membrane plasmique des cellules du rein, de l'intestin, du foie, où ils participent à la détoxification du cytoplasme. Leur surexpression dans les cellules cancéreuses pose un problème grave chez l'Homme, car ils chassent du cytoplasme les drogues utilisées en chimiothérapie, qui deviennent inefficaces. On connaît aussi un transporteur ABC localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique, et qui y importe activement les peptides issus de la dégradation des protéines réalisée par les protéasomes. C'est la première étape dans le processus de surveillance immunitaire à travers le phénomène de « présentation de l'antigène » à la surface des cellules. Un autre exemple de ces molécules est le canal chlore des cellules épithéliales bronchiques qui est non fonctionnel chez les malades de la mucoviscidose.

1.5.5. Transports actifs secondaires

Contrairement aux molécules porteuses précédentes, les transporteurs assurant un **transport actif** dit **secondaire** n'utilisent pas l'hydrolyse de l'ATP comme source directe d'énergie. Ils sont néanmoins dits actifs car ils peuvent transporter des ions ou des molécules organiques contre leur gradient de concentration ; ceci est réalisé grâce au couplage de ce transport

à celui d'un autre composé qui, lui, se déplace spontanément dans le sens de son gradient. En règle générale, ce deuxième composé, qui agit comme moteur, est un ion présentant un fort gradient de concentration (ions Na^+ , dans le cas des cellules animales, ou H^+ , dans le cas des cellules végétales ou des Bactéries), qui est entretenu, on l'a vu, par des pompes utilisant l'ATP ou des réactions d'oxydoréduction. En fait, un transporteur actif de ce type utilise une source d'énergie indirecte (ou potentielle), stockée sous la forme d'un gradient ionique.

Ce système impliquant nécessairement un co-transport, la protéine responsable doit posséder deux sites de reconnaissance : l'un pour l'**ion moteur** et l'autre pour le soluté à transporter (**Figure 25**). La fixation de l'ion moteur sur son site induit une transition allostérique de la protéine, favorisant de façon importante la fixation du soluté sur son propre site. Il faut donc bien comprendre que si le gradient ionique moteur se réduit, la vitesse de transport de l'ion co-transporté est elle-même réduite. À la limite, le système peut fonctionner dans l'autre sens si les gradients, pour une raison ou une autre, viennent à s'inverser ; le principe reste en effet le même : l'ion qui présente le gradient le plus fort propulse toujours l'ion qui a le gradient le plus faible. Ce type de mécanisme permet de transporter simultanément un ion et une petite molécule organique ou bien deux ions. On sera donc toujours amené à distinguer deux situations, selon que les transports sont de type symport ou antiport. Quelques exemples choisis dans les cellules animales, végétales ou chez les Bactéries peuvent être décrits.

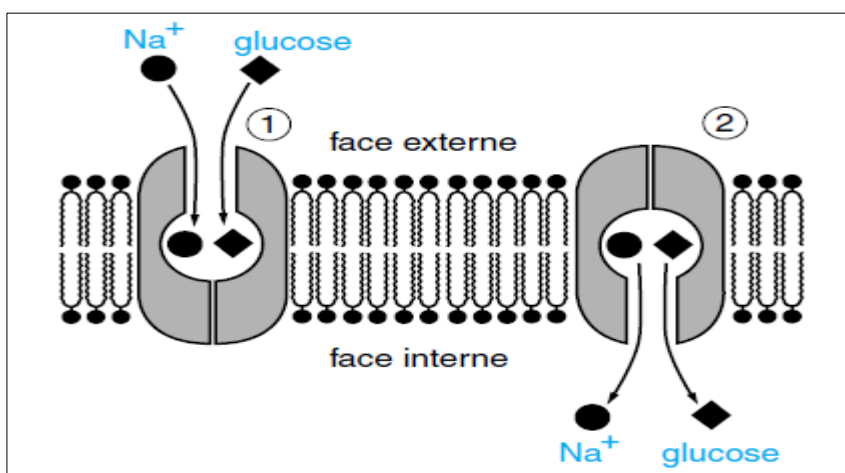


Figure 24 .Mode de fonctionnement schématique d'un transporteur actif secondaire basé sur un gradient d'ions Na^+ .

- Le transporteur intestinal du glucose. Les microvillosités des entérocytes portent dans leur membrane un transporteur spécifique, le symport Na^+ /glucose, qui utilise le fort gradient transmembranaire de Na^+ (entretenu par la pompe Na^+/K^+ ATP asique décrite plus haut), pour

faire pénétrer spécifiquement le glucose intestinal dans la cellule. La concentration en glucose dans l'entérocyte étant ainsi relativement élevée, celui-ci sort de façon spontanée, par diffusion facilitée au niveau de la membrane basolatérale, grâce à un système de perméase simple semblable à celle décrite pour l'hématie humaine (**Figure 26**). C'est de cette façon que le glucose issu de la digestion des glucides alimentaires franchit l'épithélium intestinal, et se retrouve dans le milieu intérieur. La position précise des deux types de transporteurs du glucose au sein des différents domaines membranaires de l'entérocyte est donc fondamentale, et elle constitue un excellent exemple de polarité structurale et fonctionnelle. Les jonctions serrées sous-apicales, qui unissent deux cellules voisines dans l'épithélium permettent de confiner les deux types de protéines dans leurs domaines spécifiques et jouent, en empêchant la diffusion latérale, un rôle de barrière au sein de la bicouche. La question de l'adressage précis de ces deux protéines vers leurs domaines respectifs reste posée.

De nombreux autres transporteurs à Na^+ existent dans les cellules animales (dans l'épithélium rénal, en particulier) où ils assurent l'absorption de divers métabolites : glycérol, oses, acides aminés... Ceci montre l'importance considérable du maintien du gradient de Na^+ pour l'économie cellulaire (et le métabolisme en général), et justifie l'énorme dépense énergétique effectuée par les cellules, dans ce but.

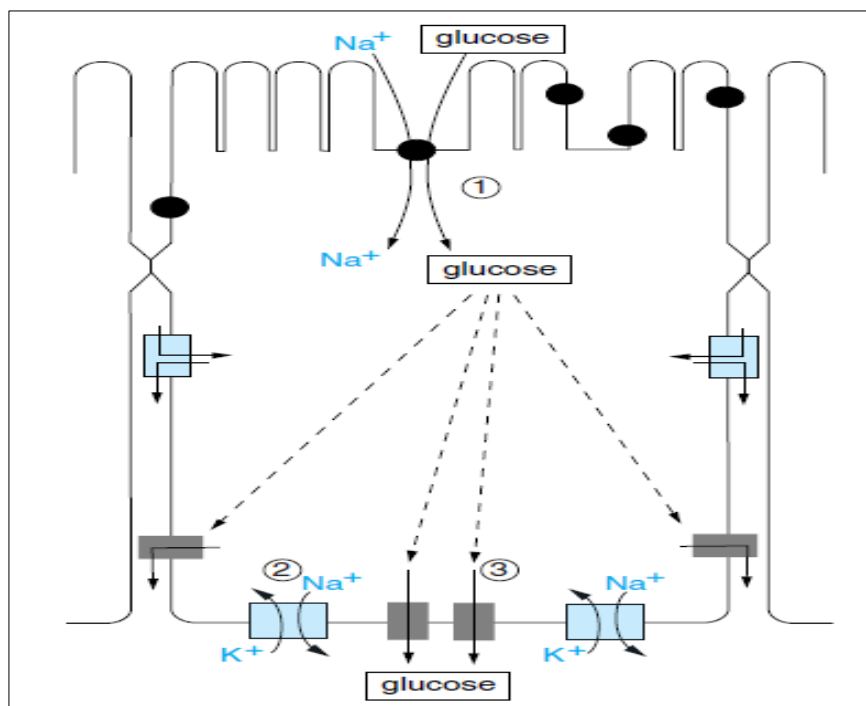


Figure 25. Schéma illustrant le transport du glucose intestinal à travers un entérocyte.

Le transporteur bactérien du lactose. Il existe, chez les Bactéries, un transporteur spécifique du lactose qui fonctionne comme le symport précédent, mais en utilisant un gradient moteur d'ions H^+ . Ceux-ci sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur car des pompes appartenant à la membrane plasmique, mues par l'ATP ou les réactions d'oxydoréduction, interviennent ici aussi ; le retour des ions H^+ vers le cytoplasme permet l'importation du lactose à raison d'un ion pour une molécule. La protéine responsable de ce co-transport est constituée d'une chaîne polypeptidique d'environ 400 acides aminés, traversant plusieurs fois la bicouche lipidique (douze aller et retour en α hélice). Un grand nombre de transporteurs actifs de ce type ont été mis en évidence chez les Bactéries : ils servent aussi à importer les sucres, les acides aminés ou les acides organiques..., nécessaires au métabolisme.

- Les **échangeurs commandés par le gradient d'ions H^+** présents dans la membrane plasmique des cellules végétales. Celle-ci contient de nombreux transporteurs destinés à importer des molécules organiques, dont le fonctionnement est semblable à celui des exemples précédents. Il faut aussi signaler l'existence d'un **symport H^+/K^+** servant à faire entrer activement ce dernier ion dans la cellule. Ce système permet sans doute de contrôler la pression osmotique interne et de maintenir la turgescence à un niveau suffisant, malgré les variations du milieu extérieur.

- L'**antiport Na^+/H^+** des cellules de Vertébrés. Dans presque toutes les cellules de ces organismes, il existe une protéine échangeuse de cations d'un type voisin de la précédente, qui intervient pour contrôler le pH intracellulaire. Grâce à ce système d'échange, un excès interne d'ions H^+ (lié au métabolisme cellulaire) est supprimé par une sortie de ces derniers, couplée à un influx d'ions Na^+ . Cette protéine est régulée par le pH, au niveau d'un site de fixation de H^+ situé du côté cytoplasmique : si le pH dépasse 7,7 à l'intérieur de la cellule, la molécule est inactivée, le flux sortant d'ions H^+ stoppé, et le cytoplasme retourne à la neutralité.

- L'**échangeur d'anions HCO_3^-/Cl^-** des hématies de Mammifères. La protéine la plus abondante de leur membrane plasmique (dite aussi « bande 3 », sur les gels d'électrophorèse) est un transporteur d'ions dont le rôle est capital dans le cadre des échanges gazeux que ces cellules assurent. Le CO_2 produit par les tissus rentre dans les hématies où il est enzymatiquement transformé en HCO_3^- ; ce dernier en sort grâce à cet échangeur d'anions qui fait simultanément entrer un ion Cl^- . Au niveau des poumons, les réactions inverses ont lieu : le CO_2 étant éliminé des hématies, les ions HCO_3^- dissous en grande quantité dans le plasma entrent dans celles-ci, où ils sont à nouveau échangés contre des ions Cl^- . Ce processus inverse d'antiport est réalisé grâce à la même protéine, dont le fonctionnement est donc totalement réversible.

Cette protéine transmembranaire de près de 1 000 acides aminés de long est une grosse protéine à traversées multiples (12 ou 14 fois) ; elle forme probablement des dimères ou des tétramères, qui sont aisément visibles grâce à la technique de cryofracture, sous forme des particules de 7,5 nm de diamètre se détachant sur le fond uni de la bicouche phospholipidique. On compte environ 10^6 chaînes polypeptidiques par cellule, associées étroitement au cytosquelette sous-membranaire. Ce transporteur est aussi présent dans de très nombreux types cellulaires.

Il faut enfin mentionner que de nombreux transporteurs de ce type, véhiculant des ions ou des molécules organiques selon le mode de l'antiport ou du symport, existent dans la membrane interne des mitochondries et des chloroplastes.

1.5.6. Les ionophores et leur utilisation

Ce sont des composés hydrophobes de petite taille, ayant la propriété de se dissoudre dans les bicouches lipidiques et de favoriser le passage des ions à travers les membranes. Ils sont en général synthétisés par divers micro-organismes qui les utilisent comme moyens de défense vis-à-vis de leurs concurrents ; c'est à ce titre que certains sont utilisés par l'Homme comme antibiotiques. Ils sont aussi employés par les chercheurs, car ils augmentent de façon spécifique la perméabilité à des ions tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ..., et constituent donc des outils irremplaçables pour les analyses des transports membranaires. Deux classes d'ionophores existent : ceux qui agissent comme des transporteurs mobiles (ou navettes) et ceux qui forment des canaux. Dans tous les cas, ils ne favorisent que des transports passifs, régis par la diffusion et s'effectuant donc dans le sens des gradients électrochimiques.

On comprend donc pourquoi les ionophores naturels constituent de puissants antibiotiques antibactériens : ils suppriment tous les gradients ioniques, indispensables à la vie des cellules.

2. Transport membranaire des macromolécules et des particules chez les eucaryotes

Les phénomènes d'échange analysés jusqu'ici relèvent du mécanisme général de la perméation, c'est-à-dire du passage à travers la membrane cytoplasmique ; les protéines de transport mises en jeu ne peuvent transporter que des petites molécules organiques polaires ou des ions (minéraux ou organiques). Or, la plupart des cellules eucaryotiques sont capables d'absorber ou de sécréter des macromolécules, telles que des protéines ou des polysaccharides. Certaines, même, peuvent ingérer des particules de grande taille, y compris des cellules guère plus petites qu'elles. Le mécanisme de franchissement de la membrane plasmique mis en œuvre ici est tout à fait particulier et il implique la formation de vésicules limitées par une membrane simple.

2.1. Notions d'endocytose et d'exocytose

Suivant le sens du mouvement, on distingue deux grands types de processus : l'**endocytose**, qui recouvre les événements d'**intérieurisation** (pénétration) de matériel, et l'**exocytose**, qui concerne au contraire ceux associés à la sécrétion de composés dans le milieu extérieur. Dans l'endocytose, la membrane plasmique s'invagine progressivement au niveau de la zone où le matériel extracellulaire doit être absorbé (= endocyté), puis elle se pince et forme une vésicule close ; les étapes initiales sont un peu différentes selon que les particules absorbées sont des macromolécules ou des particules de grande taille. Dans l'exocytose, ce sont des vésicules d'origine interne à la cellule, le plus souvent issues du réseau transgolgien des dictyosomes, qui sont chargées de produits de sécrétion. Après s'être ouvertes au niveau de la membrane cytoplasmique, elles émettent leur contenu à l'extérieur de la cellule (**Figure 27**).

Ces phénomènes, tout à fait spécifiques des cellules eucaryotiques, présentent des caractéristiques communes évidentes : 1) ils impliquent des phénomènes de fusion des bicouches lipidiques membranaires après que celles-ci se soient étroitement juxtaposées, et 2) les substances absorbées ou sécrétées sont toujours séquestrées par une membrane et ne se mélangent jamais avec les constituants du hyaloplasme. Il existe donc une certaine parenté biochimique entre membranes des vésicules et membrane cytoplasmique.

En fonction de la taille du matériel absorbé, on distingue deux processus mettant en jeu des mécanismes différents : 1) la pinocytose (au sens étymologique, la « boisson » de la cellule), qui est l'ingestion de fluides ou de macromolécules, au moyen de petites vésicules de diamètre voisin de 150 nm, et 2) la phagocytose, qui est l'absorption de grosses particules ou de cellules, au moyen de vésicules de diamètre supérieur à 250 nm, et pouvant atteindre plusieurs μm : les phagosomes (« l'alimentation » de la cellule). Chez les cellules ne pratiquant pas la phagocytose, l'usage actuel tend à confondre endocytose et pinocytose ; ces deux termes sont donc parfois utilisés indifféremment.

La phagocytose a été décrite pour la première fois par E. METCHNIKOFF, en 1854, au niveau de cellules mobiles des larves d'étoiles de mer. Chez les Animaux, la plupart des cellules sont capables de pinocytose, tandis que le deuxième processus est réservé à certaines cellules spécialisées. En revanche, de très nombreux Protistes utilisent naturellement cette voie pour se nourrir : les paramécies, par exemple, ingèrent les Bactéries grâce à leur bouche, qui est une région spécialisée pour la phagocytose. Nous verrons plus loin en détail que la plupart des constituants absorbés de cette façon sont dirigés vers le compartiment lysosomal, après avoir été triés et sélectionnés dans un compartiment membranaire intermédiaire appelé compartiment

endosomal. Les lysosomes contiennent un grand nombre d'hydrolases (enzymes de dégradation), et la majorité des matériaux capturés sont finalement digérés et les produits obtenus, en général des petites molécules simples, servent à nourrir la cellule.

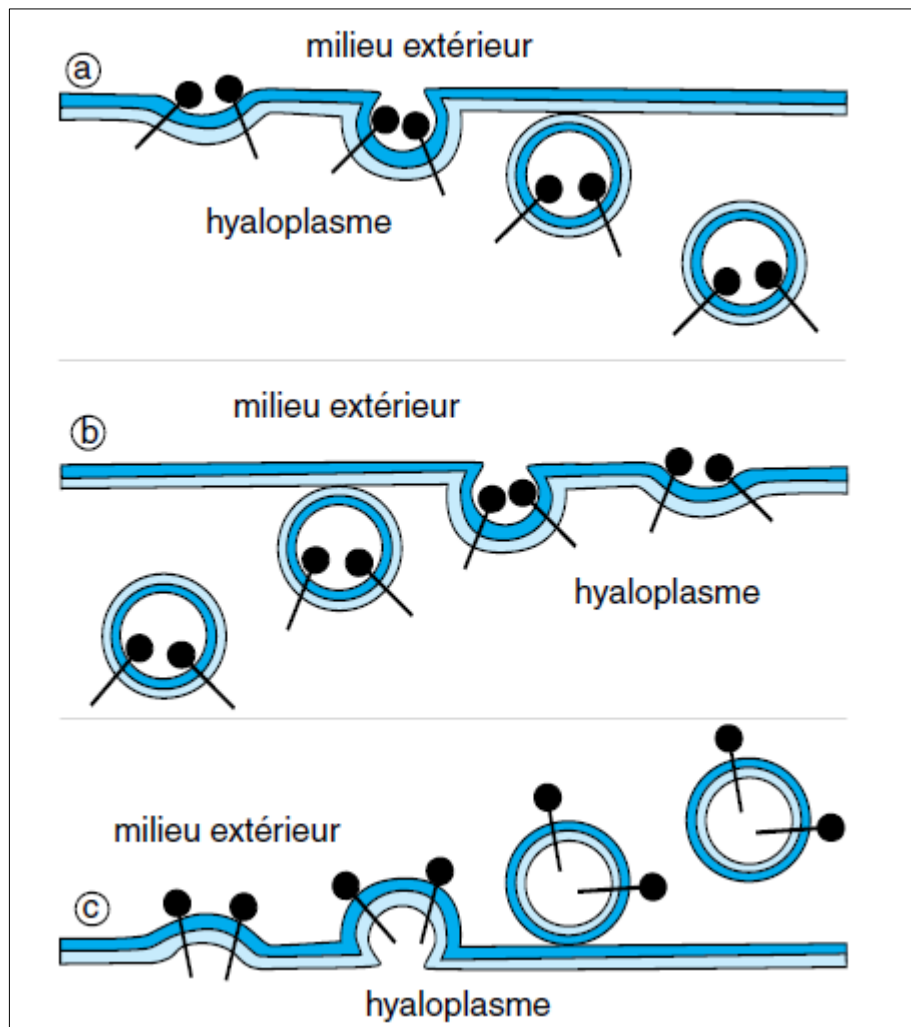


Figure 26. Principes de l'endocytose (a), de l'exocytose (b) et du bourgeonnement (c).

2.2. Phénomènes de pinocytose

2.2.1. Formation des vésicules de pinocytose

Ce processus commence en général au niveau de petits disques légèrement concaves trouvés dans la membrane plasmique, dont le diamètre est d'environ 0,2-0,4 μm . Sur les coupes fines de microscopie électronique, ces petites dépressions sont le plus souvent caractérisées par un feutrage 2 à 3 fois plus épais que la membrane plasmique elle-même, situé du côté hyaloplasmique (**Figure 28**).

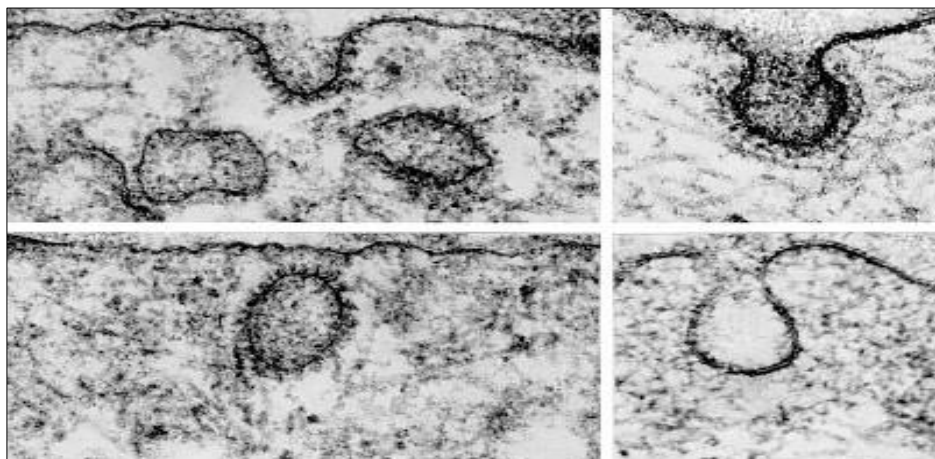


Figure 27. Micrographies électroniques illustrant le phénomène d'endocytose

Ces structures, nommées **puits recouverts**, donnent naissance par invagination progressive, à des dépressions de plus en plus profondes qui finissent par se pincer et former des vésicules closes, elles-mêmes nommées **vésicules recouvertes** ; leur diamètre est de 0,1 à 0,2 μm . La fabrication d'une vésicule à partir d'un puits est très rapide : environ une minute ; par la suite, la vésicule perd rapidement son revêtement dont le rôle, on le verra plus loin, est d'engendrer une surface sphérique à partir d'une surface plane. Dans les cellules en culture, on estime que la surface occupée par les puits recouverts représente 2 % de celle de la membrane cytoplasmique ; 2 500 vésicules recouvertes environ s'y forment toutes les minutes.

Le mécanisme moléculaire de la vésiculisation est maintenant bien connu ; il met en oeuvre essentiellement une protéine appelée **clathrine**, qui a la propriété de s'organiser en édifices supramoléculaires en forme de réseau hexagonal. La technique de cryofracture/cryodécoupage profond montre d'extraordinaires images de formation de ces vésicules recouvertes, en dessous de la membrane plasmique, à des stades variés. La clathrine forme des complexes trimériques ayant l'allure d'une croix à trois branches : les **triskelions**, édifices formés de trois longues chaînes polypeptidiques associées à trois plus petites. En raison de cette forme géométrique, ces derniers ont la possibilité d'engendrer des réseaux hexagonaux plans pouvant se coller à la surface interne de la bicouche lipidique (**Figure 29**) ; il s'agit même en fait d'un réseau à trois dimensions car l'extrémité de chaque branche plonge vers l'intérieur, d'où l'épaisseur importante de cette structure, visible en microscopie. La déformation contrôlée de ce réseau plan, par apparition de pentagones qui induisent une courbure, conduit à la formation d'une corbeille, puis d'une sphère (se souvenir qu'un ballon de football est formé d'un assemblage précis d'hexagones et de pentagones). Le morceau de membrane emprisonné dans une telle cage, qui se déforme peu à peu, se referme automatiquement pour donner une vésicule close.

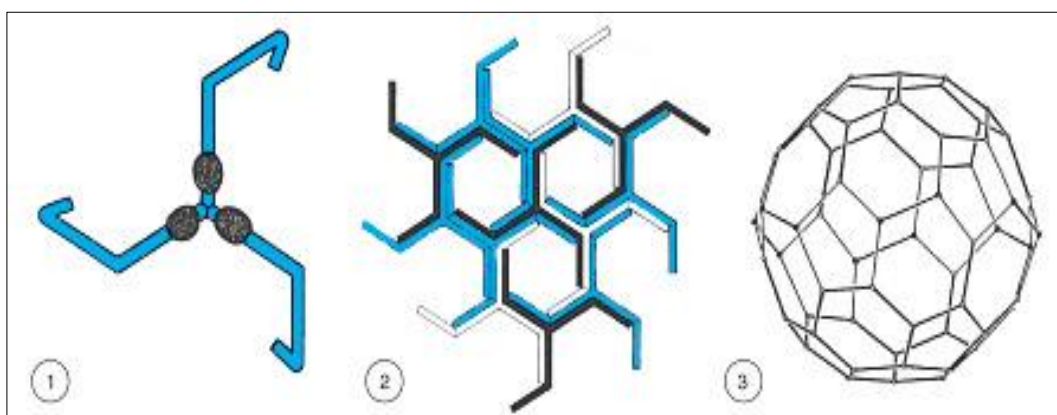


Figure 28. Schémas montrant l'organisation et le rôle de la clathrine

(1) Structure tripartite d'une molécule de clathrine, formée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères (triskélion). (2) Agencement des triskélions de clathrine pour former un réseau hexagonal plan. (3) Organisation d'une cage sphérique formée d'hexagones et de pentagones, comme celles qui englobent les vésicules d'endocytose.

La clathrine n'est pas la seule protéine structurale trouvée dans les puits et vésicules recouverts ; d'autres molécules interviennent pour associer la clathrine à la bicouche et aider à la capture spécifique de certains récepteurs membranaires (adaptine), qui seront intériorisés en même temps. Les phénomènes énergétiques et la multitude de contrôles nécessairement associés à toute cette dynamique ne sont pas encore complètement élucidés. Ce mode de formation de vésicules est généralisable à d'autres territoires membranaires que la membrane cytoplasmique ; nous verrons en effet que le bourgeonnement de certaines vésicules au niveau du réseau membranaire interne dit « transgolgien », se déroule de la même façon, grâce à des cages de clathrine. Il faut enfin signaler que certaines formes d'endocytose se déroulent sans l'intervention de la clathrine. On peut citer le cas des cellules endothéliales (décrites plus loin), ou celui de l'endocytose de la thyroglobuline, lors de la production de la thyroxine par les thyrocytes.

2.2.2. Intervention de récepteurs membranaires au cours de l'endocytose

Chaque vésicule intériorisée emporte évidemment dans sa lumière un peu du milieu extérieur à la cellule ; de l'eau, des ions, des molécules dissoutes sont ainsi absorbés. C'est ce qui se produit dans le cas des cellules endothéliales, qui absorbent ainsi des gouttelettes dont la composition est représentative de leur milieu extérieur ; on parle alors **d'endocytose de phase liquide**.

Cependant, l'efficacité réelle du mécanisme de pinocytose tient à la possibilité pour la membrane plasmique de concentrer considérablement certains composés à importer, grâce à leur adsorption spécifique au niveau de **récepteurs membranaires**, qui les prennent en charge. Il s'agit de protéines intrinsèques possédant un domaine extracellulaire capable de reconnaître et de fixer solidement le produit à absorber (ligand). Une fois chargés, ces récepteurs se rassemblent au niveau des puits recouverts et ils sont évidemment intériorisés en même temps que le reste de la membrane, lors de la formation des vésicules ; on parle alors **d'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs**. Ce mécanisme est plus de 1 000 fois plus efficace que l'endocytose simple de phase liquide, et même des substances très diluées dans le milieu extérieur peuvent être concentrées et ingérées en grande quantité par les cellules. Un seul puits recouvert peut en effet rassembler environ 1 000 récepteurs, appartenant le plus souvent à des types différents.

Un des exemples classiques de ce mécanisme est celui de l'importation du cholestérol par les cellules animales. Ce constituant hydrophobe, qui entre dans la composition des membranes cellulaires, est essentiellement d'origine exogène. Fabriqué en grande partie par le foie, il est transporté dans le sang sous forme de particules complexes nommées **lipoprotéines de faible densité** (LDL = low density lipoproteins). L'organisation d'une telle particule, d'environ 20 nm de diamètre, est donnée dans la **Figure 30**. Une protéine de haut poids moléculaire organise l'ensemble et lui donne son identité. En effet, cette molécule est précisément reconnue par un récepteur appartenant à la membrane plasmique des cellules animales : le **récepteur des LDL** ; il s'agit d'une glycoprotéine à traversée unique (de 839 acides aminés), pourvue d'un volumineux domaine extracellulaire. Au moyen de son site de liaison tourné vers l'extérieur, chaque récepteur membranaire capte une particule ; ensuite, grâce à la fluidité membranaire, les récepteurs chargés s'associent aux puits recouverts de clathrine, s'y concentrent et sont ainsi intériorisés (**Figure 31**).

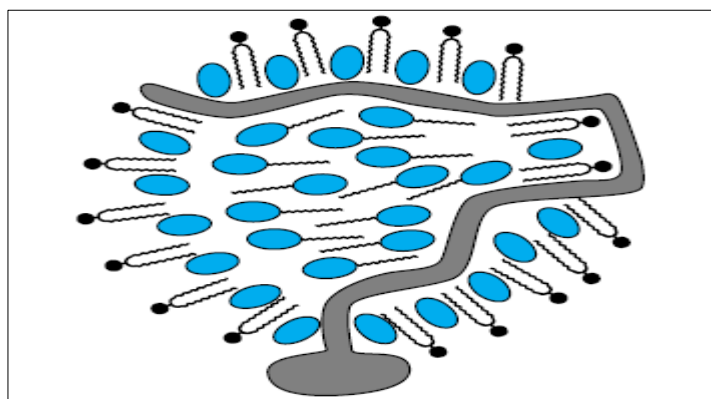


Figure 29. Schéma de l'organisation d'une particule lipoprotéique de faible densité (LDL).

De très nombreuses espèces protéiques sont fixées et accumulées de cette manière par les cellules : la transferrine (protéine transportant le fer dans le sang), des protéines de réserve (dans le cas des ovocytes), les immunoglobulines, de nombreuses hormones... On connaît plusieurs dizaines de récepteurs différents fonctionnant selon ce principe. L'intensité de l'endocytose est estimée par l'utilisation de molécules marquées qui, soit restent dissoutes dans la phase liquide, soit suivent la voie des récepteurs. Les deux méthodes donnent des résultats convergents et démontrent que des fibroblastes en culture intériorisent leur membrane plasmique à un taux élevé : ces cellules «boivent» plus de l'équivalent de leur propre volume en 24 h et ingèrent le double de la surface de leur membrane limitante en 1 h ! Ceci pose la question des mécanismes de renouvellement de cette membrane, dont la surface reste inchangée malgré l'endocytose. Nous verrons en fait que les cellules recyclent vers leur surface les « morceaux » de membrane utilisés pour la formation des vésicules, plutôt que d'en fabriquer sans cesse de nouveaux composants.

En conclusion, contrairement à l'impression statique que suggèrent souvent les images fournies par la microscopie électronique, il faut concevoir la membrane plasmique comme une structure très dynamique et en perpétuel renouvellement.

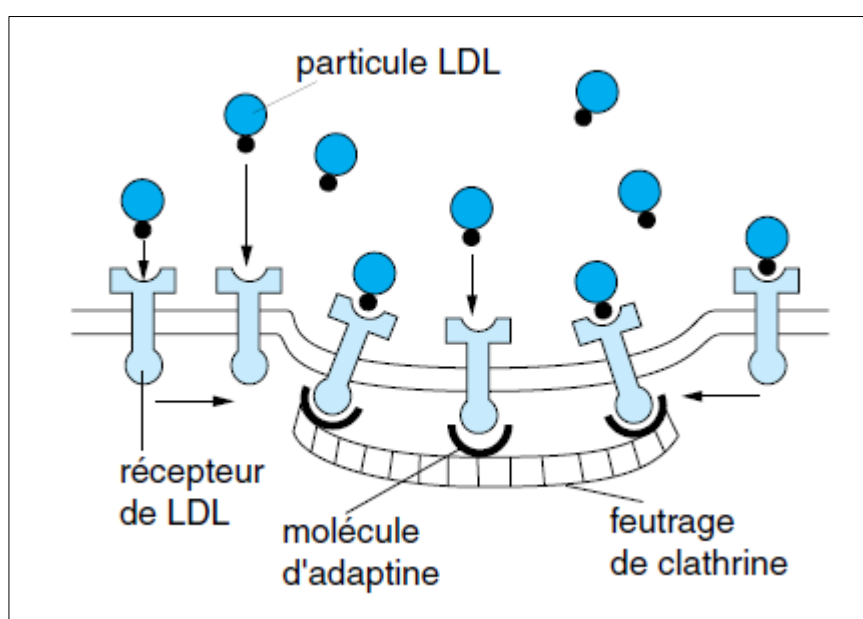


Figure 30. .Rôle des récepteurs protéiques des LDL.

2.2.3. Devenir des molécules absorbées et de leurs récepteurs. Le compartiment endosomal

Le rôle des endosomes peut être illustré en prenant l'exemple des LDL. Dans l'environnement acide de ces vésicules, le complexe récepteur/ ligand se dissocie (à la suite d'une modification de conformation du premier) et les particules LDL sont libérées dans la lumière. Selon des mécanismes encore mal identifiés, un phénomène capital de tri s'effectue alors, de sorte que les récepteurs libérés se concentrent en un endroit précis de la membrane de l'endosome, où se produit ensuite un phénomène de bourgeonnement puis de vésiculation secondaire. Les vésicules ainsi formées fusionnent avec la membrane plasmique, ce qui entraîne le retour des récepteurs à la surface cellulaire et leur permet de servir des centaines de fois. Le contenu des endosomes, quant à lui, est dirigé via d'autres vésicules, vers les lysosomes où aura lieu la digestion. Dans le cas des LDL, les phospholipides et les esters de cholestérol y sont attaqués et les produits de dégradation, dont le cholestérol libre, diffusent à travers la membrane, gagnent le hyaloplasme et sont disponibles pour la cellule ; les acides aminés issus de la digestion de la protéine de liaison sont aussi récupérés (**Figure 32**).

Ce système est régulé de la façon suivante : si la cellule absorbe trop de cholestérol, on observe d'une part, l'arrêt de la synthèse endogène de cette molécule et, d'autre part, l'arrêt de la synthèse des récepteurs protéiques des LDL. On a donc une boucle régulatrice à deux niveaux (ou à double détente), puisque des réponses rapide puis lente sont mises en jeu, qui maintiennent le taux de cholestérol intracellulaire à un niveau fixe. Cet exemple de recyclage des récepteurs s'applique aussi à ceux de la transferrine, mais selon des modalités plus complexes. On connaît cependant des cas pour lesquels les récepteurs ne sont pas renvoyés vers la membrane plasmique : la raison en est souvent l'impossibilité pour le complexe récepteur/ligand de se dissocier à pH acide, et c'est donc l'ensemble qui est dirigé vers les lysosomes où tous deux sont détruits.

Plusieurs maladies génétiques conduisent, chez l'Homme, à la production de récepteurs défectueux des LDL ; les cellules ne pouvant donc plus prélever efficacement le cholestérol sanguin, on observe une cholestérolémie élevée, dont les conséquences sont souvent graves.

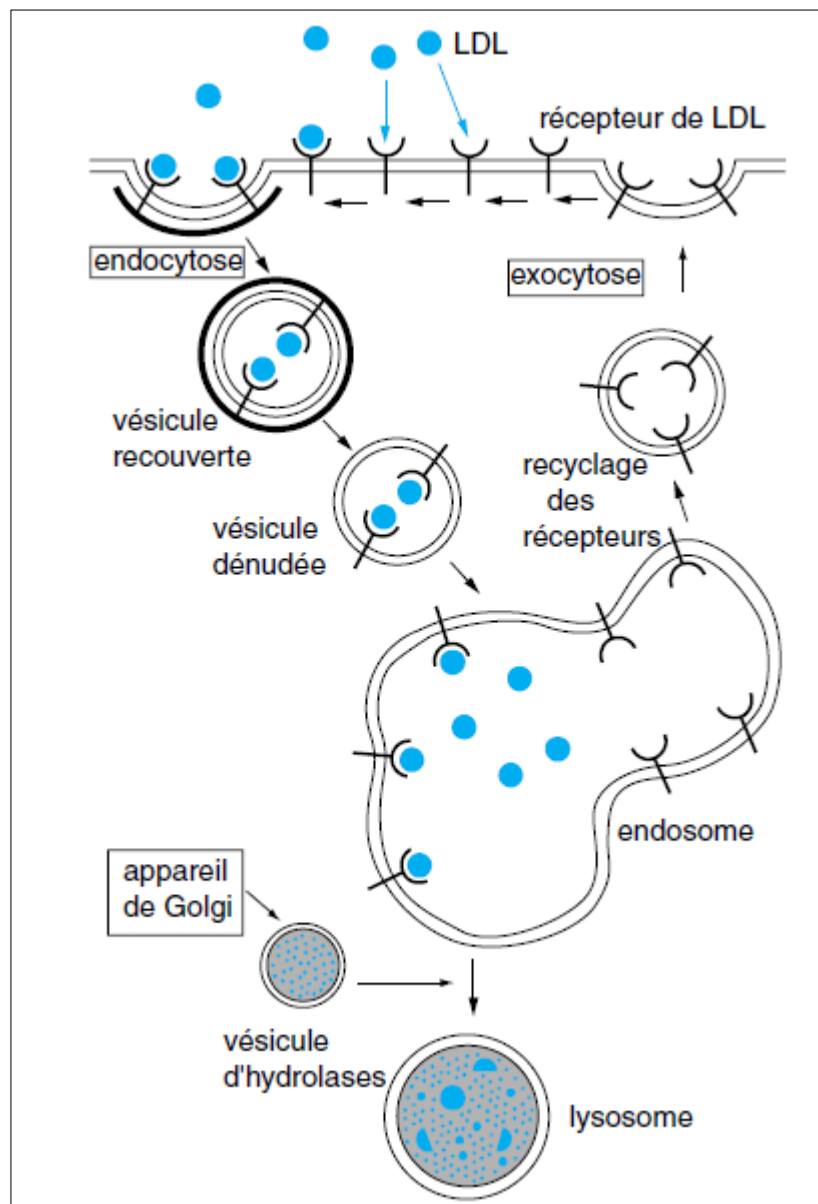


Figure 31. Rôle des endosomes dans le recyclage des récepteurs des LDL et leur retour vers la membrane cytoplasmique

2.2.4. Phénomène de transcytose

Il s'agit d'un phénomène d'endocytose dans lequel les vésicules et leur contenu ne sont pas dirigés vers le compartiment lysosomal, mais envoyés vers un autre endroit de la membrane plasmique. Les cellules endothéliales, par exemple, qui sont les cellules aplaties et très fines tapissant les vaisseaux sanguins, sont l'objet d'une endocytose de phase liquide intense, permettant de faire passer rapidement des éléments du plasma sanguin dans le milieu intérieur, par exocytose sur la face opposée de la cellule. Dans ce cas particulier, la vésiculisation de la

membrane plasmique ne met visiblement pas en jeu le feutrage très caractéristique dû à la clathrine (**Figure 33**).

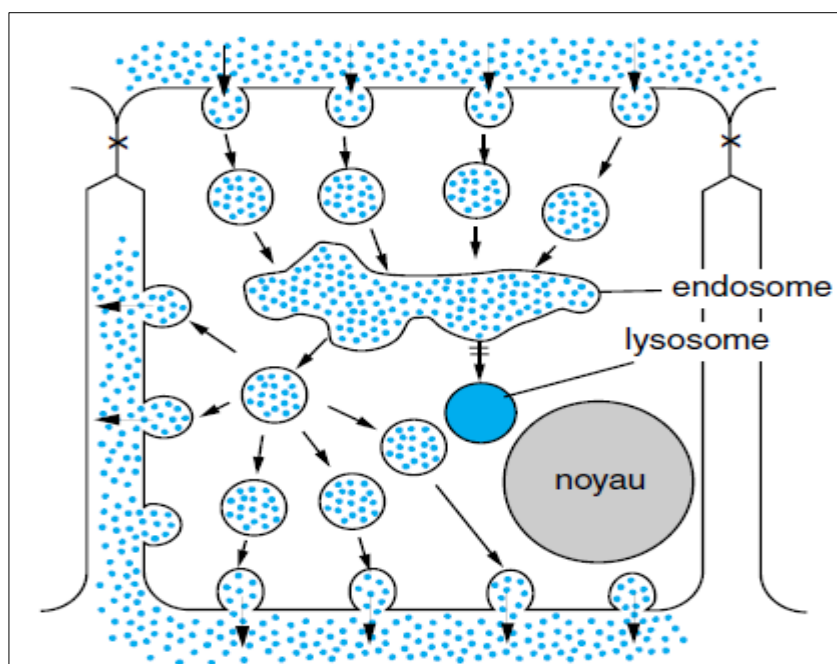


Figure 32. Cliché montrant l'intense formation de vésicules d'endocytose non recouvertes et schéma simplifié illustrant le phénomène de transcytose.

2.3. Phénomène de phagocytose

C'est le mécanisme par lequel des particules de grande ou très grande taille sont absorbées par les cellules : les vésicules ainsi formées sont appelées phagosomes. Après fusion avec les lysosomes primaires, elles donneront les **phagolysosomes**, au sein desquels le matériel ingéré sera dégradé ; cette question sera traitée lors de l'étude des lysosomes. La phagocytose est une forme d'alimentation courante chez les Protistes et chez de nombreux Invertébrés inférieurs : Cnidaires, Éponges..., qui possèdent des cellules spécialisées pratiquant une digestion intracellulaire. Chez les Vertébrés inférieurs, ce phénomène existe dans le cas de certains Poissons, pour lesquels la digestion dans le tractus digestif n'est pas totalement extracellulaire (alors qu'elle est la règle chez les Mammifères, par exemple). Chez les Animaux supérieurs, la phagocytose est réservée à certains types de cellules sanguines spécialisées dans la défense de l'organisme ou dans l'élimination des cellules sénescents, endommagées ou mortes.

Contrairement à la pinocytose, qui se produit de façon continue (phénomène constitutif), il s'agit d'un mécanisme induit et contrôlé, car des signaux doivent être envoyés vers l'intérieur de la cellule afin que les éléments assurant l'enveloppement cytoplasmique se mettent en place. La

cytologie montre que des éléments du cytosquelette contribuent en effet à ce phénomène car un réseau dense d'actine, excluant tous les autres organites du hyaloplasme, entoure les phagosomes ; en outre, les drogues qui empêchent la polymérisation de l'actine, telles que la cytochalasine, inhibent la phagocytose et non la pinocytose. On pense que la clathrine pourrait, dans une certaine mesure, intervenir aussi dans ce processus d'absorption. Le déclenchement de la phagocytose est sous la dépendance de stimuli chimiques ; en effet, si on cultive des Protozoaires ciliés, tels que *Tetrahymena*, dans un milieu de culture contenant uniquement des petites molécules organiques, ils ne forment pas de vacuoles digestives. L'apparition de ces organites n'a lieu que si on ajoute des polypeptides à ce milieu. De même, les leucocytes qui phagocytent les hématies ne s'attaquent qu'aux cellules âgées ou mortes, mais pas à celles jeunes et en «bonne santé» ; le mécanisme de cette reconnaissance n'est pas encore connu.

2.4. Phénomènes d'exocytose et de bourgeonnement

2.4.1. Exocytose

Toutes les cellules eucaryotiques ont la faculté de sécréter divers composés dans le milieu extérieur. Ceux-ci ont plusieurs destinées : soit ils restent étroitement accrochés à la membrane plasmique (glycocalyx), soit ils constituent une matrice extracellulaire emplissant les espaces libres entre les cellules, soit ils sont émis dans le milieu intérieur (hormones) ou dans le tractus digestif (enzymes)..., si on se limite aux Animaux ! Dans ces cellules, ce sont des vésicules spécialisées de transport qui acheminent leur contenu vers la membrane plasmique, ainsi que de nouveaux composants de la membrane elle-même, à la suite d'un phénomène de fusion des bicouches lipidiques.

L'origine de ces molécules et le phénomène d'**exocytose** seront décrits en détail lors de l'étude de la synthèse protéique et du transit intracellulaire de ces molécules, Nous nous contenterons ici d'annoncer les deux grandes voies que l'on distingue classiquement :

- la **voie de sécrétion constitutive**, par laquelle certaines protéines sécrétées ou membranaires, ainsi que des phospholipides, sont continuellement acheminés vers la membrane plasmique, au moyen de petites vésicules ;
- la **voie de sécrétion provoquée**, dans laquelle des vésicules de stockage sont mises en oeuvre ; celles-ci ne fusionnent avec la membrane que lorsque la cellule a reçu un signal extracellulaire bien précis.

2.4.2. Bourgeoisement

Le bourgeoisement est défini comme l'émission d'une vésicule à l'extérieur d'un compartiment membranaire ; il représente en fait exactement l'inverse de l'endocytose. Ce mécanisme est très développé au sein des cellules eucaryotiques, où il constitue un moyen capital de transport de molécules d'un compartiment à un autre. Les vésicules ayant bourgeoisé à partir d'un compartiment donneur fusionnent avec un compartiment receveur, à la manière de l'exocytose décrite plus haut. C'est le cas, par exemple, de la formation des vésicules de transition qui assurent un flux de membranes du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (sacs cis-golgiens), des vésicules transitant entre les saccules golgiens, ou bien des vésicules d'exocytose émises par le réseau transgolgien.

En fait, il ne se produit jamais de bourgeoisement au niveau de la membrane plasmique, à l'exception des phénomènes de production des particules virales, et d'un cas très particulier de sécrétion, décrit plus loin. Il existe en effet, autour de certains Virus (qui sont des entités non cellulaires), une structure membranaire typique dérivée de la membrane plasmique de la cellule-hôte, liée à leur mode de sortie à travers celle-ci. Dans les cellules des glandes mammaires des Mammifères, la sécrétion des globules graisseux du lait implique un mécanisme très particulier, dit apocrine ; les gouttelettes de triglycérides accumulées dans le hyaloplasme sont en effet progressivement enveloppées dans des évaginations de la membrane plasmique qui finissent par se pincer et se séparer de la cellule. En dehors de cet exemple de bourgeoisement typique, la production et l'émission plus ou moins anarchique de vésicules par la membrane plasmique semblent être, au contraire, la manifestation de phénomènes pathologiques et annonciateurs d'une fin proche.

2.5. Passage direct de protéines à travers la membrane cytoplasmique chez les Bactéries

Il existe, chez les Bactéries, une possibilité de franchissement de la membrane cytoplasmique par des protéines en cours de synthèse (ou après celle-ci). Ces micro-organismes ont en effet la capacité à sécréter des macromolécules dans le milieu extérieur, mais le mode de sécrétion mis en oeuvre est très particulier et fondamentalement différent de l'exocytose qu'on vient de décrire chez les Eucaryotes. Les protéines sont en effet : 1) soit littéralement «injectées» à travers la bicouche, au cours de leur polymérisation par des ribosomes accolés à la face interne de la membrane plasmique, 2) soit progressivement «dissoutes» dans la bicouche, grâce à certains de leurs domaines hydrophobes, avant d'être reconstituées puis rendues fonctionnelles à l'extérieur de la cellule.

L'intégration des activités des différents types cellulaires constituant un organisme supérieur est principalement réalisée par les trois grandes fonctions de relation : le **système nerveux**, le **système endocrinien** et le **système immunitaire**. Aux niveaux moléculaire et cellulaire, les frontières entre ces trois systèmes sont très floues car les produits et les mécanismes impliqués sont souvent communs et les interactions entre ces systèmes sont très nombreuses. Les communications intercellulaires impliquées dans le fonctionnement de ces systèmes peuvent s'établir de trois manières différentes (**Figure 34**).

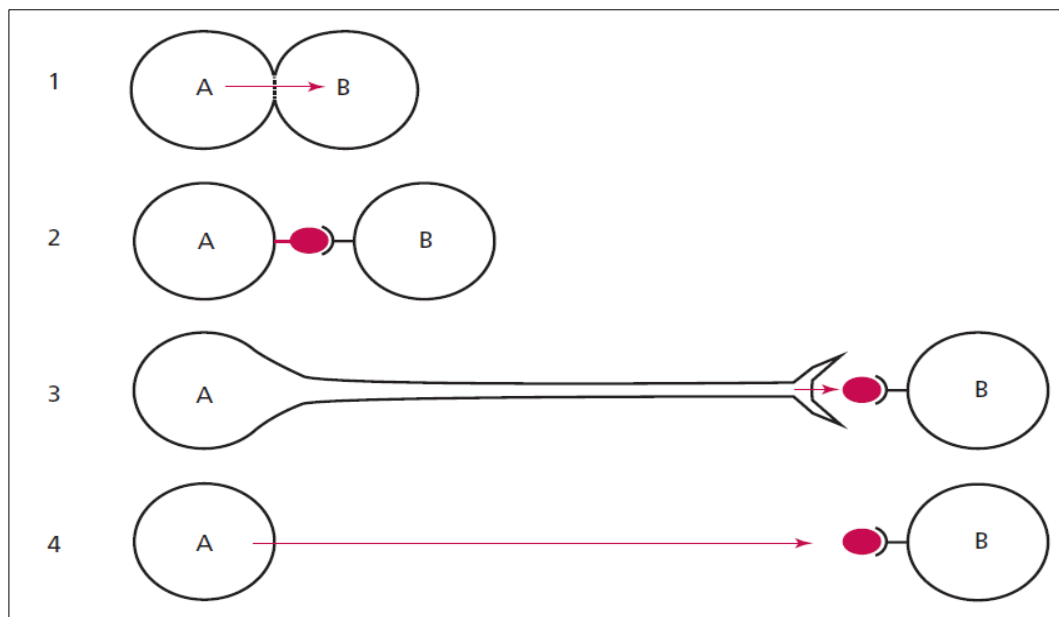


Figure 33 Communications intercellulaires.

1. Jonctions perméables (gap junction) permettant le passage passif de molécules de faible poids moléculaire (tels le calcium ou l'AMPc) du cytoplasme d'une cellule à celui de sa voisine (A > B).
2. Interactions entre protéines membranaires de cellules voisines.
3. Sécrétion dans un espace intercellulaire confiné (synapse) d'une molécule (neuromédiateur) interagissant avec un récepteur membranaire spécifique situé à moins de 0,1 μm sur la cellule cible (neurone, cellule musculaire).
4. Sécrétion dans la circulation générale d'un médiateur (hormone, facteur de croissance, cytokine) interagissant avec un récepteur spécifique (membranaire ou intracellulaire) sur une cellule cible (B) pouvant être située jusqu'à plusieurs mètres de distance.

1. Les différents types de communications intercellulaires

- Jonctions perméables (gap junctions) permettant le passage passif de molécules de faible poids moléculaire du cytoplasme d'une cellule à celui de sa voisine (AB).
- Interactions entre protéines membranaires de cellules voisines.
- Sécrétion dans un espace intercellulaire confiné (synapse), d'une molécule (neuromédiateur) interagissant avec un récepteur membranaire spécifique situé à moins de 0,1 μm sur la cellule cible (neurone, cellule musculaire).
- Sécrétion dans la circulation générale d'un médiateur (hormone, facteur de croissance, cytokine) interagissant avec un récepteur spécifique (membranaire ou intracellulaire) sur une cellule cible (B) pouvant être située jusqu'à plusieurs mètres de distance.
- Par des contacts directs entre les constituants des membranes plasmiques qui permettent des associations spécifiques entre types cellulaires différents et la stimulation de processus complexes d'activation, de différenciation et de routage de ces cellules.
- Par l'émission de molécules messagères (neuromédiateurs, hormones, cytokines, etc.) à destination de cellules cibles plus ou moins éloignées. Les cellules cibles des neuromédiateurs se trouvent à proximité immédiate de leur site de libération par les cellules émettrices et la spécificité de la communication est donc largement topographique (au niveau de la synapse). Pour les hormones, les cytokines ou les facteurs de croissance, et plus encore pour les phéromones, les cellules cibles sont généralement éloignées de la cellule émettrice. La spécificité de la communication est alors entièrement due à la reconnaissance spécifique de l'hormone par la cellule cible.

1.2. Jonctions perméables (ou communicantes)

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

1.3. Connexines et connexons

Les jonctions perméables sont des structures où les membranes plasmiques de deux cellules voisines sont rapprochées (2-4 nm) et dans lesquelles des structures protéiques appelées **connexons**, formées de 6 connexines dans chacune des membranes plasmiques, s'associent pour

constituer des demi-canaux qui se connectent pour former des pores d'environ 1,5 nm de diamètre permettant le passage passif des molécules de petite taille (< 1 500 Da) du cytoplasme d'une cellule à celui de l'autre (**Figure 35**).

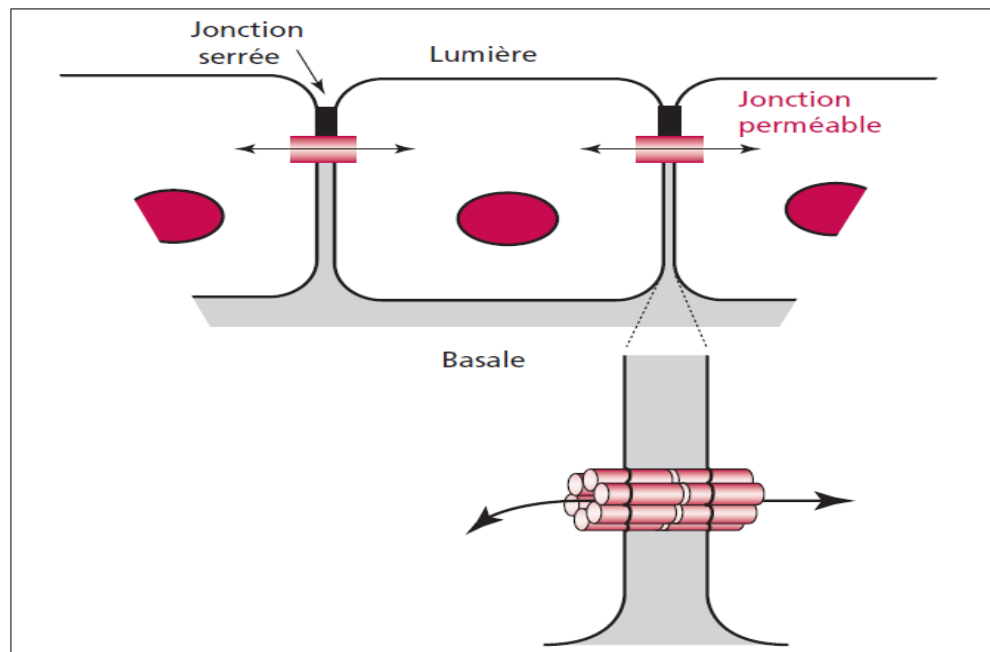


Figure 34. Contacts intercellulaires directs : jonctions serrées et jonctions perméables dans un épithélium. Les jonctions perméables (en rouge) sont formées de connexons qui sont deux hexamères associés de molécules de connexines.

Ces jonctions paraissent importantes pour la coordination des réponses de groupes de cellules d'un même type à une hormone. Ainsi, des expériences *in vitro* ont montré que, lorsque seulement une partie des cellules de granulosa d'ovaire de rat possédaient des récepteurs à l'hormone lutéinisante LH, toutes y répondent lorsqu'elles sont en contact mais pas lorsqu'elles sont dispersées. En outre, il a été montré que la LH, via l'AMPc, stimule l'établissement de ces jonctions et que, en quelque sorte, les cellules portant les récepteurs LH recrutent celles qui en sont dépourvues (**Figure 36**).

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

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

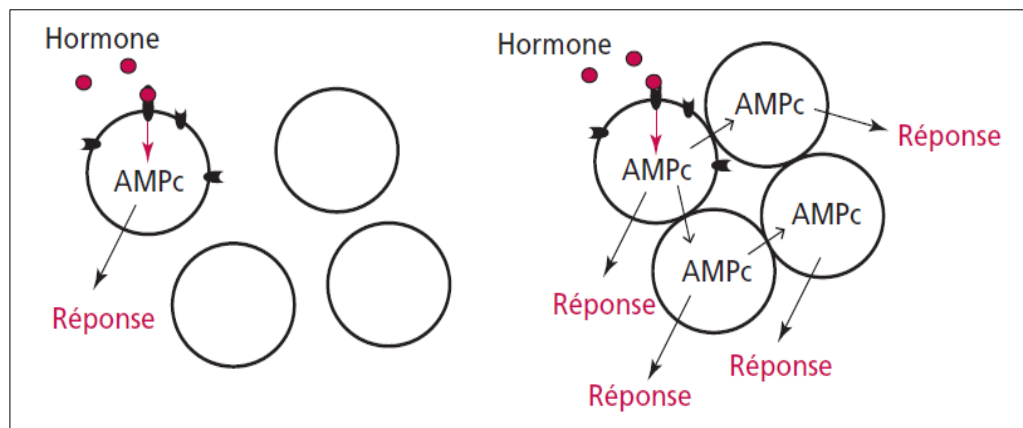


Figure 35. Coordination et amplification de la réponse à une hormone par passage du second messager intracellulaire d'un cytoplasme à l'autre via les jonctions perméables.

Lorsque les cellules sont dispersées (à gauche), seule la cellule possédant des récepteurs répond à l'hormone. Lorsque les cellules sont contiguës et communiquent via des jonctions perméables, les cellules sans récepteurs répondent également grâce au passage du second messager (AMPc) dans leurs cytoplasmes.

L'établissement de jonctions communicantes autorisant le passage de messagers cytoplasmiques entre les cellules d'un tissu permet une coordination plus précise de leurs réponses, ainsi qu'une amplification plus importante de la réponse au signal. Ce type de couplage est particulièrement important pour les types cellulaires dont les réponses doivent être synchrones pour exercer leurs actions physiologiques (contractions des cellules musculaires cardiaques, péristaltisme des cellules intestinales, etc.).

1.4. Interactions membranaire

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

Ces interactions constituent des éléments importants de régulation des réponses cellulaires des organismes pluricellulaires en particulier au cours du développement. Ainsi, les interactions entre les protéines membranaires Delta et Notch de cellules neurectodermiques voisines chez la drosophile conduisent à l'activation de Notch chez un petit nombre d'entre elles à leur différenciation en cil sensitif, tandis que l'ensemble des cellules voisines se différencie en cellules épidermiques (**Figure 37**). Les cellules ayant commencé leur différenciation en neurone sensitif inhibent cette même différenciation chez leurs voisines. Les interactions à courte distance peuvent néanmoins être indirectes. Ainsi, les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes péritubulaires du testicule produisent différents éléments de la matrice extracellulaire de la membrane basale qui les sépare. Les propriétés biologiques de la cellule de Sertoli sont très sensibles à la composition et à la structure de cette membrane basale. L'action des cellules myoïdes sur les cellules de Sertoli s'exerce donc au travers de leur production de protéines constitutives de la matrice extracellulaire. En outre, de nombreux facteurs de croissance s'associent à la matrice extracellulaire avant de pouvoir exercer leur action. Les interactions entre protéines membranaires des cellules jouent également un rôle considérable dans la fonction immunitaire (BcR, TcR, TLR) et les régulations fines des activités des diverses cellules de ce système. Des points communs existent cependant entre ces protéines membranaires et les récepteurs hormonaux et des facteurs de croissance ou des neuromédiateurs.

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

1.4.1. Cadhérines

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires impliquées de manière très importante dans les interactions directes entre cellules. Ces protéines établissent essentiellement des interactions intercellulaires homophiles entre cadhérines du même type (**Figure 38**) et semblent principalement connectées, du côté intracellulaire, aux microfilaments d'actine et aux filaments intermédiaires du cytosquelette au travers des caténines, en particulier la b-caténine.

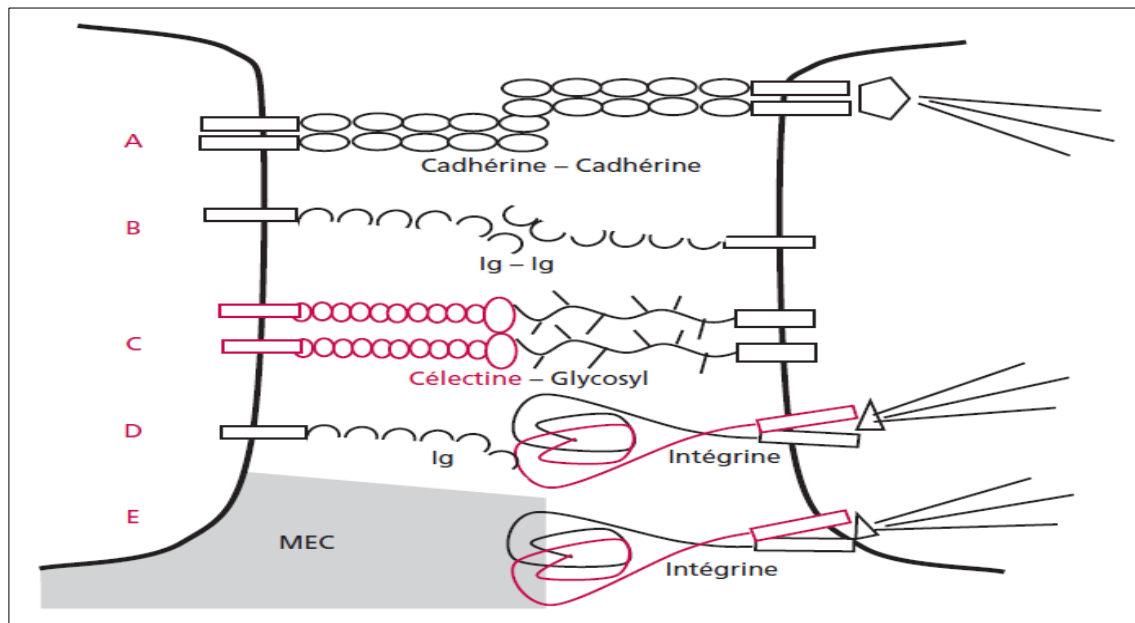


Figure 36. Classes majeures de protéines membranaires d'adhésion cellulaire. A : interaction cadhérine-cadhérine ; B : interaction Ig-Ig ; C : interaction sélectineprotéine hyperglycosylée ; D : interaction Ig-intégrine ; E : interaction MEC-intégrine.

Plus de 70 cadhérines sont déjà connues chez les mammifères pour seulement 18 chez le nématode *C. elegans*. Une hypothèse est qu'un grand nombre de cadhérines serait nécessaire à la complexité des interactions cellule-cellule du système nerveux des mammifères. Par ailleurs, on observe une expression réduite de certaines cadhérines dans les cellules néoplasiques qui pourrait être responsable de leur faible adhésion et de leur dissémination conduisant à des métastases.

Le mécanisme impliquerait la b-caténine. En effet, cette dernière est à la fois un coactivateur transcriptionnel de la voie Wnt et un composant du pontage entre les cadhérines et les filaments d'actine. Ainsi, la séquestration de la b-caténine par les cadhérines l'alpha-caténine au niveau des jonctions intercellulaire lors des contacts entre cellules diminue la concentration de b-caténine disponible pour la voie Wnt et donc la prolifération cellulaire. Cette balance des deux rôles de la b-caténine explique, au moins en partie, l'inhibition de contact de la prolifération cellulaire.

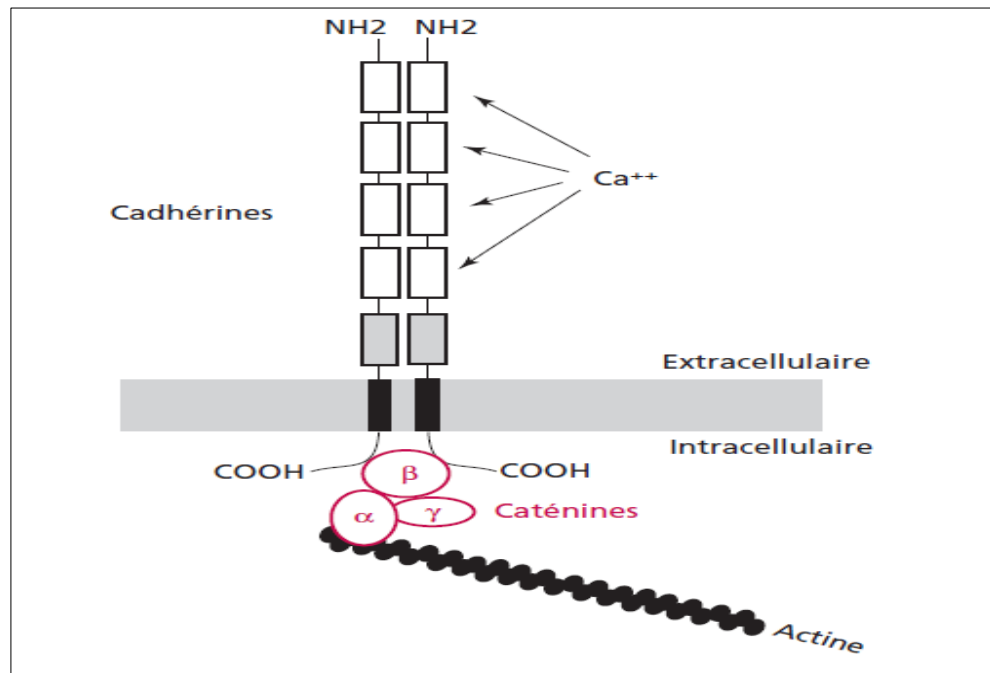


Figure 37. Cadhérines et caténines. Ensemble, ces protéines assurent un continuum entre les cytosquelettes de cellules voisines en interaction.

1.4.2. Protéines d'adhésion apparentées aux immunoglobulines : CAM

Les CAM (cell adhesion molecule) sont apparentées aux immunoglobulines dans leur partie N-terminale extracellulaire. Elles établissent surtout des interactions homophiles mais également avec des intégrines ou avec la matrice extracellulaire (MEC).

C'est essentiellement le niveau d'expression de chacune des CAM (N-CAM, I-CAM, ELAM, etc.) et de leurs isoformes respectives qui détermine la nature et la solidité de l'association entre cellules voisines sans provoquer directement de réponses cellulaires car, du côté intracellulaire, les CAM ne semblent connectées à aucune voie de signalisation.

1.4.3. Sélectines

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

1.4.4. Intégrines

La famille des intégrines compte une vingtaine de membres dont la fonction majeure est de connecter, physiquement et fonctionnellement, le cytosquelette des cellules aux protéines extracellulaires d'adhésion de la matrice extracellulaire.

Une très courte séquence Arg-Gly-Asp (RGD dans le code à une lettre) constitue un motif fonctionnellement important dans les protéines de la MEC (fibronectines, laminines, collagènes...) pour leur liaison aux intégrines. Les intégrines interagissent également avec diverses protéines membranaires de leurs voisines. Parmi celles-ci, les désintégrines, qui appartiennent à la famille ADAM (A disintegrin A metalloprotease), sont particulièrement intéressantes. L'une d'elles, la fertiline β des spermatozoïdes, joue un rôle majeur lors de la fécondation en interagissant avec des intégrines de l'ovocyte. L'interaction directe fertiline-intégrine conduit au déclenchement des signaux intracellulaires conduisant, en résumé, à l'entrée d'un seul spermatozoïde, la fusion des pronuclei, puis au démarrage du premier cycle de division de l'œuf constituant l'étape initiale du développement de l'embryon (**Figure 39**).

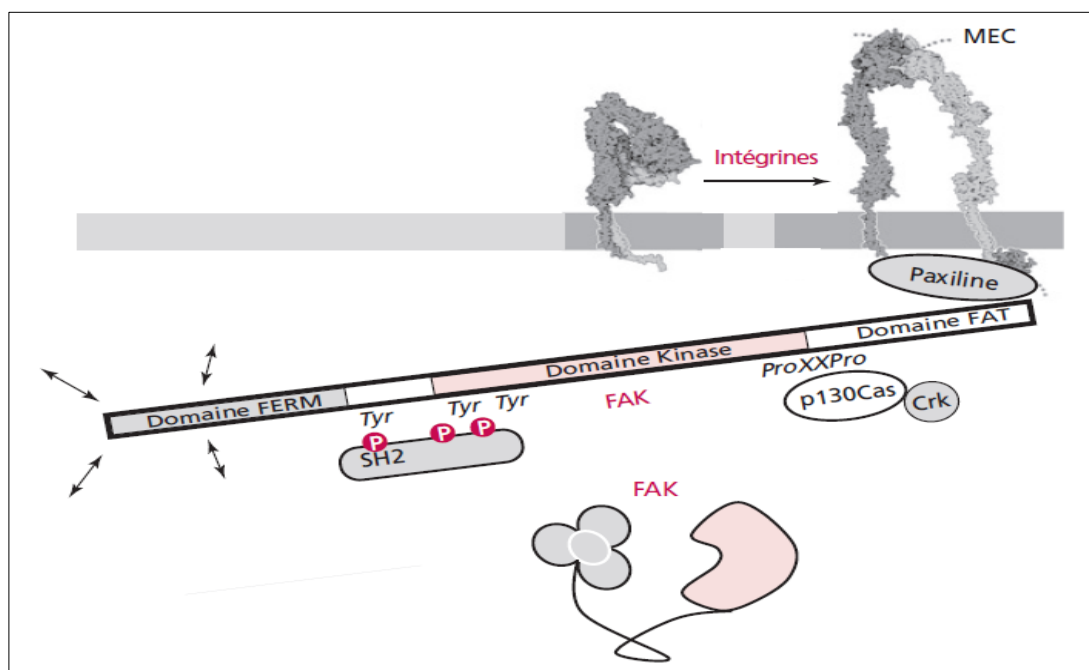


Figure 38. Structure schématique des intégrines et mécanisme d'activation. Les intégrines interagissant avec la MEC exercent de nombreuses actions intracellulaires par l'intermédiaire de la paxiline et de la FAK.

Les intégrines sont des hétérodimères membranaires $\alpha\beta$ et les 24 assortiments connus des sous-unités (18 α et 8 β) dans les hétérodimères confèrent à chacune ses propriétés particulières de liaison. Comme la constitution de la MEC dépend des cellules présentes dans le tissu, des influences mutuelles des cytosquelettes de chacune d'elles s'exercent via les intégrines. Ceci conduit par exemple à l'organisation baso-latérale ou à des mouvements des cellules. Du côté intracellulaire, les intégrines interagissent avec de nombreuses protéines, dont des protéines kinases, et indirectement avec le cytosquelette.

Les effets intracellulaires des intégrines, suite à leurs interactions extracellulaires, sont médiés via le recrutement de diverses protéines formant un complexe d'adhésion focale et parmi lesquelles principalement la tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase) ainsi que la p120 et les kindlins jouent des rôles centraux. C'est via le domaine FERM que la FAK recrute ses partenaires et stimule la voie de signalisation en aval.

1.4.5. Les éphrines et leurs récepteurs

La famille des récepteurs des éphrines (EPHR) ont pour ligands non pas des molécules solubles mais des protéines transmembranaires, les éphrines (**Figure 40**). De ce fait, les signalisations par ces voies concernent des interactions directes cellule-cellule et les mieux connues sont celles impliquées dans le développement du système nerveux et la plasticité neuronale mais également dans l'angiogenèse. On compte 14 EPHR et 8 éphrines chez les mammifères.

La signalisation éphrine-EPHR engage donc deux récepteurs membranaires et est, par conséquent, bidirectionnelle. Cet aspect est particulièrement important dans le développement du système nerveux central et dans les phénomènes de plasticité neuronale. En effet, les interactions cellulaires via les couples éphrine- EPHR conduisent à des phénomènes d'attraction puis de répulsion cellulaire qui permettent l'établissement des contacts synaptiques spécifiques entre neurones ou entre neurones et astrocytes via le phénomène de guidage axonal.

1.4.6. Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et TcR

Les protéines du CMH jouent un rôle essentiel dans les interactions cellulaires permettant les réponses immunitaires spécifiques chez les vertébrés. Il existe deux classes de ces protéines membranaires, CMH I et CMH II, qui « présentent » aux lymphocytes T les peptides antigéniques auxquels ils vont répondre spécifiquement. Les protéines de la classe CMH I, ubiquistes, présentent les antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques tandis que les protéines de la classe CMH II, spécifiques des cellules du système immunitaire, présentent les antigènes aux

lymphocytes T auxiliaires (helper). Les lymphocytes T doivent donc reconnaître à la fois l'antigène dont ils sont spécifiques et le type cellulaire qui le leur présente.

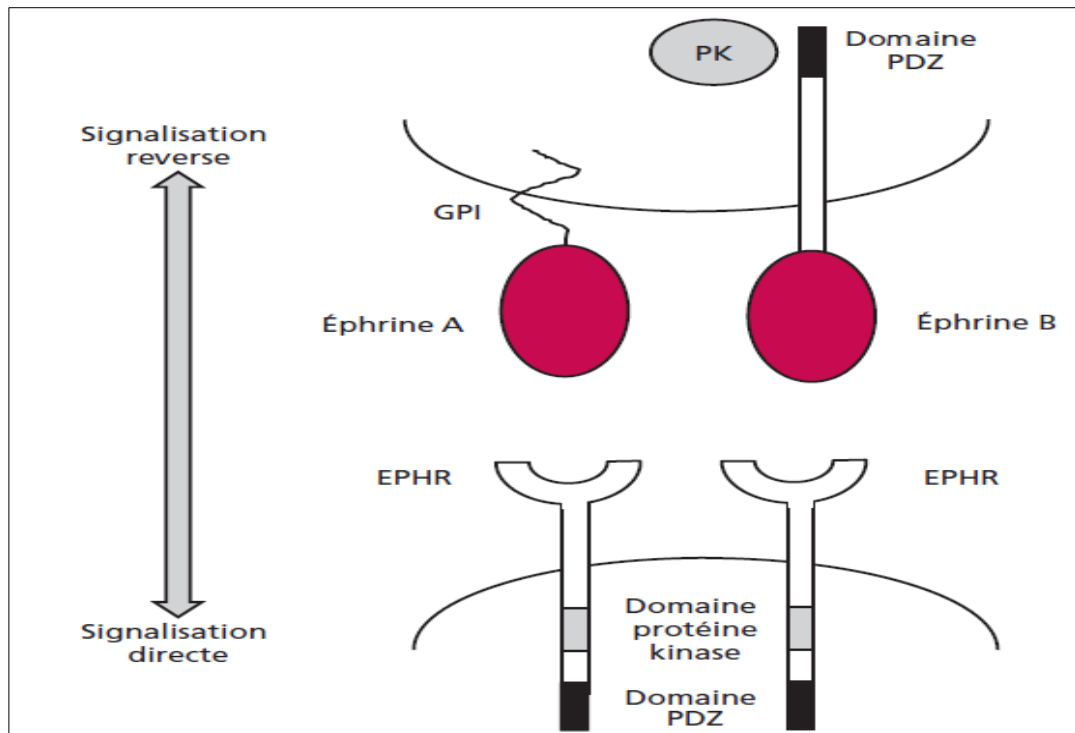


Figure 39. Éphrines et récepteurs des éphrines. Les interactions intercellulaires via ces molécules conduisent à des signalisations dans les deux sens, direct et inverse.

Les protéines du CMH I sont constituées d'une sous-unité glycoprotéique α transmembranaire associée à une sous-unité β extracellulaire, également dénommée microglobuline. Les protéines du CMH II sont constituées de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires α et β différentes de celles du CMH I. Les récepteurs des lymphocytes, appelés TcR, ont des structures multimériques transmembranaires complexes associés à des protéines permettant la spécificité d'interaction des lymphocytes avec les cellules présentatrices correctes. Ces protéines spécifiques sont CD8 pour les lymphocytes T cytotoxiques (reconnaissance de CMH I) et CD4 pour les lymphocytes T auxiliaires (reconnaissance de CMH II). Ces interactions directes entre lymphocytes et cellules présentatrices conduisent à la mise en route, dans les lymphocytes, de voies de signalisation complexes.

2. Structures et mécanismes d'action des récepteurs membranaires

Les messagers qui ne peuvent traverser la membrane cellulaire agissent sur les cellules cibles par leur liaison avec des récepteurs spécifiques membranaires. Cette liaison messenger / récepteur induit, via la mise en jeu ou non d'une protéine G, soit la synthèse d'un messenger

intracellulaire appelé **second messenger**, soit (et) des modifications de la composition ionique intracellulaire (en particulier calcique) amplificatrices du message. L'ensemble de ces modifications va provoquer des changements radicaux de la physiologie cellulaire.

2.1. Les récepteurs membranaires

Les récepteurs membranaires sont des glycoprotéines complexes fichées dans la membrane plasmique. Leurs fonctions principales sont de reconnaître le message chimique, de le traduire et de l'amplifier. Il existe quatre types de récepteurs membranaires : les **récepteurs canaux ioniques**, les **récepteurs enzymes**, les **récepteurs couplés à des protéines G** et les **récepteurs de la superfamille des cytokines**.

Les hormones et autres médiateurs intercellulaires peuvent être classés en deux grandes catégories pour ce qui concerne leur site d'action initial : certains, comme les hormones protéiques mais aussi des médiateurs hydrophiles de petite taille, ne peuvent traverser les membranes et leurs récepteurs se trouvent donc à la surface de leurs cellules cibles, au niveau de la membrane plasmique. D'autres hormones telles que les hormones stéroïdiennes ou thyroïdiennes sont hydrophobes, traversent les membranes plasmiques et se lient à leurs récepteurs, localisés à l'intérieur de leurs cellules cibles.

Dans le premier cas, les ligands interagissent avec les récepteurs membranaires du côté extracellulaire à la surface de la cellule et l'information est transmise vers l'intérieur de la cellule. Dans le second cas, les ligands doivent pénétrer dans la cellule où ils interagissent avec leurs récepteurs. La **Figure 41** schématise ces deux situations.

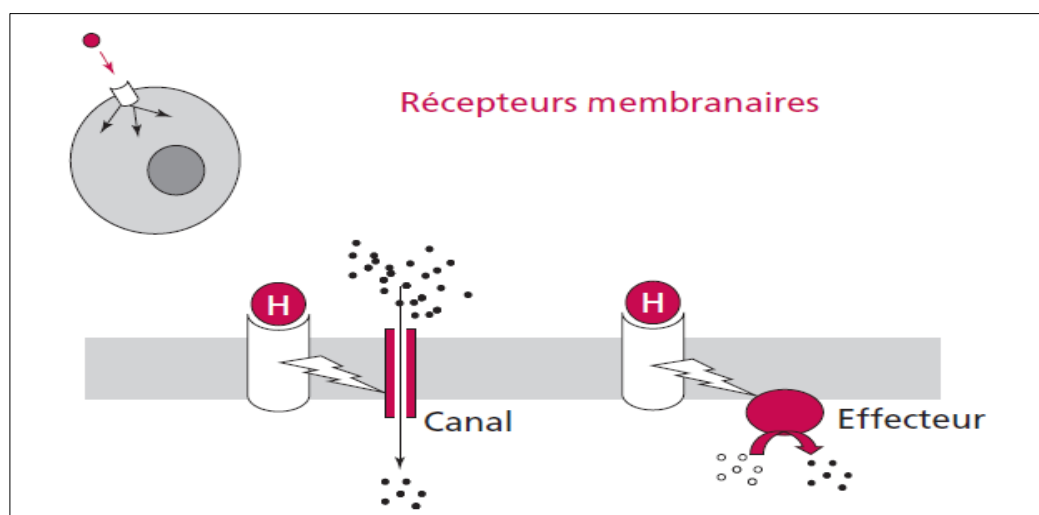


Figure 40. Mécanismes d'action des récepteurs membranaires. À gauche : ouverture d'un canal permettant l'entrée d'un second messager. À droite : activation d'un effecteur permettant la synthèse d'un second messager.

L'affinité et la spécificité des interactions **hormone-récepteur** sont les propriétés essentielles à leur activité. On peut concevoir que ces deux propriétés ne soient pas dépendantes des mêmes structures et qu'elles aient donc pu évoluer de manière indépendante au cours de l'évolution. En effet, la diversification des communications intercellulaires spécifiques ne nécessite que des modifications des propriétés de spécificité et pas obligatoirement de leurs propriétés d'affinité.

Les récepteurs d'une très grande majorité d'hormones et ceux des facteurs de croissance, des cytokines, des neurotransmetteurs et des phéromones sont membranaires et la stimulation initiale des cellules-cibles s'effectue donc à ce niveau. La transmission transmembranaire du signal intervient selon diverses modalités et conduit le plus souvent, en une ou plusieurs étapes, à l'activation d'une ou plusieurs **protéines kinases intracellulaires** et, en conséquence, à la phosphorylation spécifique de substrats protéiques. La modification des activités de ces protéines par leur phosphorylation induit alors les modifications métaboliques, génomiques et/ou morphologiques spécifiques de la réponse cellulaire à l'hormone.

Les récepteurs membranaires peuvent être classés en deux grandes familles sur une base structurale : les récepteurs à sept domaines transmembranaires (**R7TM**) et les récepteurs à un seul domaine transmembranaire. Les R7TM constituent une famille homogène par le fait qu'au-delà de leur parenté structurale, ils partagent un mécanisme d'action commun par leur couplage fonctionnel à des **protéines G hétérotrimériques**. De ce fait, ils sont communément dénommés récepteurs couplés aux protéines G (RCPG ou plus souvent GPCR : G protein-coupled receptors). À l'inverse des R7TM/GPCR, les récepteurs à un seul domaine transmembranaire ne constituent pas une famille homogène mais cette classification nous permettra de mieux appréhender les points communs et différences entre ces différents récepteurs (**Figure 42**).

Bien que les hormones et les cellules cibles d'un organisme soient extrêmement diverses, il n'existe qu'un nombre très restreint de mécanismes de transmission transmembranaire des actions hormonales et par conséquent un nombre tout aussi restreint de types de molécules engagées dans ces mécanismes (récepteurs, protéines de couplage, effecteurs, seconds messagers, kinase phosphatases, protéines plateformes, etc.).

La stimulation des cellules cibles par leurs messagers spécifiques conduit de manière quasi systématique à la stimulation d'une ou plusieurs protéine kinases. Les protéines kinases ainsi stimulées ont des spécificités différentes sur des résidus soit à fonction alcool (Ser/Thr-kinases),

soit à fonction phénolique (Tyr-kinases) appartenant à des séquences spécifiques (dites consensus car conservées dans les différents substrats d'une kinase).

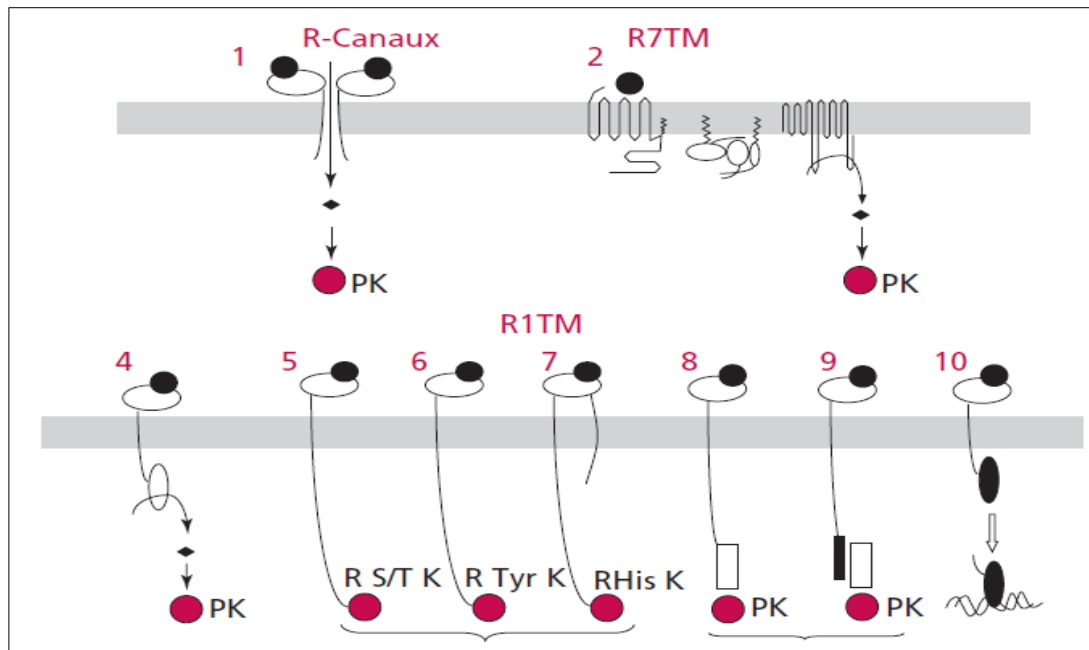


Figure 41. Schéma comparatif de l'ensemble des voies de signalisation en aval des récepteurs membranaires. De l'interaction du ligand à l'activation d'une protéine kinase (PK), le nombre d'étapes varie d'une seule (5-7) à au moins quatre (2).

Les protéines kinases sont activées après le déroulement d'un nombre variable d'étapes selon les voies de signalisation. Le nombre d'étapes élémentaires entre la liaison du ligand et l'activation de la (ou les) protéine kinase(s) varie de une à cinq ou plus. Le système le plus fréquent est celui qui fait intervenir les récepteurs à sept domaines transmembranaires (R7TM) qui stimulent la biosynthèse de seconds messagers intracellulaires par un mécanisme faisant intervenir plusieurs protéines membranaires dont en premier lieu, les protéines G, ce qui a conduit à les dénommer GPCR.

2.1.1. Les récepteurs canaux ioniques

Un certain nombre de récepteurs essentiellement activables par des neuromédiateurs (acétylcholine, glutamate, gamma-amino-butyrac acid [GABA]) sont des canaux ioniques. L'activation de ces récepteurs provoque des variations locales de potentiel qui peuvent conduire à des modifications à court (ou à long terme) du fonctionnement cellulaire (potentiels post-synaptiques excitateur [PPSE] ou inhibiteur [PPSI]), et peuvent participer aux mécanismes de potentialisation à long terme (LTP) (**Figure. 43**).

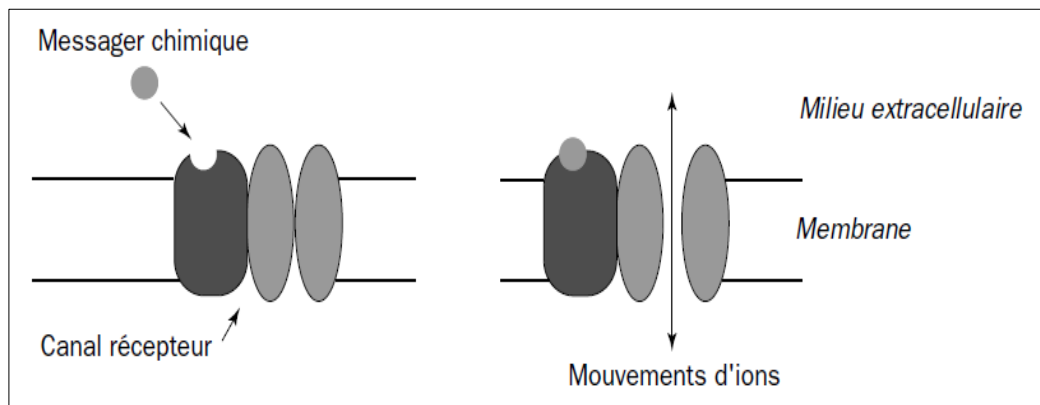


Figure 42. Représentation schématique d'un récepteur canal ionique.

2.1.2. Les récepteurs enzymes

Ces récepteurs enzymes sont soit des protéines tyrosine kinases (cas des récepteurs aux facteurs de croissance), soit des enzymes capables d'induire directement la synthèse d'un second messager cyclique (cas des récepteurs au facteur natriurétique atrial ou ANF).

La fixation du ligand (facteurs de croissance, insuline) sur les récepteurs tyrosine kinases provoque (lorsqu'ils ne sont pas déjà des dimères) une dimérisation et une transphosphorylation des récepteurs.

Les récepteurs tyrosine kinases ainsi activés phosphorylent différentes enzymes sur des résidus tyrosine (les autres kinases phosphorylent généralement sur des résidus sérine ou théonine). Ces phosphorylations peuvent conduire à la synthèse de seconds messagers (inositol [1, 4,5] triphosphate [IP3], diacylglycérol [DAG]), ainsi qu'à l'activation en cascade d'une grande variété d'enzymes impliquées dans les processus de différenciation et / ou prolifération cellulaires (**Figure. 44**).

Le récepteur pour l'ANF est une guanylate cyclase membranaire. Son activation entraîne la transformation du GTP (guanosine triphosphate) en GMPC (guanosine monophosphate cyclique) capable d'agir directement sur différentes perméabilités ioniques ou d'activer des protéines kinases G (PKG). Les rôles des PKG sont peu connus. Toutefois, leur implication a été démontrée dans la régulation de différentes perméabilités ioniques membranaires, ainsi que dans l'homéostasie calcique via la stimulation des Ca-ATPases du réticulum et probablement du sarcolemme.

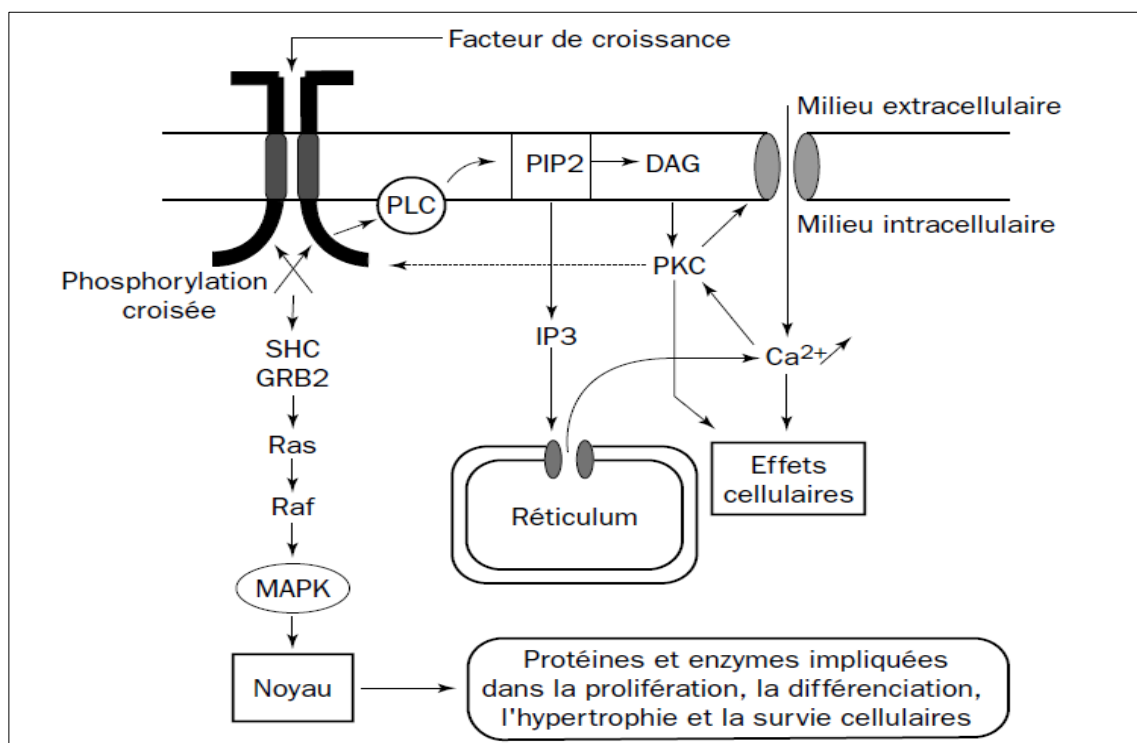


Figure 43 - Enzymes et protéines impliquées dans la prolifération, la différenciation, l'hypertrophie, les survies cellulaires

DAG : diacylglycérol ; GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2 ; IP3 : inositol (1,4,5) triphosphate ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate ; PKC : protéine kinase de type C ; PLC : phospholipase C ; Ras, Raf : proto-oncogènes ; SHC : domaine de reconnaissance 3 ; Sos : son of sevenless.

2.1.3. Les récepteurs couplés aux protéines G (R-CPG)

De nombreux récepteurs sont couplés à une classe de protéine liée au GDP (guanosine diphosphate) ou protéine G. Les protéines G sont des hétérotrimères membranaires composés de sous-unités appelées : $G\alpha$ - $G\beta$ - $G\gamma$. Il a été identifié environ vingt types de sous-unités α , 4 de β et 7 de γ . En l'absence de ligand, la sous-unité α est liée à du GDP. L'activation du récepteur génère des modifications au niveau de la protéine G : le remplacement du GDP porté par la sous-unité α par du GTP (il ne s'agit pas d'une phosphorylation) et la dissociation de la protéine G (**Figure. 45**).

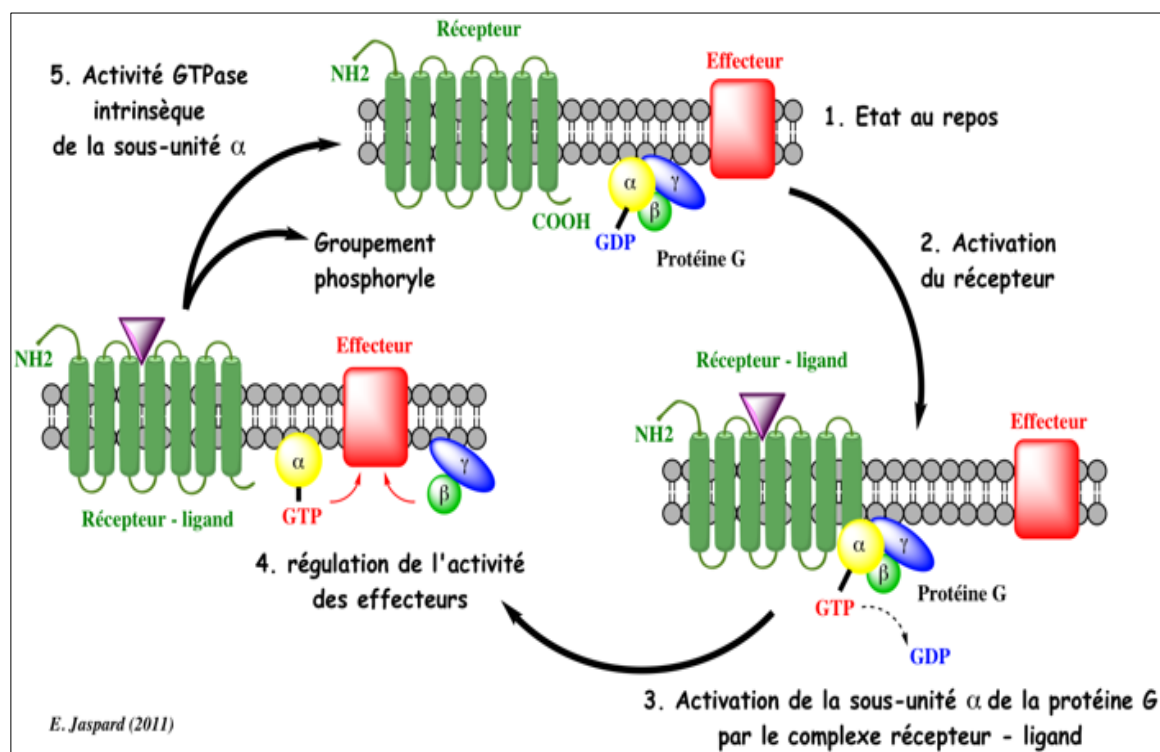


Figure 44 - Transduction du message hormonal par l'intermédiaire de la protéine Gs.

Selon le type de récepteur, la sous-unité α activée (α -GTP) peut alors agir sur différentes enzymes (adénylate cyclase, guanylate cyclase, phospholipase A ou C) pour stimuler ou inhiber (protéines Gs ou Gi dans le cas de l'adénylate cyclase) la synthèse de seconds messagers, ou agir directement sur divers types de canaux ioniques tels que certains canaux potassiques ou calciques. Ce dernier type d'action a aussi été mis en évidence pour les sous-unités β et γ qui semblent agir de concert. La sous-unité α est douée d'activité GTPasique, ce qui limite dans le temps son action.

L'utilisation d'analogues non-hydrolysables du GTP (ALF3-GTP γ S...) permet de maintenir en activité les protéines G. De plus, un certain nombre de protéines G sont sensibles à la toxine du choléra (*Vibrio cholerae*) qui inhibe l'activité GTPasique de la sous-unité α et / ou à la toxine de la coqueluche (*Bordetella pertussis*) qui découple la liaison récepteur / protéine G. Comme le montre le **tableau 3**, un grand nombre de messagers chimiques activent des récepteurs membranaires couplés à des protéines G. Il semble que la majorité de ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires (**Figure. 46**).

Tableau 3 .Exemples de messagers chimiques dont certains récepteurs sont couplés à des protéines G

Neuromédiateurs	Acétylcholine	G _s , G _i , G _k
	Adrénaline (R β)	G _s
	Dopamine (RD1, RD2)	G _s , G _i
	Neuropeptide Y	G _k
	Noradrénaline (R α 1-R α 2)	G _{PLC} , G _i
	Opiacés (μ , δ , κ)	G _i
	Sérotonine	G _s
Hormones	ACTH	G _s
	Bradykinine	G _i
	Calcitonine / CGRP	G _s
	GHRH	
	Glucagon	G _s
	LH	G _s
	Ocytocine	
	Somatostatine	G _i
	TRH	
	TSH	G _s
	Vasopressine (V2)	G _s
Autres messagers	Cytokines	G ?
	Prostaglandines	G _s , G _i , G _{PLX} , autres ?
	Thromboxane	G _s

G_i : protéine G inhibitrice ; G_k : protéine G provoquant l'ouverture de canaux K⁺ ; GPLA : protéine G activatrice d'une phospholipase A ; GPLX : protéine G stimulatrice d'une phospholipase quelconque ; G_s : protéine G stimulatrice.

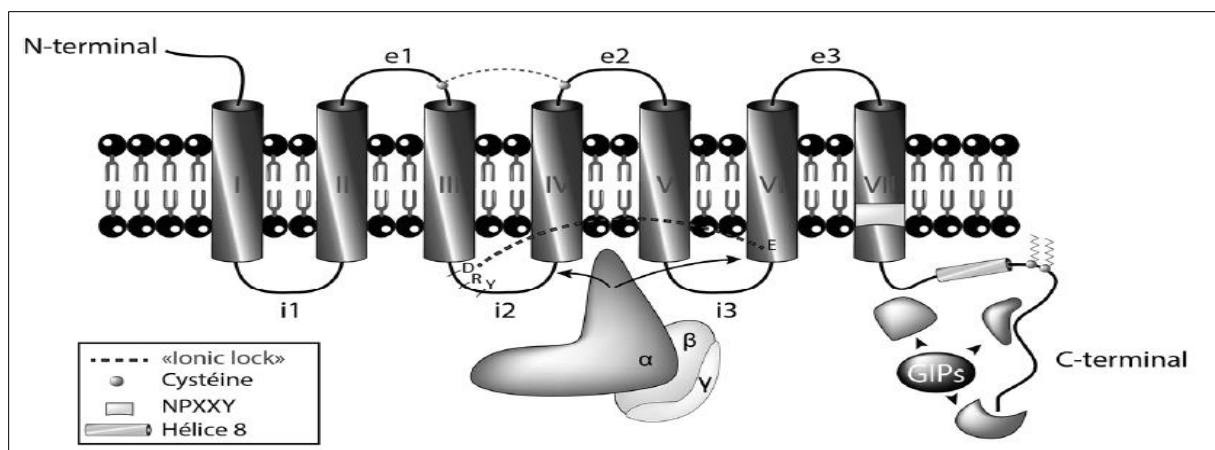


Figure 45 - Schéma d'un récepteur heptamembranaire.

Toutefois, jusqu'alors, il n'a pas été possible de déterminer une structure spatiale commune à tous les ligands susceptibles d'activer ce type de récepteurs. Quelles que soient les structures impliquées, la liaison ligand / récepteur provoque l'activation de plusieurs protéines G, ce qui déclenche la synthèse d'un grand nombre de molécules de seconds messagers et, finalement, conduit à une très forte amplification du message (**Figure. 47**).

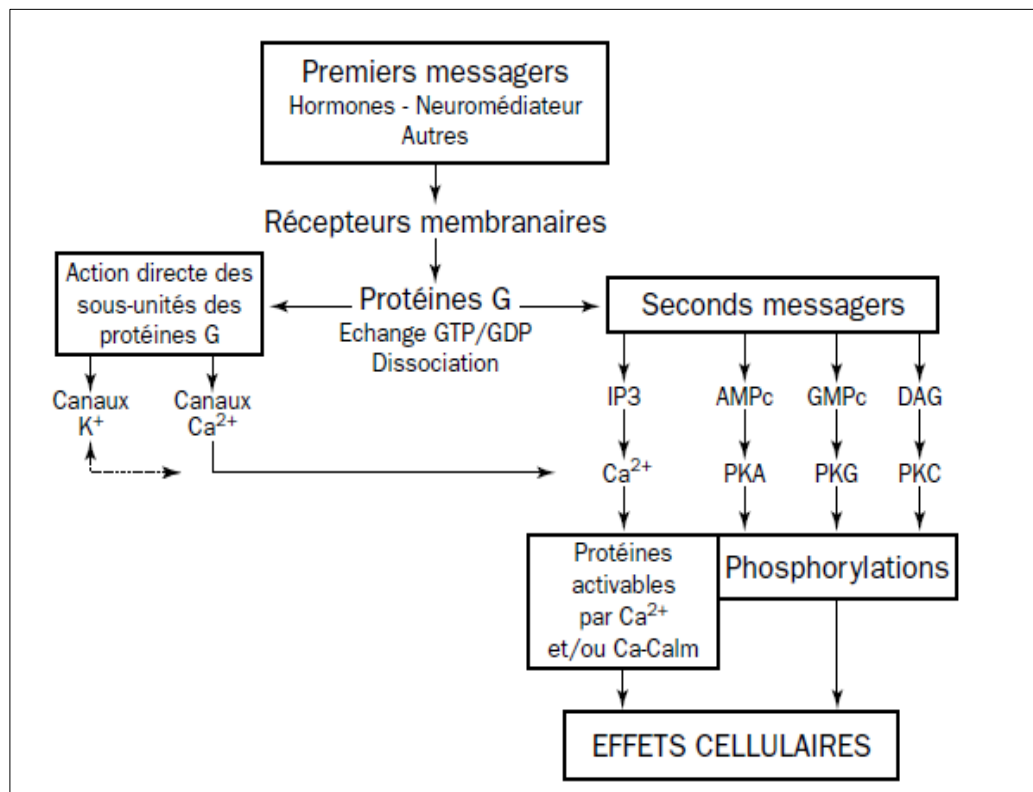


Figure 46 - Représentation schématique de la cascade de processus impliqués dans l'activation de récepteurs liés à des protéines G. Ca-Calm : calcium-calmoduline ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PKG : protéine kinase G.

2.1.4. Les récepteurs de la superfamille des cytokines

Ce sont les récepteurs de l'érythropoïétine, de la GH, de la prolactine, de l'HCG, de la leptine... Ces récepteurs ne possèdent pas de fonction tyrosine kinase. Cependant, leur activation met en jeu des mécanismes similaires à celui des récepteurs tyrosine kinases : dimérisation du récepteur, activation de protéines à fonction tyrosine kinase. Ceci donne lieu à une transphosphorylation de ces protéines et à la phosphorylation du récepteur. La suite de la cascade similaire à celle résultant de l'activation des récepteurs à fonction tyrosine kinase conduit à la prolifération et / ou la différenciation tissulaire (**Figure. 48**).

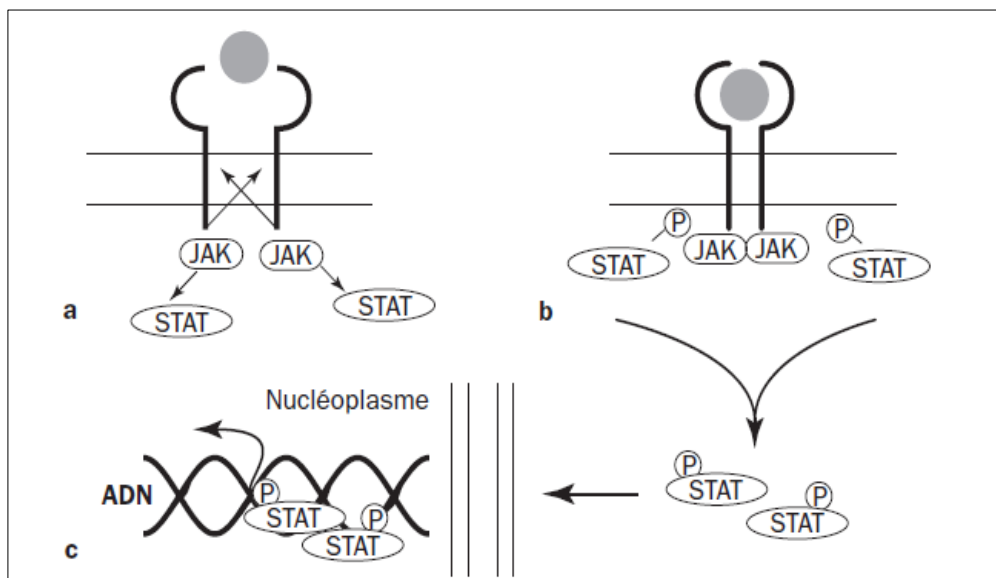


Figure 47 - Mécanisme de la transduction du signal par les récepteurs des cytokines. JAK : Janus activated kinase ; STAT : signal transducers and activators of transcription.

a - La liaison du ligand au récepteur entraîne la dimérisation de celui-ci.

b - Elle entraîne en outre l'activation de protéines JAK associées au récepteur. Ces protéines se transphosphorylent et phosphorylent le récepteur qui devient un site de liaison pour des protéines cytoplasmiques, les protéines STAT.

c - La liaison des protéines STAT au récepteur entraîne leur activation par phosphorylation.

Les protéines STAT activées forment des homo- ou hétérodimères, sont transloquées dans le noyau où elles lient des séquences spécifiques d'ADN et activent une série de gènes cibles.

2.1.5. Les récepteurs des cellules B

- **Activation des récepteurs BCR**

Le récepteur des cellules B (BCR, B-cell receptor) est un complexe multiprotéique comprenant une immunoglobuline (Ig) membranaire, élément de fixation de l'antigène, et un élément de signalisation fait de l'association hétérodimérique, via des ponts disulfure, d'une protéine Iga et d'une protéine Igβ. L'élément de fixation de l'antigène est une Ig complète, associant une chaîne lourde H et une chaîne légère L, insérée dans la membrane plasmique au niveau de son fragment Fc et présentant vers l'extérieur ses fragments Fab N-terminaux (**Figure 49**). Ces derniers présentent une immense variété de séquences, obtenue par recombinaison génique et hypermutations somatiques ; ils déterminent la spécificité clonale des anticorps et sont capables de reconnaître et de fixer chacun un antigène original. Les protéines Iga et Igβ, distinctes mais homologues, leur sont associées par des liaisons non covalentes. Elles contiennent chacune

un motif d'activation contenant deux résidus tyrosine (ITAM, Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) du côté cytoplasmique, dans le cadre d'une séquence consensus.

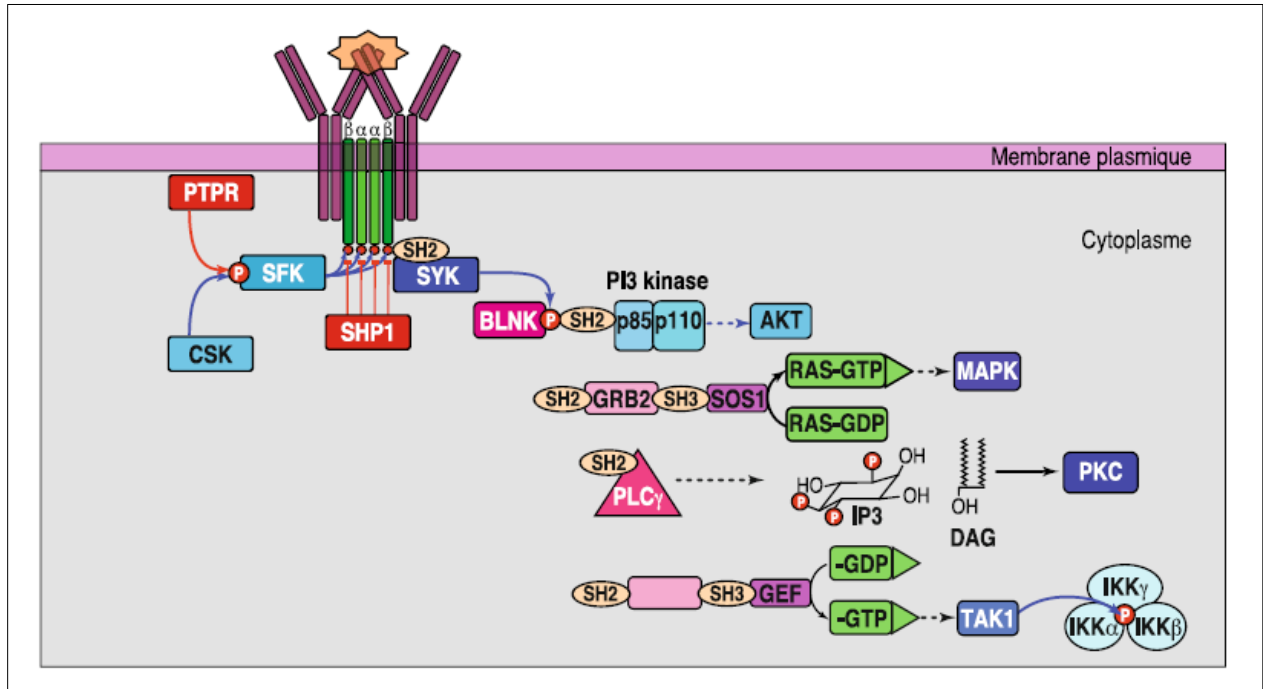


Figure 48 – Récepteurs des cellules B et voies de signalisation associées.

Des tyrosine kinases cytoplasmiques sont chargées de la phosphorylation de ces résidus tyrosine, ce qui permet ensuite leur reconnaissance par des protéines pourvues de domaines SH2 (voir chapitre 1). Ces tyrosine kinases appartiennent à la famille des SRC kinases (SFK, SRC-family kinases) : ce sont en particulier LYN (Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog), FYN (FES-YES related novel gene), BLK (B-lymphoid tyrosine kinase) et LCK (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). Ces kinases sont ancrées dans la membrane plasmique par une chaîne acylée ajoutée de façon post-traductionnelle (voir Annexe C). Leur activité est facilitée par l'agrégation locale des récepteurs au niveau de radeaux lipidiques (rafts) ; cette agrégation survient lors de l'activation des récepteurs, et permet l'agrégation des kinases.

Des phosphatases comme SHP1 (SH2-containing phosphatase 1) peuvent être recrutées pour contrebalancer l'activation des kinases afin d'obtenir un degré de phosphorylation adéquat des ITAM. Les kinases, en dehors du complexe de réception, sont elles-mêmes soumises à une balance entre leur phosphorylation par une kinase CSK (c-src tyrosine kinase) et leur déphosphorylation par une phosphatase CD45 ou PTPR (Protein tyrosine phosphatase, receptor type).

C'est une autre tyrosine kinase, SYK (Spleen tyrosine kinase), qui reconnaît les tyrosines phosphates des ITAM des protéines Ig α et Ig β et peut à son tour phosphoryler des substrats, qui est responsable de la transduction du signal. Une protéine adaptatrice pourvue de domaines SH2, BLNK (B-cell linker protein), permet le recrutement des effecteurs de l'activation des BCR. Quant à l'antigène qui a activé le signal, il est internalisé avec le récepteur, envoyé vers des compartiments endosomaux pour être ultérieurement présenté aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Les protéines Ig α et Ig β semblent en revanche rester en place pour maintenir une signalisation en absence du complexe de réception du signal. La **Figure 49** présente l'initiation de la signalisation par les récepteurs BCR.

- **Voies de transmission du signal**

L'activation des BCR conduit à une grande diversité de voies de signalisation, tout particulièrement aux voies de prolifération nécessaires à l'expansion clonale des lymphocytes B. Nous ne ferons ici que les citer, en renvoyant le lecteur vers les chapitres où ces voies sont présentées en détail :

- voie ERK des MAP kinases, atteinte par le recrutement de GRB2 par la protéine adaptatrice BLNK ; rappelons simplement que GRB2 recrute SOS1, la protéine GEF de RAS, lui-même activateur de la MAP3K appelée RAF ;
- voies p38 et JNK des MAP kinases, atteintes par recrutement, par BLNK, de GEF de petites protéines G de la famille RHO, qui activent les MAP3K correspondantes ;
- voie de la PI3 kinase, atteinte par recrutement de la protéine adaptatrice GAB, qui possède un domaine SH2 qui reconnaît les tyrosines phosphates de SYK et un domaine SH3 reconnu par la sous-unité régulatrice de la PI3 kinase ;
- voie des IKK, atteinte d'une part par AKT, de la voie de la PI3 kinase, et d'autre part par l'activation de TAK1 par des petites protéines G activées après recrutement d'un GEF ;
- voie de l'IP3 et du DAG, atteinte par activation de la PLC γ , qui est pourvue de domaines SH2 ;

Toutes ces voies convergent vers des facteurs de transcription impliqués dans la survie et la prolifération lymphocytaires et étudiés dans les chapitres correspondants : MYC, ELK, JUN, NF κ B, etc.

2.1.6. Les récepteurs des cellules T

- **Activation des récepteurs TCR**

Le récepteur des cellules T (TCR, T-cell receptor) est lui aussi un complexe multiprotéique comprenant un élément de fixation de l'antigène et un élément de signalisation appelé CD3 :

- le module de reconnaissance de l'antigène est constitué de deux polypeptides transmembranaires, α et β , dont la partie extracellulaire, glycosylée, est analogue aux fragments Fab d'immunoglobulines ; chacune contient une partie constante et une partie variable associées par un pont disulfure. Le domaine transmembranaire est fait d'une simple hélice et le domaine intracellulaire est très court (de quatre à dix résidus).
- le module de signalisation est constitué de polypeptides transmembranaires hétérodimériques CD3 (CD3 ϵ -CD3 γ et CD3 ϵ -CD3 δ) et d'un polypeptide transmembranaire homodimérique, CD247, fait de deux chaînes ζ au domaine extracellulaire très réduit. La partie intracellulaire des protéines CD3 contient environ cinquante acides aminés et celle de la protéine CD247 en contient cent dix (**Figure. 50**). Les chaînes ζ contiennent des résidus tyrosine phosphorylables, les ITAM.

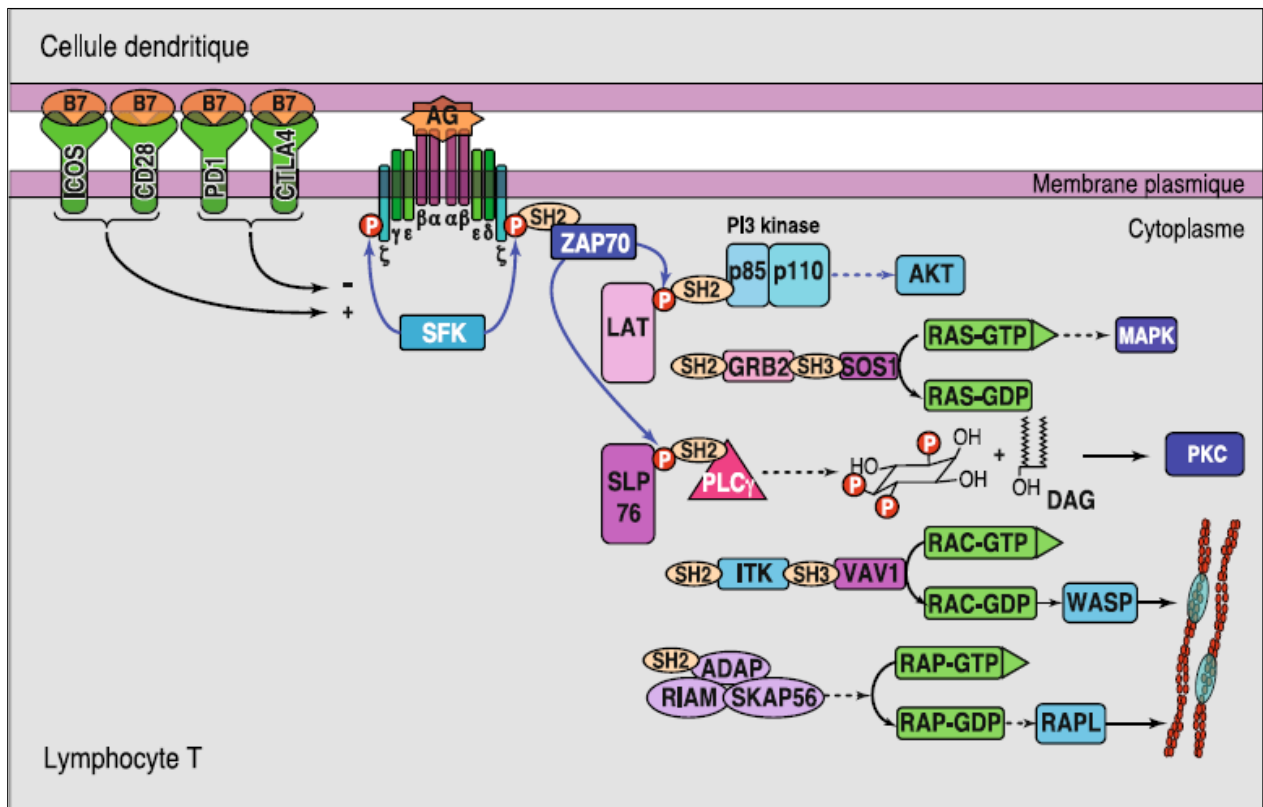


Figure. 49 – Récepteurs des cellules T et voies de signalisation associées.

La stoechiométrie du complexe de réception fait intervenir deux hétérodimères TCR α -TCR β , deux hétérodimères CD3 et un homodimère CD247 (($\alpha\beta$)² : $\epsilon\gamma$: $\epsilon\delta$: $\zeta\zeta$). Les complexes sont en fait organisés en clusters multimériques localisés dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Comme pour les BCR, la première étape de la signalisation est l'activation de kinases de la famille SRC (SFK), comme FYN et LCK. Ces kinases viennent phosphoryler les

ITAM du CD247, ce qui permet de recruter une autre tyrosine kinase cytoplasmique, la ZAP70 (Zeta-chain associated protein kinase 70 kDa). Des protéines adaptatrices pourvues de domaines SH2 sont alors mises en jeu : LAT (Linker for the activation of T cells) et SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa) ou LCP2 (Lymphocyte cytosolic protein 2). Ces protéines jouent le rôle d'intermédiaires pour le recrutement d'autres protéines de signalisation. Outre le récepteur principal, TCR, les lymphocytes T possèdent des récepteurs accessoires, qui sont des immunoglobulines dont les mieux connues sont le CD28 et la protéine ICOS (Inducible T-cell costimulator) ; l'activation complète des cellules T requiert la fixation, sur ces récepteurs, de molécules costimulatrices parmi lesquelles les protéines B7, également apportées par les cellules présentatrices d'antigènes.

Toutefois, d'autres récepteurs accessoires présents à la surface des lymphocytes T, analogues de CD28, ont un effet inhibiteur : ce sont CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) et PD1 (Programmed death 1). Ces récepteurs exercent un effet immunosuppresseur en bloquant la réception des molécules costimulatrices (**Figure. 50**). La signalisation par les récepteurs accessoires est en fait bidirectionnelle et peut se faire entre cellules T, ce qui est récepteur pour l'un étant ligand pour l'autre et vice et versa. Un inhibiteur général de l'activation des lymphocytes T est une protéine CBL (Casitas B-lineage lymphoma) qui est une E3 ubiquitine-ligase capable de reconnaître des phosphotyrosines : cette molécule a un effet inducteur de la tolérance immunologique et semble jouer un rôle majeur dans le contrôle du niveau d'activation des lymphocytes T, en particulier pour éviter la reconnaissance du soi et les phénomènes d'auto-immunité. Signalons enfin qu'en dehors des récepteurs lymphocytaires spécifiques, les cellules T expriment le récepteur-canal du Ca^{2+} , CRAC (Calcium release-activated calcium modulator), qui permet l'activation de la calcineurine, une phosphatase qui active le facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T cells). Ce facteur de transcription, malgré son nom, n'est pas spécifique des cellules T.

- **Voies de transmission du signal**

Une série de protéines effectrices peuvent exercer leurs effets grâce à leur recrutement par les protéines adaptatrices LAT et SLP76 ; certaines sont déjà présentées de façon détaillée dans d'autres chapitres, car elles ne sont pas spécifiques de l'activation lymphocytaire :

- la protéine GRB2 ouvrant la voie des MAP kinases via l'activation de RAS;
- la protéine p85 ouvrant la voie de la PI3 kinase;
- la PLC γ permettant la formation du DAG et de l'IP $_3$, donc ouvrant la signalisation calcique;

- la PKC θ , qui est à l'origine de la formation d'un complexe CBM, spécifique de l'activation lymphocytaire ; ce complexe est formé de la protéine CARMA1 (CARD [Caspase recruitment domain] and membrane-associated guanylate kinase), de la protéine BCL10 (B-cell lymphoma 10, une protéine adaptatrice à domaine CARD) et de la protéine MALT1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1). Ce complexe est à l'origine de l'activation de la kinase NIK (NF κ Binding kinase), qui est elle-même à l'origine de l'activation du facteur de transcription NF κ B;
- la tyrosine kinase cytoplasmique ITK (IL2-induced tyrosine kinase), elle-même à l'origine du recrutement de la protéine VAV1 (du nom du sixième oncogène découvert par Barbacid), qui est un GEF permettant l'activation de petites protéines G de la famille RHO comme RAC1 et CDC42 ; ces protéines sont impliquées dans l'adhésion et la migration des cellules, par l'intermédiaire de protéines d'interaction avec le cytosquelette d'actine que l'on appelle les protéines WASP (Wiskott-Aldrich syndrome proteins). Cette voie est à l'origine de l'activation intracellulaire des intégrines en promouvant leur agrégation. L'ITK possède un domaine PH expliquant son recrutement à la membrane et son activation de la voie AKT ;
- la protéine RAP1 (Regulator of adhesion and polarization 1), qui est une petite protéine G activée par un complexe fait de trois protéines, recruté par SLP76 : ADAP (Adhesion and degranulation-promoting adapter protein), RIAM (Rap1-interacting adaptor molecule) et SKAP55 (SRC kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa) ; RAP1 est également un médiateur de l'activation intracellulaire des intégrines et joue un rôle au niveau de l'adhésion et de la migration cellulaires.

2.2. Régulation du nombre des récepteurs

Le nombre limite de récepteurs spécifiques permet de restreindre la réponse cellulaire en cas de concentration hormonale élevée.

En fait, les phénomènes ne sont pas toujours aussi simples. On suppose pour simplifier que les sites, pour un même type, n'interagissent pas. Le nombre des sites des récepteurs peut varier en fonction de l'état physiologique (et surtout hormonal) de la cellule, témoignant d'un mécanisme régulateur portant sur la biosynthèse ou sur la dégradation du récepteur ou sur les propriétés structurales du récepteur.

C'est ainsi qu'une stimulation prolongée du récepteur nicotinique entraîne une plus grande affinité pour l'agoniste, mais le canal devient imperméable aux ions sodium.

L'hormone peut elle-même agir sur le nombre de ses récepteurs. C'est le cas de l'insuline, l'insulinémie élevée dans l'obésité s'accompagne d'une diminution du nombre des récepteurs Au

contraire, l'œstradiol augmente la teneur en récepteurs de ses cellules cibles. Par ailleurs, l'effet "facilitant" de l'œstradiol sur la sécrétion des hormones progestagènes ou de la FSH sur la sécrétion de la LH s'explique par le fait que les œstrogènes augmentent la synthèse du récepteur utérin de la progestérone et que la FSH augmente le nombre des récepteurs de la LH au niveau de la granulosa.

Le nombre de récepteurs sur la membrane cellulaire n'est pas fixe et peut augmenter (up regulation) ou diminuer (down-regulation). Le nombre de récepteurs peut varier en fonction :

1. du programme génétique (développement, puberté, ménopause, âge...),
2. de l'action du messenger chimique sur ses récepteurs (régulation homospécifique),
3. de l'action d'autres messagers chimiques agissant sur leurs récepteurs (régulation hétérospécifique),
4. de la présence d'agents qui ne sont pas des messagers chimiques (virus...).

Le nombre de récepteurs peut être régulé au niveau du génome mais aussi au niveau de la membrane. A ce niveau, le messenger peut agir en provoquant l'internalisation du récepteur. Celle-ci a souvent lieu lorsque le récepteur est lié à son ligand. Elle peut être provoquée par des phosphorylations homo- ou hétérospécifiques. Lorsque le couple récepteur-messenger est internalisé, il peut :

1. être dissocié par les lysosomes (le messenger chimique et / ou le récepteur peuvent alors être dégradés),
2. être dissocié, et seul le messenger chimique est dégradé, le récepteur étant, lui, recyclé,
3. se lier (un ou les deux éléments du couple) à des récepteurs intracellulaires ou intranucléaires.

2.3. Internalisation des complexes récepteurs-hormones polypeptidiques

Des hormones polypeptidiques telles que l'insuline, l'hormone de croissance, la LH- RH, la TRH, la prolactine, subissent, après avoir formé un complexe avec leur récepteur membranaire, un processus d'internalisation par endocytose. La vésicule endocytotique, recouverte de clathrine (réceptosome), s'enfonce dans la cellule en perdant son enveloppe de clathrine. Elle peut gagner l'appareil de Golgi où elle fusionne avec une vésicule golgienne. L'appareil de Golgi apparaît ainsi très riche en récepteurs. L'hormone polypeptidique peut être ensuite transférée dans un lysosome où elle est dégradée. Une autre alternative, qui paraît s'appliquer à l'EGF (epidermal growth factor), à la LH-RH, à la TRH, serait, après l'étape golgienne, un transfert vers le noyau sur lequel l'hormone pourrait avoir une action directe.

Pendant ce temps, les molécules de récepteurs, après s'être séparées des molécules hormonales, peuvent être recyclées en reprenant leur place au niveau de la membrane plasmique. Le recyclage n'exclut pas la possibilité de néo-formation de récepteurs par synthèse protéique.

2.4. Les différents types de messagers chimiques impliqués dans la communication intercellulaire

La découverte constante de nouveaux messagers, ainsi que la mise en évidence de nouvelles propriétés des messagers existants font que la classification classique (fondée sur les fonctions et / ou le mode d'action des messagers) est régulièrement remise en cause.

Les **neuromédiateurs**, les **phéromones** (moyens de communication - différés ou non - entre individus), ainsi que les **cytokines** ne font pas l'objet de cet ouvrage. Les **neurohormones**, en tant que telles, ne seront pas spécifiquement abordées dans ce chapitre (elles ne diffèrent pas particulièrement des hormones). Nous distinguerons donc ici cinq types de messagers chimiques.

2.4.1. Les hormones

Une hormone est une substance chimique produite par une cellule sécrétrice qui la libère dans la circulation. L'hormone ainsi convoyée va agir, en quelques secondes, sur différents types de cellules cibles. Cette action se traduit par des modifications de la physiologie de la cellule réceptrice, et résulte de la liaison du messenger hormonal avec des récepteurs spécifiques membranaires ou intracellulaires de la cellule cible.

2.4.2. Les pro-hormones

Les pro-hormones sont de grosses molécules, généralement peptidiques, précurseurs des hormones. Ces pro-hormones peuvent être découpées (éventuellement pour la même pro-hormone, d'une façon variable) pour donner une ou plusieurs hormones. Il existe ainsi des **pré-pro-hormones** dont le découpage comporte une ou plusieurs étapes supplémentaires. Le découpage des pro-hormones peut se faire au niveau du site de production - cas de la pro-opiomélanocortine (POMC), mais aussi au niveau du sang et / ou de l'organe cible (cas de l'angiotensinogène). Remarquons avec cet exemple, qu'au sens strict, l'angiotensine produite par dégradation de l'angiotensinogène par la rénine sanguine (ou endothéliale) ne peut être considérée comme une hormone. Un certain nombre de vitamines (A, B, D, K), qui ne sont pas synthétisées directement par l'organisme (apport alimentaire, action des UV, synthèse par les bactéries intestinales), peuvent être cependant considérées comme des pro-hormones, voire des hormones.

2.4.3. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des messagers chimiques produits par une grande variété de types cellulaires (neurones, glandes salivaires, cellules vasculaires, plaquettes...) qui stimulent la prolifération et / ou la différenciation. Leur mode d'action n'est pas différent de ceux décrits plus haut (ils exercent cependant essentiellement une action autocrine ou paracrine). Un certain nombre d'hormones (insuline, endothéline, angiotensine, prolactine...) exercent, en outre, des actions de type facteur de croissance (pour certaines, leur récepteur est couplé à une protéine possédant une fonction tyrosine kinase), ou sont des agents co-mitogènes.

2.4.4. Les parahormones

Un certain nombre de substances impliquées dans des modes de communication auto-, para- ou endocrine sont des messagers chimiques que l'on ne peut pas (toujours) classer comme des hormones vraies. C'est le cas de l'histamine, l'acide arachidonique et ses dérivés (leucotriènes, thromboxane, prostaglandines), le monoxyde d'azote, le PAF (platelet activating factor), les endothélines.

Un autre mode de classification des messagers chimiques consisterait à prendre en compte leur capacité à traverser ou non la membrane cellulaire et à considérer que les messages hydrosolubles sont actifs sur les récepteurs membranaires et que les messages liposolubles possèdent des récepteurs intracellulaires. Cette classification ne peut (comme les autres) être appliquée strictement, car certains messagers peuvent diffuser dans l'eau et dans les lipides et, de plus, certains possèdent des récepteurs membranaires et intracellulaires. Aussi, dans ce chapitre, nous envisagerons successivement, et avec les restrictions formulées plus haut, la traduction des messagers chimiques via la mise en jeu des récepteurs membranaires puis la traduction des messages via la mise en jeu de récepteurs intracellulaires.

2.4.5. Neuromédiateurs

Dans le cas du système nerveux, la communication entre la cellule émettrice et la cellule réceptrice se réalise au niveau de structures spécialisées, les synapses. Les neurones sont des cellules hautement différenciées formées d'un corps cellulaire, de dendrites et d'un axone. Les synapses sont établies entre les axones des cellules émettrices (A) et les corps cellulaires ou les dendrites des cellules réceptrices (B). Les neurones excités transmettent un signal électrique le long de leur axone. Ce signal provoque, au niveau de la synapse, la libération d'un médiateur (neuromédiateur ou neurotransmetteur). Celui-ci, en se liant à un récepteur de la cellule réceptrice (sur le corps cellulaire ou une dendrite d'un neurone ou sur la plaque neuromusculaire d'une

cellule musculaire), provoquera l'excitation de cette dernière. La cellule réceptrice conduira à son tour le signal électrique (neurone) ou se contractera (muscle).

Les corps cellulaires des cellules A et B peuvent être éloignés de quelques microns ou de un à plusieurs mètres (chez l'homme ou la baleine par exemple), mais le neuromédiateur ne parcourt, dans tous les cas, qu'une fraction de micron à l'intérieur de la synapse. C'est donc le « câblage » des neurones entre eux et avec les cellules musculaires qui est essentiellement responsable de la spécificité des interactions cellulaires. Bien évidemment, la cellule B n'est réceptrice que si elle possède, au niveau synaptique, le récepteur du neuromédiateur produit par la cellule A.

3. Traduction membranaire des messages chimiques

3.1. Les seconds messagers

L'activation des récepteurs tyrosine kinases, des récepteurs couplés à des protéines G, ainsi que celle d'autres types de récepteurs, de même que la mise en jeu de facteurs physico-chimiques (comme l'étirement membranaire) induisent la production de seconds ou troisièmes messagers. Les principaux seconds messagers connus sont : l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), le GMPc (guanosine monophosphate cyclique), le DAG (sn-1,2 diacylglycérol), les dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines et thromboxane), le monoxyde d'azote (NO), l'ADPRc (adénosine-ribose diphosphate cyclique).

En 1984, il apparaissait que les hormones polypeptidiques qui n'agissaient pas selon un mécanisme AMPc-dépendant mettaient en jeu un mécanisme calci-dépendant (à l'exception de la prolactine, de l'insuline et de la GH). C'était le cas :

- en augmentant le Ca^{2+} intracellulaire libre,
 - de la noradrénaline (sur les récepteurs $\alpha 1$),
 - de l'ADH dans le foie,
 - du stimulus glucose sur la sécrétion de parathormone ;
- en diminuant le Ca^{2+} intracellulaire libre.

3.1.1. L'AMP cyclique

L'adénosine monophosphate cyclique (**Figure 51**) a été le premier second messager découvert (1967). Il agit dans un très grand nombre de types cellulaires pour participer à la régulation d'une très grande variété de processus physiologiques. Un grand nombre de messagers chimiques stimule la synthèse d'AMPc via l'activation d'une protéine G_s , d'autres (moins nombreux) l'inhibent par la mise en jeu d'une protéine G_i . Il a été montré que l'action inhibitrice de G_i ne peut s'exercer que sur l'adénylate cyclase préalablement activée par G_s . L'AMPc formé

stimule différentes protéines et, en particulier, la protéine kinase A (PKA). La protéine kinase A phosphoryle un grand nombre de protéines, ce qui a pour conséquences majeures :

1. d'induire l'activation de la phosphorylase b (enzyme impliquée dans le métabolisme énergétique),
2. de stimuler le calcium ATPase du réticulum (stimulation du repompage du calcium),
3. d'induire l'ouverture de canaux ioniques membranaires sensibles au voltage (K^+ , Ca^{2+}),
4. de moduler la synthèse protéique via son action sur la MAPK (mitogen activated protein kinase).

Lorsque le ligand se sépare de son récepteur, soit après phosphorylation directe par la PKA ou par une phosphorylation via une cascade dont le point de départ est la PKA, ou après phosphorylation par d'autres kinases telle que le PKC (protéine kinase C), la protéine G n'est plus activée, l'AMPc formé disparaît sous l'action d'une phosphodiesterase des nucléotides cycliques (phosphodiesterase stimulée par le GMPc). Il est à noter que cette dernière présente plus d'affinité pour l'AMPc que pour le GMPc. L'action stimulatrice des phosphorylations réalisées par la PKA disparaît sous l'action de phosphatases (pour certaines, préalablement activées par une phosphorylation dépendante de la PKA elle-même).

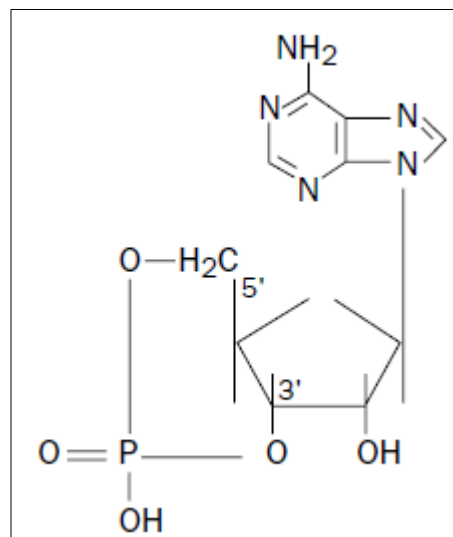


Figure 50. Adénosine 3',5' monophosphate cyclique ou AMP cyclique (AMPc).

3.1.2. Le GMP cyclique

Le guanosine monophosphate cyclique 1 (GMPc) est formé lors de :

1. l'activation d'une guanylate cyclase membranaire (récepteur à l'ANF) ou cytoplasmique (NO)
2. processus mettant en jeu une protéine G (rhodopsine) activée par la lumière,
3. la stimulation de récepteurs couplés à une protéine G (acétylcholine...).

Le GMPc peut avoir une action directe pour inhiber ou activer différents types de perméabilités ioniques ou une action indirecte par la stimulation de protéine kinases G. En outre, comme il a été dit plus haut, il stimule une phosphodiesterase active sur les nucléotides cycliques (**Figure 52**). Les rôles joués par les protéines kinases G sont mal connus. Toutefois, il a été mis en évidence l'implication de phosphorylations dépendantes des PKG dans la modulation de certaines perméabilités ioniques, ainsi que dans l'activation des calcium-ATPases du réticulum (et / ou de la membrane plasmique), ce qui finalement conduit à diminuer la teneur en calcium libre cytoplasmique. De ce point de vue, et c'est souvent le cas, l'AMPc et le GMPc ont des effets opposés, sauf semble-t-il au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires.

Comme l'AMPc, le GMPc est désactivé par une phosphodiesterase qu'il stimule.

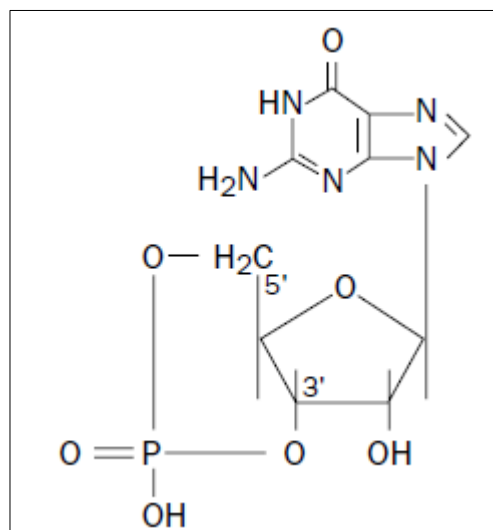


Figure 51. Guanosine 3',5' monophosphate cyclique ou GMP cyclique (GMPc).

3.1.3. L'ADPR cyclique

L'adénosine-ribose diphosphate cyclique (ADPRc) (**Figure.53**) a été découvert en 1987. Depuis, sa présence a été détectée, des Invertébrés à l'Homme, dans un grand nombre de types cellulaires. La formation d'ADPRc à partir de NAD^+ est, en large majorité, réalisée par une enzyme de la membrane du réticulum. Cette enzyme est bi-fonctionnelle : elle assure à la fois la

synthèse et l'hydrolyse de l'ADPRc. L'ADPRc agit sur les canaux calciques du réticulum sensibles à la ryanodine (alcaloïde végétal) et au calcium (impliqué, à ce titre, dans ce qu'il est convenu d'appeler le "Ca²⁺ induced Ca²⁺ release" [CICR] : le calcium induit la libération de calcium). A ce niveau, il a été clairement démontré que l'ADPRc agit sur le réticulum indépendamment des effets de l'IP3.

S'il a été démontré l'implication de l'ADPRc dans l'augmentation du calcium libre intracellulaire d'œufs fécondés, ainsi que dans l'activation in vitro de certains canaux ioniques du réticulum, on ne connaît pas de messenger chimique susceptible d'induire la production de l'ADPRc. Aussi, le rôle physiologique de l'ADPRc dans d'autres situations reste donc à démontrer.

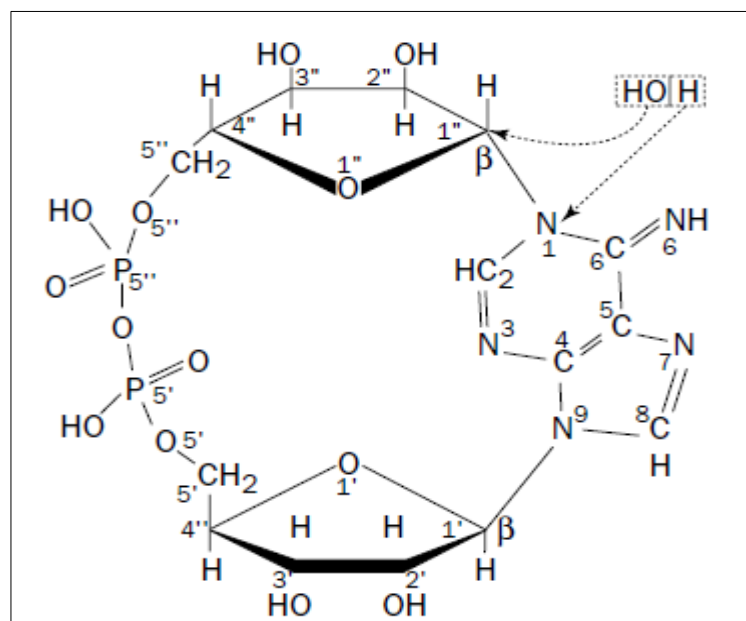


Figure 52. Adénosine-ribose diphosphate cyclique (ADPRc)

3.1.4. Les inositols phosphates et le diacylglycérol

De nombreux messagers stimulent leurs cibles via l'activation du métabolisme des phosphatidylinositols (Ptd Ins), ce qui conduit à la synthèse d'inositol (1,4,5) triphosphate (IP3) et de sn-1,2 diacylglycérol (DAG). Un troisième messenger est formé lors de ce métabolisme, l'inositol (1,3,4,5) tétraphosphate (IP4). L'IP4 joue, dans certains types cellulaires, le rôle de second messenger actif sur le métabolisme du calcium (**Figure. 54**).

L'IP3 et le DAG sont synthétisés lors de l'activation des récepteurs tyrosine kinases activables par les facteurs de croissance, ainsi que dans le cas de récepteurs membranaires couplés à une protéine G qui stimule une phospholipase membranaire (**Figure. 55**). De même, il a été

montré que l'étirement de la membrane de certains types cellulaires induit la synthèse d'IP3. En outre, une synthèse d'IP3 existe au niveau de la membrane nucléaire. Le DAG provoque l'activation de la protéine kinase C (sensible au calcium). La fixation du calcium sur ses récepteurs canaux ioniques du réticulum conduit à la libération de calcium. Enfin, il a été montré que, dans certains types cellulaires, l'existence des canaux cationiques membranaires activables par l'IP3 laisse passer le calcium. L'IP4 est lui aussi capable, dans certains types cellulaires, d'activer des canaux du réticulum et, peut-être, de la membrane plasmique.

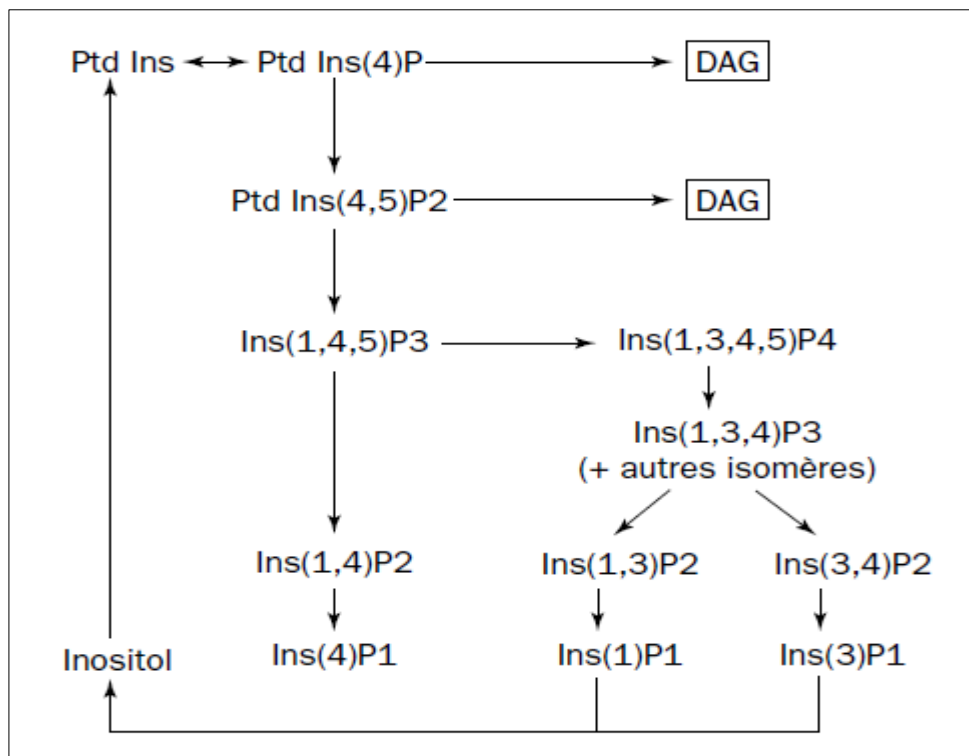


Figure 53 - Représentation schématique du cycle des inositols phosphates

DAG : sn-1,2 diacylglycérol ; InsP : inositol phosphate(s) ; IP3 : Ins(1,4,5)P3 ; IP4 : Ins(1,3,4,5)P4 ; PIP2 : Ptd Ins(4,5)P2 ; Ptd Ins : phosphatidylinositol.

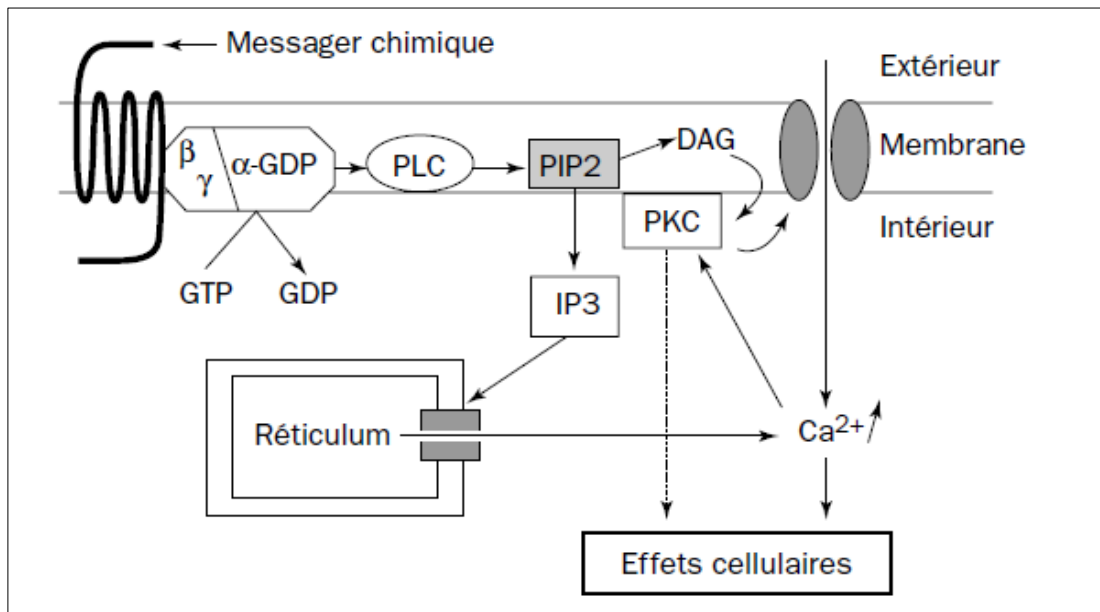


Figure 54 - Représentation schématique de la synthèse d'IP3 et de DAG

DAG : sn-1,2 diacylglycérol ; IP3 : Ins(1,4,5)P3 ; PIP2 : Ptd Ins(4,5)P2 ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C.

3.1.5. Les céramides

La sphingomyéline et la sphingomyélinase sont deux protéines colocalisées du côté externe de la membrane cellulaire. L'activation de la sphingomyélinase (enzyme inductible) par différents agents ou messages chimiques conduit à la production de céramide. Les céramides sont des seconds messagers impliqués, suivant le type cellulaire, dans des mécanismes variés tels que la différenciation, la prolifération, la senescence cellulaires ou l'apoptose (**Figure. 56**).

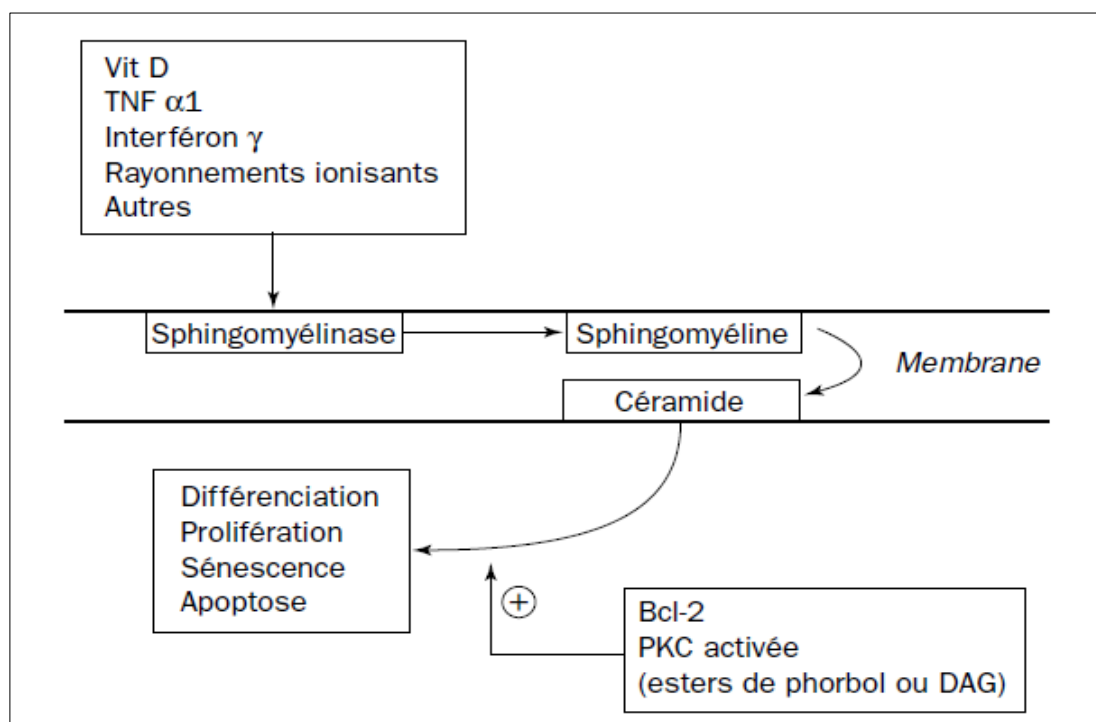


Figure 55 - Représentation schématique des mécanismes impliqués à la suite de l'activation de la sphingomyélinase

3.1.6. Le calcium

La teneur en calcium libre cytoplasmique $[Ca^{2+}]_i$ est un paramètre fortement régulé. La concentration cytoplasmique, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-6}$ M, est très faible, si on la compare aux teneurs du calcium extracellulaire ou au calcium contenu dans les sites de stockage (de l'ordre de 10^{-3} M). Les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ constituent un message (second ou troisième) pour un grand nombre d'actions enzymatiques. Le calcium peut agir directement ou via la calmoduline, une protéine qui lie le calcium.

A concentration élevée, le Ca^{2+} se lie réversiblement à des protéines spécifiques ou calciprotéines. En même temps que Ebashi, à Tokyo en 1970, découvrait que le Ca^{2+} déclenche la contraction musculaire en se liant à une calciprotéine : la troponine C, d'autres auteurs japonais découvrent que l'adénylate cyclase est activée par une calciprotéine, la calmoduline. En fait, la calmoduline apparaît comme le modulateur de la majorité des effets cellulaires du calcium, la troponine C n'étant qu'une forme spécialisée de la calmoduline.

La calmoduline est ubiquitaire, elle est présente depuis les végétaux jusqu'aux animaux supérieurs. C'est une protéine de PM 17 000 (148 AA). Elle possède quatre sites de liaisons du Ca^{2+} . Elle intervient :

- comme sous-unité de la phosphorylase b kinase dans la contraction du muscle strié,

- dans l'assemblage et la dissociation des microtubules,
- en favorisant la phosphorylation de la myosine (via l'activation d'une protéine kinase) dans l'interaction actine / myosine au cours de la contraction des cellules musculaires lisses et d'autres cellules non-musculaires,
- sur l'adénylate cyclase, qu'elle active,
- en activant la pompe à Ca^{2+} membranaire liée à des ATPases Mg^{2+} dépendantes. Elle permet la régulation du flux du Ca^{2+} entre, d'une part, le cytoplasme et l'extérieur de la cellule et, d'autre part, le cytoplasme et les réservoirs intracellulaires qui "séquestrent" le Ca^{2+} (réticulum endoplasmique). Au repos, le cytoplasme contient peu de Ca^{2+} , alors qu'il y en a :
 - jusqu'à 200 000 fois plus dans le milieu extracellulaire,
 - et jusqu'à 106 fois plus dans les réservoirs intracellulaires.

L'énergie nécessaire au pompage membranaire permanent qui maintient ces concentrations est fournie par l'hydrolyse de l'ATP, sous l'effet d'une ATPase Mg^{2+} dépendante. L'élévation puis la diminution du taux intracellulaire de calcium constituent un mécanisme "marche-arrêt" pour l'action de la calmoduline.

Un mécanisme hormonal peut être uniquement calci-dépendant (par exemple la réponse des récepteurs $\alpha 1$ aux catécholamines, ou la réponse de la cellule β des îlots de Langerhans du pancréas au stimulus glucose) ou impliquer, à la fois, un mécanisme AMPc dépendant et un mécanisme calci-dépendant, les deux convergeant vers une même stimulation enzymatique (cas de la TRH).

Le muscle, au cours de l'effort physique, illustre un exemple de convergence d'un mécanisme hormonal AMPc dépendant (effet de l'adrénaline libérée) et d'un mécanisme nerveux Ca^{2+} dépendant (contraction musculaire), qui tous deux aboutissent à la glycogénolyse (**Figure. 57**). L'adrénaline active la glycogénolyse via l'AMPc à des concentrations de Ca^{2+} faibles (10^{-7} mol / l) qui sont celles du muscle au repos.

Lorsque celui-ci se contracte, l'augmentation de Ca^{2+} qui en résulte (10^{-5} mol / l) stimule la phosphorylase b kinase du muscle, indépendamment de l'augmentation de concentration de l'AMPc.

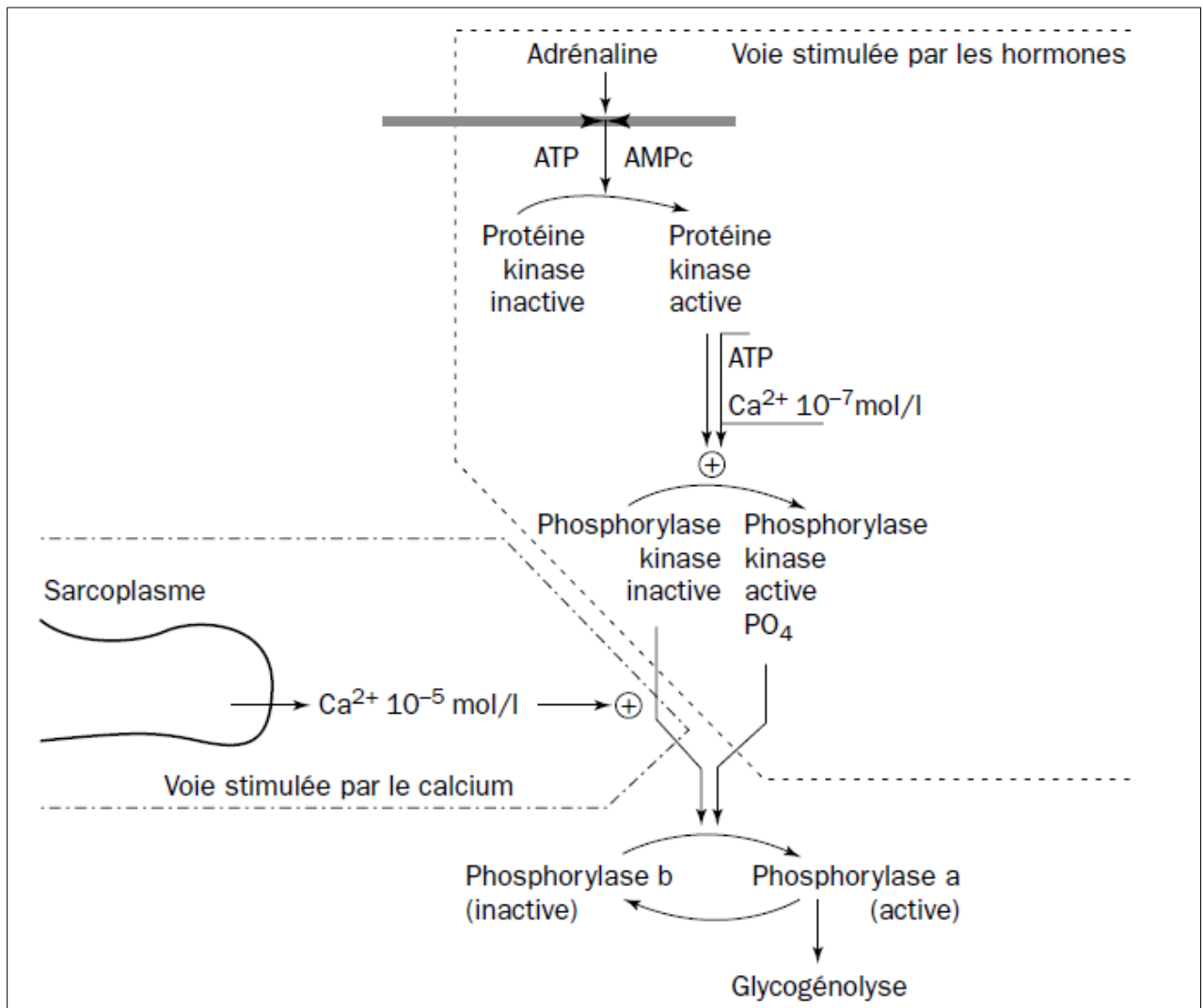


Figure 56 - La glycolyse dans le muscle

3.1.7. L'acide arachidonique et ses dérivés

Un certain nombre d'acides gras polyinsaturés peuvent être métabolisés pour donner des composés appelés prostanoïdes ou éicosanoïdes. Ces composés comprennent les prostaglandines, les thromboxanes, prostacyclines, leucotriènes, lipoxines et une grande variété de tri-, di- ou monohydroxy acides gras. Le plus important de ces types de composé est l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique et certains de ses dérivés (formés au niveau de la membrane cellulaire) peuvent agir d'une façon paracrine ou autocrine, directement au niveau intracellulaire et / ou via l'activation de récepteurs spécifiques conduisant à la synthèse de seconds messagers "classiques". Ces composés dérivés de l'acide arachidonique, dont certains ont une durée de vie extrêmement courte, peuvent agir localement avec force et modifier radicalement le fonctionnement cellulaire.

3.2. Traduction des messagers capables de diffuser au travers des membranes

Un certain nombre de messagers sont à même de diffuser au travers des membranes et d'agir au niveau intracellulaire. C'est le cas de certains dérivés de l'acide arachidonique, des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, c'est aussi le cas du monoxyde d'azote (NO). En outre, parmi eux, certains peuvent exercer une action directe et / ou peuvent agir après activation de récepteurs membranaires ou cytoplasmiques.

3.2.1. Les récepteurs hormonaux nucléaires

Les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes font partie d'une famille de protéines au sein de laquelle on trouve les récepteurs de la 1,25-(OH)₂-D₃, les récepteurs des hormones thyroïdiennes et les récepteurs des rétinoïdes (les rétinoïdes sont des composés apparentés à l'acide rétinoïque, forme carboxylique de la vitamine A1).

La comparaison des séquences en acides aminés de ces récepteurs fait apparaître plusieurs séquences très conservées, ainsi que des régions qui diffèrent profondément d'un récepteur à l'autre. Il s'agit de protéines nucléaires qui sont dotées de la capacité de lier spécifiquement certaines séquences de l'ADN et qui, par suite de l'interaction avec leurs ligands respectifs, agissent comme facteurs transcriptionnels.

Tous les récepteurs contiennent une séquence centrale de 66 à 68 AA très semblable d'un récepteur à l'autre ; c'est le domaine de liaison à l'ADN (région C), qui a une structure retrouvée dans d'autres protéines connues pour se lier à l'ADN. Ces domaines de liaison à l'ADN ont en commun une structure en "doigts de zinc", séquence contenant huit résidus de Cys pouvant lier deux Zn²⁺ qui stabilisent le domaine de liaison à l'ADN. Une autre région (région E) constitue le site de liaison du récepteur avec l'hormone.

Ces récepteurs nucléaires constituent des hétérodimères avec la molécule R-XR, récepteur de l'acide rétinoïque 9 cis (voir plus loin), qui joue ainsi pour les hormones stéroïdes, thyroïdiennes et la 1,25-(OH)₂-D₃, un rôle de partenaire commun dans l'activation de ces hormones (**Figure. 58**).

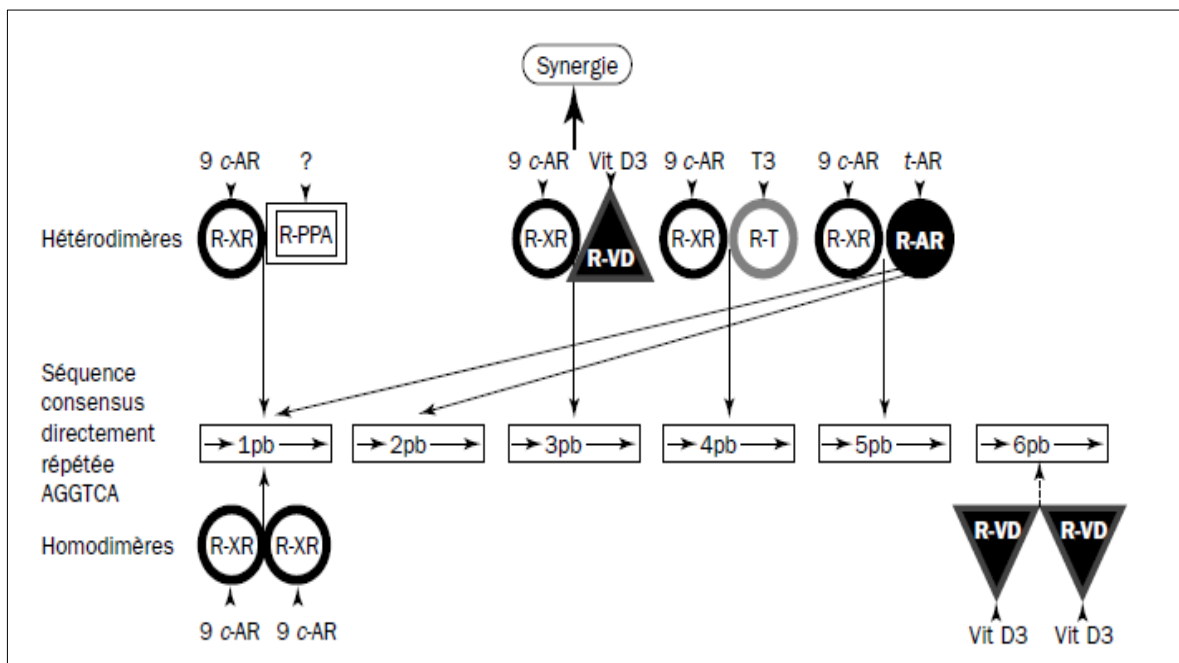


Figure 57 - Spécificité de liaison des récepteurs nucléaires à leurs cibles R-AR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-trans (t-AR) ; R-PPA : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssome et les acides gras; R-T : récepteur de l'hormone thyroïdienne ; R-VD : récepteur de la vitamine D3 ; R-XR : récepteur de l'acide rétinoïque 9 cis (9 c-AR). Les récepteurs nucléaires, sous la forme d'un hétérodimère avec la molécule R-XR, lient un motif d'ADN, présent dans la région promoteur des gènes cibles, composé d'une séquence consensus (AGGTCA) directement répétée et espacée par un nombre variable de nucléotides (de une à six paires de bases). La protéine R-XR joue ainsi le rôle majeur de partenaire "universel" au sein de voies d'activation hormonale multiples.

3.2.1.1. Récepteur des œstrogènes

Il serait constitué par une seule chaîne polypeptidique, dont le gène a été cloné puis séquencé. Il possède 595 AA de PM 65 kDa, avec deux sites fonctionnels, l'un, de liaison avec l'hormone, localisé dans la moitié N-terminale du récepteur et l'autre, de liaison avec l'ADN, localisé dans la moitié C-terminale du récepteur. Le KD est de 2,5 pM.

3.2.1.2. Récepteur de la progestérone

Il comporte, selon O'Malley (1984), deux sous-unités, une sous-unité A (PM 79 000) ou sous-unité effective qui lie l'ADN avec une haute affinité et une sous-unité B (PM 105 000) qui joue un rôle dans la spécificité de localisation du récepteur. Le KD est de 1 à 10 µM, selon les espèces. Cette forte affinité pour la chromatine ne se manifeste qu'après liaison avec l'hormone, en l'absence d'hormone le récepteur est faiblement lié au noyau.

3.2.1.3. Récepteurs des androgènes

Selon les cellules cibles le meilleur ligand endogène est la testostérone ($K_D = 0,5 \text{ nM}$) ou la dihydrotestostérone ($K_D = 0,3 \text{ nM}$).

La forme “native” du récepteur est un hétéropolymère d'environ 300 kDa, la forme “activée” est un monomère de 117 kDa. En fait, l'existence de deux sous-unités pour le récepteur est discutée. Pour Baulieu (1990), la protéine de 90 kDa est une “heat shock protein”, hsp 90, qui serait liée de façon réversible au récepteur et marquerait la région liant l'ADN (région C). Le processus de transformation décrit par O'Malley serait en fait une dissociation du récepteur d'avec la protéine hsp 90, ce qui explique le passage de la forme 8S, non-active, à la forme 4S, active. Après liaison avec certaines molécules pharmacologiques, cette dissociation ne se ferait pas, ce qui expliquerait la propriété anti-hormone de ces molécules.

3.2.1.4. Récepteurs de l'acide rétinoïque

Deux sous-groupes de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque ont été identifiés (**Figure. 59**) : le premier, composé des récepteurs de type R-AR qui présentent une affinité élevée pour l'acide trans-rétinoïque ; le second, des récepteurs de type R-XR qui affichent une affinité plus élevée pour l'acide rétinoïque 9 cis. Ces derniers constituent également des facteurs auxiliaires, ayant la propriété d'interagir avec d'autres récepteurs nucléaires tels que ceux de la vitamine D, de l'hormone thyroïdienne et les récepteurs R-AR .

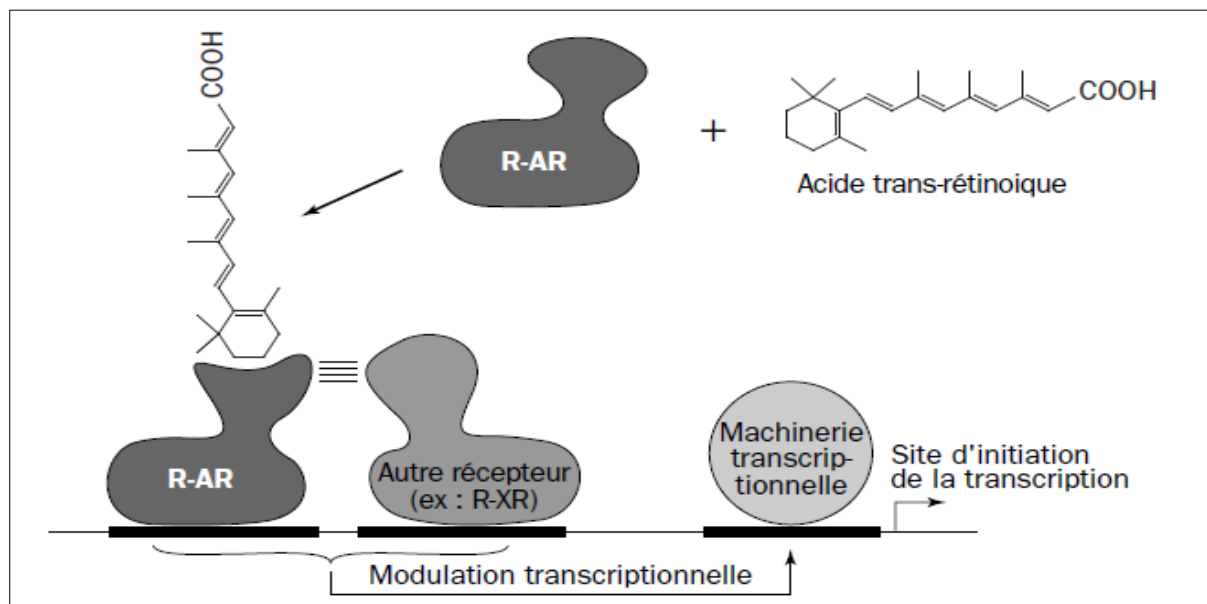


Figure 58 - Représentation schématisée du mode d'action des récepteurs de l'acide rétinoïque

3.2.2. Interactions entre les différents systèmes activés par les messagers chimiques

Quel que soit le processus de traduction, il existe toujours, au niveau de la cellule cible, une amplification du message. Néanmoins, compte tenu de la grande variété des messagers chimiques, de la grande diversité des récepteurs portés par la même cellule et de l'existence de plusieurs types de récepteurs pour le même messager (**Figure. 58**), divers types d'interaction peuvent s'établir entre les multiples systèmes mis en jeu par les messagers chimiques.

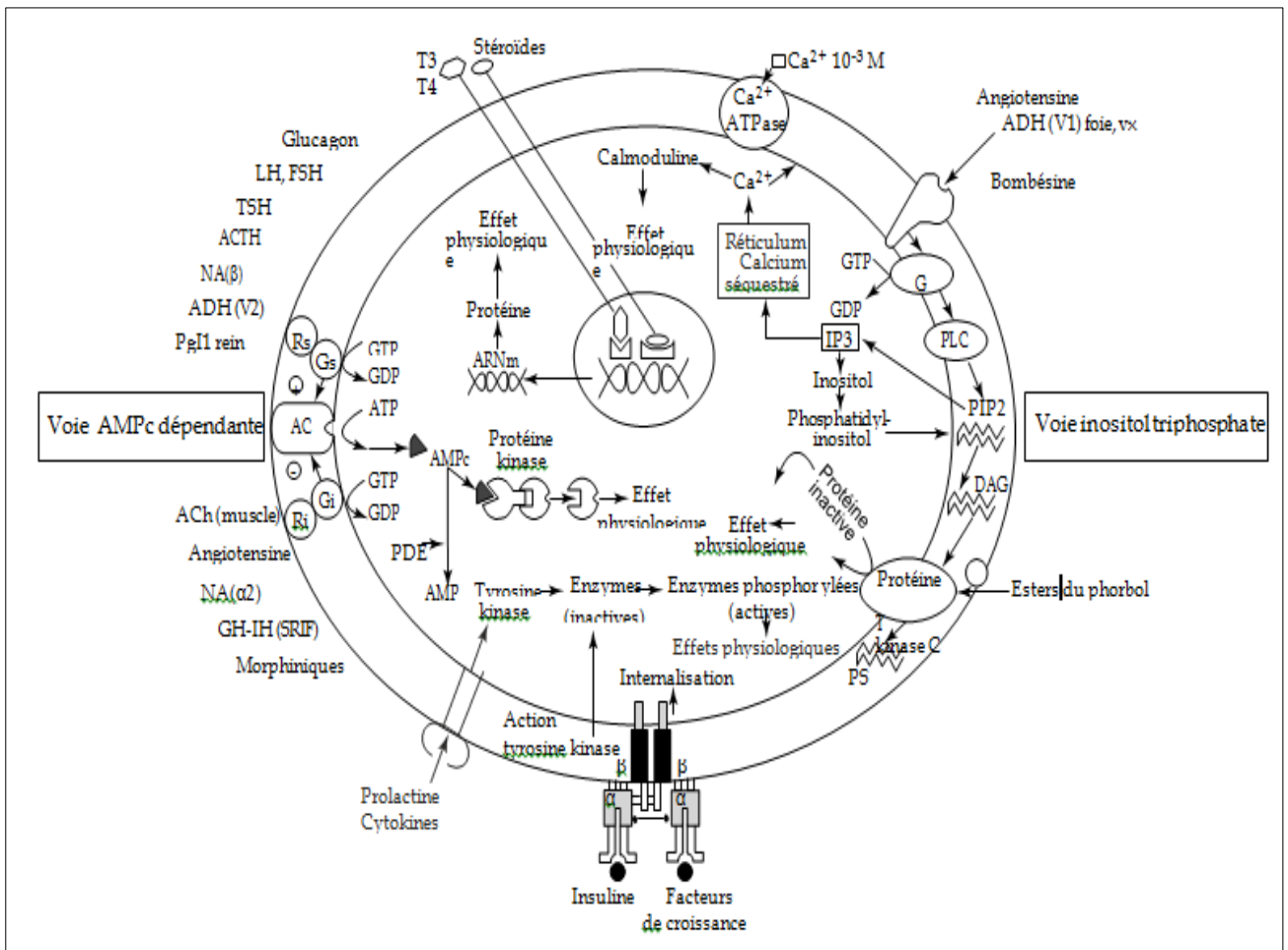


Figure 59 - Représentation schématique du mode d'action des différentes hormones

Ainsi, plusieurs messagers différents peuvent agir sur leur récepteur spécifique pour générer des modifications physiologiques régulées par le même second messenger : convergence ou sommation de l'information. Au contraire, dans certains cas, un messenger peut limiter la synthèse, stimulée par ailleurs, d'un second messenger (cas des récepteurs couplés à une protéine Gi) : occlusion de l'information. D'une manière similaire, le même messenger, agissant sur des récepteurs différents, peut conduire à la synthèse de seconds messagers aux effets opposés. En

revanche, l'activation de récepteurs différents (ou la mise en jeu par l'activation du même récepteur de mécanismes complémentaires) peut induire l'augmentation simultanée de la teneur en $[Ca^{2+}]_i$ et celle d'un second messenger dont la synthèse et / ou les effets sont régulés par le calcium : synergie d'action ou modulation de l'information. Enfin, la mise en jeu de plusieurs types de récepteurs par le même messenger chimique peut conduire à une divergence de l'information.

Il est clair que les modifications physiologiques de cet effecteur final commun que représente la cellule cible varieront en fonction du type, du nombre et de l'affinité des récepteurs, et bien entendu de la libération simultanée ou non de messagers chimiques différents.

1. La signalisation intracellulaire ou réseau de protéines intracellulaire de signalisation

- **La transmission du signal dans les cellules**

Une fois activés, les récepteurs couplés aux enzymes ou à la protéine G transmettent le signal à l'intérieur des cellules en activant des chaînes de protéines de signalisation intracellulaire. C'est un véritable système d'engrenages. Les petites molécules de signalisation intracellulaire sont appelées petits médiateurs intracellulaires ou seconds messagers. Elles sont synthétisées en grand nombre en réponse à l'activation des récepteurs et diffusent rapidement loin de leur source pour transmettre le signal aux autres parties de la cellule. Certaines, comme l'AMP cyclique ou le Ca^{2+} , sont hydrosolubles et diffusent dans le cytoplasme tandis que d'autres, comme le diacylglycérol (DAG), sont liposolubles et diffusent dans le plan de la membrane plasmique.

- **Les protéines de signalisation**

Les protéines de signalisation forment un véritable réseau, qui peut aussi être comparé à un réseau informatique, pour relayer le signal extracellulaire jusqu'au noyau nucléaire où elles se lient à des facteurs de transcription et induire l'expression de gènes cibles. Ces protéines s'interagissent, se chevauchent et peuvent souvent activer plusieurs voies de signalisation. Elles ont de multiples fonctions. Certaines relayent le signal, d'autres transportent le signal d'une partie de cellule à une autre, d'autres servent d'adaptateur, d'amplificateur ou de transducteur en convertissant le signal reçu en une autre forme, d'autres permettent le regroupement de plusieurs protéines en créant un véritable échafaudage, d'autres enfin modulent l'action d'autres molécules.

- **L'activation/désactivation par phosphorylation/déphosphorylation des protéines de signalisation**

La plupart des protéines de signalisation se comportent comme des commutateurs moléculaires. Elles passent d'un état inactif à un état actif et vice versa à la réception de signal spécifique. Il existe deux classes principales de commutations moléculaires qui agissent de façon différente, mais dans les deux cas, l'état fonctionnel de la protéine de signalisation est déterminé par la perte ou le gain d'un groupement phosphate (**Figure 61**).

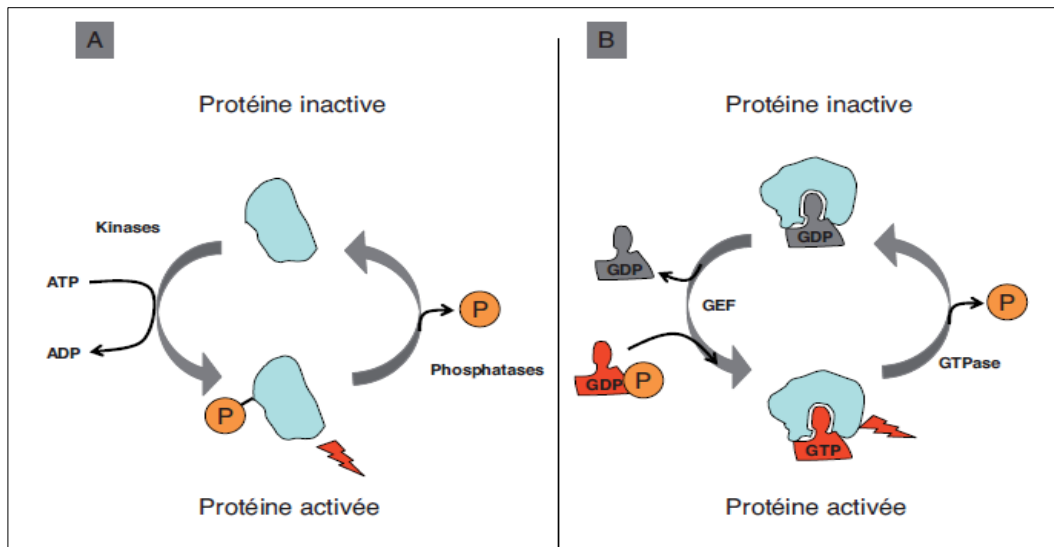


Figure 60. Activation par addition d'un groupement phosphate. (A) La protéine de signalisation est activée par phosphorylation par une protéine kinase. Elle est inactivée par une phosphatase qui élimine le groupement phosphate. (B) Activation de la protéine de signalisation par l'intermédiaire d'un échange entre son GDP lié par un GTP. Elle se déroule sous l'action d'un facteur d'échange des nucléotides guanylique ou GEF (guanine exchange factor). La protéine activée possède une activité GTPasique intrinsèque qui hydrolyse son GTP en GDP, ce qui l'inactive.

- **La plupart des protéines de signalisation sont activées ou inactivées par phosphorylation ou déphosphorylation**

Le groupement phosphate est ajouté par une protéine-kinase alors qu'une protéine-phosphatase le soustrait de la protéine de signalisation. La protéine de signalisation activée par phosphorylation est le plus souvent elle-même une protéine-kinase, ce qui explique les cascades de phosphorylations. La protéine-kinase activée phosphoryle une autre protéine-kinase qui a son tour active une autre protéine-kinase, et ainsi de suite, amplifiant et disséminant le signal vers l'avant. Les protéine-kinases sont classées en fonction de leurs sites de phosphorylation. Les sérine/thréonine-kinases phosphorylent les protéines sur les sérines et les thréonines et les tyrosine-kinases sur les tyrosines.

- **L'autre catégorie de commutateur moléculaire est constituée des protéines liées au GTP**

La protéine est active lorsqu'elle est liée au GTP. Lorsqu'elle est activée, la protéine possède une activité GTPasique intrinsèque et elle s'inactive elle-même en hydrolysant le GTP en GDP. Il existe deux groupes de protéines de liaison au GTP : les protéines trimériques de liaison au GTP (ou protéines G) qui relayent le signal transmis par les récepteurs couplés aux protéines G

et les petites protéines GTPases monomériques. Celles-ci peuvent transmettre le signal intracellulaire comme la protéine Ras mais sont surtout impliquées dans le transport vésiculaire.

2. La signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs couplés aux enzymes

2.1. Signalisation par les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G activent de nombreuses voies intracellulaires (**Figure 62**).

- Certains activent l'**adénylate cyclase** entraînant ainsi l'augmentation intracellulaire de l'AMP cyclique et l'activation de la **protéine-kinase A (PKA)**.

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

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

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

La liaison du signal extracellulaire au récepteur couplé aux protéines G active celles-ci. L'activation de la protéine G stimule l'adénylate cyclase qui produit une augmentation de l'AMP (adénosine monophosphate) cyclique induisant l'activation de la protéine-kinase A (PKA). D'autres récepteurs peuvent induire la phospholipase C (PLC) aboutissant à la production de l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 augmente le Ca^{2+} intracellulaire via le relargage du Ca^{2+} stocké dans le réticulum endoplasmique. Le Ca^{2+} intracellulaire peut stimuler directement la protéine-kinase C (PKC) qui est aussi stimulée par le DAG et/ou se lier à la calmoduline et activer les protéine-kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (CaM-kinases). Les protéines G peuvent aussi activer la phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3) kinase tout comme les récepteurs à activité tyrosine-kinase. PI3K activé induit la production de phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate (PI (4, 5) P2) et de (PI (3, 4,5) P3).

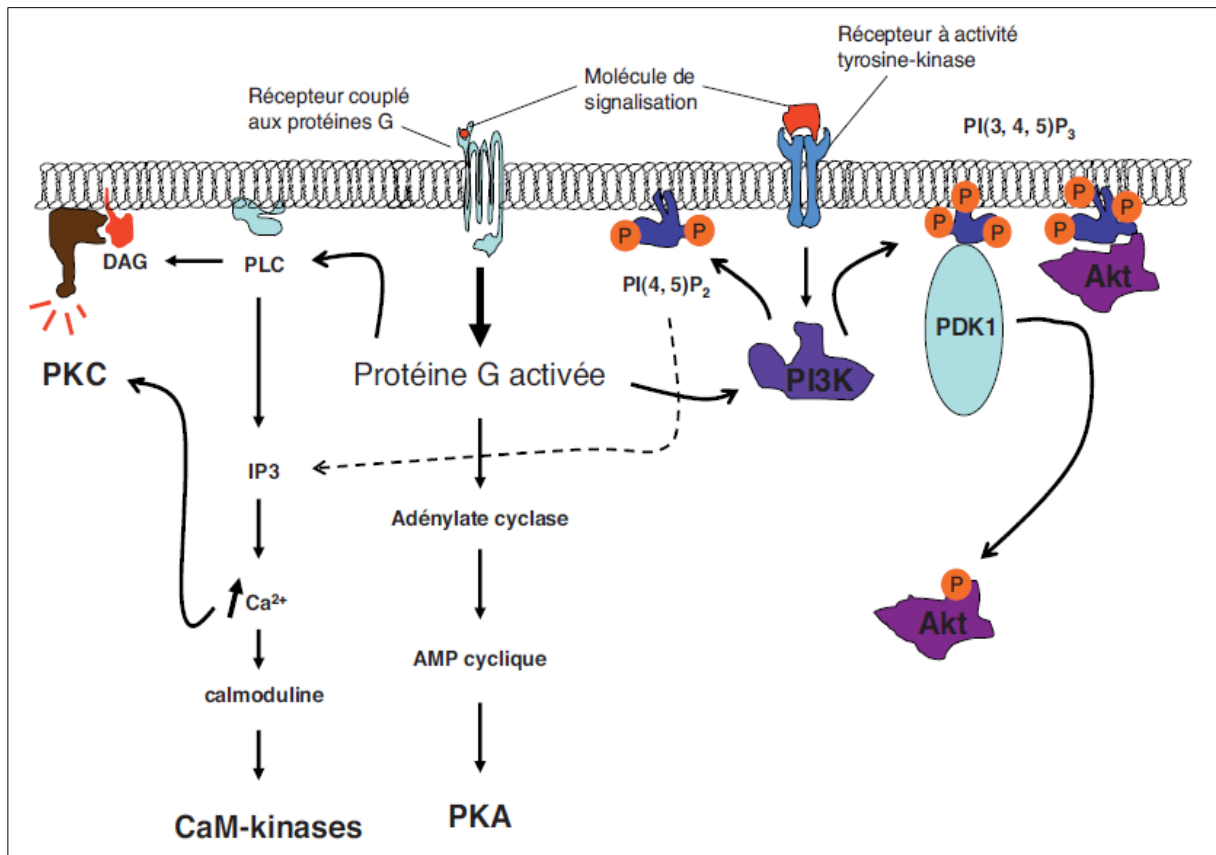


Figure 61. Quelques voies de signalisations activées par les récepteurs couplés aux protéines G.

Ce dernier recrute alors la protéine-kinase B (ou Akt) et la protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (PDK1). Akt phosphorylé par PDK1 se dissocie de PI (3, 4,5) P3 et passe dans le cytosol. Les protéine-kinases PKA, PKB (Akt), PKC et CaM-kinases activent ensuite les protéines/gènes cibles et modifient le comportement de la cellule.

2.2. La signalisation par les récepteurs couplés aux enzymes

Il existe 5 classes de récepteurs couplés aux enzymes :

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

- **Les récepteurs à activité tyrosine-kinase et ceux associés aux tyrosine-kinases sont les plus nombreux, regroupés en 20 sous-familles.** Ils ont de multiples ligands dont divers facteurs de croissance et hormones comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), des cellules endothéliales (VEGF), des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), des cellules épithéliales (EGF), l'insuline ou encore les facteurs de croissance de type insuline-like (IGF-1 et

IGF-2). La liaison du ligand à son récepteur à activité tyrosine-kinase déclenche une autophosphorylation du récepteur sur de multiples tyrosines. Cette autophosphorylation active des kinases et recrute de nombreuses protéines de signalisation intracellulaire qui s'interagissent par des domaines spécifiques et hautement conservés (domaines SH2 ou régions d'homologie avec Src) pour transmettre le signal par de multiples voies de signalisation.

- **La protéine Ras est une GTPase monomérique qui joue un rôle majeur dans la signalisation des récepteurs à activité tyrosine-kinase.** Elle est recrutée par des protéines adaptatrices ayant des domaines SH2 et SH3. Comme toutes les protéines de liaison au GTP, l'activité de Ras dépend de sa liaison au GDP ou au GTP. Ras activée stimule une voie de signalisation hautement conservée et impliquée dans la croissance cellulaire et la réponse inflammatoire : la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein kinases*) (**Figure 63**). La voie de PI3K (PI3 kinase) est une autre voie de signalisation importante de survie cellulaire stimulée par Ras (**Figure 58**). L'activation de Ras dépend de la protéine Sos (*son of sevenless*), un facteur d'échange des nucléotides guanyliques ou GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), qui est recrutée au récepteur à activité tyrosine-kinase par la protéine adaptatrice Grb2. Ras-GTP activé stimule la kinase Raf et la voie de MAP kinase ERK (**Figure 63**).

3. Les voies de signalisation intracellulaires

3.1. Les voies des MAP kinases

- La famille des MAP kinases comporte plusieurs enzymes interactives organisées en module à trois niveaux d'activation successive (Figure 63). Les trois voies principales des MAP kinases, définies par les derniers éléments de la cascade qui comportent tous plusieurs isoformes, sont les voies des kinases ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinases), de p38 MAP kinases (avec 4 isoformes dénommés α , β , γ et δ) et de C-Jun N-terminal kinases (JNK1, JNK2 et JNK3).

- Les MAP kinases ont une expression ubiquitaire et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. ERK1 et ERK2 régulent habituellement la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Les MAP kinases p38 et c-JUN sont impliquées dans la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire, etc...

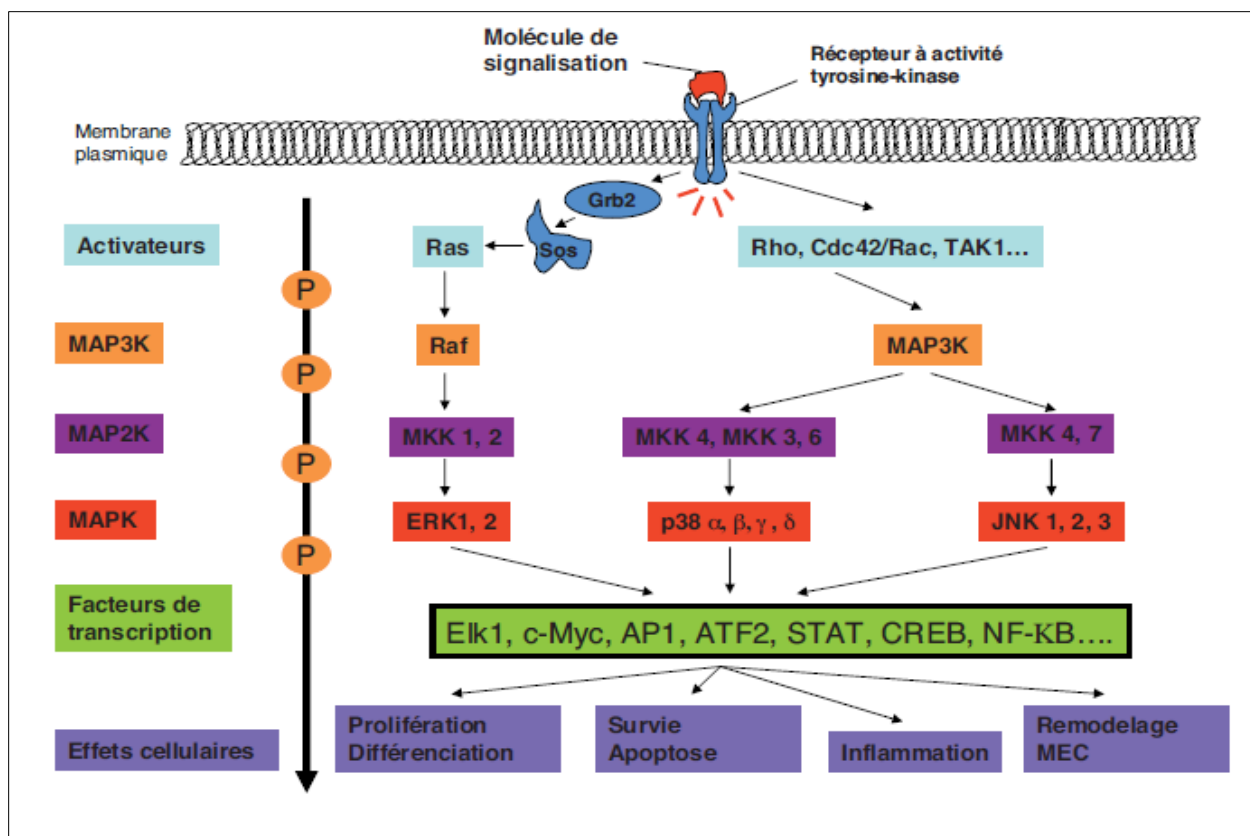


Figure 62. Voie des MAP kinases. Les voies des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) sont divisées en trois voies : ERK (extracellular signal-regulated kinases), p38 et JNK (C-Jun N-terminal kinases). Ces trois protéines ont plusieurs isoformes et sont les dernières protéines kinases des trois voies respectives. Chaque protéine-kinase est activée par des MAPK kinases (MKK ou MAP2K) spécifiques qui elles-mêmes sont activées par d'autres kinases, les MAPK kinase-kinases (MAP3K). Les MAP3K ont des activateurs spécifiques en fonction du signal extracellulaire initial et du type de cellule.

- **Les MAP kinases sont activées par phosphorylation par des MAP kinase-kinases (MKK ou MAP2K)** qui sont elles-mêmes stimulées par des MAP kinase-kinase-kinases (MAP3K) situées les plus en amont de la voie (**Figure 63**). Par exemple, JNK est activée principalement par deux kinases d'amont MKK4 et MKK7. JNK activé stimule le facteur de transcription c-Jun qui peut alors former le complexe de facteurs de transcription AP-1 (transcription factor complexe activator protein) par homodimèrisation ou hétéro dimèrisation en s'associant avec un autre membre de la famille des facteurs de transcription Jun et Fos. AP-1 a une distribution ubiquitaire et régule, entre autres, l'expression de métalloprotéases (MMP), de cytokines inflammatoires. Les mêmes cascades d'activation existent pour les deux autres voies des MAPK : MEK1 et MEK2 activent ERK1 et ERK2 alors que MKK3/6 activent p38 MAP kinases. L'activation des voies MAPK est régulée étroitement (de façon temporelle et spatiale) dans

chaque cellule et son inactivation dépend des sérine/thréonine-phosphatases, des tyrosine-phosphatases et des phosphatases à double spécificité (dual specificity phosphatases DUSP).

3.2. La voie de PI3 kinase/Akt

- **La phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) peut être activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase** mais aussi par d'autres types de récepteurs comme les récepteurs couplés aux protéines G. Elle est impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaires. PI3K est classée en plusieurs familles qui contiennent plusieurs isoformes. PI3K activée stimule la phosphorylation des inositol phospholipides membranaires sur la position 3 du cycle inositol et génère des lipides membranaires appelés PI (3, 4) P2 (phosphatidylinositol 3, 4 bisphosphate) et PI (3, 4, 5) P3 (phosphatidylinositol -3, 4, 5 trisphosphate). Ces phospholipides membranaires sont déphosphorylés par des inositol phospholipides phosphatases (PTEN). PI (3, 4) P2 induite par PI3K peut aussi être converti en IP3 et DAG par une PLC γ activant ainsi les CaM-kinases.

- **L'activation de PI3K génère un signal qui recrute la protéine-kinase B (ou Akt) à la membrane cellulaire.** Celle-ci se lie alors avec la PI (3, 4, 5) P3 et change de conformation permettant son activation par une protéine-kinase phosphatidylinositol dépendante (la PDK1). Akt activé est relâché dans le cytosol où il favorise la survie cellulaire en inhibant des protéines pro-apoptotiques et/ou la transcription des gènes qui les codent (**Figure 62**).

3.3. La voie de NF- κ B

- **Les protéines NF- κ B (dimères formés à partir de 5 protéines) ont été identifiées** il y a une vingtaine d'années. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, en particulier elles lient le promoteur du gène codant pour la chaîne légère kappa dans les cellules B. Ainsi, la voie de NF- κ B est une voie majeure dans l'organisme vivant. Sa délétion chez l'animal est létale. NF- κ B régule le développement, la communication intercellulaire, la réponse immunitaire innée et adaptative et la réponse inflammatoire, etc... Elle est impliquée dans les pathologies inflammatoires, les pathologies cancéreuses, l'athérosclérose ou encore le diabète.

- **La famille de NF- κ B comporte 5 membres chez les cellules de mammifères : RelA (ou p65), RelB, RelC, p50 (ou NF- κ B1) et p52 (ou NF- κ B2) qui s'associent pour former des homodimères et des hétérodimères.** Les dimères de NF- κ B sont maintenus inactifs par les protéines de la famille des inhibiteurs de NF- κ B (I κ B ou inhibitors of NF- κ B). Les 9 membres de la famille I κ B sont I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p100 et p105 qui sont, respectivement, les précurseurs de p50 et p52, I κ B ζ et I κ BNS (ou I κ B δ).

● **L'activation de NF- κ B est sous le contrôle d'I κ B kinase (IKK)**, complexe trimérique composé de deux sous-unités catalytiques (IKK α ou IKK1 et IKK β , ou IKK2) et de la sous-unité régulatrice NEMO (NF- κ B essential regulator, connu aussi sous le nom d'IKK γ) (**Figure 64**). Lorsque la voie de NF- κ B est stimulée, le complexe IKK phosphoryle les protéines I κ B sur des résidus sérines et thréonines spécifiques. I κ B phosphorylé subit une ubiquitinylation puis est dégradé par le protéasome permettant ainsi aux dimères NF- κ B libres de passer dans le noyau et d'activer les gènes cibles.

NF- κ B est séquestré dans le cytosol par des protéines inhibitrices I κ B (inhibitors of NF- κ B). L'activation de la voie de NF- κ B par les récepteurs du TNF α , les récepteurs TLR (récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs IL-1 et des récepteurs Toll) ou encore un stress (rayonnement ultraviolet, ionisant, dérivés oxygénés) stimule la phosphorylation du complexe I κ B kinase-kinases (IKK) qui est un trimère associant la sous-unité régulatrice NEMO (NF- κ B essential regulator, connu aussi sous le nom de IKK γ) et des deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β . IKK activé induit la phosphorylation d'I κ B puis son ubiquitinylation (Ub) et sa dégradation par le protéasome. La dégradation d'I κ B permet alors à NF- κ B de se déplacer dans le noyau et d'activer la synthèse de protéines spécifiques impliquées dans la régulation de la survie et de l'apoptose cellulaire, de la réponse immune et inflammatoire etc...NIK : NF- κ B-inducing kinases. MyD88: myeloid differentiating factor 88.

● **NF- κ B peut être activé par deux voies principales.**

La voie classique ou canonique est activée par de nombreux stimuli comme les cytokines inflammatoires, les produits bactériens ou viraux, le stress, les radicaux libres dérivés de l'oxygène, les ultraviolets et les rayonnements ionisants, ect...Ces signaux induisent la dégradation de I κ B α et l'accumulation nucléaire, essentiellement, du dimère RelA-p50 qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la mort cellulaire.

● La voie alternative ou non-canonique est activée par des récepteurs impliqués dans l'organogenèse des tissus lymphoïdes et le développement des lymphocytes comme le récepteur à la lymphotoxine- β , ou encore le récepteur au facteur activateur des lymphocytes B (BAFF ou B cell-activating factor).

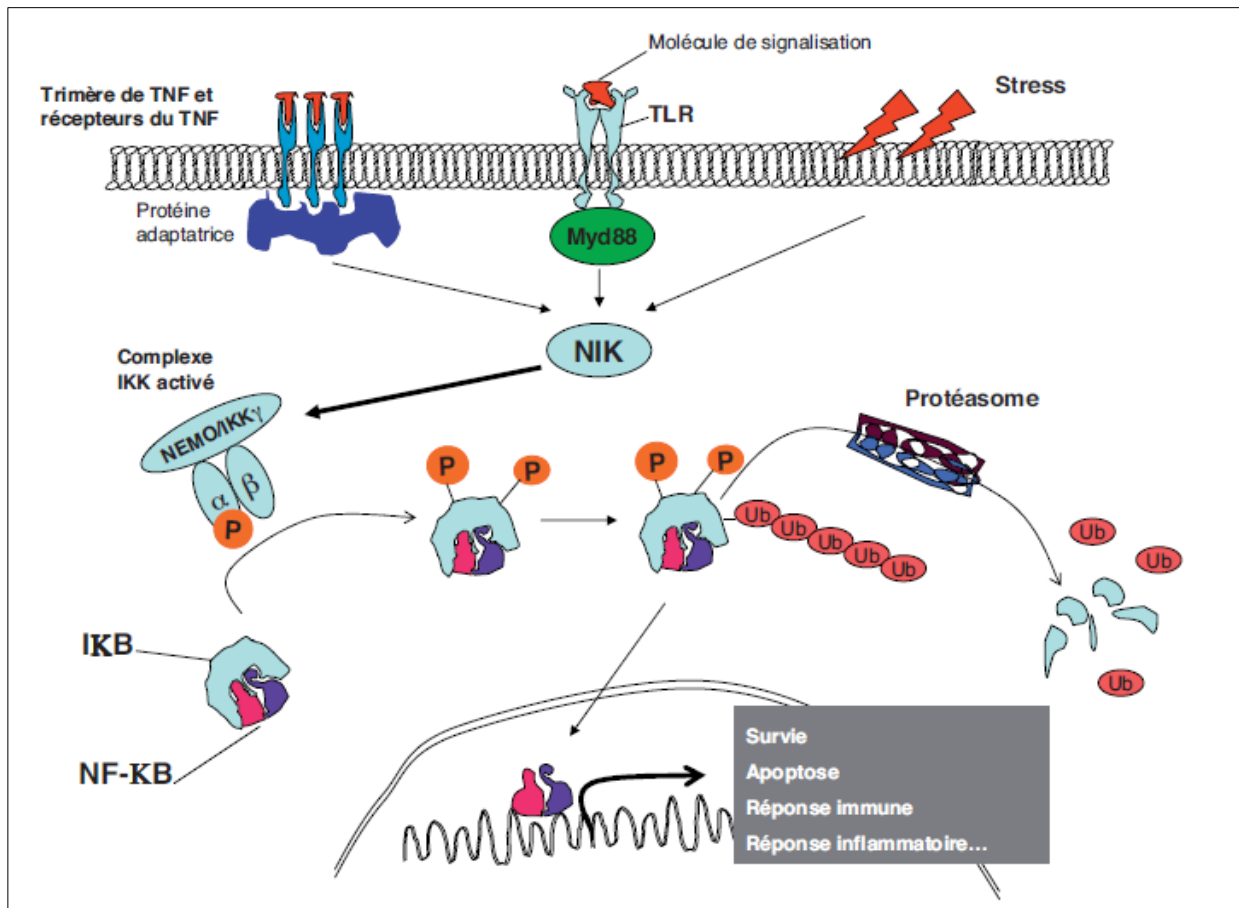


Figure 63. Voie de NF- κ B.

3.4. La voie JAK/STAT

- La voie JAK (Janus kinase) est la voie d'activation de nombreuses cytokines telles que l'interféron, l'IL-6, IL-15 et de facteurs de croissance comme l'hormone de croissance et le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor). Les JAK (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques. Elles ont été découvertes au cours des études sur les effets des interférons. Elles régulent l'expression de gènes impliqués dans l'activation, la prolifération et la différenciation cellulaires.

- L'activation des JAK stimule la phosphorylation des protéines STAT (signal transducers and activator of transcription) qui induisent alors la transcription de gènes cibles. JAK stimule aussi les voies de Ras/MAPK et de PI3K et Akt.

- Sept protéines STATs sont actuellement identifiées. (Elles possèdent toutes un domaine SH2 qui permet leur liaison sur la tyrosine phosphorylée du récepteur activé. Le domaine SH2 permet aussi la formation de dimères (homodimères et hétérodimères) entre les protéines STAT activées. Les dimères activés de STAT migrent ensuite dans le noyau nucléaire pour stimuler des gènes spécifiques. La voie des STAT est souvent accompagnée d'un rétrocontrôle

négatif. En effet, STAT stimule aussi la production de protéines inhibitrices telle que SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) qui va inactiver JAK et STAT5 qui par rétrocontrôle inactive la STAT phosphorylée. L'autre mécanisme de désactivation passe par les tyrosine-phosphatases. Ainsi, les JAK sont inhibés par la tyrosine-phosphatase SHP-1 (**Figure 65**).

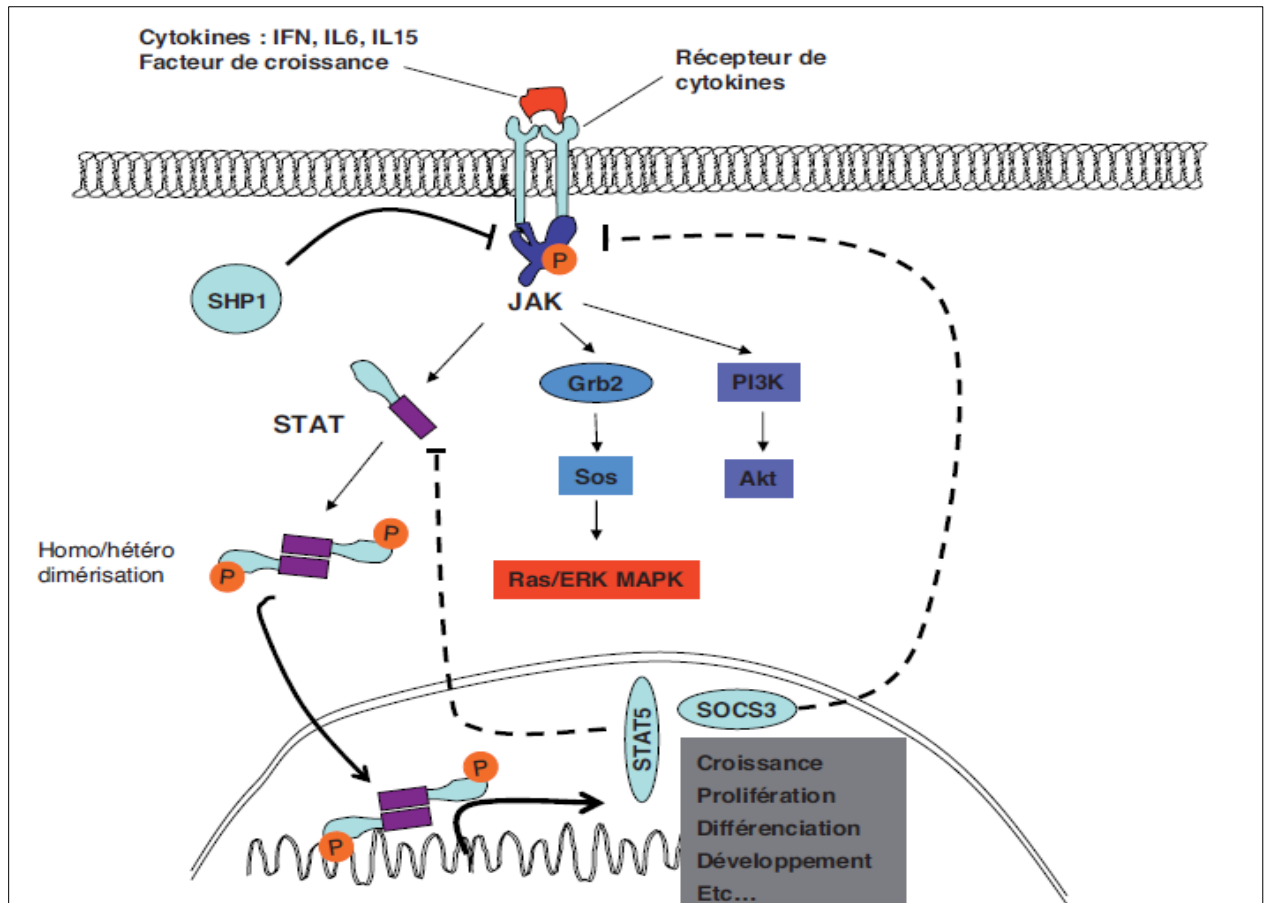


Figure 64. Voie d'activation de JAK/STAT. Janus Kinases (JAK) sont des tyrosine-kinases intracytoplasmiques qui peuvent être activés par les récepteurs des cytokines. JAK activé stimule la phosphorylation de STAT (signal transducers and activator of transcription) qui peut alors former des homo/hétérodimères. Les dimères de STAT migrent dans le noyau nucléaire et stimulent des gènes cibles à l'origine des modifications du comportement cellulaire. STAT induit aussi la production de protéines qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie de JAK comme les protéines SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) et STAT5. JAK peut être inhibé par une tyrosine-phosphatase, la SHP1. Par ailleurs, l'activation de JAK peut aussi stimuler les voies de Ras/MAPK ERK1/2 et la voie de PI3K et d'Akt.

3.5. La voie des récepteurs TLR

• **La réponse immune innée est médiée par les récepteurs TLR (toll-like receptors) qui ont comme ligand les produits microbiens ou PAMP (pathogen-associated molecular patterns).** L'activation des récepteurs TLR stimule des voies de signalisation intracellulaire qui peuvent être séparées en deux groupes : celles dépendantes de la protéine adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation factor 88) qui déclenchent une production de cytokines pro-inflammatoires avec une activation rapide de NF- κ B et des MAPK, et celles indépendantes de MyD88 associées à la production de l'interféron (IFN) β , et des gènes IFN-dépendant, et la maturation des cellules dendritiques avec une activation lente de NF- κ B et des MAPK (**Figure 66**).

• **Il existe chez l'homme au moins 9 TLR qui s'interagissent pour former des homo- et des hétérodimères.** Chaque TLR possède un répertoire particulier de PAMP comme ligand. Ainsi, TLR2 lie le peptidoglycane des parois bactériennes, TLR4 le lipopolysaccharide des bacilles Gram négatif, TLR3 et TLR7 les séquences des ARN viraux, TLR9 des séquences d'ADN contenant les CpG, etc...TLR2 et TLR4 reconnaissent aussi des microcristaux d'urate monosodique (UMS) et des cristaux de pyrophosphate de calcium (PPCD) ou encore des cristaux de phosphate de calcium. Tous les TLR et le récepteur à l'IL-1 ont en commun MyD88 comme protéine adaptatrice intracellulaire hormis l'homodimère TLR3 dont le signal est relayé par la molécule TRIF (toll-interleukin-1 receptor-domain containing adapter-inducing interferon β) (**Figure 66**). L'activation de MyD88 recrute des kinases et facteurs activateurs tels que IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) et TRAF (TNF receptor-associated factor) qui stimulent rapidement les voies de NF- κ B et des MAPK.

3.6. La voie des récepteurs intracellulaires NOD et de l'inflammasome NLRP3

• **La reconnaissance des produits microbiens est aussi assurée par des récepteurs intracellulaires NLR (NOD-like receptors).** Les NLR détectent les PAMP et les motifs moléculaires associés aux signaux dangers (DAMPs ou danger-associated molecular patterns). Ils ont un domaine qui reconnaît des domaines riches en leucine, un domaine NOD et des motifs d'interaction protéine-protéine tels que des domaines pyrine et CARD (caspase activation and recruitment domain). Les effets pro-inflammatoires des NLR sont médiés par la voie de NF- κ B et l'activation de la caspase 1 par un complexe protéique appelé inflammasome (**Figure 67**).

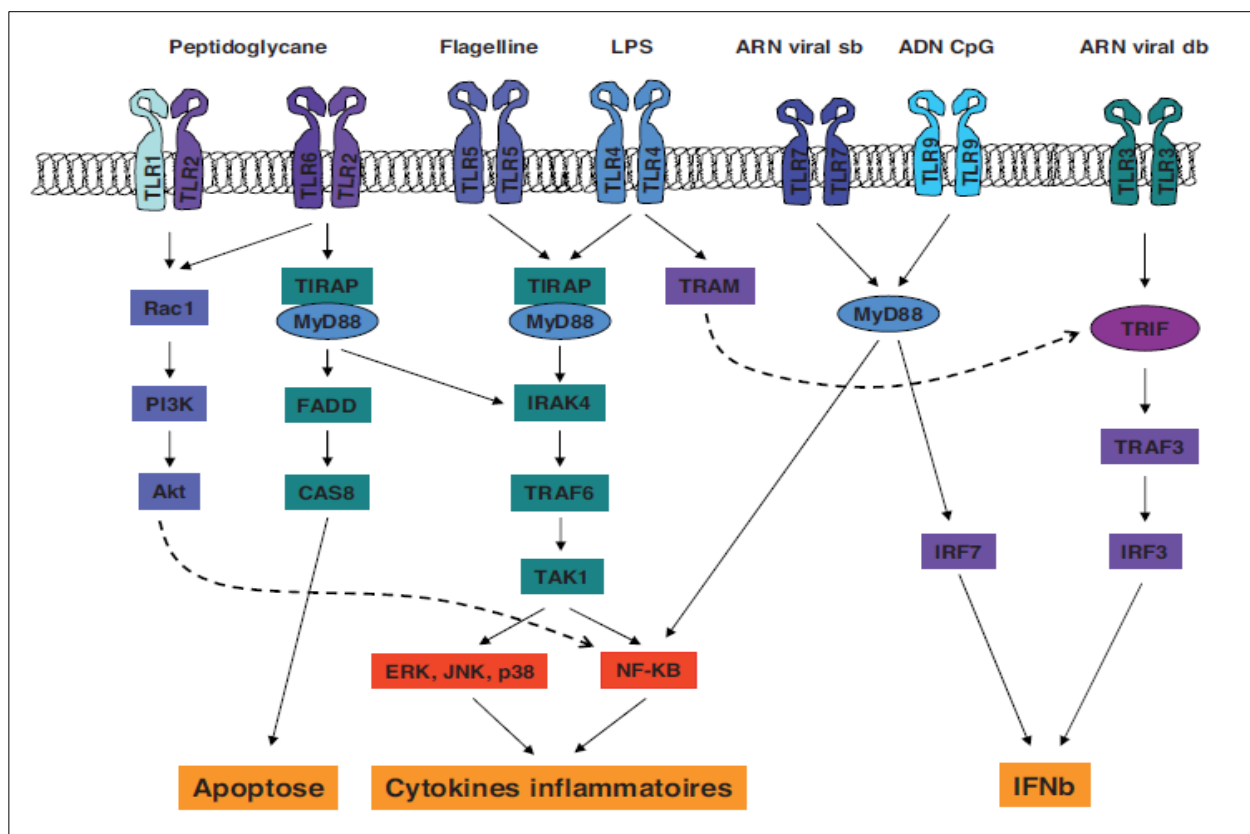


Figure 65. Voies de signalisation des récepteurs Toll-like (TLR).

- **L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique composé d'une protéine de la famille des récepteurs NLR, de la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) et de la pro-caspase-1 (Cas1).** La stimulation de NLRP3 active la Cas1 qui va induire la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β active. L'inflammasome NLRP3 ou cryopyrine contient les domaines NACHT-LRR-PYD. Le domaine LRR reconnaît les ligands, les domaines NACHT permettent l'oligomérisation et donc l'activation de NLRP3 et le domaine PYD le recrutement de protéine adaptatrice. NLRP3 peut être activé par des produits microbiens et des DAMP (cristaux d'UMS, cristaux de PPCD, dérivés oxygénés, β amyloïde, irritants dermiques, des protéines du choc thermique, les microcristaux de silice, d'asbeste, d'aluminium ou encore de cholestérol). Ces stimuli peuvent activer NLRP3 soit par une interaction avec la membrane cellulaire soit après leur phagocytose.

- **La liaison de l'ATP à son récepteur P2X7 induit un efflux de potassium qui stimule NLRP3.** Les microcristaux, après leur phagocytose, stimulent l'inflammasome par désorganisation des phagolysosomes et libération des enzymes lysosomales telle que la cathepsine B et libération des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) (Figure 67).

La liaison des motifs moléculaires associés au signal danger (DAMPs danger signal molecular pattern) à leur récepteur intracellulaire, les récepteurs NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) ou NLR, activent la voie des MAPK via la protéine CARD9 (caspase recruitment domain family) et la voie de NF- κ B via la protéine RIP2 (receptor interacting serine/threonine-protein kinase). NF- κ B activé migre dans le noyau et induit la transcription de gènes cibles dont l'IL-1 β . NF- κ B peut aussi être activé par la voie des TLR stimulés par les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). La protéine NLRP3 peut être stimulée par les DAMPs, des toxines bactériennes, l'ATP via le récepteur P2X7, des structures microparticulaires, des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS), etc...L'activation de NLRP3 induit son oligomérisation, le recrutement des protéines ASC (apoptosis-associated specklike protein containing a CARD) et l'activation de la procaspase-1 (pro-cas1). Cas1 activé stimule la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β active qui est alors sécrété.

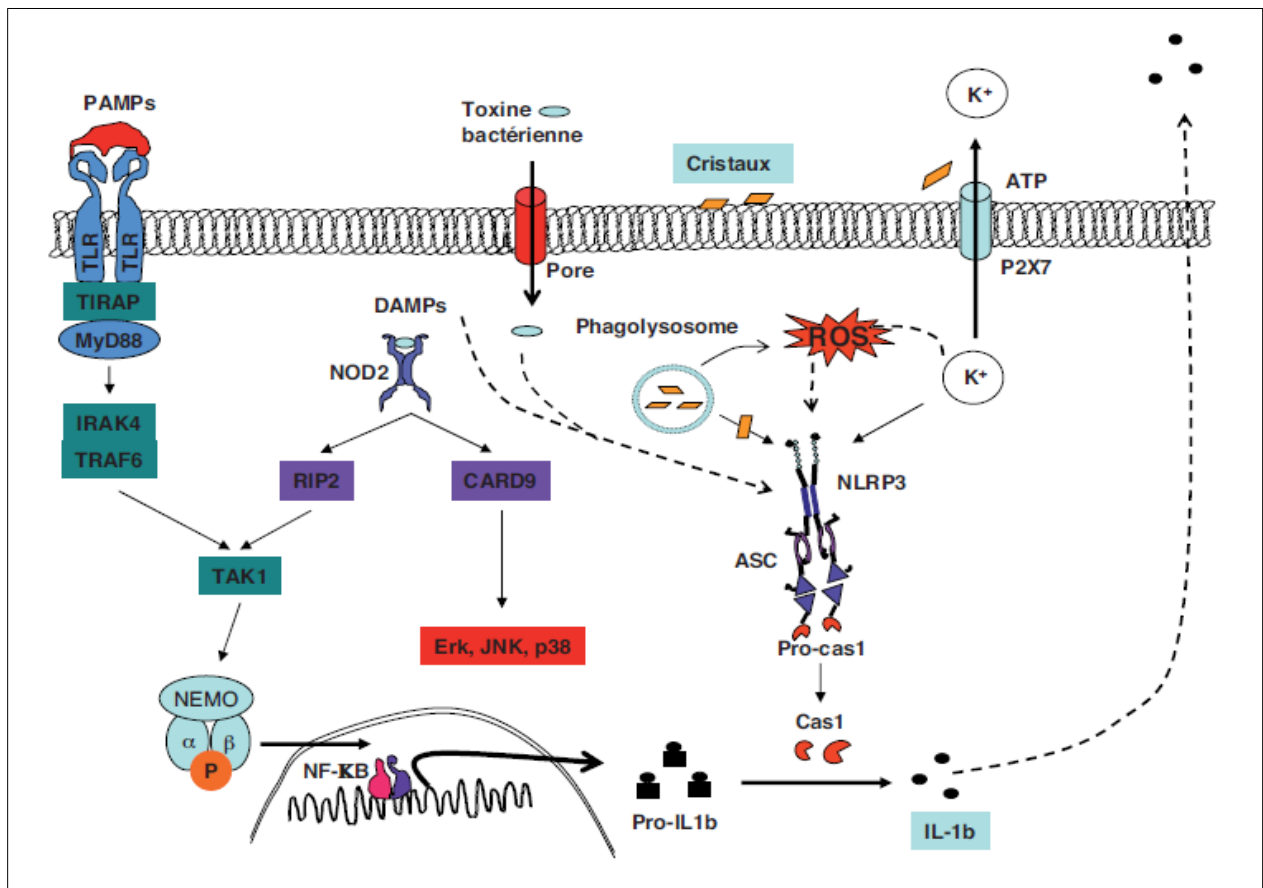


Figure 66. Activation des NOD et maturation de l'IL-1 β par l'inflammasome NLRP3.

4. La signalisation intracellulaire et cancer

La cellule cancéreuse est une cellule génétiquement instable, capable d'explorer les fonctions de l'ensemble du génome et de mettre à profit tout avantage prolifératif ou migratoire pour le sélectionner et le transmettre à sa descendance. Une tumeur est une néoformation nécessitant une multiplication cellulaire toujours active ; le support de la malignité des cancers est lié à leur aptitude à disséminer dans l'organisme ; la capacité de survie est une nécessité pour les cellules tumorales. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation, dans l'adhésion et la migration, dans la survie et la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. On a pu dire ainsi que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire.

Ces altérations peuvent précisément faire l'objet d'un ciblage thérapeutique : c'est de cette constatation qu'est né le concept de thérapie ciblée. Les voies de signalisation sont constituées de protéines interagissant les unes avec les autres en séquences ordonnées. Certaines de ces protéines ont des fonctions catalytiques (en particulier des phosphorylations et des déphosphorylations, assurées respectivement par des kinases et des phosphatases) et sont plus accessibles au pharmacologue que celles dont le rôle est simplement d'interagir avec une autre protéine. Une difficulté particulière vient du fait que les voies de signalisation sont redondantes et interconnectées ; il arrive qu'un message que l'on empêche d'aboutir en bloquant une voie donnée pourra quand même être transmis par l'intermédiaire d'une autre voie où en empruntant un chemin détourné. C'est là l'une des principales causes de la résistance aux thérapies ciblées, l'autre étant représentée par les mutations survenant au niveau des cibles thérapeutiques.

4.1. Altérations oncogéniques des récepteurs à activité tyrosine kinase

Parmi les facteurs de croissance et les récepteurs impliqués dans la prolifération tumorale, on peut citer la famille de l'épidermal growth factor (EGF) (11 facteurs de croissance et quatre récepteurs, qui peuvent s'homodimeriser ou s'hétérodimeriser pour être actives); la famille du fibroblastic growth factor (FGF) (18 facteurs de croissance et quatre récepteurs); les platelet-derived growth factors (PDGF) et les facteurs apparentés, KIT et FLT3, et leurs récepteurs respectifs ; l'insuline et les insulin like growth factors (IGF) et leurs récepteurs ; l'hépatocyte growth factor (HGF) et son récepteur MET; le glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) et son récepteur RET; le récepteur ALK; les éphrines et leurs récepteurs ; et plusieurs autres couples. Les altérations oncogéniques des récepteurs sont nombreuses et ont été identifiées dans de nombreux récepteurs de cette famille; elles peuvent être quantitatives (surexpression du gène, souvent due à son amplification) et qualitatives (mutations activatrices, en particulier au niveau du domaine tyrosine kinase). A ces récepteurs s'ajoutent ceux impliqués dans l'angiogenèse,

exprimés dans des cellules non tumorales : le vascular endothelial growth factor (VEGF) et ses récepteurs, les angiopoïétines et leurs récepteurs.

Des altérations oncogéniques de l'EGFR sont rencontrées dans de nombreux cancers : surexpression dans les cancers du côlon, du sein, des voies aérodigestives supérieures ; mutation VIII, qui entraîne la troncation de la partie extracellulaire du récepteur, dans les glioblastomes ; mutations du domaine tyrosine kinase dans un petit contingent de cancers du poumon non à petites cellules. Dans le cas d'ERBB2, une amplification du gène est rencontrée dans environ 20 % des cancers du sein. ERBB3 est surexprimé dans les cancers du sein, du poumon, et dans les mélanomes. Dans tous les cas, ces altérations entraînent l'activation du récepteur en absence de facteur de croissance et l'utilisation des voies en aval du récepteur pour assurer la prolifération tumorale. Il peut en résulter une véritable dépendance (addiction) des cellules vis-à-vis de ces voies de prolifération, qui explique le succès du blocage du récepteur par divers outils pharmacologiques.

4.2. Altérations oncogéniques de la voie des mitogen activated protein kinases

La voie des MAP kinases est une des grandes voies de l'oncogenèse et plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs y ont été identifiés depuis longtemps. Si la protéine adaptatrice GRB2 et le facteur d'échange GDP-GTP ne semblent pas subir de mutations oncogéniques, il n'en est pas de même pour la protéine RAS dont les trois isoformes K-RAS, H-RAS et N-RAS sont mutées dans de nombreux cancers. Par exemple, K-RAS est muté dans environ 40 % des cancers colorectaux, 20 % des cancers du poumon non à petites cellules, 90 % des cancers du pancréas et 5 % des cancers du sein. C'est une des protéines les plus fréquemment mutées dans les cancers humains. Les mutations activatrices siègent principalement au niveau des codons 12 et 13 et remplacent deux glycines par d'autres acides aminés. La protéine mutée conserve ses propriétés de se lier au GDP, de permettre l'échange GDP-GTP, de reconnaître et de recruter à la membrane une protéine RAF ; mais elle devient incapable de remplir sa fonction enzymatique intrinsèque qui est de cliver le GTP en GDP : elle reste donc active en permanence pour transmettre un ordre de prolifération. On dit souvent que cette mutation « transforme un fusil à un coup en une mitrailleuse ». Des mutations, plus rares, au niveau du codon 61, entravent la stimulation de l'activité GTPasique par le facteur GAP ; les conséquences en sont les mêmes, l'activité enzymatique intrinsèque de RAS paraissant insuffisante pour une désactivation rapide.

Pour les mêmes raisons, des mutations désactivatrices du système de stimulation de l'activité GTPasique de RAS auront un effet oncogénique et les facteurs GAP ou les facteurs qui leur sont associés comme la protéine NF1 (Neurofibromatosis 1) sont des suppresseurs de tumeurs

; l'altération germinale de NF1 est responsable de la neurofibromatose et s'accompagne d'une prédisposition aux cancers.

La protéine RAF constitue également un point d'appel pour l'oncogenèse. Une mutation activatrice est principalement rencontrée : la mutation V600E de la protéine B-RAF. En effet, on ne connaît pas de mutations activatrices d'A-RAF et exceptionnellement de C-RAF. Cela est dû au fait que plusieurs mutations seraient nécessaires sur ces deux protéines pour les activer, alors que B-RAF, déjà « préparé » au niveau des sites de phosphorylation N-terminaux, n'a besoin que de l'introduction d'une charge négative à proximité des acides aminés 599-602 pour mimer la présence d'un groupement phosphate. La mutation V600E, qui introduit un acide glutamique à proximité des sites de phosphorylation du domaine catalytique, remplit cet office. Ces mutations sont rencontrées dans les mélanomes et les cancers thyroïdiens principalement, mais aussi dans d'autres cancers comme les cancers de l'ovaire et du côlon.

Les protéines MEK et ERK, en revanche, ne subissent pas de mutations activatrices récurrentes ; elles sont souvent surexprimées dans les cancers et apportent par-là, vraisemblablement, une contribution significative à l'oncogenèse. On évalue souvent leur degré d'activation par les événements oncogéniques en amont par leur degré de phosphorylation, grâce à la disponibilité d'anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de ces protéines. Les MAPK et MAP2K des autres modules peuvent, à l'opposé, se comporter comme des suppresseurs de tumeurs : on connaît des mutations invalidantes de MEK4 dans des cancers variés, quoique à une fréquence faible (pancréas, sein, poumon, côlon, etc.) Il existe une diminution de l'expression de cette protéine dans 75 % des cancers de l'ovaire.

Les voies des p38 et des JNK se comportent le plus souvent, à l'inverse de la voie ERK, comme des suppresseurs de tumeurs ; ce sont les altérations invalidantes des kinases de ces voies, comme MEK4 et MEK6, qui pourraient être impliquées dans l'oncogenèse. Le niveau d'activité des kinases p38 et MEK6 est très faible dans les carcinomes hépatocellulaires et des mutations « perte de fonction » de MEK4 ont été décrites dans des tumeurs humaines. Toutefois, une augmentation du niveau de phosphorylation de p38 α a été corrélée à une malignité accrue de divers cancers, peut-être en raison du rôle de la voie p38 dans la régulation de l'expression des cytokines proinflammatoires comme l'IL6 (chapitre 4) ou l'IL1. En outre, la voie JNK et la voie p38 stimulent l'angiogenèse et l'invasivité tumorale en raison de leur activité stimulatrice de la motilité cellulaire et de la production des métalloprotéinases. L'un des effecteurs principaux de la voie JNK, le facteur de transcription JUN, qui participe au complexe AP1, est clairement oncogénique.

Enfin, les facteurs de transcription (les MAP) sont également des proto-oncogènes importants à l'extrémité de cette voie de signalisation. Parmi les facteurs de transcription phosphorylés et activés par les MAP figurent la protéine MYC, la protéine MYB, les protéines JUN et FOS et bien d'autres connues pour leur rôle oncogénique. Le point de départ de l'oncogenèse liée à ces facteurs de transcription est à rechercher au niveau de leur surexpression : la quantité de protéine disponible pour se lier à MAX dans le cas de MYC ou à FOS dans le cas de JUN. À l'inverse, les protéines MAD apparaissent comme des suppresseurs de tumeurs. Une amplification de MYC est présente dans plusieurs types tumoraux, et l'amplification de MYCN sont un facteur de mauvais pronostic des neuroblastomes de l'enfant.

4.3. Altérations oncogéniques de la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase

La voie de la PI3 kinase est riche en altérations, mutationnelles et non mutationnelles, capables de concourir à l'oncogenèse. La PIK3CA est elle-même une oncoprotéine majeure : les mutations de son gène sont fréquemment rencontrées, entre autres choses, dans les cancers du sein et du côlon. Les mutations activatrices siègent le plus souvent au niveau de trois acides aminés distincts, E542, E545 et H1047. Une amplification du gène ou une surexpression de la protéine peuvent également être rencontrées dans les cancers. La sous-unité régulatrice peut être, elle aussi, le siège de mutations activatrices, que l'on rencontre dans des syndromes lymphoprolifératifs et les cancers colorectaux.

La phosphatase PTEN, qui reverse l'action de la PI3 kinase, est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs de type *gatekeeper* dont les altérations sont retrouvées dans les cancers de l'endomètre, du sein, du côlon, de l'ovaire, les glioblastomes, les mélanomes, etc. Des mutations de PTEN dans la lignée germinale s'accompagnent d'un syndrome de prédisposition héréditaire au cancer appelé maladie de Cowden. L'inactivation de PTEN peut se produire par des mutations invalidantes, qui sont nombreuses, incluant des délétions, par méthylation du promoteur du gène, diminuant son expression, et par toute régulation transcriptionnelle négative.

Il a été décrit exceptionnellement des mutations oncogéniques activatrices d'AKT ; en revanche, un gain de fonction par amplification, surexpression et hyperphosphorylation est susceptible d'être fréquemment oncogénique. Une phosphorylation activatrice d'AKT sur la sérine 473 a été associée à de nombreux cancers (sein, pancréas, estomac, endomètre, prostate, etc.). TSC1 et 2 doivent leur nom à une pathologie du développement liée à une prédisposition génétique aux cancers, la sclérose tubéreuse de Bourneville. Une mutation dans la lignée germinale, suivie d'une perte d'hétérozygotie au niveau somatique, explique classiquement l'implication de ces protéines dans l'oncogenèse.

Parmi les nombreux substrats des kinases AKT, certains activent des voies prooncogéniques, comme celles aboutissant à NFκB, d'autres des voies anti-oncogéniques comme les facteurs de transcription FOXO, qui sont des suppresseurs de tumeurs impliqués dans les rhabdomyosarcomes et certaines leucémies : des remaniements chromosomiques entraînent une perte de fonction de ces facteurs proapoptotiques.

LKB1 a été identifiée originalement comme le produit d'un gène suppresseur de tumeurs. Ses mutations germinales s'accompagnent de la formation d'hamartomes et de polypes, en particulier au niveau du tube digestif, par effet d'haplo-insuffisance. Il semble que le rôle de cette protéine dans la polarité cellulaire épithéliale soit à l'origine de cette fonction de suppresseur de tumeurs, plus que son rôle dans le métabolisme énergétique.

Enfin, il n'a pas été décrit de mutations activatrices ni de surexpressions de MTOR dans les cancers, et le rôle direct de cette protéine dans l'oncogenèse reste incertain.

4.4. Altérations oncogéniques des récepteurs et l'activation des kinases JAK

Il existe de nombreuses altérations pathologiques de cette voie de signalisation ; beaucoup d'entre elles concernent les mécanismes de l'immunité : déficiences immunitaires, maladies inflammatoires et auto-immunes. Signalons par exemple l'association entre les mutations de JAK3 et les syndromes d'immunodéficience sévère SCID (Severe combined immunodeficiency) chez la souris comme chez l'homme. Nous n'entrerons pas dans le détail de la pathologie immunitaire liée aux altérations moléculaires de la voie des cytokines. Sur le plan de l'oncogenèse, de nombreuses altérations ont été décrites à tous les niveaux de cette voie de signalisation : les récepteurs des facteurs de croissance hématopoïétiques, les kinases JAK, les facteurs de transcription STAT et leurs inhibiteurs SOCS.

Le récepteur IL3Rα est surexprimé dans les blastes de plus de 80 % des leucémies aiguës myéloïdes, entraînant une augmentation de l'activation de STAT5. Dans d'autres cas, c'est le récepteur commun, IL3Rβ, qui est exprimé sous une forme tronquée. Les formes tronquées des récepteurs les rendent en effet insensibles à l'ubiquitinylation. De même, une version tronquée du G-CSFR est associée à une suractivation de STAT5 et des mutations ponctuelles de ce récepteur sont également rencontrées dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Enfin, des mutations du récepteur de la thrombopoïétine (TPOR) ont été rencontrées dans des syndromes myéloprolifératifs.

La découverte de la mutation V617F de JAK2 dans plusieurs syndromes myéloprolifératifs a constitué une étape importante dans la connaissance de la genèse de ces hémopathies malignes (polyglobulie essentielle ou maladie de Vaquez, thrombocythémie essentielle, myélofibrose idiopathique). Cette mutation survient dans le domaine JH2 de JAK2 et a pour conséquence une

activation constitutive de JAK2, conduisant à une hypersensibilité des récepteurs. D'autres altérations moléculaires de JAK2, en particulier des translocations et des amplifications, avaient été décrites dans les leucémies et les lymphomes. De nouvelles mutations de JAK2 ont été décrites dans les syndromes myéloprolifératifs, les LAL (leucémies aiguës lymphoblastiques) et les leucémies aiguës à mégacaryocytes. Des mutations activatrices de JAK1 ont été récemment décrites dans des leucémies aiguës lymphoblastiques à cellules T et des mutations de JAK3 dans des leucémies aiguës à mégacaryocytes.

Bien qu'aucune mutation des protéines STAT n'ait été rencontrée dans les cancers, celles-ci se comportent fréquemment comme des oncogènes. L'activation constitutive de STAT1 se rencontre dans les LAM, les LAL à cellules B, les érythroleucémies ; celle de STAT3 dans la maladie de Hodgkin et certaines LAM, mais aussi dans des tumeurs solides (carcinomes hépatocellulaires, du sein, de la prostate) ; celle de STAT5 dans les érythroleucémies, les LAM, les LAL, les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les leucémies à mégacaryocytes. Toutefois, les protéines STAT peuvent jouer un rôle ambivalent : STAT1 est un promoteur de l'apoptose dans la signalisation par les interférons et pourrait se comporter comme un suppresseur de tumeurs dans les stades tardifs de l'oncogenèse en induisant l'apoptose. De même, STAT3 est activé par l'IL10, qui est une cytokine anti-inflammatoire, et pourrait réduire l'oncogenèse liée à l'inflammation.

Les protéines SOCS se comportent comme des suppresseurs de tumeurs ; une méthylation du promoteur de SOCS1, conduisant à son inactivation, a été observée dans près de 60 % des LAM ainsi que dans les LMC et les carcinomes hépatocellulaires. De même, une méthylation du promoteur de SOCS3 est rencontrée dans les hépatocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes.

4.5. Altérations oncogéniques de la voie du TGF β

Les voies induites par le TGF β et ses analogues ont de multiples rôles dans le développement et la morphogenèse, et les mutations des gènes impliqués sont à l'origine de nombreuses pathologies héréditaires et de malformations congénitales. Leurs rôles dans l'oncogenèse sont complexes et contradictoires. La voie du TGF β est plutôt une voie anti-oncogénique dans les étapes précoces, car elle s'oppose à la prolifération et induit la différenciation et l'apoptose ; mais dans les étapes tardives, elle joue un rôle favorisant l'invasion et la métastase par son action au niveau de l'adhésion cellulaire, du microenvironnement tumoral, de l'angiogenèse et de la surveillance immunitaire.

Dans la plupart des études, les acteurs de la voie du TGF β apparaissent comme des suppresseurs de tumeurs. Des mutations invalidantes de BMPR1A (ALK3), de SMAD4, et plus rarement de l'endogline, ont été rencontrées dans des syndromes de prédisposition aux cancers

digestifs (syndrome de polypose juvénile). Par ailleurs, certains polymorphismes fonctionnels des TGF β et de leurs récepteurs s'accompagnent d'une augmentation de la susceptibilité à certains cancers. Les métastases des cancers du sein et du poumon s'accompagnent fréquemment de la perte du gène TGFBR3. Des mutations de TGFBR2 et de SMAD4 sont rencontrées dans les cancers du côlon, du pancréas et du poumon. Les mutations de TGFBR2 sont liées à la présence d'un microsatellite dans la séquence codante, qui est fréquemment muté en cas d'instabilité microsatellitaire, dans les cancers sporadiques comme dans les cancers du côlon à prédisposition héréditaire. Une perte d'expression de TGFBR2 a été observée dans de nombreuses tumeurs humaines de divers types.

Le rôle positif du TGF β sur la formation des métastases a été mis en évidence expérimentalement : l'inhibition de l'activité kinase du TGFBR1 inhibe la formation des métastases pulmonaires de tumeurs mammaires xénogreffées chez la souris nude.

Un tel rôle est fortement suspecté dans les cancers humains, car le TGF β est un inducteur puissant de la transition épithélio-mésenchymateuse, par l'intermédiaire de l'action de SMAD sur l'expression des gènes SNAIL, SLUG et TWIST.

4.6. Altérations oncogéniques des voies des récepteurs couplés aux protéines G

Les voies mises en jeu par l'activation des GPCR ne sont pas fréquemment altérées dans les cancers comme les voies mises en jeu par l'activation des RTK. Il est toutefois intéressant de rechercher et de décrire de telles altérations qui peuvent servir de cibles à des approches thérapeutiques innovantes. Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent le fait que, de façon générale, les voies activées par les GPCR pouvaient concourir à la prolifération cellulaire avec, en particulier, le rôle promoteur de tumeurs de la PKC, via son activation pharmacologique par les esters de phorbol. Plusieurs altérations spécifiques de ces voies peuvent être signalées pour leur contribution à l'oncogénèse. Le cas particulier des chimiokines et de leurs récepteurs sera évoqué dans le paragraphe suivant.

Un certain nombre de ligands sont des facteurs mitogènes : la thrombine, l'acide lysophosphatidique (LPA), la sphingosine-1-phosphate (S1P), le GRP (Gastrin-releasing peptide), l'endothéline et les prostaglandines stimulent la prolifération cellulaire par activation de leurs GPCR respectifs ; ils sont surexprimés dans certains cancers, mais leur rôle moteur de l'oncogénèse est difficile à affirmer. Cette action sur la prolifération peut être réalisée par l'activation de la PKC ou des voies de prolifération classiques (voies des MAP kinases, voie de la PI3 kinase) interconnectées avec les voies activées par les GPCR via des petites protéines G.

4.7. Altérations oncogéniques de la voie des chimiokines

Les chimiokines sont associées à de nombreux phénomènes immunopathologiques, relevant de l'infectiologie, de la pneumologie ou de la rhumatologie. En oncologie, les chimiokines sont impliquées dans les phénomènes métastatiques. Un premier rôle des chimiokines exprimées, parfois fortement, par les cellules tumorales, est de recruter des lymphocytes et des macrophages au niveau de la tumeur, entretenant un état inflammatoire chronique. Une chimiokine impliquée dans le recrutement des macrophages est RANTES (Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) ou CCL5. L'activation des macrophages entraîne la production de métalloprotéinases (MMP) dont l'activité est capitale pour le développement des métastases, car elles hydrolysent la matrice conjonctive du stroma tumoral. Une autre chimiokine tumorale, CXCL12 ou SDF1 (Stromal cell-derived factor 1), est capable de recruter des cellules endothéliales concourant au développement de nouveaux vaisseaux (angiogénèse), car les progéniteurs de ces cellules expriment le récepteur du SDF1, CXCR4.

Un deuxième aspect concerne l'activité des chimiokines sur la motilité des cellules tumorales, grâce aux récepteurs de chimiokines qu'elles expriment souvent à un niveau élevé, comme CXCR4 et CCR7. L'activation de ces récepteurs leur permet de sécréter également des métalloprotéinases. Par ailleurs, la chimiokine CXCL12, qui reconnaît le récepteur CXCR4, est fortement exprimée dans le poumon, le foie et la moelle osseuse, ce qui suggère qu'elle puisse être responsable de la métastase des cellules cancéreuses dans ces organes ; la chimiokine CCL21 ou ECL (Efficient chemoattractant for lymphocytes), qui est le ligand principal du récepteur CCR7, est en revanche fortement exprimée dans les ganglions lymphatiques et y attirerait les cellules cancéreuses.

Enfin, l'activation des récepteurs des chimiokines des cellules tumorales est susceptible de favoriser leur multiplication : on a vu plus haut que les GPCR étaient susceptibles d'activer la voie de la PI3 kinase et certains modules de la voie des MAP kinases.

4.8. Altérations oncogéniques des récepteurs toll-like, l'interleukine 1 et le NFκB

En l'absence de mutations identifiées sur les diverses kinases impliquées dans la transduction des signaux reçus par les TLR-IL1R, c'est évidemment NFκB qui apparaît comme le modulateur des effets pro-oncogéniques de cette voie de signalisation, en raison de ses propriétés favorisant la survie et la prolifération cellulaires.

Plusieurs mécanismes d'activation de NFκB dans des tumeurs humaines ou des lignées cellulaires tumorales ont été décrits :

– surexpression ou hyperactivité des différents récepteurs dont l'activation induit, entre autres choses, celle de NFκB (EGFR, ERBB2, MET, TNFR, intégrines, récepteurs des cytokines) ;

- surexpression ou hyperactivité des ligands de tels récepteurs (IL1 β , cytokines, TNF, HGF, etc.) ;
- hyperactivité de kinases cytoplasmiques comme JAK, ABL (en liaison avec la translocation BCR-ABL), AKT (en liaison avec le caractère oncogénique de la voie de la PI3 kinase) ;
- mutations des protéines I κ B, en particulier I κ B α , plus rarement I κ B ϵ dans la maladie de Hodgkin, accompagnées de la perte de l'allèle non muté, selon les processus classiques d'activation des gènes suppresseurs de tumeurs ;
- mutations des gènes constitutifs du NF κ B, en particulier du gène REL, dont des amplifications, délétions et mutations ponctuelles ont été décrites dans les lymphomes B. Des réarrangements du gène NFKB2 ont été également signalés dans diverses hémopathies malignes.

Il existe par ailleurs des mutations germinales des gènes codant pour les protéines NEMO (IKK γ), I κ B α , IRAK4, qui conduisent à des maladies congénitales diverses affectant le plus souvent le système immunitaire.

4.9. Altérations oncogéniques des récepteurs des cellules B

Il a été proposé il y a plus de cinquante ans que la stimulation antigénique pouvait contribuer à la genèse des lymphomes malins non hodgkiniens. De nombreuses situations reliant un état inflammatoire chronique à la survenue de lymphomes ont été décrites. Par ailleurs, la stimulation antigénique des récepteurs BCR est une condition de la survie des lymphocytes B : dans ces conditions, l'expression de récepteurs BCR fonctionnels constituerait un moyen par lequel les anomalies moléculaires originales (translocations) pourraient s'exprimer dans une lignée lymphocytaire devenue tumorale.

Cette stimulation de la prolifération lymphocytaire peut être le fait d'auto-antigènes dans la leucémie lymphoïde chronique. Il y aurait ainsi une « dépendance » des lymphocytes à l'égard de la stimulation antigénique et très peu de lymphomes malins n'expriment plus le récepteur BCR. Cette situation explique pourquoi le traitement anti-infectieux ou anti-inflammatoire d'infections chroniques sur lesquelles survient le lymphome s'accompagne d'une régression tumorale : c'est le cas des lymphomes associés au virus de l'hépatite C ou à l'infection gastro-duodénale par *Helicobacter pylori*. Dans ces deux situations, le traitement antiviral ou antibiotique représente une option thérapeutique importante du lymphome. De façon générale, toute approche envisageant l'élimination des antigènes qui permettent l'expansion des cellules tumorales pourrait se révéler féconde.

4.10. Altérations oncogéniques des récepteurs des cellules T

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la surveillance immunologique des tumeurs et dans la mise en jeu de l'immunité antitumorale ; leurs capacités de survie et d'activation de leurs cibles, en particulier la production d'IL2, sont importantes pour inhiber la prolifération de certaines tumeurs comme les mélanomes malins. Malheureusement, la réponse immunitaire aux cancers est le plus souvent inefficace : les antigènes tumoraux majeurs de la plupart des cancers demeurent inconnus, empêchant toute thérapie spécifique. De plus, les cancers mettent en jeu toute une série de mécanismes pour échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte : mutations modifiant les épitopes reconnaissables par les cellules T, absence d'expression de molécules co-stimulatrices, sécrétion de cytokines immunosuppressives, etc.

Références bibliographiques

Pour en savoir plus :

- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.G., Nunez, G. (2009).** NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Ann Rev Pathol Mech Dis* ; 4 :365-98.
- Cohen, S., Zwillich, S.H., Chow, V., LaBadie, R.R.,Wilkinson, B. (2010).** Co-administration of the JAK inhibitor CP-690,550 and methotrexate is well tolerated in patients with rheumatoid arthritis without need for dose adjustment. *Br J Clin Pharmacol*; 69:143-151.
- Cuadrado A, Nebreda AR. (2010).** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* ; 429:403-17.
- De Ménorval, M. A. (2013).** Etude de la perméabilisation de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires par des agents chimiques et physiques. Thèse de doctorat. Université Paris Sud. p268.
- Dupont, S. (2011).** Implication de la membrane plasmique dans la survie de *saccharomyces cerevisiae* lors de perturbations hydriques : Rôle clé de l'ergostérol. Thèse de doctorat. Université de bourgogne. p177.
- Hebenstreit, D., Horejs-Hoeck, J., Duschl, A. (2005).** JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* ; 18 : 243-9.
- Jacques, R. (2010).** Signalisation cellulaire et cancer. ©Springer-Verlag France, Paris. ISBN-13 :978-2-8178-0027-1.p323.
- Jacques, R. (2017).** Bases biologiques de la cancérologie ; Signalisation cellulaire et cancer. 2^e édition. Lavoisier MSP.ISBN-13-9782257207081.p400.
- Jean-Claude, C., Roland, P. (2005).** Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes. 2^e édition. © Dunod, Paris, ISBN 2 10 049236 5.p514.
- Joël, B. (2012).** Les récepteurs couplés aux protéines G : caractéristiques générales et mécanismes d'activation. *Bull. Acad. Natle Méd* : 196 (9) ; 1765-1775.
- Kant, S., Schumacher, S., Singh, M.K., Kispert, A., Kotlyarov, A., Gaestel, M. (2006).** Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem*; 281 : 35511-9.
- Kremer, J.M., Bloom, B.J., Breedveld, F.C., Coombs, J.H., Fletcher, M.P., Gruben, D., Krishnaswami, S., Burgos-Vargas, R.,Wilkinson, B., Zerbini, C.A., Zwillich, S.H. (2009).**The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum.* ; 60:1895-905.

- Mahé, M. (2015).** Caractérisation des voies de signalisation des oncogènes FGFR3 muté et FGFR3-TACC3 dans les carcinomes de vessie. Thèse de doctorat. Université Paris Sud.p192.
- Mahlknecht, U., Will, J., Varin, A., Hoelzer, D., Herbein, G. (2004)** .Histone deacetylase 3,a class I histone deacetylase, suppressesMAPK11-mediated activating transcription factor- 2 activation and represses TNF gene expression. *J Immunol* ; 173 : 3979-90.
- Pasparakis, M. (2009).** Regulation of tissue homeostasis by NF-kappa B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* ; 9:778-88.
- Pawson, C.T., Scott, J.D., (2010).** Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nat Struct Mol Biol.*; 17:653-8.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers-Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001).** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* ; 22 : 153-83.
- Philippe, G. (2004).** Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif. Thèse de doctorat de l'université paris7.p181.
- Riese, R.J., Krishnaswami, S., Kremer, J. (2010).** Inhibition of JAK kinases in patients with rheumatoid arthritis: scientific rationale and clinical outcomes. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*; 24:513-526.
- Robert. J. (2012).** Signalisation cellulaire et cancer : caractérisation de cibles thérapeutiques Cell signalling and cancer: Characterisation of therapeutic targets. *Pathologie Biologie* : 60 ; 217–222.
- Stéphanie, O., Anne-Marie, M., Jean-Claude, M., Tony, L. (2011).** Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal. *Med Sci (Paris)* ; 27 : 514–520.
- Vo-van, Q.B. (2015).** Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez des micro-organismes d'intérêt technologique : Dynamique de la réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Université de bourgogne Agrosup dijon. p135.
- Yves, C.** Communications et signalisations cellulaires. 4^e édition. TEC&DOC. Lavoisier Paris. ISBN 978-2-7430-1508-4.