

UE11 – Parcours Biologie Cellulaire–
Signalisation Cellulaire – cours n°5
13 Mars 2019
Hervé Enslén
herve.enslen@inserm.fr

RT : MEZIANI Sofia
RL : MARTINOT Ophélie

Les voies de signalisation des MAP kinases : Méthodes d'étude, physiologie et implications physiopathologiques.

Plan :

I. Introduction

II. La phosphorylation dans la voie des MAP Kinases

III. Comment analyse-t-on la phosphorylation des protéines ?

- 1) L'usage d'ATP marqué au radio-isotope le ^{32}P .
- 2) Mise en évidence à l'aide d'Anticorps.
- 3) Mise en évidence par hydrolyse légère avec séparation par électrophorèse.
- 4) Au final, que valent ces méthodes ?

IV. Trois types de phosphorylation.

V. L'effet de la phosphorylation sur les protéines

- 1) Différents effets.
- 2) Cascades de phosphorylation.

VI. Les MAP Kinases.

- 1) Les voies principales.
- 2) Où se passe la phosphorylation ?
- 3) Comment stopper le signal ?

VII. Nos trois voies d'intérêt

- 1) Une histoire d'isoformes.
- 2) Séquences cibles des MAP Kinases.
- 3) Importance de ces voies dans les pathologies.

VIII. Comment étudier ces voies de signalisation ?

- 1) Exemples « rapides ».
- 2) Introduction d'inhibiteurs.
- 3) Autres illustrations sur comment utiliser les mutants.
 - a) Expériences sur le foie.
 - b) Expériences sur le thymus.

IX. Intéressons-nous aux kinases !

- 1) Quel est le site d'interaction des kinases ?
- 2) Une vraie question : Où est la spécificité ??
 - a) L'interaction avec les protéines d'échafaudage spécifiques.
 - b) Petit mot sur les Récepteurs couplés à la protéine G.
 - c) Spécificité de la régulation de la localisation.

But du cours :

- Faire un récap de ce qu'on connaît probablement déjà sur une voie de signalisation qui est essentielle : La voie des MAP kinases.
- Nous donner un aperçu un peu différent de ce qu'on a l'habitude de nous montrer (*En effet les aspects moléculaires des voies de signalisation sont souvent peu explorés en raison du manque de temps probablement, d'où l'intérêt de ce cours pour nous initier au mieux aux mécanismes moléculaires concernant cette voie de signalisation.*)

Abréviations : AA : Acides Aminés ; Ac : Anticorps

Mot du RT :

Bon... ce cours fut très dur à écrire les amigos... Le prof a refusé de nous donner les diapo et de filmer son cours, une dame m'a dit d'arrêter de prendre en photos les diapositives et de stopper l'enregistrement (Mdr pour ça je l'ai pas écouté #ThugLife)... cependant la qualité de l'enregistrement était juste affreux et monsieur notre professeur, pour rendre la tâche plus difficile, n'a pas utilisé de micro pour parler L.O.L.

J'ai donc fait de mon mieux pour retranscrire le plus de détails possible (fin de deviner au mieux les mots du prof), il se peut donc que certains détails n'y figurent pas... tout comme ceux qui étaient sur les diapos c-à-d images, Western Blot etc...

Tout ça pour dire, que je suis désolée si cette RT n'est pas ouf... je vous souhaite beaucoup de courage pour la lire mes crevettes :*

PS : C'est même pas un ancien cours :'

PS n°2 : J'ai mis des images de Google pour vous aider au mieux, mais ce ne sont pas les images du prof !

Mis à part ça, le professeur a montré différentes revues ; pour ceux et celles qui sont intéressés.es il est possible de le contacter pour qu'il vous les envoie.

Soyez vigilants les prochains RT/RL parce que des problèmes comme ça je pense que ça va être de plus en plus commun en Parcours ...

I. Introduction :

Qu'est-ce que la phosphorylation ?

Tout d'abord, c'est le **mécanisme principal de cette voie de signalisation**.

La transduction du signal c'est en premier lieu un signal extracellulaire (chimique, peptidique, hormonal...) rencontrant des récepteurs à la surface de la cellule. Cette interaction entraîne donc des changements de conformation des récepteurs déclenchant alors un certain nombre de signaux intracellulaires. Ces signaux vont ensuite entraîner une réponse cellulaire qui s'inclue dans une réponse tissulaire générale. Ces différentes réponses auront donc un effet sur leur environnement ce qui engendrera tout le métabolisme cellulaire et donc la réponse cellulaire dans ce contexte.

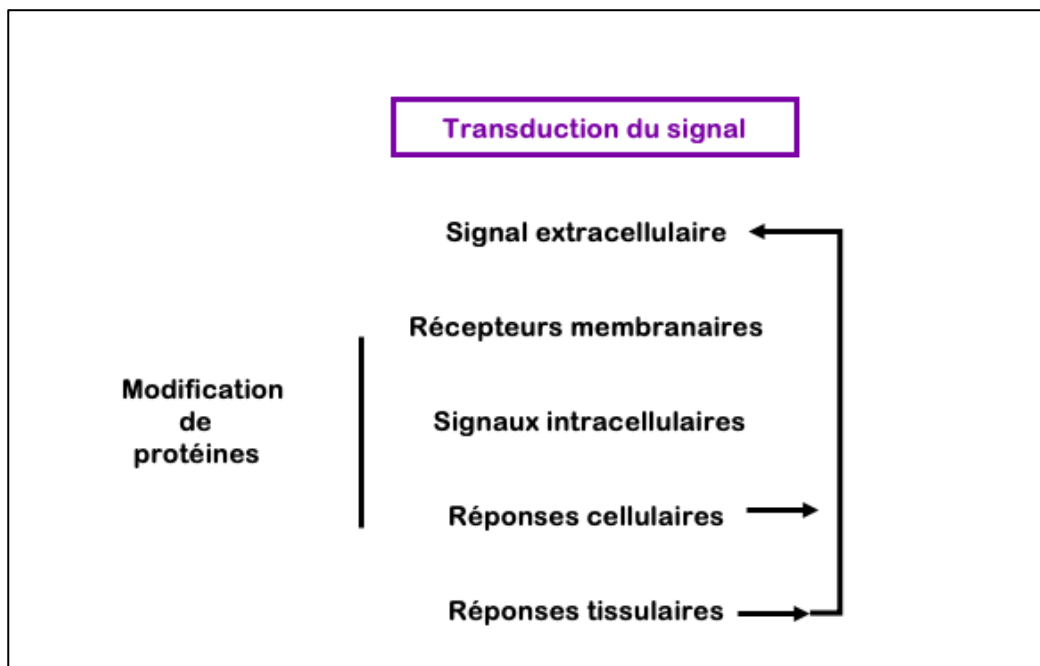


Image tirée d'une diapo du prof que j'ai recopiée

Les modifications des protéines lors de ces signaux intracellulaires, s'effectuent principalement par réactions de phosphorylation. Bien sûr il existe d'autres types de modifications post-traductionnelles mais **la phosphorylation demeure le mode de modification le plus répandu**.

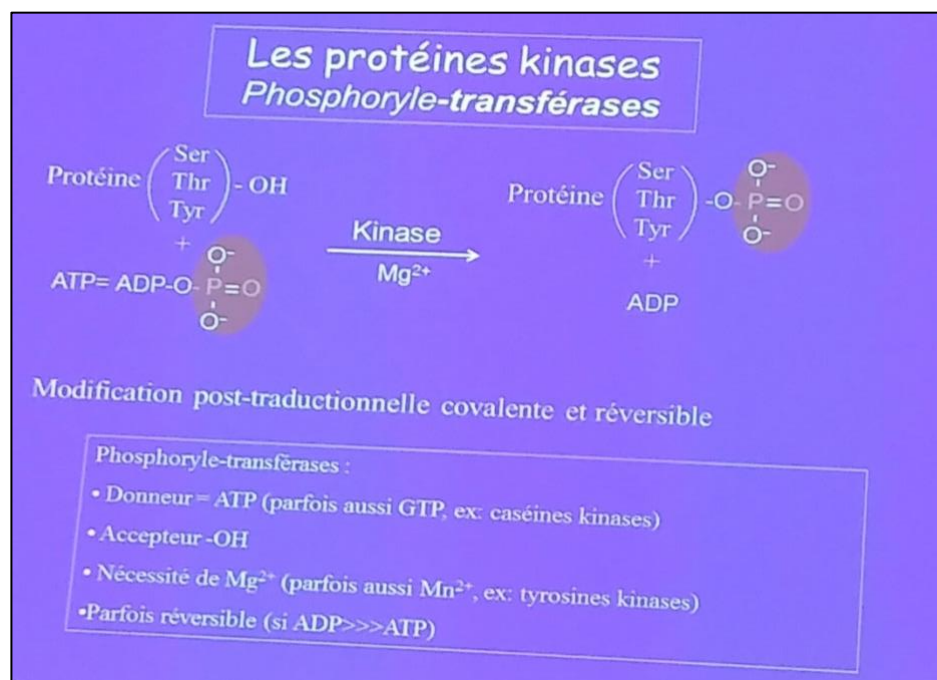
Chez les eucaryotes on va s'intéresser principalement à trois types de phosphorylation : Phosphorylation sur Sérine (Ser), Thréonine (Thr) et Tyrosine (Tyr).

Chez les mammifères ce sont les plus étudiées et les plus présentes. Cependant dans d'autres organismes on peut observer la phosphorylation d'autres AAs. On sait par exemple que chez les mammifères d'autres phosphorylations existent mais à des niveaux bien plus bas.

II. La phosphorylation dans la voie des MAP Kinases :

Ce sont des esters de phosphate qui sont créés après phosphorylation, soit à partir de fonction alcool si c'est sur des Ser/Thr ou soit à partir de fonction phénol si c'est sur des Tyr. La phosphorylation a bien sûr une sensibilité au pH dans notre cas, plutôt aux pH basiques.

Il s'agit du **transfert du groupements phosphate en position gamma de l'ATP**, la plupart du temps. Qui vont ensuite générer en présence d'enzymes, de la protéine kinase et de Mg^{2+} la protéine phosphorylée et de l'ADP.



Une des rares diapo du prof que j'ai pu prendre en photo les amis...

Ce qu'il faut retenir : C'est que la phosphorylation est une **modification post-traductionnelle covalente et réversible** \Rightarrow ne pas oublier qu'il existe la déphosphorylation !!

Dans les réactions de phosphorylation, le donneur est généralement l'ATP (ou le GTP pour certaines protéines kinases), l'accepteur est la fonction alcool/phénol, sans oublier la nécessité du Mg^{2+} (ça peut être du Manganèse dans certains cas), aussi, ce processus peut être réversible catalytiquement par présence d'un excès d'adénine.

III. Comment analyse-t-on la phosphorylation des protéines ?

1) L'usage d'ATP marqué au radio-isotope le ^{32}P .

Pour analyser la phosphorylation d'une protéine, on peut **incuber des cellules ou des tissus avec de l'orthophosphate marqué par un radio-isotope le ^{32}P** . Ce phosphate va être incorporé dans les cellules, sur l'ATP en position gamma et donc au cours de réactions de phosphorylation, ce phosphate marqué va être transféré aux protéines cibles.

On peut appliquer ça sur des cellules en culture, des fragments de tissus, puis on peut prélever des extraits cellulaires et effectuer des analyses par électrophorèse ou d'autres radiographies...

Il faut savoir que **la phosphorylation correspond à l'ajout de charges négatives**, cela peut donc modifier la migration des protéines dans différentes conditions notamment l'électrophorèse, on a ce qu'on appelle « un retard sur gel ». C'est-à-dire qu'une protéine qui normalement va migrer à un poids approximatif de 60kDa, peut se retrouver à 70, 80 kDa ! Dans certains cas on peut avoir un shift énorme de 20 à 30 kDa.

Question d'une personne de l'amphi :

Est-ce que cette modification dépend du nombre de groupements phosphates ou y'a-t-il d'autres facteurs ?

Ça dépend aussi de la protéine, le professeur pense qu'en plus du nombre de groupements phosphates qui sont ajoutés, la protéine en elle-même, ainsi que son environnement jouent sur le caractère du shift.

Il est intéressant de noter, qu'au début des études, pour mettre en évidence la phosphorylation on étudiait ce retard sur gel. Maintenant on a des techniques qui permettent d'observer la forme phosphorylée directement. Mais en fait, initialement on ne disposait que d'anticorps qui reconnaissaient la forme globale et quand elle était phosphorylée, on ne le savait que grâce au retard sur gel.

Cette technique n'est bien sûr pas parfaite, elle dépend de l'incorporation du groupement phosphate dans l'ATP, de la stœchiométrie de la phosphorylation des phosphates sur la protéine etc...

NB : La stœchiométrie = la quantité de Phosphate incorporée par mole de protéine.

On peut également effectuer ce type de réaction in vitro : on a des protéines purifiées ou recombinantes, on peut donc les incubier avec des enzymes elles aussi purifiées en présence d'ATP radioactif et de la même manière analyser si ces protéines sont phosphorylées et comment.

Cela permet donc de connaître le niveau de phosphorylation mais c'est peu sensible, les applications sont donc limitées.

Les inconvénients : Un des problèmes majeurs est l'utilisation de la radioactivité. Puisque c'est de plus en plus difficile, cher et dangereux, surtout que maintenant on est très sensible à cet aspect.

2) Mise en évidence à l'aide d'Anticorps.

Aujourd'hui, on a des outils beaucoup plus performants, qui sont des Ac qui reconnaissent soit le type de phosphorylation soit des phosphorylations sur certaines protéines de manière spécifique.

Ce type de réactifs peuvent être utilisés contre des Tyr par exemple, ainsi les résidus Tyr^P vont être reconnus de manière très sensible. Combiné à des technique permettant d'isoler la protéine d'intérêt, cela permet de savoir si elle est ou non phosphorylée.

On peut aussi avoir des Ac contre un phosphopeptide synthétique. On va donc prendre le site de phosphorylation et la séquence qui l'entoure, l'AA cible sera phosphorylé chimiquement et on va ensuite produire des Ac chez le lapin, la souris, le hamster etc...
(On peut prendre différent type d'animaux qui permettent d'obtenir des Ac)

On peut aussi faire un Ac contre la protéine entière phosphorylée mais ça c'est très aléatoire et pas très sensible.

On peut aussi avoir des Ac qui sont « Déphospho spécifique ». C'est-à-dire, lorsque la protéine sera phosphorylée, l'Ac ne reconnaitra plus sa cible.

Tous ces outils fonctionnent très bien.

Les avantages des Ac sont qu'ils sont très faciles d'emplois cela peut même permettre d'accéder à la stœchiométrie et on peut également les utiliser en immunocytochimie, avec expérience d'immunofluorescence. **Les Ac sont donc LA méthode de choix maintenant.**
Les inconvénients : il faut les faire ces Ac... travailler sur les Ag etc.. et il peut y avoir des problème de réactions croisées...

3) Mise en évidence par hydrolyse légère avec séparation par électrophorèse.

Une autre technique qui permet de regarder quel type d'AA est phosphorylé : c'est une analyse par hydrolyse légère avec séparation par électrophorèse. Cela consiste en une analyse de séparation par hydrolyse ménagée qui permet de distinguer si c'est une Ser/Tyr/Thr qui est phosphorylée. Parce qu'il est intéressant de savoir sur quel type de résidu votre protéine est phosphorylée.

On prend donc notre protéine marquée au ^{32}P on procède à une hydrolyse légère en milieu acide, puis on effectue une séparation par électrophorèse en couche mince à une ou deux dimensions.

Ainsi par exemple à pH=1,9 on sépare la fonction Ser^P. Et à pH=3,5 on sépare Thr/Tyr^P
Technique très classique.

De nos jours, on n'a pas encore de bons substitues à ça, si ce n'est des approches systématiques par exemple.

4) Au final, que valent ces méthodes ?

Une comparaison entre l'ATP radioactif et les Ac qui reconnaissent les protéines, ou AA phosphorylés a été faite dans un laboratoire au collège de France. Ils ont produit des Ac qui reconnaissent la forme phosphorylée d'une protéine (un Facteur de Traduction EF2), et en parallèle ils ont fait des expériences de marquage au ^{32}P puis ils ont procédé à une détection par l'électrophorèse et autoradiographie de la quantité de phosphate incorporée et ont fait la même expérience, cette fois-ci avec de l'ATP à froid. On a observé que **la détection en fonction du temps était plus sensible avec l'Ac que la radioactivité.**

Un autre document illustre la réponse de neurone de souris en présence de glutamate (stimulation oxydotoxique) : on observait une augmentation de la phosphorylation d'une protéine dans les neurones en fonction du temps (avec toujours la nécessité d'un contrôle car l'augmentation de la quantité de protéines n'est pas la même chose que l'augmentation de la phosphorylation !).

En résumé : Il existe deux approches pour étudier la phosphorylation d'une protéine. Soit avec de l'**ATP radioactif** ; dans ce cas on regarde le transfert du ^{32}P en position gamma sur l'ATP à la protéine d'intérêt. La protéine devient donc radioactive, on l'observe suite à un lysat suivi d'une électrophorèse et on finit par une autoradiographie. Ainsi la radioactivité va s'imprimer sur le filtre. On observe qu'au fur et à mesure qu'on laisse la protéine incuber avec sa kinase et de l'ATP plus la protéine est phosphorylée.

L'autre méthode est celle associant **des Ac sans radioactivité** ! C'est donc l'Ac qui reconnaît la forme phosphorylée de la protéine ; dans ce cas on détecte la liaison de l'Ac à l'Ag.

On a donc le même but mais des techniques différentes. Cette comparaison a permis de mettre en évidence la plus grande sensibilité de la technique utilisant l'Ac que celle associée à l'ATP radioactif. Et qu'en plus, on pouvait accéder à la stœchiométrie à l'aide des Ac. Cette notion de stœchiométrie est très importante, car si par exemple, on a 0,1 mole de Phosphate par mole de protéine il y a peu de chance d'avoir un effet physiologique. **On s'attend à un effet avec au moins 1 mole de Phosphate par mole de protéine.**

Pour mettre en évidence la phosphorylation on peut aussi utiliser la spectrométrie de masse. (*Cependant le professeur n'est pas revenu dessus considérant que l'on avait déjà eu cours sur cette technique*). Il nous a tout de même rappelé, que la phosphorylation a une masse on peut donc détecter par rapport à la séquence attendue du **peptide un shift de l'ordre de 7 Da.**

LE truc à retenir: **LA PHOSPHORYLATION EST UNE MODIFICATION POST TRADUCTIONNELLE COVALENTE ET RÉVERSIBLE.**

Cela signifie qu'à un moment clef on aura une phosphorylation de la protéine, mais c'est quelque chose de dynamique, c'est-à-dire qu'on aura une phosphorylation et déphosphorylation ! Cela tourne en cycle ! Ainsi à un moment donné dans la cellule, la phosphorylation va prendre le pas ou bien la déphosphorylation, cela en réponse à différents stimuli (de stress, hormonaux, métaboliques...) dans différentes conditions.

En fait, à un instant T, l'état de P d'une protéine c'est la résultante de sa phosphorylation et sa déphosphorylation.

IV. Trois types de phosphorylation.

On l'a évoqué précédemment, chez les mammifères il existe trois types principaux de phosphorylation : Sur une Sérine, une Thréonine ou une Tyrosine.

À noter que les Ser/Thr représentent une famille et les Tyr une autre famille. C'est-à-dire qu'il existe des protéines kinases qui phosphorylent les Ser ou Thr et d'autres les Tyr. Cependant, il y a une quinzaine-vingtaine d'années de cela on a découvert une troisième famille qui phosphoryle à la fois les Ser/Thr ET les Tyr. Dans cette famille on retrouve **uniquement des enzymes qui appartiennent aux MAP Kinases !**

Ne pas oublier l'existence des phosphatases qui ont l'effet inverse ; ciblant les Ser/Thr, les Tyr ou les deux.

Une expérience a été faite il y a maintenant une trentaine d'années à partir de fibroblastes suggérait qu'à peu près 30% des protéines cellulaires étaient phosphorylées. Ce qui est intéressant à noter, c'est que sur ces protéines phosphorylées, **il y a à peu près 99% de Ser/Thr pour moins de 1% de Tyr.**

En effet, quand le génome a été séquencé on a trouvé à peu près 518 signatures kinases. Parmi elles, à peu près quatre fois plus de signatures kinases Ser/Thr que de Tyr kinases. On a donc un **rapport enzymes d'un à quatre** pour un **rapport de phosphorylation d'un à cent !** Cela illustre le fait que pour la plupart des Tyr Kinases elles sont extrêmement spécifiques et ont par conséquent relativement peu de substrats, par rapport au Ser/Thr kinases.

Par la suite on a répertorié environ 38 Ser/Thr phosphatases et 38 Tyr phosphatases et également 62 phosphatases capables de déphosphoryler à la fois les Ser/Thr et les Tyr.

De plus, il a été montré que sur ces 518 kinases il y a au moins 116 Tyr et Ser kinases qui ont été associées au cancer chez l'Homme ; soit par ce qu'elles sont mutées soit parce qu'elles sont surexprimées, entraînant par conséquent une dérégulation de leur voie de signalisation.

V. L'effet de la phosphorylation sur les protéines :

1) Différents effets :

La phosphorylation entraîne différents types d'effets :

- La régulation de l'activité biologique.
- La régulation de la stabilité des protéines (*la phosphorylation peut stabiliser ou déstabiliser une protéine, entraîner sa dégradation ou pas*)
- Réguler le mouvement et la localisation cellulaire d'une protéine.
- Réguler les interactions entre protéines : *Pour exemple, prenons les récepteurs Tyr Kinases. Lorsqu'ils sont activés par la fixation d'un ligant, ils vont s'auto-phosphoryler en trans et se dimériser.*
- Changement complexe de la conformation des protéines.

- Changement de charge et de volume des protéines (*Rendre accessible ou pas le site actif*)
- Modifier l'interaction après phosphorylation. (*Ex: lorsque les Tyr sont phosphorylées, le site de phosphorylation et la séquence environnante peuvent être reconnues par d'autres protéines de façon spécifique. Cela a été initialement modélisé avec la protéine Src qui est une Tyr Kinases. Ce sont ce qu'on appelle des domaines SH2*)

2) Cascade de phosphorylation.

Les cascades de phosphorylation ont été initialement étudiées sur la glycolyse. On arrive à une cascade qui active des enzymes qui aboutit au produit. *Cette cascade représente plus de cent ans d'études, avec de nombreux prix Nobel pour pratiquement chaque étape.*

Comment cela se passe ?

L'exemple donné était l'augmentation d'une hormone, qui va induire l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cet AMPc va activer une protéine kinase qui s'appelle la PKA. La PKA va phosphoryler et activer la Phosphorylase kinase qui à son tour va phosphoryler et activer la glycogène phosphorylase et ainsi de suite jusqu'à la glycolyse.

Il faut savoir que ces cascades de signalisation sont extrêmement courantes chez les mammifères, la levure etc...

On peut modéliser cela par :

Un signal extracellulaire => 1^{ère} Kinase => 2^{ème} Kinase => 3^{ème} Kinase qui se rend dans le noyau ... bien sûr à chaque étape, les kinases peuvent phosphoryler d'autres substrats ou pas, selon la spécificité.

L'intérêt pour la cellule, c'est d'avoir un **système d'amplification**, c'est-à-dire qu'un faible changement au départ peut induire une réponse massive. De plus, cela peut **permettre une diversification**, puisqu'à chaque étape la kinase peut avoir différents substrats.

Une kinase peut voir sa localisation modifiée après activation pour trouver la prochaine kinase à phosphoryler.

Cela entraîne aussi une transformation du signal par exemple une hormone qui aboutit à la prolifération, à l'apoptose etc...

VI. LES MAP KINASES.

Ce sont des kinases impliquées dans de nombreux processus cellulaires !

Elles jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, la transformation, les réactions inflammatoires, le métabolisme etc...

NB : la phosphorylation n'a pas toujours un rôle activateur !

Cependant, il se trouve que pour les MAP Kinases c'est activateur.

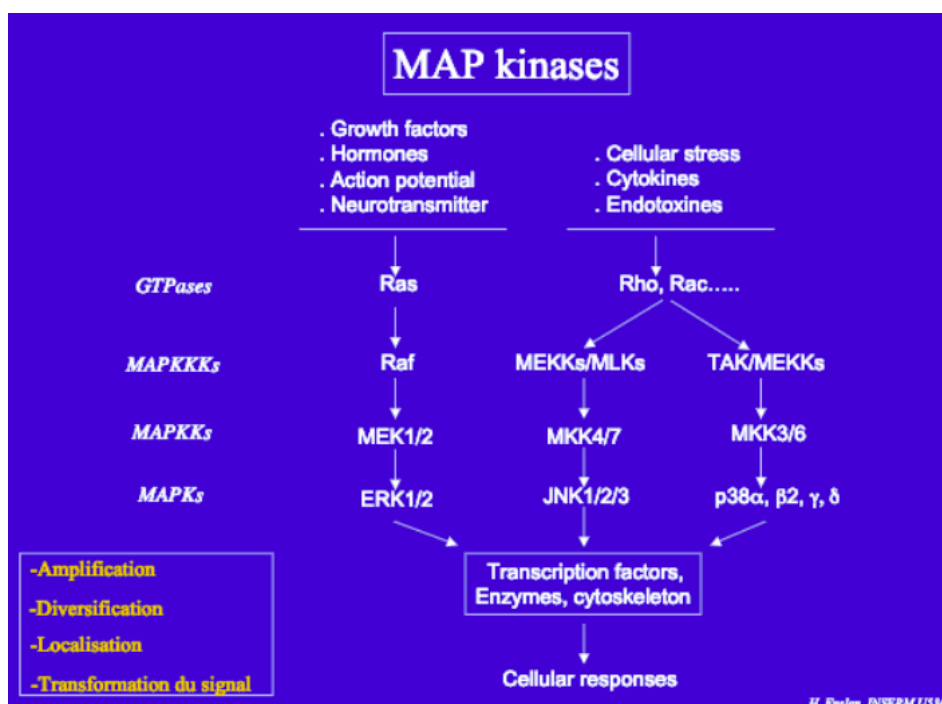
1) Les voies principales.

Aujourd'hui il y a quatre voies principales via la MAP Kinases, dans ce cours on s'intéresse à trois d'entre elles.

- **MAP Kinase ERK**
- **MAP Kinase JNK** (*c-Jun N-terminal kinase ; Jun est un facteur de transcription*)
- **MAP Kinase p38**

ERK essentiellement régulée par des mitogènes, des Potentiels d'action, des neurotransmetteurs etc...

JNK et P38 plutôt activées activé en cas de **stress cellulaire** ou par des cytokines et endotoxines.



Diapo du prof les amis *-*

Ainsi entre ces voies on note bien des différences même s'il existe des interactions entre elles.

À noter qu'on retrouve bien l'activation en cascade, avec des stimuli proches de la membrane, puis une première MAP KKK (MAP 3 Kinase), phosphoryle et active une MAP KK (MAP 2 Kinase), qui phosphoryle et active à son tour la MAP K (MAP Kinase). On retrouve ainsi ce schéma pour chaque voie, avec toujours amplification, diversification et ainsi de suite...

Des études ont été faites, à Nice, où ils avaient montré qu'il suffisait, pour quantité d'enzymes égale, que 5% seulement de la MAP 3K de la voie ERK soit activé pour activer de façon totale les 100% de la voie ERK : on a bien une belle amplification là !

Ces MAP Kinases, sont présentes dans le cytoplasme, et une fois activées, elles vont se rendre dans le noyau pour réguler la transcription. Ainsi, on les retrouve à la fois dans le cytoplasme où elles régulent des fonctions cytoplasmiques et dans le noyau où elles régulent des fonctions nucléaires. Le tout pour aboutir à une réponse cellulaire.

2) Où se passe la phosphorylation ?

Si on reprend notre modèle de cascade de signalisation, on a la MAP 3K une fois activée en réponse au signal extracellulaire, phosphoryle et active la MAP 2K qui phosphoryle et active la MAP K. La MAP 2K est activée par la MAP 3K par une double phosphorylation sur deux résidus Ser. Une fois phosphorylée sur ses DEUX résidus Ser, **la MAP 2K activée, a la particularité de phosphoryler à la fois les Thr ET les Tyr !** Ainsi la MAP 2K va phosphoryler les MAP K sur un résidu Thr ET un résidu Tyr. On a donc une manière très spécifique de réguler et contrôler l'activation de ces enzymes, puisqu'on ne connaît que les MAP 2K qui ont cette capacité. De plus, les MAP 2K ne phosphorylent comme substrat QUE les MAP K !! On a donc une belle signature de la voie des MAP Kinases.

Quand on regarde dans la séquence primaire, cette Thr et cette Tyr sont très très proches l'une de l'autre, elles ne sont séparées que par un seul AA. L'identité de cette AA est un peu comme une signature de la famille de la MAP Kinase : **Thr-X-Tyr, avec X :**

- Dans le cas des ERK cet AA sera un Glutamate (Glu)
- Dans le cas des P38 une Glycine (Gly)
- Et pour les JNK une Proline (Pro).

Ainsi, on s'est posé la question de savoir si la spécificité de régulation était dépendant de cette différence d'AA ... Mais pas du tout, c'est simplement une conservation, un changement d'AA entre les deux résidus Thr et Tyr n'a aucun effet, la spécificité demeure. **On parle donc plutôt de signature moléculaire que de signature fonctionnelle.**

3) Comment stopper le signal ?

Par Déphosphorylation !

Ainsi ce sont des Ser/Thr Phosphatases qui vont rendre inactive la MAP 2K. En ce qui concerne la MAP K, phosphorylée à la fois sur une Tyr et une Thr, on va avoir différents types d'enzymes qui peuvent agir.

Ce qu'il faut bien comprendre c'est que **cette MAP K doit être phosphorylée sur SES DEUX résidus pour être réellement activée.** Or son activation est dépendante d'UNE seule enzyme : la MAP 2K, alors que son inactivation peut se faire par différentes enzymes, puisqu'il **suffit de déphosphoryler UN résidu** pour la rendre inactive ! De ce fait, une Ser/Thr Phosphatase peut inactiver la MAP K, de même qu'une Tyr Phosphatase, sans oublier les Phosphatases capables de déphosphoryler les deux types de résidus ! **On a donc un seul mode d'activation et de multiples modes d'interruption du signal.**

Ainsi, l'étape limitante de cette voie est celle des Phosphatases.

À noter que des Phosphatases capables de déphosphoryler à la fois les Tyr et les Thr/Ser, il y en a tout un groupe qui est régulé de façon transcriptionnelle par les MAP Kinases ! C'est-à-dire, qu'à l'état basal, on ne les retrouve pas dans les cellules, mais dès que les MAP Kinases sont activées, elles vont induire la transcription de gènes codant pour ces phosphatases. On va créer une sorte d'effet rentable, puisque ces Phosphatases vont **arriver après** les Ser/Thr Phosphatases et les Tyr Phosphatases pour inactiver les effets plus tardifs des MAP Kinases.

VII. Nos trois voies d'intérêt.

1) Une histoire d'isoformes.

Pour les 3 familles, il y a différentes isoformes.

NB : Il y a deux manières d'avoir des isoformes, soit par épissage alternatif de l'ARN, soit par duplication génique au cours de l'évolution.

Pour les MAP Kinases, ces deux mécanismes sont mis en jeu. Ainsi, on connaît deux gènes pour ERK, quatre gènes pour les p38 et trois gènes pour les JNK. À savoir que pour les JNK il y a deux isoformes exprimées de manière ubiquitaire et une isoforme JNK3 exprimée que dans certains tissus (*système nerveux notamment*). Sachant qu'à l'intérieur de ces différents gènes, il y a un épissage alternatif. Ainsi on a trois gènes pour les JNK mais dix isoformes au total !

Les intérêts pour la cellule, sont tout d'abord des **changements de propriétés**, puisque toutes ces isoformes n'ont pas toutes exactement la même séquence, pas forcément régulées de la même manière, l'expression aussi peut être différente ainsi que leur localisation.

2) Séquences cibles des MAP Kinases.

Une fois activée, une MAP Kinase doit aller phosphoryler ses substrats. Différentes études ont été faites afin de déterminer les séquences cibles de ces kinases, il a donc été clairement démontré en ce qui concerne les ERK notamment que la séquence préférentielle était lorsque la Ser et Thr était suivies par une Proline : **Xaa-Ser-Thr-Pro**. Un facteur supplémentaire de spécificité réside dans le fait qu'une Proline peut être présente deux AA en N-Terminal.

Bien sûr on a des exceptions, mais si on a une protéine qui est phosphorylée par les MAP Kinases on cherche d'abord le site de phosphorylation en se basant sur la séquence primaire cible.

3) Importance de ces voies dans les pathologies.

La voie des MAP Kinase n'est pas seulement intéressante par son importance dans le fonctionnement de notre organisme mais aussi parce que leur dérégulation est impliquée dans différentes **pathologies comme dans les cancers**, avec notamment la voie ERK.

En effet, dans un certain nombre de cancers on retrouve une dérégulation de la voie des MAP Kinases.

Par exemple : RAS (*MAP 4, n'est pas une kinase*), médiateur de la voie ERK est souvent impliqué dans les cancers du pancréas, de l'intestin... ou RAF qui est la MAP 3K de la voie ERK avec notamment une mutation V600E qui est extrêmement importante dans certains cancers.

Par contre il y a très peu de mutations pour la MAP 2K et la MAP K, donc c'est vraiment dans les étapes initiales, les étapes d'amplifications importantes où on aura le plus de mutations avec un réel impact sur la voie de signalisation.

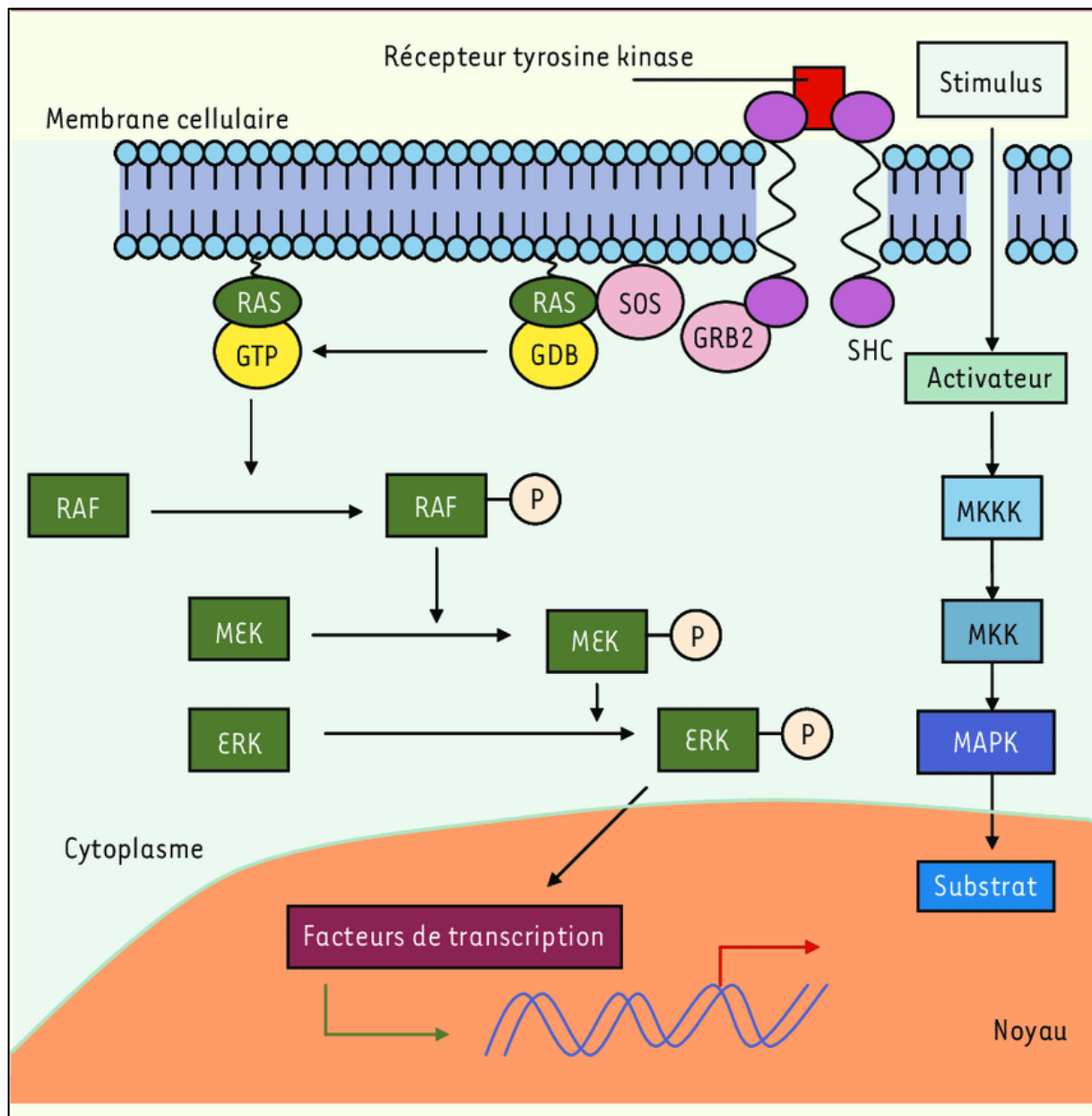


Image tirée du web encore une fois, pas mal pour illustrer la voie de ERK

Pour les **JNK et p38**, bien qu'ayant des effets aussi dans les cancers, on retrouve leur dérégulation dans des pathologies telles que des maladies dites de « **stress chronique** », dans des maladies neurodégénératives, des maladies inflammatoires, ainsi que le diabète, les AVC, les fibroses etc...

Pour les p38 leur impact avait été initialement caractérisé pour leur effet dans la réponse inflammatoire ainsi que dans les maladies neurodégénératives.

VIII. Comment étudier ces voies de signalisation ?

1) Exemples « rapides »

Ici on va se concentrer sur une seule voie principale qui est celle des p38 en générale afin d'expliquer comment peut s'effectuer l'étude d'une voie de signalisation.

Voici donc différents outils par mutation dirigée permettant d'étudier tout ça :

- **Les Dominants Négatifs (DN)** : Interrompre la transmission du signal par interaction d'une molécule inactivable avec son activateur et le substrat. Par exemple, la MAP 2K est activée par phosphorylation sur ses deux résidus Ser, si on remplace ces Ser par des Alanines (Ala), la molécule n'est plus phosphorylable, elle n'est donc plus activable.

On a donc :

- MAP3K l'activateur
- MAP2K mutée : la molécule inactivable
- ATP : Le substrat pour la phosphorylation

Après avoir créé ces espèces de monstres inactivables, on va les introduire dans la souris, dans les cellules. On aura donc à l'intérieur de la cellule la voie de signalisation normale MAIS on trouvera en abondance le mutant qu'on aura introduit. Il va donc d'une certaine manière titrer la MAP 2K endogène et interrompre le signal (Car la MAP2K mutante ne pourra ni activer ni être activée et donc interrompt la transmission du signal). Cela permet notamment de démontrer que cette voie de signalisation est impliquée dans la réponse qu'on étudie. Le même procédé peut se faire sur la MAP K où l'on remplace la Tyr ou Thr par Ala ou une Phénylalanine (Phe) (*une Phe car sa structure est plus similaire à celle d'une Tyr*).

- **Les Dominant Actifs (DA)** : Activation en absence de stimuli. Rappelez-vous, la phosphorylation est une charge négative. Donc si on change une Ser/Thr par du Glutamate (Glu) on introduit une charge négative de façon « basale », c'est comme si la protéine était phosphorylée, on obtient donc des enzymes constitutivement actives, qu'on ne peut pas « inactiver ». C'est une technique qui fonctionne très bien, sauf pour la MAP K, en effet, on a beau remplacer la Tyr ou la Thr par du Glu, l'enzyme ne s'active pas. Donc si on introduit notre nouveau mutant dans la cellule on aura une activation permanente de la voie de signalisation et cela même en présence des phosphatases.

- **Reconstruction d'une voie de signalisation des MAP Kinases :**

Petite histoire pour illustrer ce procédé :

À l'époque ils avaient trouvé une « nouvelle p38 » la question se posait de savoir si c'était vraiment une p38 ?!

On voulait savoir si elle était régulée de la même manière ; activée par P sur la Thr et Tyr par une MAP 2K etc ...

On a donc produit des mutants p38β2 avec le motif classique de phosphorylation des p38 : Thr-Gly-Tyr. Puis on a modifié ponctuellement ces mutants, en remplaçant la Thr en Ala, la Tyr en Phe et un autre mutant avec ces deux modifications. Suite à ça, on a procédé à une transfection de ces mutants dans des cellules, et on a stimulé en présence de ces mutants la voie des MAP Kinases, par rayonnement UV qui est un stress intense pour les cellules et tout cela avec bien sûr un contrôle.

Les cellules contrôles sans rayon UV n'activent pas la voie des MAP Kinases, on n'a pas de transfert de phosphate.

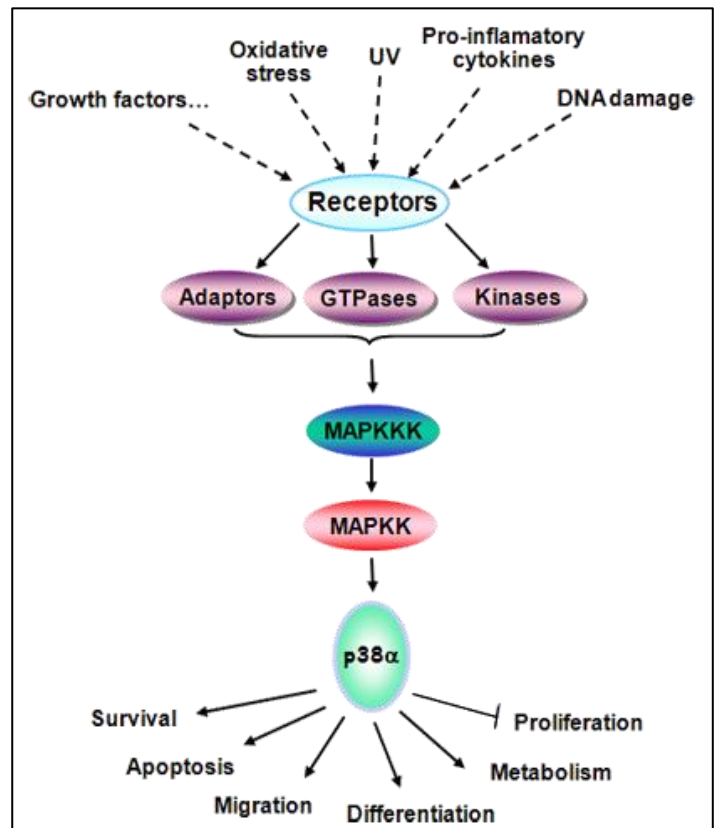
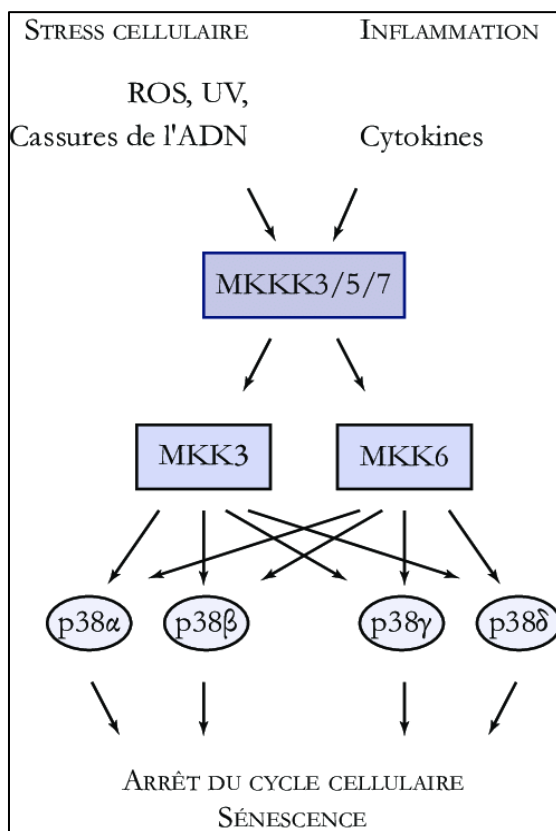
Pour les cellules stimulées par les UV avec la MAP Kinase native (la p38β2 non mutée) on a activation de la voie de signalisation **donc phosphorylation**. Par contre pour aucun des trois mutants Ala-Gly-Tyr, Thr-Gly-Phe ou Ala-Gly-Phe on a eu d'activation de la voie, donc pas de transfert de phosphate.

On a donc différentes informations sur cette nouvelle enzyme : elle semble être **activée** par les rayons UV ; conditions de **stress**, de plus la réponse cellulaire nécessite l'intégrité de la séquence cible de phosphorylation : Thr-Gly-Tyr ; on peut donc supposer que son activation passe par la **phosphorylation de cette séquence**.

La deuxième problématique est de savoir quelle est la MAP 2K responsable de cette phosphorylation ?!

Pour y répondre, on a utilisé une MAP 2K **MKK6 constitutivement active** (DA) où les deux Ser sont remplacées par des Glu. On a donc effectué exactement les mêmes manipulations que citées juste avant, cette fois-ci sans stimulation par rayon UV, mais introduction de cette MAP 2K mutée. Finalement on obtient le même profil de résultats, avec une enzyme P38β2 qui est activée par phosphorylation mais **aucune activation des trois mutants de P38β2** malgré la présence d'une MAP 2K constitutivement active.

En résumé, par des manipulations très simples, qui prennent à peine quelques jours (moins de 15 j), on a bien prouvé que cette p38β2 était activée par phosphorylation sur ses deux résidus Thr et Tyr par une MAP 2K. On a donc en quelque sorte en plus d'avoir découvert une nouvelle p38, reconstitué une voie des MAP Kinases.



Deux pictures d'internet pour illustrer la voie p38... Merci Google images mdr

2) Introduction d'inhibiteurs...

Ces voies sont très importantes, leur dérégulation peut avoir tellement d'impact que l'industrie pharmaceutique a fait des efforts considérables pour produire des inhibiteurs efficaces qu'on puisse utiliser pour traiter les patients.

En ce qui concerne la voie ERK, tout la voie peut être ciblée. Ainsi on peut cibler la première molécule de la voie : RAS (MAP 4 même si ce n'est pas une kinase), on peut aussi cibler son interaction avec la MAP 3K (Pour rappel c'est Raf), en interférent avec cette interaction, sans oublier les inhibiteurs directs de la MAP 3K, MAP 2K ou de la MAP K. Par conséquent toutes ces différentes étapes de la voie de signalisation peuvent être ciblées. On a de cette manière de nombreuses molécules tous les ans qui sont brevetées.

Ainsi en phase clinique on a certaines molécules comme des inhibiteurs de Raf, qui ciblent une mutation de Raf très prépondérante touchant la Valine 600 impliquée dans mélanome qui change les propriétés de Raf et la rend constitutivement active. Bien sûr comme pour tout, on a des inhibiteurs plus ou moins efficaces, avec au cours du temps une **résistance qui se met en place au bout de six, sept mois** avec notamment des modifications des étapes au-dessus de Raf, touchant Ras etc...

De plus, des inhibiteurs de la MAP 2K ont été développés, mais sont assez peu efficaces seuls, du coup des co-traitements ont été mis en place avec à la fois des inhibiteurs de la MAP 2K et de la MAP 3K.

En ce qui concerne la voie JNK c'est plus des maladies neurodégénératives qui ont été ciblées soit en ciblant des étapes très hautes dans la voie soit en ciblant JNK directement (*mais là ce sont des cas assez particuliers avec des inhibiteurs en cas d'ischémie, reperfusion ...*). De plus, d'autres études ont permis de mieux comprendre comment fonctionnait la voie de JNK.

Pour la voie des p38, les inhibiteurs sont développés dans des situations d'inflammation. On a beaucoup d'inhibiteurs dont un qui fonctionnait très bien mais il avait beaucoup trop d'effets indésirables, conduisant à son retrait du marché.

3) Autres illustrations sur comment utiliser les mutants :

a) Expériences sur le foie.

À l'époque le professeur et d'autres personnes furent convoquées par des spécialistes qui s'intéressaient au foie, plus précisément au foie embryonnaire.

Rappel : Il y a une augmentation de la croissance hépatocytaire durant les trois derniers jours de la vie embryonnaire (la masse du foie est alors multipliée par trois !). Puis à la naissance il y a un arrêt de la prolifération et cela reprend progressivement durant la première semaine post-natale. À l'âge adulte, les hépatocytes sont quiescents ainsi, à moins d'un événement particulier, il y en a très peu qui prolifèrent.

NB : la gestation est de 20 jours chez la souris et de 21 jours chez le rat.

Le groupe de chercheurs s'intéressait donc à la croissance hépatocytaire chez le rat et se demandait quel pourrait être l'effet de la voie des MAP Kinases dans ce processus de croissance.

Différents tests ont été fait (comme ceux présentés précédemment, sauf qu'ici on regarde l'enzyme endogène : les ERK, les JNK et les P38).

Les résultats présentés par le prof sont celles des p38 :

Les manipulations furent très simples.

Ils ont prélevé des foies et testé l'activité des MAP Kinases, en évaluant le transfert de phosphate marqué sur le substrat (*méthode qui marchait le mieux pour eux et qui été la plus sensible*) sur des prélèvements réalisés à :

- 17 j de gestation
- 19 j de gestation
- La naissance
- La première semaine de vie
- Un mois
- L'âge adulte

Ils ont ainsi observé une corrélation assez intéressante : **Une augmentation de l'activité de P38 lorsqu'il n'y avait plus de prolifération.**

En effet, à J17 et J19 de gestation on a une forte prolifération mais une moindre activité de la voie P38, or le jour de la naissance on a un arrêt de la prolifération avec un pic d'activité de P38, puis lorsque la prolifération reprend l'activité de P38 diminue à nouveau et finit par ré-augmenter chez l'adulte une fois que la prolifération devient moindre.

Ils ont voulu prouver que cette corrélation était vraie.

Les hépatocytes sont des cellules particulières et intéressantes, puisque quand on les prélève ils sont très prolifératifs chez le foie embryonnaire et gardent cette propriété une fois mis en culture. Ainsi, ils ont prélevé à J19 de gestation des hépatocytes (forte prolifération, faible activité p38).

NB : on a des moyens de marquer en culture des hépatocytes en prolifération, leurs noyaux apparaissent rouges

Puis ils ont introduit dans ces cellules différentes molécules.

- Des **DN** avec qui il n'y a pas d'activité p38, donc utilisé ici comme marqueur et comme contrôle → les hépatocytes demeurent prolifératifs.
- Les **mutant de MKK6** de la MAP 2K constitutivement active de la voie P38 → les hépatocytes arrêtent alors de proliférer.

Par ces manipulations ils ont bien démontré l'absence de prolifération des hépatocytes lorsque la voie P38 est activée.

Puis les mêmes expériences ont été faites, avec cette fois-ci des cellules pré-incubées avec des **inhibiteurs de p38**. Par conséquent la prolifération a lieu cette fois ci car la p38 est inhibée !

Les expériences ayant été concluantes, ils ont décidé de publier leur découverte, cependant les éditeurs n'étaient pas aussi enthousiastes qu'eux car ils ont pointé du doigt l'absence de preuves in vivo.

Les collaborateurs du professeur ont alors **extériorisé à J20 de la gestation des embryons**, puis ils ont injecté :

- Une solution saline (contrôle)
- Des inhibiteurs de la voie p38.

Puis... ils ont ré-intériorisé les embryons. Ensuite, à la naissance ils ont sacrifié ces embryons et ont fait des **coupes de foie**, ont utilisé des **marqueurs de prolifération** qui ont permis de mettre en évidence **l'absence de prolifération dans les foies ayant reçu la solution saline**, puisqu'à la naissance on ne doit pas avoir de prolifération, alors que ceux ayant **reçu les inhibiteurs de la voie p38 ont des hépatocytes qui prolifèrent**. De ce fait ils ont bien montré la corrélation entre prolifération et moindre activité de p38 dans les hépatocytes in vivo.

b) Expériences sur le thymus.

Une autre expérience nous a été présentée :

Cette fois-ci on part de souris mutantes transgéniques, sur lesquelles les chercheurs ont utilisé MKK6, la forme constitutivement active de la MAP 2K de la voie p38. Leur but était de connaître l'effet de cette voie sur le **développement du thymus** lors de la maturation des lymphocytes. Ils ont ainsi créé des souris exprimant **MKK6 mutée uniquement dans le thymus**.

Rappel: Dans le thymus s'effectue la maturation des lymphocytes T (LT). C'est à la fois une succession d'étape de prolifération, de différenciation et de sélection par apoptose qui aboutit à principalement deux types cellulaires : les cellules CD4 et les CD8 matures, qui quittent ensuite le thymus pour les organes périphériques qui sont la rate et les ganglions lymphatiques.

Au début, pas de réels effets, avec une activation constitutive de la voie p38. Puis au bout de cinq, six mois les souris ont commencé à mourir. Après dissection les chercheurs ont observé une **augmentation par dix de la taille du thymus** sans que cela soit un cancer avec en parallèle une atrophie des ganglions et de la rate.

Toute une série d'études a été faite, notamment avec le DN ainsi qu'avec les inhibiteurs pharmacologiques.

Ils ont pu démontré qu'à un moment très tôt dans la maturation des LT, il y a une étape de la **prolifération cellulaire**, du cycle cellulaire qui **nécessite que l'activité de la p38 soit basse** de façon très similaire à ce qu'on a vu dans le foie en fait ! Ainsi en activant de façon constitutive la voie p38 on bloque cette étape, les cellules se retrouvent bloquées au stade de métaphase, on a donc une accumulation de cellules qui entraîne une augmentation du volume du thymus qui finit par écraser la trachée et entraîner la mort des souris

On est donc, par deux approches différentes dans deux tissus différents, arrivé à la même conclusion : **La voie P38 est ANTI-proliférative !**

IX. Intéressons-nous aux kinases !

1) Quel est le site d'interaction des kinases ?

Intuitivement on pense que la kinase interagit avec son substrat par son site catalytique...Or l'interaction par le site catalytique est extrêmement faible, très labile ! Ainsi pour stabiliser les interactions de la kinase avec son substrat il existe d'autres interactions dans d'autres endroits de la protéine kinase. On appelle cela **des sites d'ancrage** et parfois ces interactions qui sont indépendantes du site catalytique peuvent être mutuellement exclusifs.

En effet, dans le cas des MAP Kinases on a cette cascade de signalisation et on s'est demandé si ce mode de régulation qui est tant important doit d'une certaine manière être conservé chez les MAP 2K. Pourquoi cet intérêt pour les MAP 2K, tout simplement parce qu'il y en a peu et qu'elles sont très spécifiques.

Ils ont procédé à un alignement des séquences des sept MAP 2K des différentes familles, et ils ont observé une séquence qui revenait généralement dans la partie N-Terminale qu'on peut modéliser comme étant : deux AA chargés positivement suivis de deux acides AA puis d'un triplet Leu-Ile-X. Ils se sont ensuite aperçus que cette séquence chez les MAP 2K était responsable de son interaction avec son substrat qui est la MAP K. Puis ils se sont demandé si les autres molécules qui interagissent avec les MAP K ont des séquences similaires. Ils ont en effet découvert des séquences très proches dans les différents substrats et également chez les Phosphatases. Cela suggère donc que **le domaine d'interaction sur les MAP K devait être commun**. Ce qui permettait donc de composer toute une série de régulations additionnelles, c'est-à-dire qu'en fonction de la stœchiométrie, de la force de l'interaction et de l'expression on pouvait avoir des régulations tout à fait différentes, dans différents tissus en réponses à différents stimuli etc...

Ils ont donc trouvé un domaine principalement chez les différentes MAP K qui leur permettait d'interagir. Bien sûr ces domaines sont très conservés mais on garde quand même une grande spécificité avec tous les AAs autour : en gros, **le domaine de reconnaissance c'est ce qui est conservé et tout ce qui est autour détermine la spécificité**.

Une autre petite histoire :

À l'époque, après avoir réalisé toutes ces études, un homme aux USA, complètement fou envoyait des enveloppes avec de l'anthrax à certaines personnes. Évidemment ces gens n'étaient pas en bonne santé après. Une enquête a été menée pour arrêter le coupable. Lors de ce fait divers, les autorités ont débloqué beaucoup d'argent pour financer les recherches sur l'anthrax. Ainsi ils ont découvert que l'anthrax possède parmi ses nombreuses protéines une protéase qui se nomme Facteur Léthal (FL) qui clive un certain nombre de protéines essentielles comme les MAP 2K ! En effet le site de reconnaissance du FL est en plein milieu du site de liaison des MAP 2K. Lorsque ce FL clive la MAP 2K elles ne reconnaissent plus les MAP K il y a donc blocage de la voie des MAP Kinases. Ainsi beaucoup des effets de l'anthrax passent par là.

2) Une vraie question : Où est la spécificité ??

Prenons des neurones, des hépatocytes ou des fibroblastes, le même stimuli activera la voie des MAP Kinases mais la réponse cellulaire ne sera pas forcément la même. Ainsi, quels sont les mécanismes responsables de la réponse cellulaire spécifique ?

Dans le cas de la voie ERK on sait qu'il y a plus de deux cents substrats et cinq cents cibles phosphorylées.

Ainsi on considère que les différents déterminants de cette spécificité sont :

- La durée et l'intensité du signal
- L'interaction avec les protéines d'échafaudages spécifiques
- L'interaction fonctionnelle avec d'autres voies de signalisation
- Les intervenant aux différentes étapes de la voie
- Les changements de localisation cellulaire

Petit exemple : il y a un modèle très utilisé depuis un certain temps pour mettre en évidence l'influence de la durée et l'intensité du signal qui est celui des cellules PC12 qui sont des phéochromocytomes de rats. Ces cellules sont spéciales puisqu'elles se différencient un peu comme des neurones, elles ont certaines propriétés similaires aux neurones puisqu'elles peuvent sécréter certains neurotransmetteurs par exemple... Et cette **différenciation n'a lieu que dans certaines conditions**. Ainsi si ces cellules sont mises en culture avec un facteur tel que l'EGF (facteur de croissance épithélial) les cellules prolifèrent facilement. Par contre si on enlève le sérum et l'EGF et qu'on les stimule avec du NGF (facteur de croissance des neurones), les cellules arrêtent de proliférer et commencent à se différencier en adoptant un phénotype neuronal.

Mais où réside cette différence de réponse ? Ces deux molécules sont des facteurs de croissance mais **l'une induit la prolifération l'autre la différenciation, PoUrQuOi ??**

En fait, une partie de ces effets est médiée par la différence sur la voie ERK. **L'EGF** a un effet activateur très rapide de la voie ERK mais **transitoire**, elle n'est pas stable. Alors que le **NGF** active la voie ERK de manière plus **lente et beaucoup plus stable**. Ce n'est pas la seule différence, puisqu'on a aussi une régulation différente de certaines phosphatases.

a) L'interaction avec les protéines d'échafaudages spécifiques

Qu'est-ce qu'une protéine d'échafaudage ?

C'est un peu différent des sites d'ancrage dont on a parlé tout à l'heure.

Ce sont des protéines qui organisent des complexes dans les voies de signalisation, c'est très utile pour les MAP Kinases puisque cela permet une **sélectivité entre les différents partenaires de la cascade** : ça permet de choisir quelle MAP 3K, quelle MAP 2K et quelle MAP K sera mise en jeu. De plus ça **stabilise** les partenaires. On note aussi un effet catalytique, ce qui permet **d'améliorer la signalétique** au sein de la voie et ça joue sur la **localisation** des membres de la cascade. Sans oublier bien sûr leur effet **protecteur contre les phosphatases !**

Pourquoi se poser cette question sur les MAP Kinases ?

Et bien parce qu'elles appartiennent à des voies très conservées au cours de l'évolution et parce qu'elles ont beaucoup été étudiées chez la levure.

On savait très bien que chez la levure il existe différents types de MAP Kinases mais elles ont aussi ces fameuses molécules d'échafaudage qui vont permettre l'association de différents membres de module.

Par exemple en réponse à des phéromones on va avoir un certain type de module qui va être mis en place qui va induire la prolifération ; on va donc avoir une MAP 3K qui va interagir avec une MAP 2K ainsi de suite... Puis dans le cas d'un **changement d'osmolarité** pour la synthèse de glycérol, cette **même MAP 3K peut interagir avec une protéine d'échafaudage et une autre MAP 2K.**

On a donc cherché chez les mammifères les mêmes protéines d'échafaudage... et on les a trouvées !

En gros l'idée c'est **qu'on va avoir une enzyme commune mais grâce aux protéines d'échafaudage on va obtenir des réponses cellulaires différentes puisqu'on va sélectionner différents membres de la voie.**

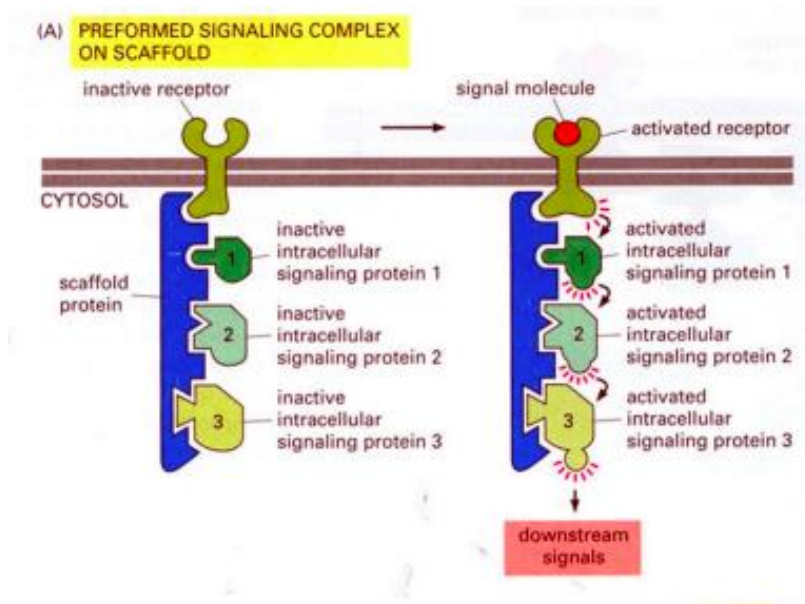


Image expliquant les protéines d'échafaudage : Elles rassemblent les protéines de la cascade pour qu'elles soient proches les unes des autres et ainsi augmenter la rapidité du signal. De plus, elles peuvent rassembler différents types de protéines et ainsi générer une réponse intracellulaire différente selon la protéine d'échafaudage utilisée. (scaffold protein = protéine d'échafaudage)

Les protéines d'échafaudage initialement découvertes intervenaient dans la voie de JNK. On a retrouvé toutes les mêmes combinaisons possibles que chez la levure c'est-à-dire des modules qui étaient différents soit au niveau de la MAP 3K ou de la MAP 2K etc...

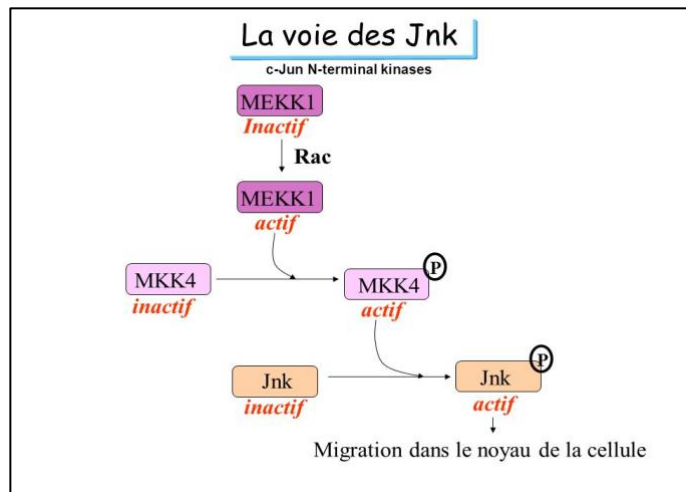


Image Google pour comprendre brièvement la voie de JNK... ça peut être utile je pense :3

b) Petit mot sur les Récepteurs couplés à la protéine G :

Il existe des régulateurs de ces récepteurs qui s'appellent les β -arrestin qui sont recrutés à la membrane et régulent ces récepteurs or il se trouve que ces protéines sont également des protéines d'échafaudage. Elles permettent ainsi de réunir certains membres de la voie des MAP Kinases, ici JNK3 avec une MAP 2K qui s'appelle MKK4 et une MAP 3K et cela dans le but de mobiliser ce module au niveau du secteur du récepteur couplé à la protéine G. On retrouve également des protéines d'échafaudage dans la voie ERK etc...

Les β arrestin, protéines d'échafaudage de la voie JNK, qui interagissent avec ce module à la membrane, **permettent par leur action de localiser des MAP Kinases au niveau de récepteurs couplés à des protéines G**. On a découvert qu'il existait **deux isoformes de β arrestin** :

- Une β arrestin 1, localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau
- Une β arrestin 2 qui se trouve à l'état basale exclusivement dans le cytoplasme.

On s'est rendu compte que la différence entre ces deux β arrestin étaient l'existence d'un doublé de Leucines (Leu) dans β arrestin 2 qui n'existait pas dans β arrestin 1. Or ces **doublets Leu peuvent jouer le rôle d'export nucléaire**. Ainsi si l'on mute une des Leu, on retrouve β arrestin 2 dans le noyau.

De ce fait, comme les β arrestin jouent le rôle de protéines d'échafaudage dans la voie JNK et que JNK quand il est activé est importé dans le noyau on s'est demandé ce que ferait un mutant de β arrestin 2.

Ainsi pour des cellules exprimant **β arrestin 2 normale** on retrouve JNK3 dans le **cytoplasme**. Mais en présence d'une **β arrestin 2 mutée** qui ne joue plus son rôle d'export du noyau, JNK demeure dans le **noyau**.

Par conséquent, **non seulement β arrestin est une protéine d'échafaudage au niveau de la membrane mais elle permet également lorsqu'elle entre et ressort du noyau, d'exporter certains de ses partenaires comme JNK3**.

c) Spécificité de la régulation de la localisation :

Ce qu'il faut savoir, c'est qu'on a soit une diffusion passive en dessous d'un certain poids moléculaire vers le noyau, soit des mécanismes permettent d'importer et d'exporter les protéines du noyau.

Dans le cas de l'import ce sont les importines qui sont mises en jeu. En effet ces importines vont reconnaître des signaux qui s'appellent des signaux de localisation nucléaire de différents types localisés sur certaines protéines. Donc lorsque ces signaux sont exposés, les importines vont les reconnaître et prendre en charge la protéine afin de la faire passer à travers les pores nucléaires vers le noyau.

À l'inverse, il existe les exportines qui elles reconnaissent les séquences d'export nucléaire qui vont permettre de faire passer les protéines à travers les pores nucléaires pour les faire sortir du noyau.

À l'époque, des chercheurs s'étaient intéressés à un mécanisme similaire en ce qui concerne la localisation des MAP Kinases. Et en effet, une fois activée, la MAP Kinase se rend dans le noyau. Or on sait maintenant, notamment pour la voie ERK qu'il existe des résidus : Ser-Pro-Ser qui lorsque ces deux Ser sont phosphorylées, sachant qu'elles sont indépendantes de la Thr et de la Tyr de la séquence cible de ERK, sont perçues comme le signal d'importation vers le noyau ! L'exportation se fait quand ces deux Ser sont déphosphorylées.

Ainsi la régulation de la localisation passe aussi par la phosphorylation.

Fiche récapitulative : Les voies de signalisation des MAP kinases : Méthodes d'étude, physiologie et implications physiopathologiques.

La phosphorylation

- Régulateur majeur des signaux cellulaires
- Modification covalente post-traductionnelle et réversible de 7kDa (visible en spectrométrie de masse)
 - o Donneur = ATP
 - o Accepteur = OH
 - o Nécessite du Mg²⁺ ou Mn²⁺ pour les tyrosines kinases
- Sur des résidus de serine, thréonine ou tyrosine
 - o Beaucoup plus souvent sur les Ser/Thr (99%)
 - o 518 Ser/Thr/Tyr kinases en tout avec 113 Tyrosine kinases, ainsi la phosphorylation d'une tyrosine est beaucoup plus spécifique
- Réversible par la déphosphorylation
- Étudier grâce à
 - o **Radiomarquage** au ³²P incorporé dans l'ATP en position gamma et transféré aux protéines cibles. L'ajout de phosphate induit un retard sur gel acr ajoute une charge négative.
 - Problème de la radioactivité
 - o **Anticorps** : extrêmement spécifiques, faciles d'emploi et permettent de calculer la stœchiométrie. Possibilité de faire de l'immunocytochimie ou immunofluorescence
 - Problème : besoin d'élaborer les anticorps
 - Reste tout de même la meilleure méthode
 - o **Hydrolyse légère et séparation par électrophorèse** : hydrolyse ménagée pour distinguer quel résidu est phosphorylé, à chaque résidu correspond un pH de séparation.
- Effets sur la **régulation** de : l'activité biologique, de la stabilité des protéines, du mouvement et de la localisation cellulaires des protéines, des interactions protéiques, des changements de conformation, de la charge ou du volume.
- **Les cascades** : Signal extracellulaire induit une 1^{ère} kinase qui phosphoryle une 2^{ème} qui elle-même phosphoryle une 3^{ème} qui peut aller dans le noyau pour réguler la transcription
 - o Permet une diversification et une amplification du signal cellulaire

Les MAP Kinases, cascades de phosphorylation et régulation de l'activité cellulaire

- Voies principales nommées selon le nom de la MAP kinase correspondante
 - o **ERK** : régulée par les mitogènes, hormones, potentiels d'action, neurotransmetteurs
 - o **JNK** : régulée par le stress cellulaire, les cytokines, les endotoxines
 - o **P38** : régulée par le stress cellulaire, les cytokines, les endotoxines
 - Voie **antiproliférative** comme montré dans les exemples du foie de souris en début de vie et du thymus où la prolifération cellulaire requiert une concentration **basale basse de p38**.
- Les MAP kinases sont activées à la fin de la cascade après activation séquentielle des MAPKKK et MAPKK
- Les MAPKKs phosphorylent la MAP Kinase sur une Thr ET une Tyr : **seules ces enzymes** peuvent réaliser ce genre de phosphorylation et seulement sur les MAPK
- Stopper le signal
 - o Par déphosphorylation
 - o Sur la MAPKK seulement besoin de déphosphoryler seulement UN résidu pour arrêter l'activité → peut donc être inactivée par un grand nombre de phosphatases
 - o Dès l'induction des MAPK elles induisent la transcription de leurs phosphatases pour inactiver leurs effets tardifs

Étudier les voies de signalisation

- **En culture**
 - Le DN : Interrompre la transmission du signal par interaction d'une molécule inactivable (mutée) avec son activateur et le substrat
 - Le DA : Activation en absence de stimuli, exemple de la MKK6 constitutivement active
- **Inhibiteurs pharmacologiques** : exemple de l'inhibiteur de p38 utilisé pour induire la prolifération des hépatocytes in vitro puis in vivo
- **Génétique en utilisant des souris transgéniques** comme dans l'expérience du thymus avec expression du DA MKK6 qui induit une augmentation du volume du thymus et la mort des souris par compression de la trachée

Site d'interaction des kinases

- **Sites d'ancrage**
 - L'interaction avec le substrat ne se fait **pas sur son site catalytique**
 - Pour stabiliser l'interaction kinases/substrat, il existe d'autres interactions entre les deux grâce au **site d'ancrage**
 - Domaine d'interaction commun dans le **domaine N-terminal** (pour les MAPKK) responsable de l'interaction avec le substrat (la MAPK) et aussi avec les phosphatases
 - Si clivage de ce site d'ancrage : pas de liaison possible avec le substrat → pas d'activité catalytique (ex : anthrax et site de clivage du facteur létal)

Mécanismes de spécificité

- **Durée et intensité du signal**
 - Exemple avec les cellules de phéochromocytome qui répondent différemment au
 - EGF effet rapide, instable/transitoire → prolifération
 - NGF action lente, très stable → différenciation
- **Scaffold ou protéines d'échafaudage**
 - Protéines qui organisent les complexes des voies de signalisation pour permettre le choix des partenaires, leur localisation, leur stabilisation, la protection contre les phosphatases et l'amélioration de la signalétique (signal plus rapide si protéines proches dans l'espace)
 - Sélection des membres par ces protéines permet la diversité de la réponse à un signal extracellulaire
 - β arrestin, protéines d'échafaudage pour JNK3 avec MAP2K et MAP3K, permet la localisation des MAP kinases au niveau des récepteurs couplé aux protéines G
 - Une β arrestin 1, localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau
 - Une β arrestin 2 qui se trouve à l'état basale exclusivement dans le cytoplasme, rôle dans l'export en dehors du noyau
 - β arrestin en tant que protéine d'échafaudage, permet, lorsqu'elle ressort du noyau, d'exporter certains de ses partenaires comme JNK3.
- **Régulation de la localisation cellulaire**
 - Dans le noyau : passif avec diffusion en dessous d'un certain poids moléculaire
 - Pour l'import : importines reconnaissent les signaux NLS, quand exposés, passent dans le noyau
 - Export : les exportines font passer les protéines du noyau au
 - Dans la voie ERK, séquence Ser-Pro-Ser sur la MAPK ERK :
 - Si les serines sont phosphorylées ERK est importé dans le noyau.
 - Si les serines sont déphosphorylées : exportation dans le cytoplasme → la phosphorylation induit une régulation de la localisation subcellulaire