

UE11 –Biologie cellulaire– Signalisation cellulaire - n° 7 03/04/2019 Jérôme Bertherat jerome.bertherat@cch.aphp.fr	RT : Léna Glasberg RL : Jean Baptiste Louis
---	--

## **Voie de signalisation de l'AMPC de la membrane cellulaire au noyau et régulation de la transcription par l'AMPc**

### **I. Présentation générale de la voie de signalisation de l'AMPC**

### **II. La protéine kinase A (PKA)**

- A) Structure de la PKA
- B) Activation de la PKA
- C) Exemples de pathologies et démarches expérimentales
  - i) Adénomes surrenaliens : SU catalytique
  - ii) Complexe de Carney : SU régulatrice

### **III. Présentation de CRE, CREB et cinétique de la réponse**

- A) Découverte du CRE
- B) Découverte de CREB
- C) Démonstration de l'action de la PKA sur CREB
- D) Cinétique des réponses

### **IV. Le CRE et les gènes ayant un CRE**

### **V. La famille des facteurs de transcription liant le CRE et leurs structures moléculaires**

### **VI. Liaison de CREB à l'ADN**

### **VII. CREB Binding Protein (CBP)**

Abréviations :

- AC : Adényl Cyclase
- cAMP : cyclic adenosine monophosphate
- PDE: phosphodiesterases
  
- PKA: Protéine Kinase A
  
- SU: sous-unité
- KO: Knock Out
  
- AKAP: A-Kinase Anchoring Protein
  
- CAT : chloramphenicol Acetyl Transferase
  
- FK : Forskoline
  
- CREB : cAMP Response Element Binding-protein
- pCREB : CREB phosphorylé
  
- CRE : cAMP Response Element
  
- ICER : inducible cyclic AMP (cAMP) early repressor
- CREM : cAMP Responsive Element Modulator
  
- ATF-1 : AMPc Dependent Transcription Factor
  
- CBP : CREB Binding Protein
  
- b-ZIP domain : Basic Leucine Zipper domain
  
- KID : Kinase Inductible Domain

## I : Présentation générale de la voie de signalisation de l'AMPC

La voie de signalisation de l'AMPC est une voie majeure dans la physiologie des glandes endocrines et dans la physiopathologie des tumeurs endocrines, en particulier la tumeur surrénalienne. De plus, c'est une voie **ubiquitaire**.

L'AMPC fait partie des premiers seconds messagers qui ont été bien décrits. Il a été décrit par Sutherland qui en a obtenu le prix nobel (1971).

Exemple de la cellule somatotrope (cellule hypophysaire synthétisant l'hormone de croissance) :

Au niveau des cellules somatotropes, la synthèse **de l'hormone de croissance (GH)** est contrôlée via la voie de signalisation de l'AMPC en amont par des peptides : **GHRH** qui **stimule** cette voie tandis que la **somatostatine l'inhibe**.

Ces peptides viennent des neurones **hypothalamiques** et sont libérés dans le système sanguin au niveau de l'antéhypophyse. Ils se lient aux récepteurs couplés à une protéine G (récepteurs à 7 domaines transmembranaires). La protéine G peut être soit une protéine **Gs**, (stimulatrice), c'est le cas pour le récepteur au GHRH, soit une protéine **Gi** (inhibiteur) pour le récepteur à la somatostatine :

- La liaison de **GHRH** à la sous-unité **alpha « s »** de son récepteur active la protéine **Gs**, actionnant alors l'**adényl cyclase (AC)** qui transforme l'**ATP en AMPC**. L'AMPC, second messager, va stimuler la synthèse et l'expression de GH.

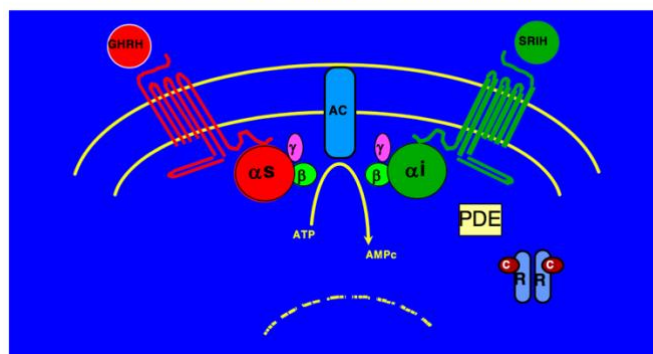
- A l'inverse, quand la **somatostatine** se lie à la **sous-unité alpha « i »** de son récepteur, c'est la protéine **Gi** qui s'active pour inhiber l'adényl cyclase, et donc la formation d'AMPC intracellulaire. La synthèse et l'expression de GH est alors inhibée.

Rappel : les protéines G sont des hétérotrimères avec une **sous-unité alpha** qui porte la **spécificité** en terme de signalisation et une sous-unité bêta-gamma beaucoup plus ubiquitaire.

Les **PDE** (11 familles, 50 protéines avec les isoformes) situées à proximité sont capables de **fixer l'AMPC** grâce à leur domaine GAFa/GAFb et de le **dégrader**, permettant ainsi la régulation du taux intracellulaire d'AMPC. (des taux trop élevés d'AMPC sont potentiellement toxiques pour la cellule).

L'AMPC a pour principale cible la **PKA** mais aussi EPAC (dans le cours on se focalisera uniquement sur la PKA).

1- Voie de signalisation de l' AMPC: exemple de la cellule somatotrope



## II. La protéine kinase A (PKA)

Découverte en première, la PKA est la principale cible de l'AMPC, bien que ce ne soit pas la seule. Lorsque le taux intracellulaire d'AMPC augmente, l'AMPC va lier la PKA.

### A. Structure de la PKA

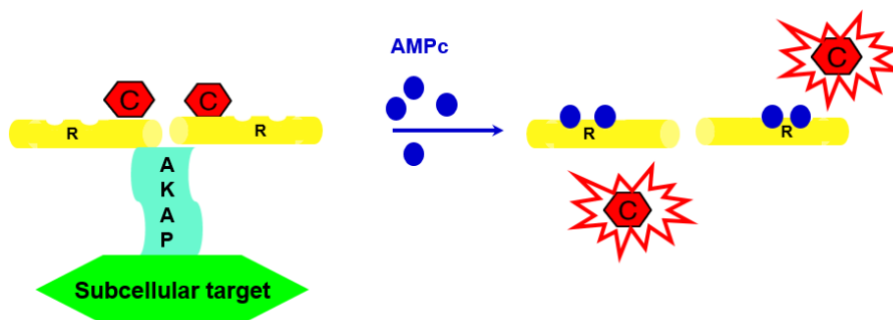
La PKA est un **hétérotétramère** composé de **2 sous-unités régulatrices (R)** chacune liée à **une sous-unité catalytique (C)** en situation de repos. Pour chaque sous-unité il y a des gènes différents possibles :

- sous-unités **régulatrices** : 4 gènes R1A (la plus ubiquitaire), R1B, R2A, R2B. On retient que **R1A** est la seule sous-unité qui ne peut pas être compensée : son inactivation est **létale** chez les souris KO. De plus, R1A est la seule sous-unité sur laquelle on a décrit des mutations.
- sous-unités **catalytiques** : 3 gènes C $\alpha$  (la seule ubiquitaire), C $\beta$ , C $\gamma$ . C $\alpha$  est la seule sous-unité sur laquelle on a décrit des mutations somatiques. Pour former la PKA, plusieurs combinaisons de SU sont possibles, mais elles comprennent toutes **R1A**.

## B. Activation de la PKA

La PKA est distribuée dans toute la cellule, en dehors du noyau. En situation de **repos**, sa localisation subcellulaire (face interne de la membrane plasmique, mitochondrie, face externe du noyau) est permise par les **protéines d'ancrage AKAP** (A-kinase anchor proteins) qui se fixent à la partie régulatrice de la PKA. Les 2 sous-unités régulatrices lient chacune une sous-unité catalytique.

Lorsque le taux d'AMPc intracellulaire augmente, 2 molécules d'AMPc viennent se fixer sur chaque sous-unité **régulatrice** de la PKA. Cette liaison entraîne une modification de la conformation de la PKA qui conduit à la **dissociation des sous-unités catalytiques**. La **SU catalytique libre** (étoile rouge sur le schéma) **est la forme active de l'enzyme**, elle va pouvoir diffuser, entrer dans le noyau et phosphoryler les substrats de la PKA sur des résidus **sérine** ou **thrénine**.



En absence d'AMPc, on ne retrouve pas de SU catalytiques dans le noyau.

## C. Exemple de pathologies et démarches expérimentales

### i. Adénomes surrenaliens : SU catalytique

Exemple de l'adénome surrenalien sécrétant :

La mutation Leu206Arg de la SU catalytique perturbe son interaction avec la SU régulatrice, la SU catalytique libre active la cascade de signalisation (activation de la PKA) **indépendamment du complexe SU régulatrice/AMPc**. On dérégule ainsi l'action enzymatique, ce qui aboutit à la formation d'une tumeur endocrine bénigne : l'adénome de la surrenale synthétisant du cortisol.

Démarches expérimentales :

Par une approche de séquençage d'exome, on compare l'ADN tumoral collecté à partir de plusieurs tumeurs ayant le même phénotype avec l'ADN leucocytaire qui constitue notre séquence de référence.

**On regarde ensuite les variants uniquement présents dans la tumeur** : ce sont des mutations acquises au cours du développement tumoral donc qui jouent potentiellement un rôle dans le développement de la tumeur.

On a ainsi mis en évidence la mutation d'un nucléotide dans le gène codant la **sous-unité catalytique** de la PKA, uniquement présente dans l'ADN tumoral. Cette mutation touche un hotspot **Leu206Arg**, elle induit une **diminution d'interaction** entre les sous-unités catalytiques et régulatrices : la sous-unité catalytique ayant plus de mal à interagir avec la SU régulatrice, se trouve plus facilement libérable, ce qui active de manière **autonome** la réponse de la PKA.

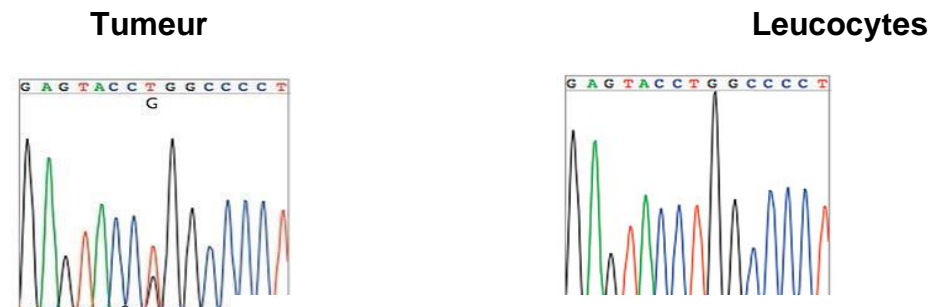
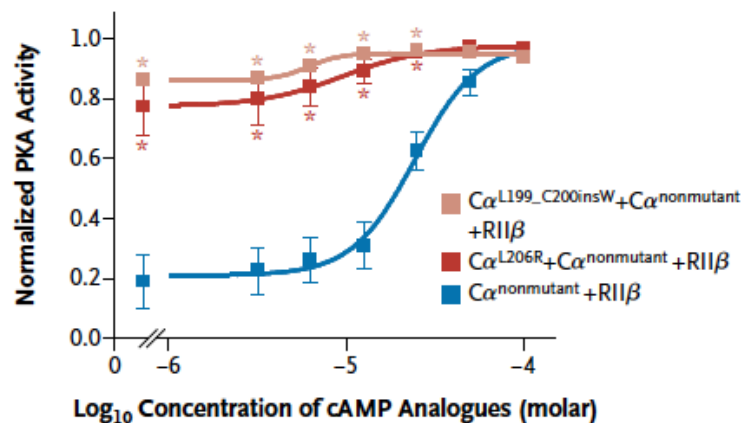
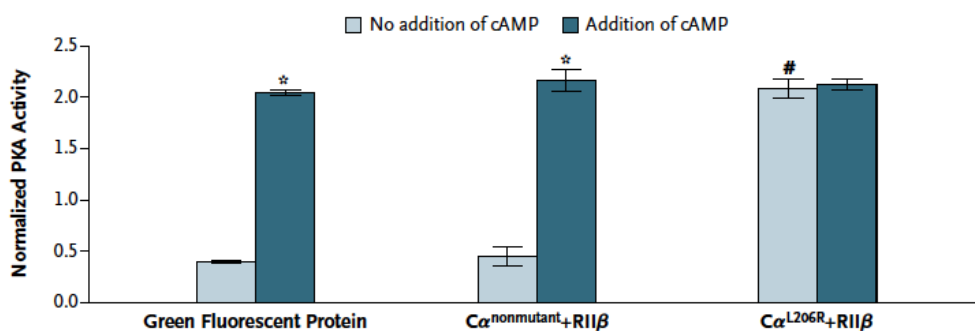


Figure 1 :



On mesure l'activité de la PKA en fonction de la quantité d'AMPc. Pour la SU catalytique sauvage *Cα non mutant*, plus on ajoute de l'AMPc, plus on active la PKA. Quant à la SU *CαL206R* (hot spot), l'activité enzymatique PKA est initialement très élevée, avec ou sans AMPc. (ce qui démontre l'activité constitutive).

Figure 2 :



On mesure l'activité de la PKA globale avant et après ajout d'AMPc sur des cellules non transfectées, des cellules transfectées avec  $\alpha$  *non mutant* de la PKA sauvage et la sous-unité régulatrice R2B, et des cellules transfectées avec  $\alpha$ L206R et la SU régulatrice R2B. Dans le dernier cas, on a d'emblée une activité enzymatique maximale avant l'ajout d'AMPc.

**Bilan** : Avec la mutation, il y a donc une **activation constitutive de la sous-unité catalytique par perte d'interaction avec la sous-unité régulatrice**, aboutissant à des adénomes surrénaliens.

## ii. Le complexe de Carney : SU régulatrice

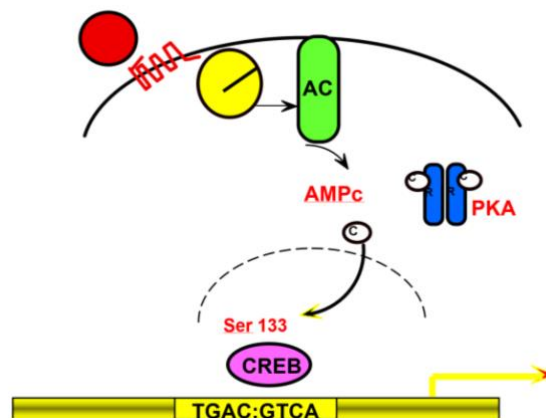
Le gène responsable du complexe de Carney a été identifié en 2000, il s'agit d'une mutation germinale **inactivatrice de la sous-unité régulatrice R1A** de la PKA. L'expression de cette SU régulatrice est réprimée voire disparaît complètement dans les tumeurs des patients. Comme **R1A** a un rôle inhibiteur dans l'activité de la PKA en se liant à la sous-unité catalytique, son inhibition conduit alors à une **activation de la PKA**.

NB : Dans le cas de la tumeur surrénalienne, on voit une production excessive de cortisol due à l'hyperactivation de la PKA.

En touchant la PKA, cette maladie impacte une voie de signalisation cellulaire ubiquitaire, c'est pourquoi les **manifestations cliniques** sont **nombreuses** : tumeurs endocrines sécrétantes, notamment cortico-surrénales (car la voie de signalisation de l'AMPc est une voie majeure dans la physiologie des glandes endocrines), myxomes cardiaque ou cutanés, tâches pigmentées... etc.

## III. Présentation de CRE, CREB et cinétique de la réponse

La **fixation de l'AMPc** sur les sous-unités régulatrices de la PKA libère la **sous-unité catalytique** de la PKA. Elle va pouvoir rentrer dans le noyau et **phosphoryler** des facteurs de transcription, notamment le facteur **CREB**. CREB phosphorylé sur sa sérine en position 133, lie sur le promoteur de la somatostatine, l'élément de réponse **CRE**, constitué d'un palindrome de 8 pb TGAC/GTCA, et interagit avec **CBP** (via des résidus spécifiques du KID domaine). CBP étant lié à la **machinerie de transcription**, cela stimule ainsi l'expression de la somatostatine.

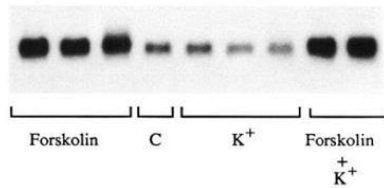


Les paragraphes suivants correspondent aux procédés par lesquels le mécanisme a été découvert.

### A. Découverte du CRE

Le Pr Montminy voulait étudier la régulation de l'expression de la somatostatine.

Expérience 1 :



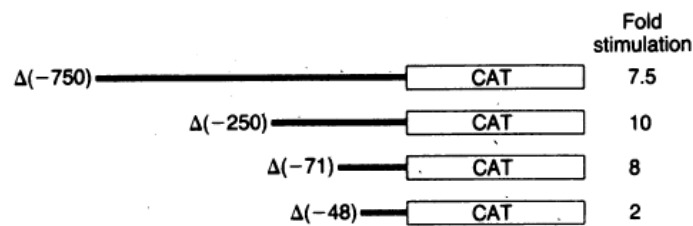
Lorsque l'on traite des neurones qui ont la capacité de synthétiser de la somatostatine en culture avec de la FK = forskoline (activateur de l'adénylate cyclase), **on augmente le taux d'ARNm** de somatostatine. Si on rajoute du K<sup>+</sup> qui stimule la **sécrétion** de somatostatine par ces neurones (et non l'expression), on n'a pas d'augmentation d'ARNm : l'effet de la FK est spécifique sur la somatostatine.

**Bilan 1 : une activation de la voie de signalisation de l'AMPC par FK augmente le taux d'ARNm de somatostatine et donc l'expression de la somatostatine.**

Il fait l'hypothèse d'une stimulation de la transcription (cela pourrait être une non-dégradation d'ARNm) et envisage de manier le promoteur de la somatostatine dans le but de connaître les éléments qui expliqueraient cette augmentation d'ARNm suite à l'activation de la voie d'AMPC.

Expérience 2 :

Pour cela, le Pr Montminy a tronqué le promoteur du gène de la somatostatine selon 4 constructions différentes et l'a couplé à la CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase, un gène rapporteur, maintenant on utilise la luciférase). Il a ensuite mesuré l'activité des transcrits après stimulation par la FK.



On observe que la stimulation chute lorsqu'on supprime la région comprise entre -71 et -48. **Il y a donc entre -71 et -48 (région très proximale) un élément de réponse à l'AMPC.**

De plus, quand on réintègre cet élément de réponse dans le promoteur d'un gène qui n'est pas régulé par l'AMPC, dans des cellules contenant de la PKA, on est capable de conférer à ce gène la capacité d'être stimulé par l'AMPC.

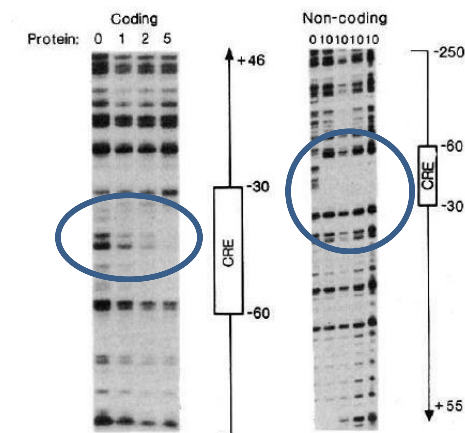
Il l'a comparé avec les promoteurs d'autres gènes pour lesquels on a également une stimulation par l'AMPC, et il a trouvé en région proximale de ces gènes, une **séquence palindromique commune** de 8pb : **TGAC/GTCA**. Cette séquence a été nommée **CRE**.

**Bilan 2 : il existe sur le promoteur de la somatostatine un séquence palindromique CRE impliquée dans la stimulation de l'expression suite à l'activation de la voie AMPC par FK.**

**B. Découverte de CREB**

Selon une hypothèse légitime, une protéine se lierait sur cette séquence CRE. Ainsi, le Pr Montminy voulait d'abord démontrer l'**existence** d'une telle protéine par une expérience de **Footprinting**.

Expérience 3 :



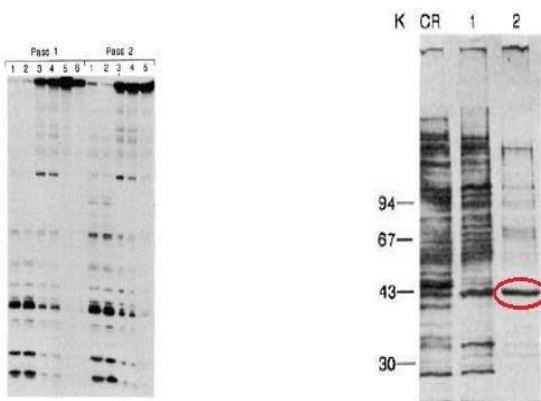
Le Pr Montminy a pris la partie proximale du promoteur (comprenant le CRE) et il a mis des extraits nucléaires de cellules PC12 (cellules utilisées auparavant, elles contiennent de la PKA). Par cette expérience, il a mis en évidence une séquence non digérée par la DNase, qui était donc protégée par des protéines. Cela conforte donc son hypothèse. Cette séquence est localisée au niveau du CRE.

**Bilan 3 : il existe une protéine qui se fixe au niveau du CRE.**

Expérience 4 : Comment identifier la protéine ?

Afin d'identifier la protéine se liant au CRE, il a pris une **colonne d'affinité** sur laquelle il a multimérisé un CRE synthétique, puis passé des extraits nucléaires (il cherchait un FT, donc une protéine nucléaire) dans des conditions de lavage de telles que les protéines liant faiblement le CRE étaient d'abord éluées, et puis celles qui le liaient fortement étaient éluées à leur tour.

Quand on prend les dernières fractions d'éluion, on met en évidence une protéine de 43 kDa : **CREB**. Il a tout de suite montré que CREB disposait d'un site de phosphorylation (une sérine en position 133). Si l'on mute cette sérine, on a plus de stimulation de la transcription.



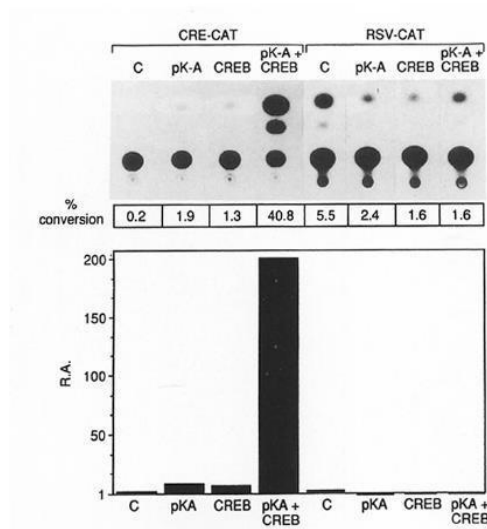
- Sur la figure de gauche, les colonnes 1 et 2 correspondent aux protéines liant faiblement le CRE, et les colonnes 3, 4, 5 et 6 aux protéines le liant fortement. Les numéros sont corrélés au temps d'éluion.
- Sur la figure de droite, la colonne 2 représente les protéines liant fortement le CRE, on met en évidence une seule protéine de 43 kDa.

**Bilan 4 : la protéine qui se fixe sur le CRE est CREB.**



## C. Démonstration de l'action de la PKA sur CREB

### Expérience 5 :

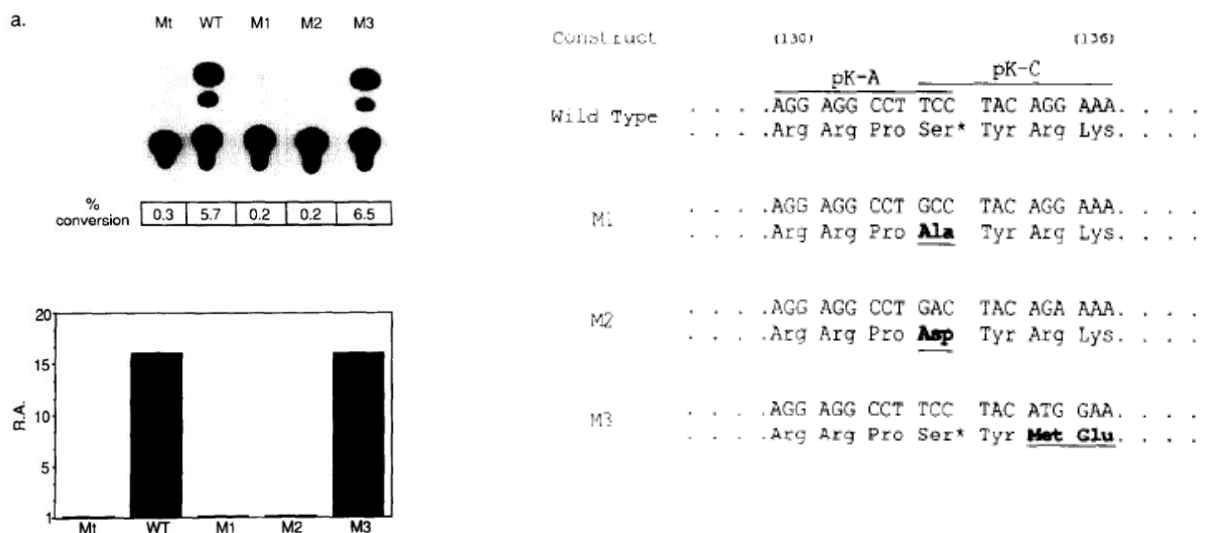


L'expérience a été faite avec un gène rapporteur comportant le promoteur de la somatostatine.

La transfection du vecteur contenant uniquement la SU catalytique de la PKA ou CREB est sans effet. Lorsque la cellule possède à la fois la SU catalytique de la PKA et CREB, on voit une activation de la transcription du gène rapporteur.

**Bilan 5 : CREB stimule la transcription quand la PKA est activée.**

### Expérience 6 :



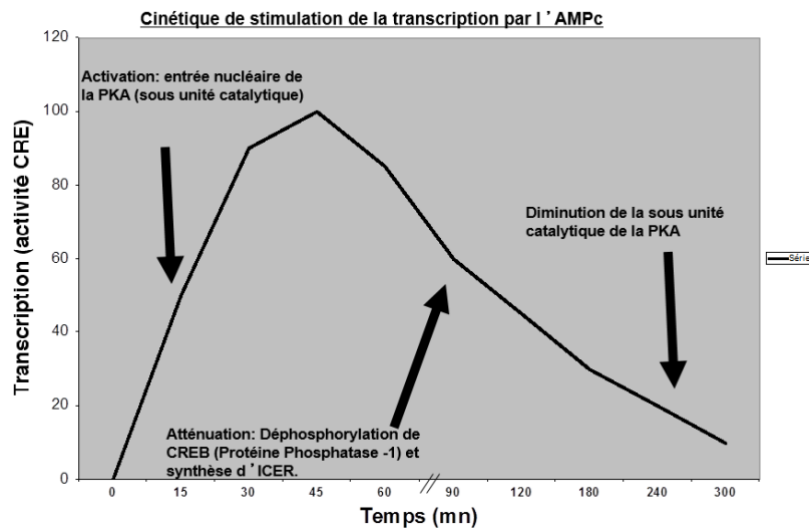
Ensuite, il est allé voir la séquence du CREB : une sérine se trouve dans une séquence consensus de phosphorylation par la PKA (*figure de gauche*)

Lorsqu'on mute cette sérine, même en présence de CREB et de PKA, on voit disparaître la transcription du gène rapporteur (*figure de droite*, c'est le cas pour M1 et M2).

**Bilan 6** : CREB est phosphorylée par la PKA au niveau de la sérine 133. Une mutation de cette sérine a pour conséquence la non-phosphorylation de CREB et donc la perte de la capacité de CREB à stimuler la transcription. L'activité du CRE est directement proportionnelle à la phosphorylation de CREB par la PKA.

## D. Cinétique de la régulation de la transcription

Modélisation de la cinétique de régulation transcriptionnelle (activité CRE) au cours du temps :



Au temps  $t_0$ , on active la voie avec un ligand extracellulaire comme le GHRH ou de façon non physiologique avec de la FK ou de l'AMPC.

La montée de l'activité durant les 15 à 30 premières minutes correspond au temps que met la SU catalytique à se détacher de la SU régulatrice.

Ensuite, il y a un plateau qui correspond au moment où la SU catalytique est rentrée dans le noyau.

Le CRE est activé rapidement, et on observe un maximum à 45 min. Ensuite la stimulation va progressivement décroître, en réponse à **3 mécanismes d'inactivation** :

- 1) Des **phosphatases** vont être activées et déphosphoryler CREB.
- 2) CREB stimule l'expression d'ICER, FT synthétisé très rapidement. ICER est un **inhibiteur compétitif non phosphorylé de CREB se liant au CRE**.

Il inhibe donc l'activité transcriptionnelle à ce niveau (rétro-contrôle négatif).

- 3) Enfin, la SU catalytique de la PKA va être réexportée hors du noyau pour rejoindre la SU régulatrice et retrouver la conformation de repos de la PKA.

**Bilan** : CRE une fois stimulé par CREB phosphorylé ne reste pas actif à jamais, son expression va être inhibée par 3 mécanismes d'inactivation, pour éviter une toxicité cellulaire.

## IV. Le CRE et les gènes ayant un CRE

Le CRE palindromique de 8 paires de bases a une meilleure affinité que les demi-CRE (les CRE n'ayant pas le palindrome complet) qui médient la réponse à l'AMPc de **façon moins franche** (Kd plus faible).

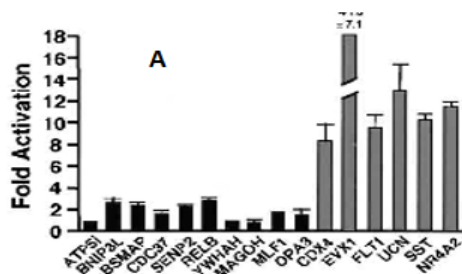
Il existe plus de 105 gènes contenant un CRE, impliqués dans de nombreuses **fonctions très diverses**. (gènes codant pour des canaux, des protéines de structure, des FT... ).

Parmi ces gènes, 50% contiennent le palindrome, 50% ont un demi-CRE et 2/3 des CRE sont localisés entre -50 et -150 (très proximaux).

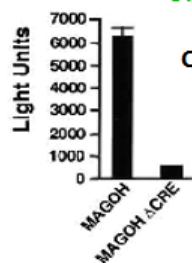
Il y a une possible méthylation du CRE mais les conséquences de cette méthylation sur la transcription n'ont pas été démontrées.

Par des outils bio informatiques, il a été montré que la plupart des CRE, à l'échelle du génome entier sont très proximaux. (par rapport au site d'initiation de la transcription ou du codon ATG).

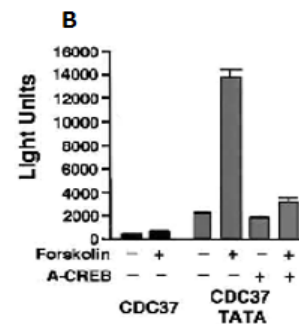
Un grand nombre des CRE sont situés dans des gènes contenant une **boîte TATA**. Avec un système de gènes rapporteur de la luciférase, l'activité de ces CRE a été étudiée.



**Les gènes contenant une boîte TATA répondent plus fortement à l'AMPc**  
(TATAAA vers -25 site d'initiation, liaison RNA Pol via une TATA binding protein)



**TATA ou pas le CRE est important à l'activité basale et stimulée du promoteur**



**L'addition d'une boîte TATA confère une plus forte activation par l'AMPc**

### Légendes et explications des figures :

**Figure A :** Après stimulation par la FK, on quantifie le taux de réponse à l'AMPc. Ainsi on a pu différencier **2 groupes de CRE** :

- ceux qui répondent très fortement à la FK (en gris sur la figure)
- ceux qui répondent à la FK mais plus faiblement : ce sont ceux qui ne contiennent pas de boîte TATA (en noir sur la figure).

**Bilan A :** Les gènes contenant une boîte TATA répondent plus fortement à l'AMPc.

**Figure B :** On fait ensuite l'expérience de rajouter une boîte TATA à un gène n'en contenant pas, puis on regarde le taux d'activité. A-CREB est un dominant négatif de CREB.

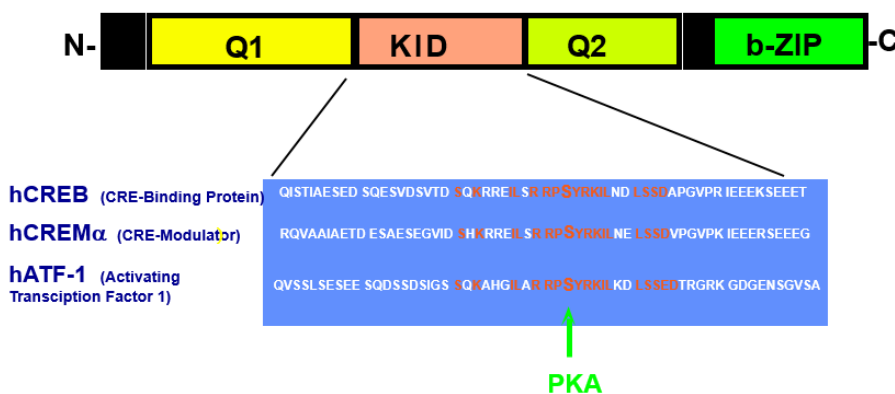
**Bilan B :** L'ajout de la boîte TATA confère une activation beaucoup plus forte par l'AMPc.

Figure C : On a aussi montré que lorsque l'on délète le CRE d'un gène ne contenant pas de boîte TATA, la réponse à l'AMPc est considérablement réduite.

**Bilan C : Même sans boîte TATA, le CRE est important pour l'activité basale et stimulée du promoteur.**

## V. La famille des facteurs de transcription liant le CRE et leurs structures moléculaires

CREB est le premier facteur de transcription liant le CRE ayant été identifié. Bien que **CREB** soit le plus abondant, il en existe deux autres : **CREM** (protéine très peu abondante) et **ATF-1**. Ces 3 facteurs font partie d'une famille encore plus large : la famille **b-ZIP** dont les autres membres se lient à d'autres sites de régulation de la transcription que le CRE (leur site principal est l'élément AP1), selon la **structure modulaire** suivante :



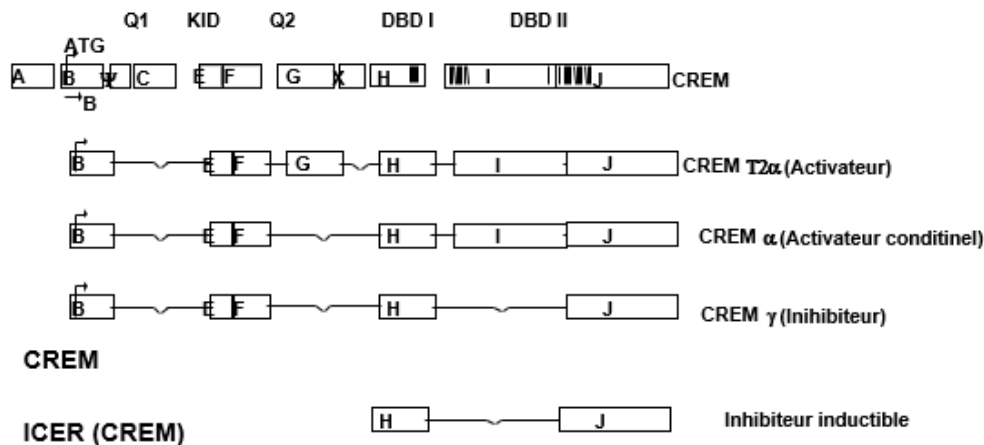
Cette structure est découpée en modules qui ont une fonction différente :

- **b-ZIP** (domaine non spécifique de CREB) : domaine situé en C-ter de CREB, riche en **résidus leucines** donc très basique, qui permettent aux facteurs de transcription de la famille B-ZIP de se **dimériser** (c'est une fermeture éclair à leucine) et de se lier à l'ADN.
- **Q1 et Q2** : 2 domaines **riches en glutamines**, pas très spécifiques des facteurs CREB.
- **KID** : domaine commun **spécifique** à CREB, CREM et ATF-1. C'est dans ce domaine que se situe le **site de phosphorylation** par la PKA, la sérine 133, au sein d'une **région conservée** entre les 3 facteurs (en rouge sur l'image).

Comparaison de la structure de CREB et de CREM :

**CREB**, similaire à ATF1, n'a pas beaucoup d'isoformes (monomorphe). C'est une protéine **stable** : pratiquement toutes les modifications viennent de la phosphorylation par la PKA.

**CREM** (Modulating), en revanche, dont l'ARN peut être plus ou moins stable et la protéine plus ou moins dégradée, est plus **labile**, activateur ou inhibiteur selon ses **nombreuses isoformes** de tailles très variables :



- 1<sup>ère</sup> isoforme avec tous les domaines : forme complète quasi inexistante (isoforme très proche de CREB).

- isoforme sans Q1 : forme plus courte qui reste néanmoins **activatrice**.

- isoforme sans Q1 ni Q2 (CREM α) : forme encore plus courte, faible activateur de la transcription appelé **activateur conditionnel** (plus ou moins activateur).

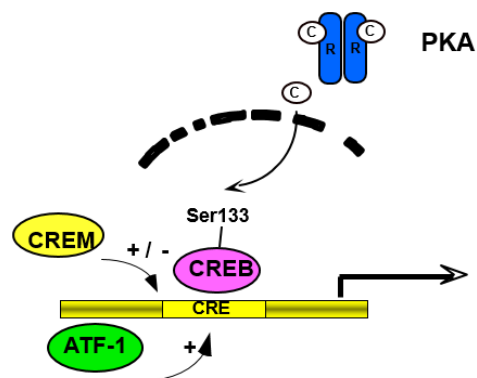
- isoforme sans Q1, Q2 et une partie du b-ZIP (CREM γ) : forme très courte **inhibitrice de la transcription**.

- **ICER** (Inducible Cyclic AMP Early Repressor) est exprimé à partir du même gène que CREM avec un promoteur alternatif ayant 4 CRE. ICER ne comporte que le domaine de liaison à l'ADN et n'a pas de domaine de transactivation : c'est donc un facteur de transcription passif, il vient se lier au CRE (avec une assez forte affinité) mais n'active rien (**pas de domaine KID**).

→ **ICER est un inhibiteur compétitif de CREB**. Identification de CREM à partir de l'ARNm de CREM

La PCR a permis de mettre en évidence l'existence de cDNA codants pour des FT proches mais différents de CREB, comme CREM, en quantité bien plus variable que CREB qui est ubiquitaire. L'approche est différente pour CREB, que l'on peut identifier grâce à sa protéine (alors que pour CREM : ARNm → ADNC)

3 protéines différentes peuvent donc se lier au CRE : **CREB** et **ATF-1** sont **activatrices** tandis que **CREM**, selon l'isoforme, peut être **activatrice ou inhibitrice**.



## VI. Liaison de CREB à l'ADN

CREB se lie au CRE sous forme d'un **dimère CREB/CREB**, par l'intermédiaire du domaine b-ZIP. **Cette liaison est constitutive** : CREB est toujours lié au CRE, même en l'absence d'activation par la PKA. Mais tant qu'il n'est pas phosphorylé par la PKA, il ne va pas stimuler la transcription. C'est une différence avec beaucoup d'autres FT **qui ne se lient qu'une fois phosphorylés**.

## VII. CREB Binding Protein (CBP)

Comment la phosphorylation de CREB lui confère un effet activateur ?

La phosphorylation de CREB par la PKA va induire un changement de conformation stabilisant KID pour lier pCREB au **co-facteur CBP**, sur des résidus spécifiques du domaine KID. **CBP interagit avec la machinerie transcriptionnelle**, ce qui déclenche la transcription.

Mais tant que CREB n'est pas phosphorylé sur la sérine 133, KID reste labile, CBP se lie avec la polymérase via son domaine KIX mais n'interagit pas avec le CREB : il n'y a pas de transcription.

*Note : CBP lie d'autres facteurs de transcription (ATF1, CREM, P53...) et n'est pas spécifique de CREB.*

Démarches expérimentales :

Afin de mettre en évidence la protéine co-activatrice, on a effectué un screening différentiel de banques d'expressions protéiques avec CREB d'un côté et pCREB de l'autre afin d'identifier tous les clones les liant.

Ensuite on a fait la différence entre les deux screening pour ne mettre en évidence que les protéines liant spécifiquement pCREB, la forme phosphorylée. Une seule protéine a alors été mise en évidence : **CBP**, une protéine nucléaire de très grande taille.

### **RESUME DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'AMPC :**

Il y a augmentation des taux intracellulaires d'AMPC → liaison de l'AMPC à la SU régulatrice → libération de la SU catalytique → la SU catalytique libre rentre dans le noyau et phosphoryle CREB sur la sérine 133, déjà lié au palindrome du CRE TGAC-GTCA sous forme d'un homodimère CREB/CREB (le + souvent). Cette phosphorylation de CREB entraîne son interaction avec CBP ce qui stimule la transcription.

## FICHE RECAPITULATIVE

Ex : Dans la cellule somatotrope, la synthèse de GH est régulée à travers la voie AMPc.  
(+) La GHRH stimule la production d'AMPc par l'adényl cyclase, et ainsi la synthèse de GH  
(-) La somatostatine inhibe l'adényl cyclase, donc la production d'AMPc et la synthèse de GH

### **La protéine kinase A, activée par l'AMPc**

Repos : 2 SU catalytiques et 2 SU régulatrices de la PKA sont liées dans le cytoplasme

Activation : 2 molécules d'AMPc se fixent sur chaque SU régulatrice, et libèrent la SU catalytique de la PKA dans le noyau pour phosphoryler des substrats sur la Sérine ou la Thréonine.

### **Anomalies de la PKA : hyperactivation indépendante de l'AMPc**

. Mutation de la SU catalytique : hotspot Leu206Arg dans les adénomes surrénaliens sécréteurs

. Mutation de la SU régulatrice R1A : complexe de Carney, multiples et divers symptômes entraîne dans les 2 cas : altération de l'interaction SU catalytique/SU régulatrice de la PKA

### **CRE, CREB**

AMPc active PKA ainsi PKA phosphoryle le FT CREB et puis P-CREB se fixe au CRE d'un gène (élément de réponse, promoteur) ce qui entraîne l'activation de l'expression de ce gène

### **Découverte de l'élément de réponse CRE**

. La forskoline (FK) qui active l'adényl cyclase augmente la transcription de la somatostatine par conséquent, l'AMPc stimule la transcription de certains gènes

. La délétion d'une région promotrice palindromique particulière (= élément de réponse CRE) diminue la transcription de la somatostatine stimulée par l'AMPc par conséquent le CRE favorise la transcription de certains gènes

### **Découverte du facteur de transcription CREB**

. DNA footprinting : la région CRE est protégée de l'activité DNase ainsi des FT se fixent sur cette région

. Colonne d'affinité : élution d'extraits nucléaires sur CRE fixée à la colonne montre que CREB se lie à CRE.

**Il faut que CREB soit phosphorylé sur la sérine 133 par la PKA pour activer la transcription**

### **Cinétique de l'activité transcriptionnelle**

Croissance puis décroissance (phosphatases CREB, ICER, réunion des SU catalytiques et régulatrices)

ICER = inhibiteur compétitif non phosphorylé de CREB se fixant sur les CRE.

**CRE et gènes** : La présence d'une TATA box sur les gènes à CRE leur confère une activation plus forte

### **Famille b-ZIP : CREB, CREM, ATF-1**

Domaine b-ZIP riche en leucines pour la dimérisation ce qui permet la fixation des dimères de FT à l'ADN

Domaine KID comprenant le site de phosphorylation par la PKA

. CREB : protéine stable, monomorphe, activatrice et ubiquitaire

. CREM : protéine labile, multiples isoformes, activatrices ou inhibitrices

### **Liaison de CREB à l'ADN**

Elle est constitutive mais non activatrice tant que CREB n'est pas phosphorylé. Sa phosphorylation stabilise KID avec lequel le cofacteur CBP interagit, lui-même lié à la machinerie transcriptionnelle.