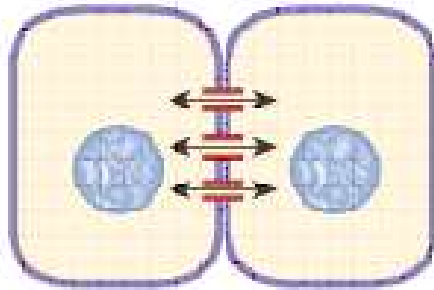


TD « signalisation » n°1

Exercice 1

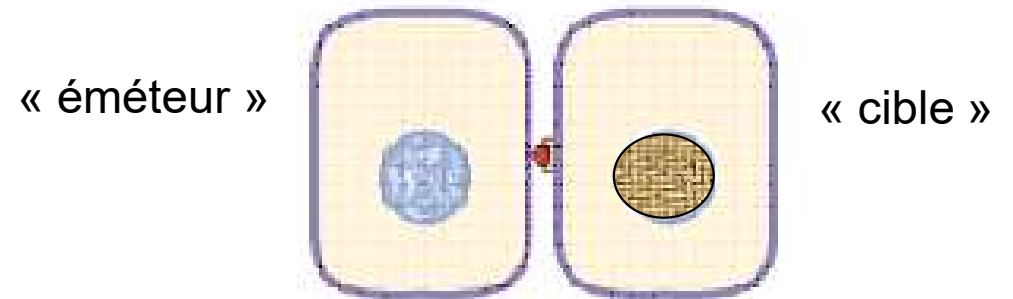
Différentes formes de communications intercellulaires

1 - Jonctions communicantes:



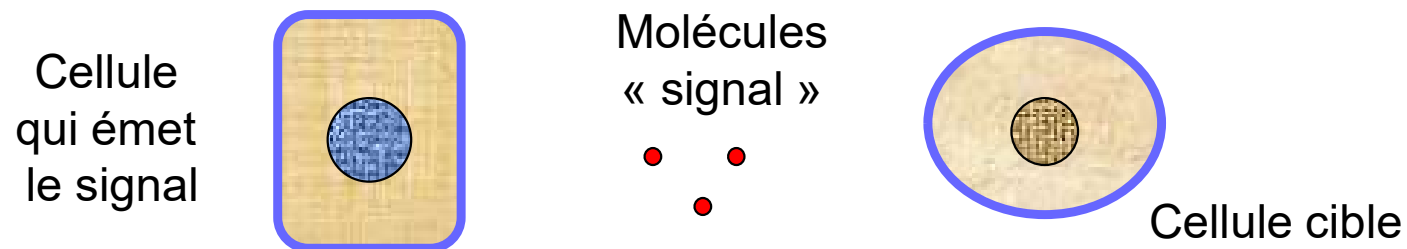
Echange direct d'informations entre les cytoplasmes de deux cellules voisines sans sécrétion.

2 - transmission contact-dépendante:



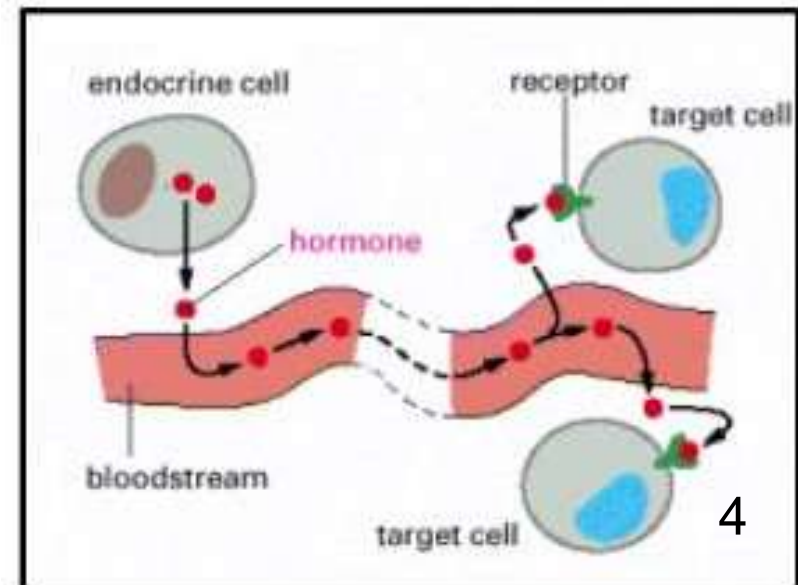
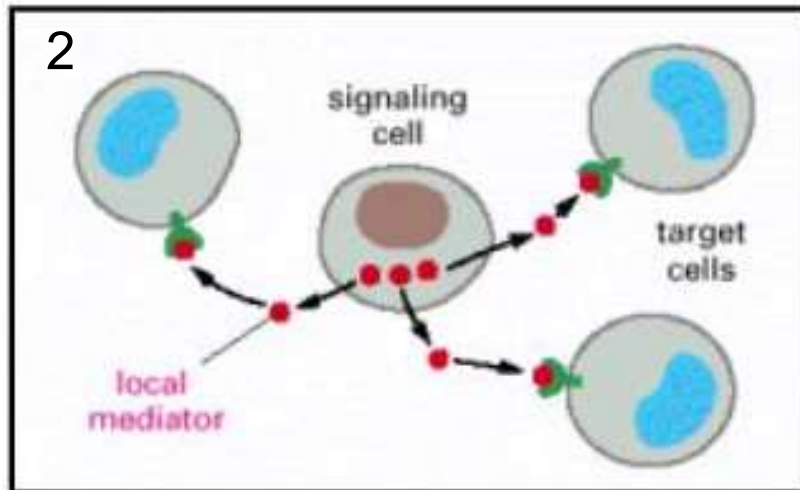
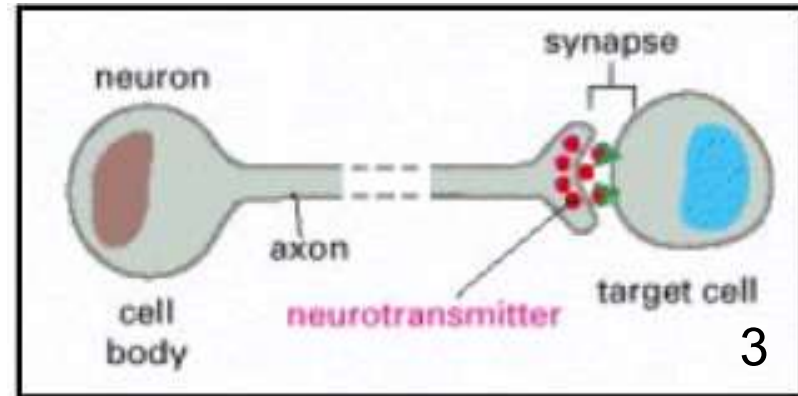
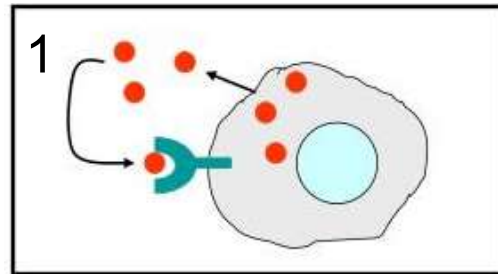
implique une interaction physique directe entre des molécules présentes à la surface des deux cellules voisines.

3 - Transmission via des molécules sécrétées:



Différents types de communications intercellulaires via les molécules sécrétées

1. Autocrine
2. Paracrine
3. Synaptique
4. endocrine



Réponses primaire et secondaire aux molécules hydrophobes

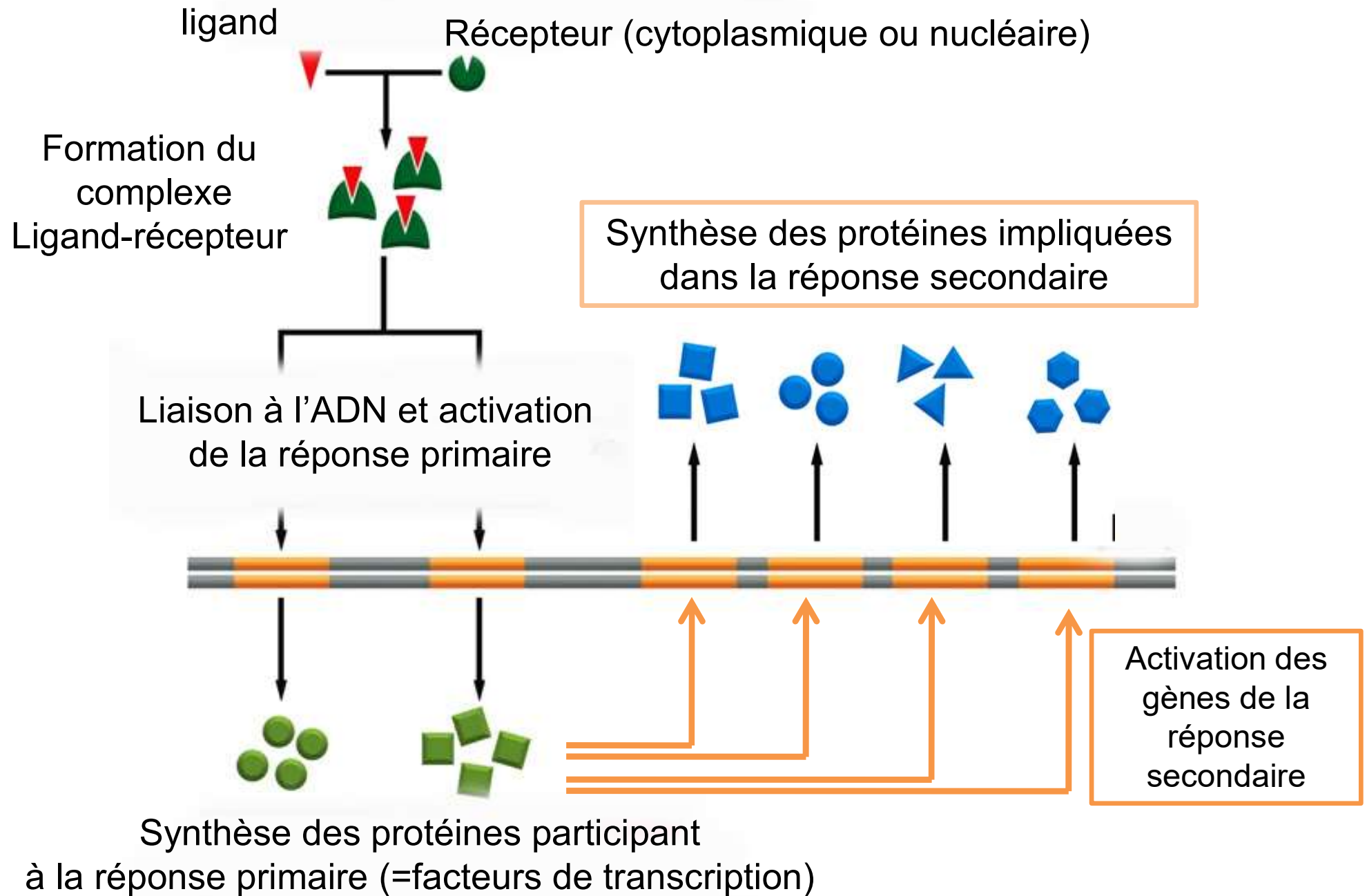
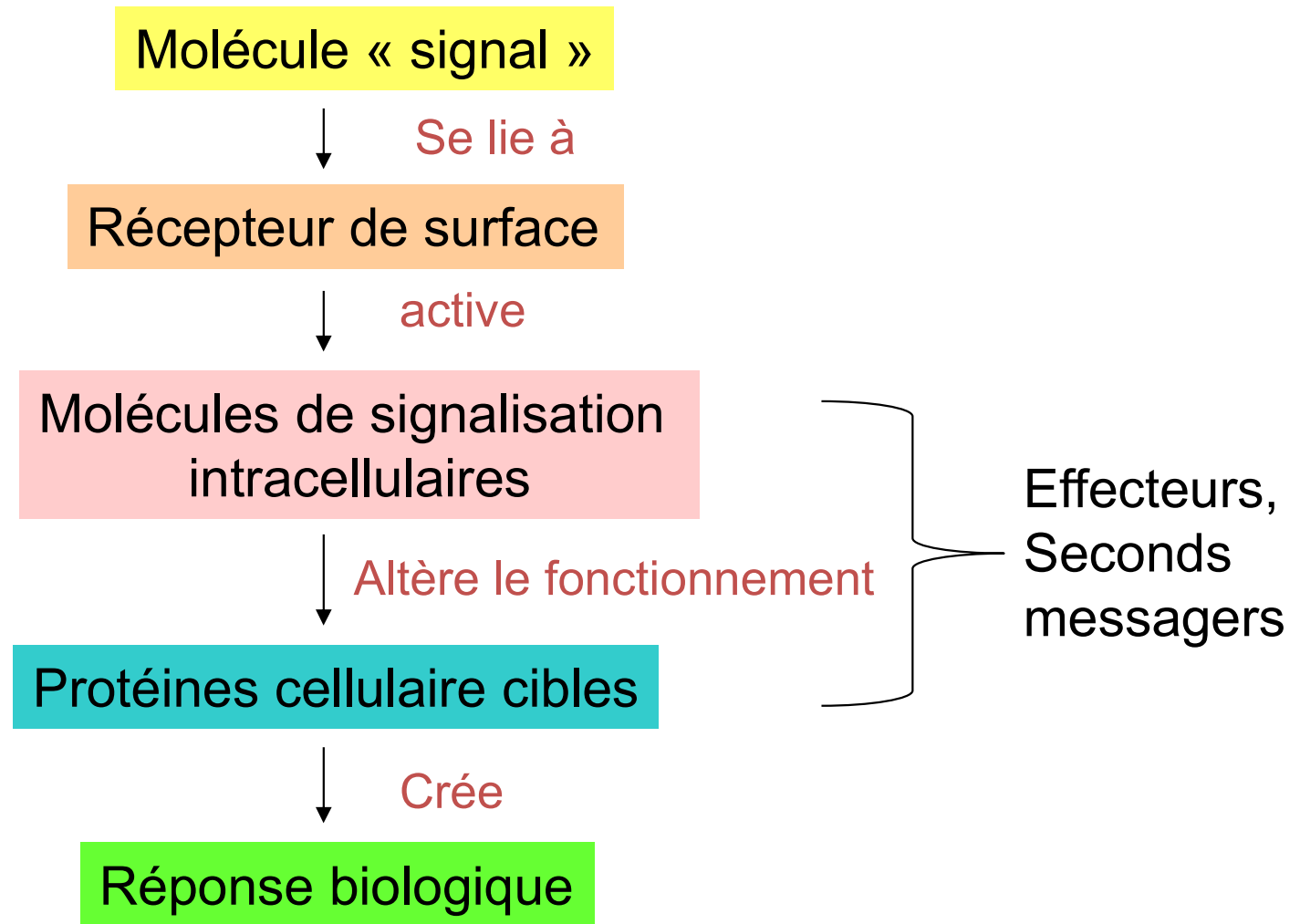
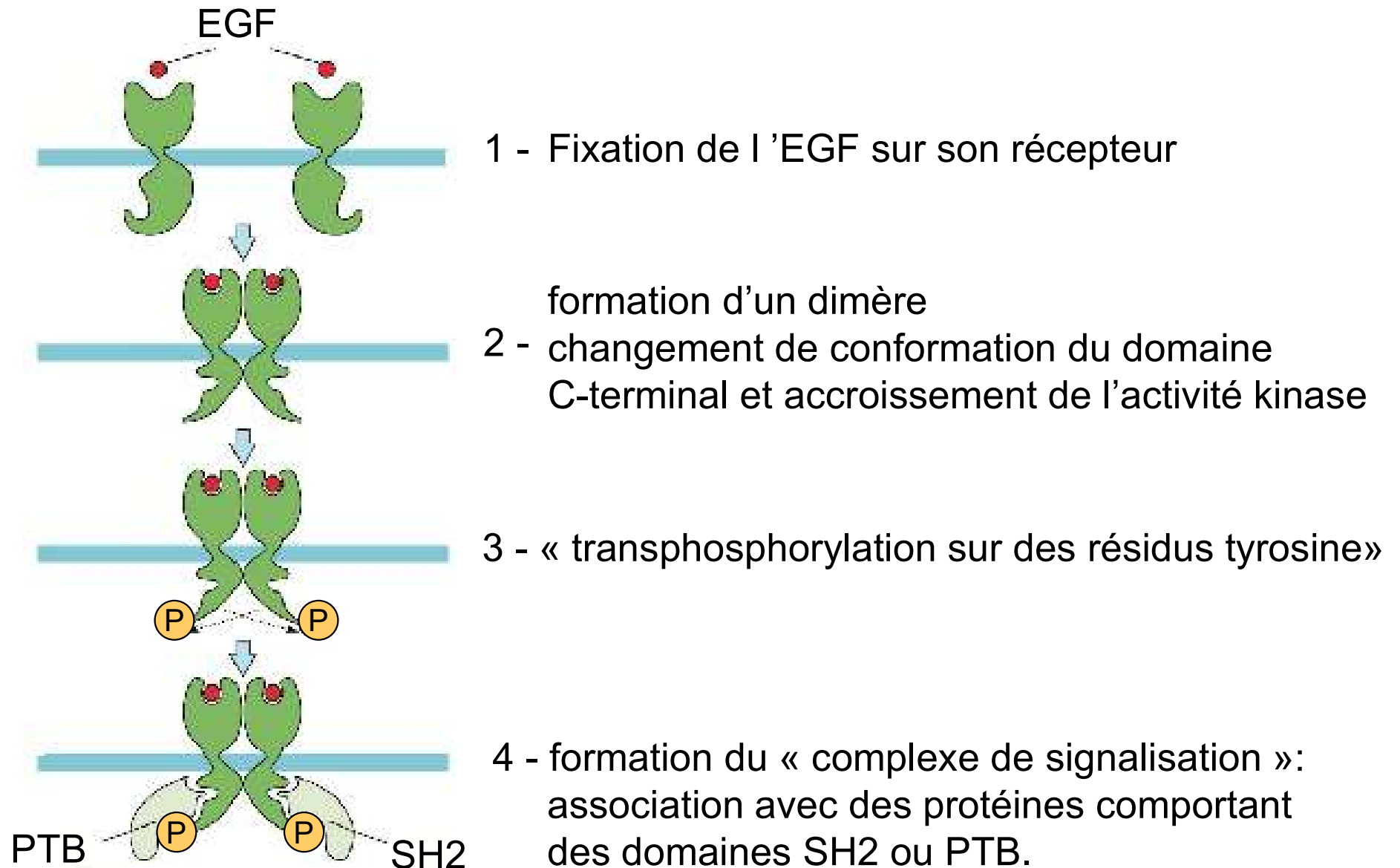


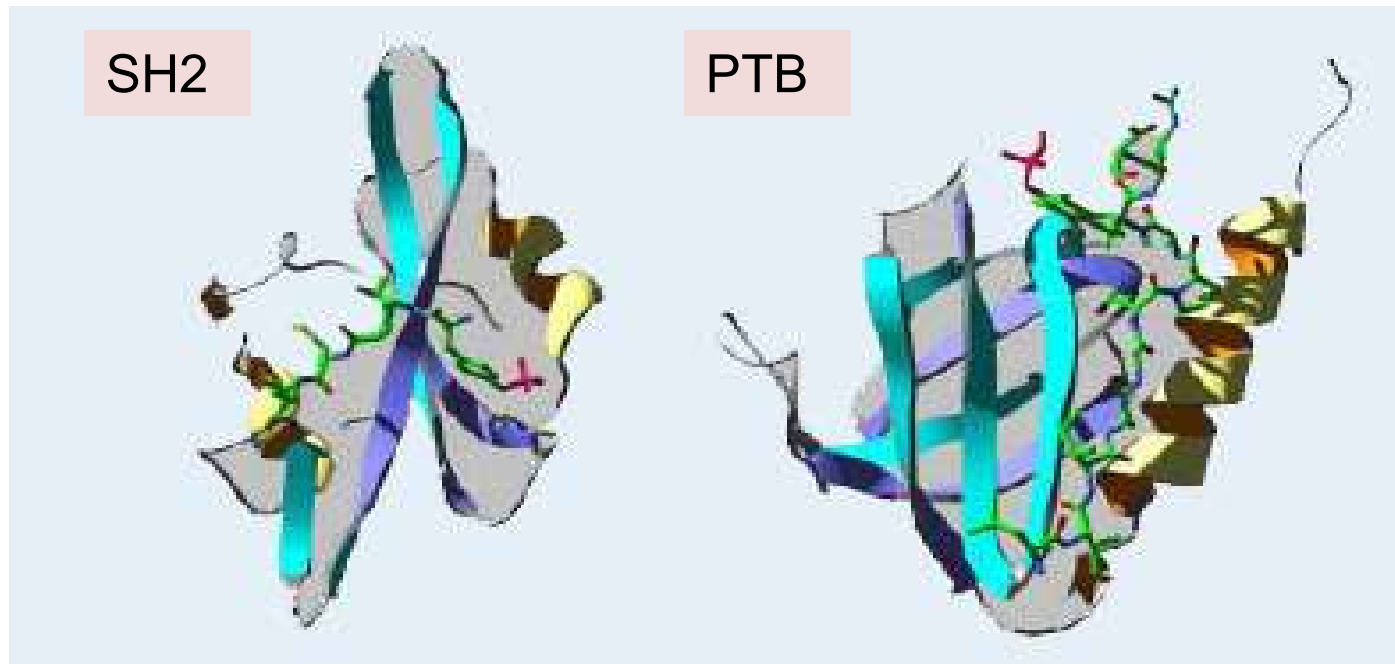
Schéma général d'une voie de signalisation activée par une molécule sécrétée hydrosoluble



Activation du récepteur de l'EGF



Récepteurs à activité tyrosine kinase:
organisation et spécificité de reconnaissance des domaines SH2 et PTB



Domaine SH2

Nom: Src homology domain 2
Taille: 100 acides aminés
Spécificité: Séquence peptidique particulière
située du côté de l'extrémité COOH
du résidu Y phosphorylé

Domaine PTB

Phosphotyrosine binding domain
100 acides aminés
Séquence peptidique particulière
située du côté de l'extrémité NH₂
du résidu Y phosphorylé

Exemples de protéines cytosoliques contenant des domaines SH2/PTB s'associant avec les récepteurs à activité tyrosine kinase

2 classes

Protéines effectrices, possédant une activité enzymatique

Protéines adaptatrices, dépourvues d'activité enzymatique

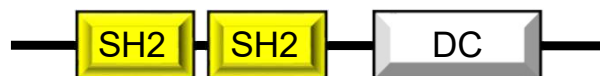
Phospholipase C γ



Grb2



Phosphotyrosine phosphatases



IRS-1

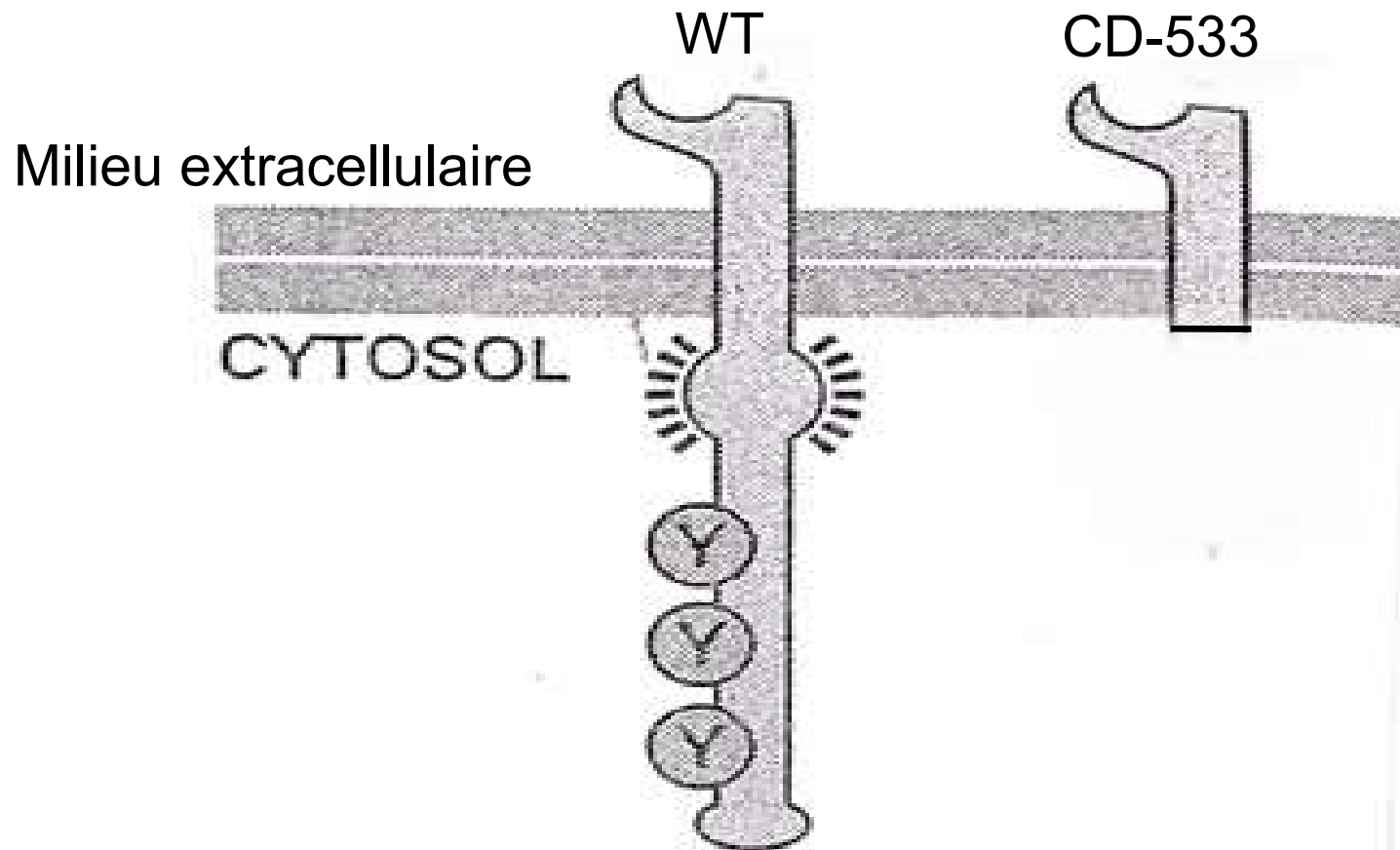


GTPase activating protein (GAP)



DC: domaine catalytique – SH3: src homology domain 3 – PH: pleckstrin homology domain – PI3K BD: domaine de liaison de la PI3K.

Structure des récepteurs de l'EGF sauvage (WT) et tronqué (CD-533)



Activité kinase	+	-
Sites de phosphorylation	+	-

Protocole expérimental (figures 1)

Incubation des cellules exprimant le récepteur normal ou le récepteur tronqué pendant 16h avec de la méthionine-³⁵S



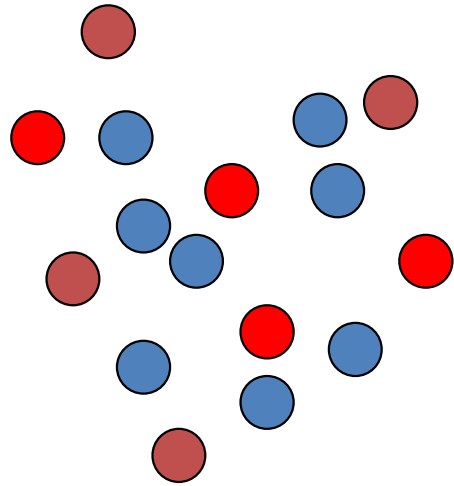
Stimulation ou non par l'EGF



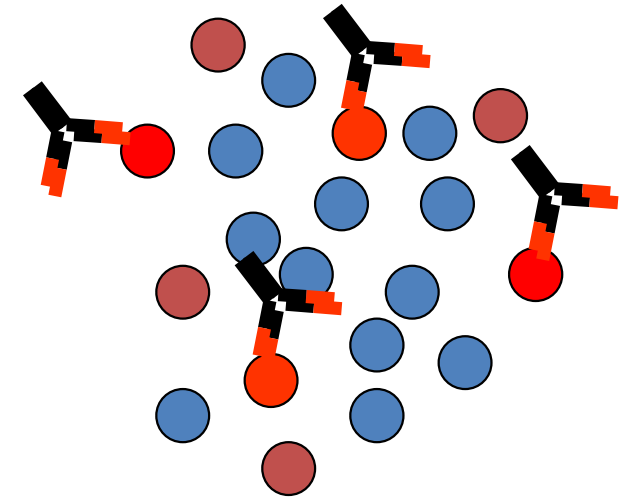
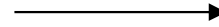
Traitement avec l'EDAC (=crosslinker)



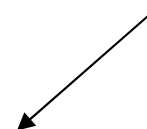
Lyse des cellules et immunoprécipitation du récepteur normal ou du récepteur tronqué avec un anticorps dirigé contre le récepteur de l'EGF.



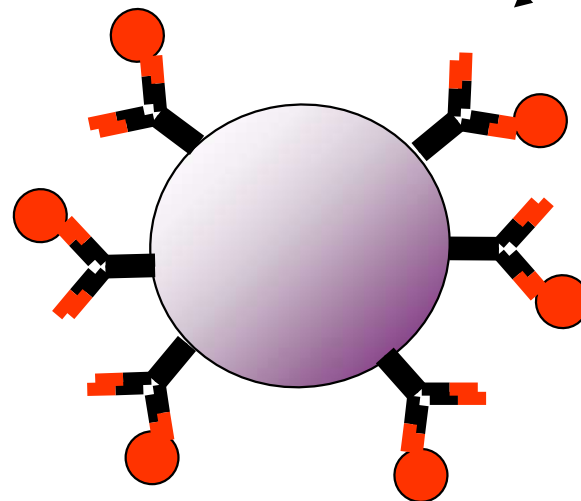
1 - Lyse cellulaire
(mélange de protéines)



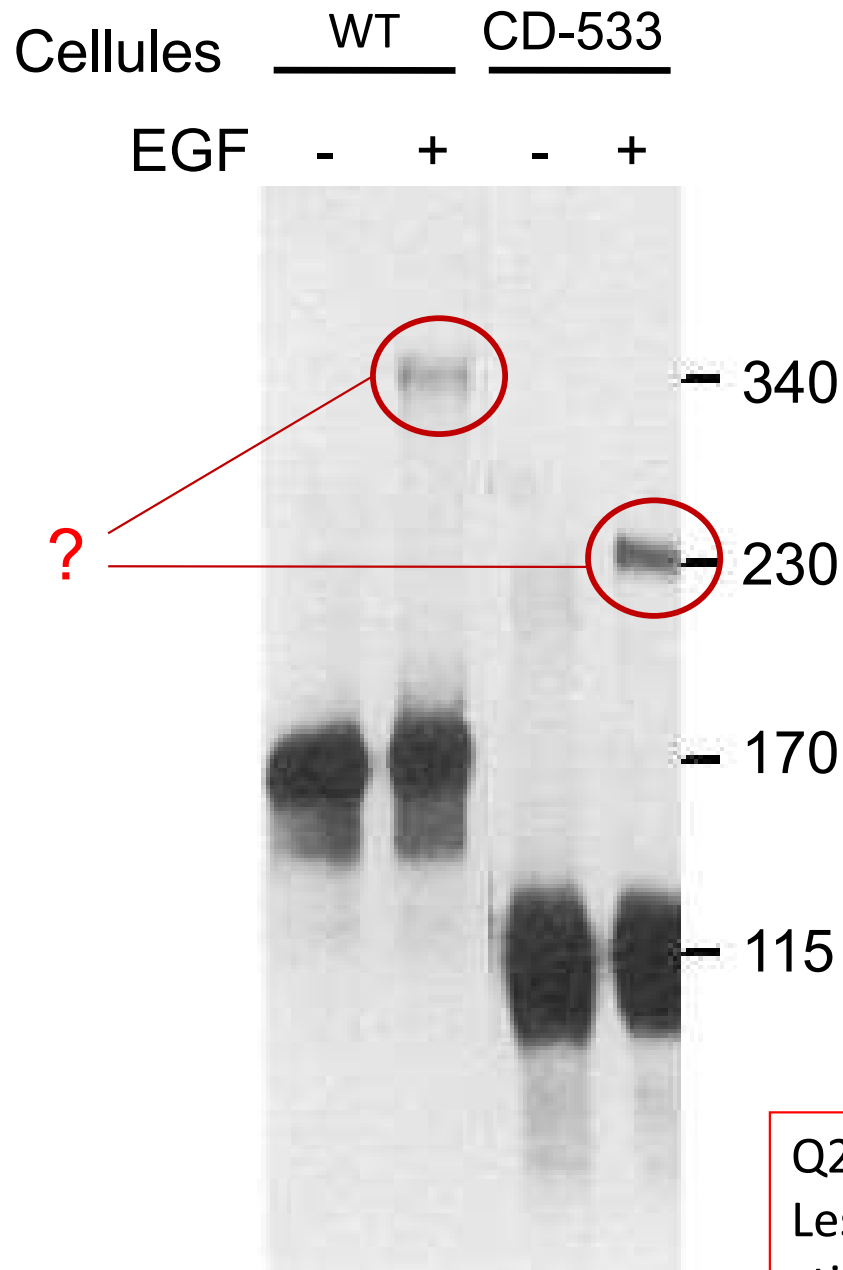
2 -Incubation du lysat avec des anticorps anti-protéine rouge



Principe de l'immuno-précipitation



3 - Précipitation des complexes antigène-anticorps avec des billes de sépharose recouvertes de protéine A ou G



WT = récepteur sauvage
 CD-533= récepteur tronqué

Séparation des protéines par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS



Mise en autoradiographie du gel

Bande à 340 kDa : Dimère de récepteur WT

Bande à 230 kDa : Dimère de CD-533

Q2. En présence d'EGF et d'EDAC.

Les deux sous-unités du dimère, formé suite à la stimulation par l'EGF, sont liées de façon covalente par l'EDAC et restent associées même en présence de SDS.

Protocole expérimental (figures 2)

Incubation des cellules exprimant seulement le récepteur normal ou le récepteur normal et le récepteur tronqué pendant 16h avec de la ^{35}S -methionine



Stimulation ou non par l'EGF



Traitement avec l'EDAC (=crosslinker)



Lyse des cellules et immunoprécipitation du récepteur normal ou du récepteur tronqué avec un anticorps dirigé contre le récepteur de l'EGF.

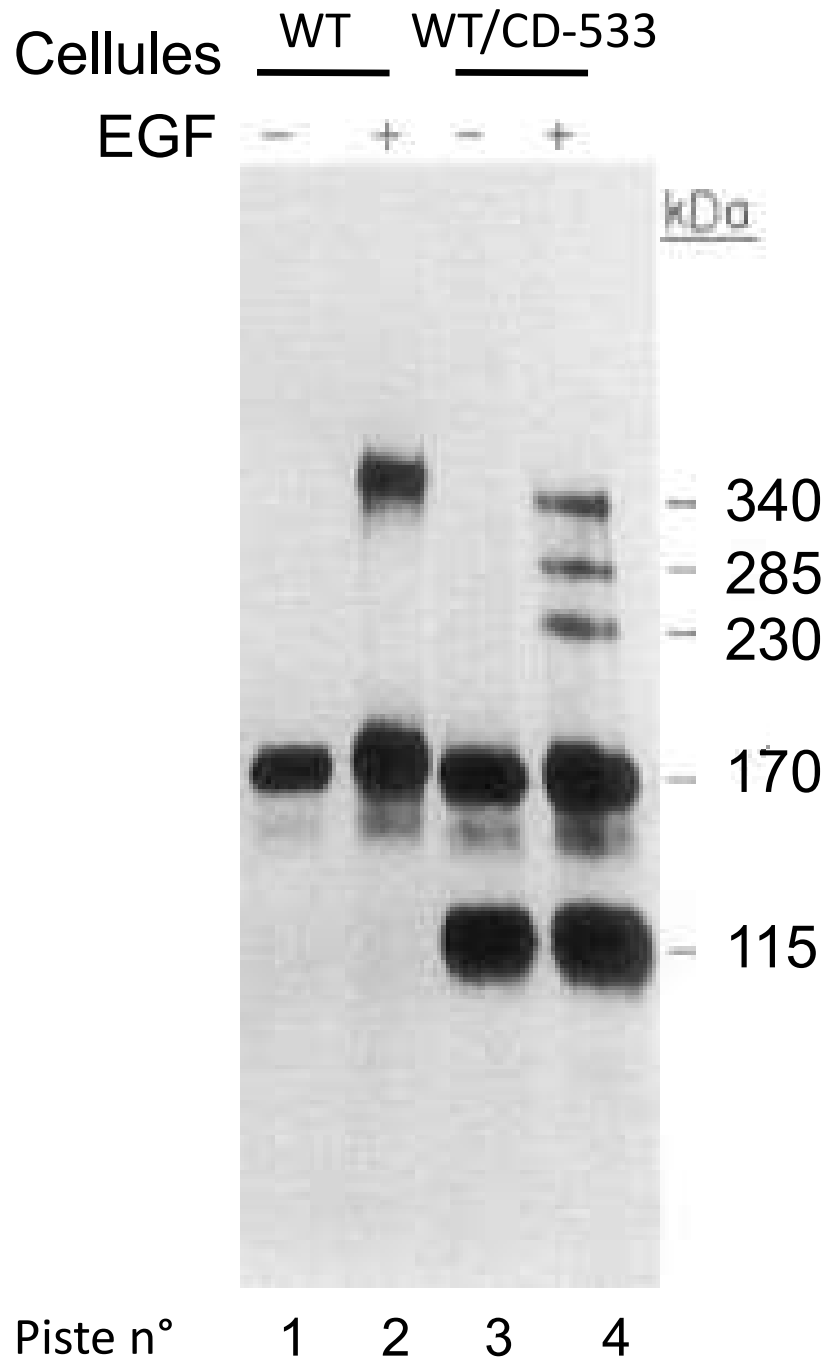


Figure 2

Séparation des protéines par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS puis autoradiographie du gel

Q3. Hétérodimère récepteur sauvage/ récepteur tronqué

Protocole expérimental (figure 3)

Culture des cellules en présence de sérum de veau foetal (SVF)
jusqu'à ce qu'elles atteignent 50% de confluence



Incubation pendant 6h dans un milieu sans SVF



Incubation pendant 30h dans un milieu contenant :

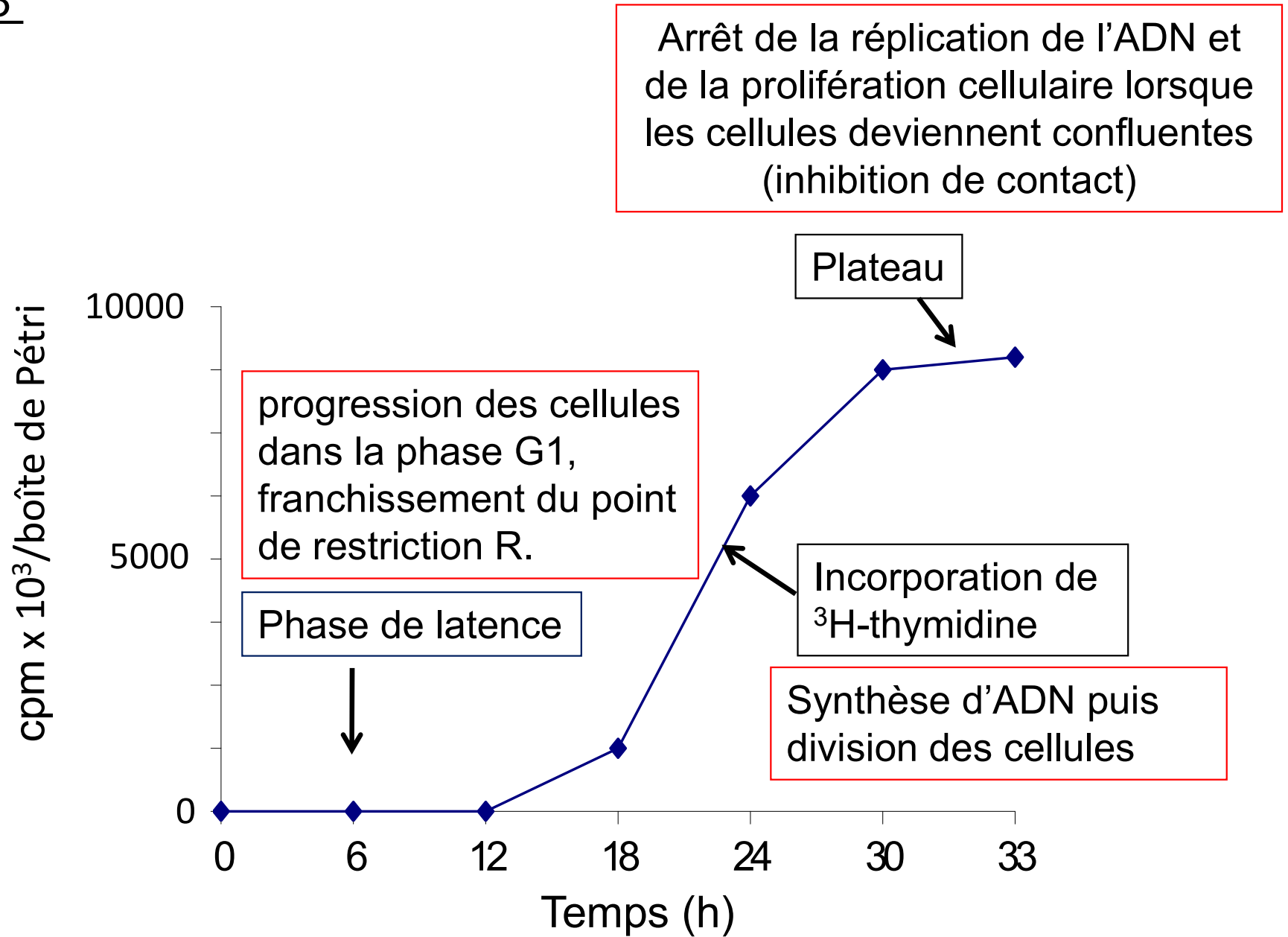
- De l'EGF
- de la thymidine tritiée

Q4. Nucléoside (Thymine + désoxyribose) radioactif qui est incorporé dans le brin d'ADN néosynthétisé au cours de la phase S du cycle cellulaire (après avoir été converti en thymidine triphosphate). L'incorporation de thymidine tritiée reflète la prolifération cellulaire.



- Lyse des cellules après différents temps d'incubation
- Précipitation des macromolécules par l'acide trichloracétique
- Comptage de la radioactivité associée au précipité

Figure 3



Q6. Le SVF contient de nombreux facteurs de croissance. Si l'on souhaite étudier spécifiquement les effets de l'EGF, il faut éliminer le SVF.

Protocole expérimental (figures 4)

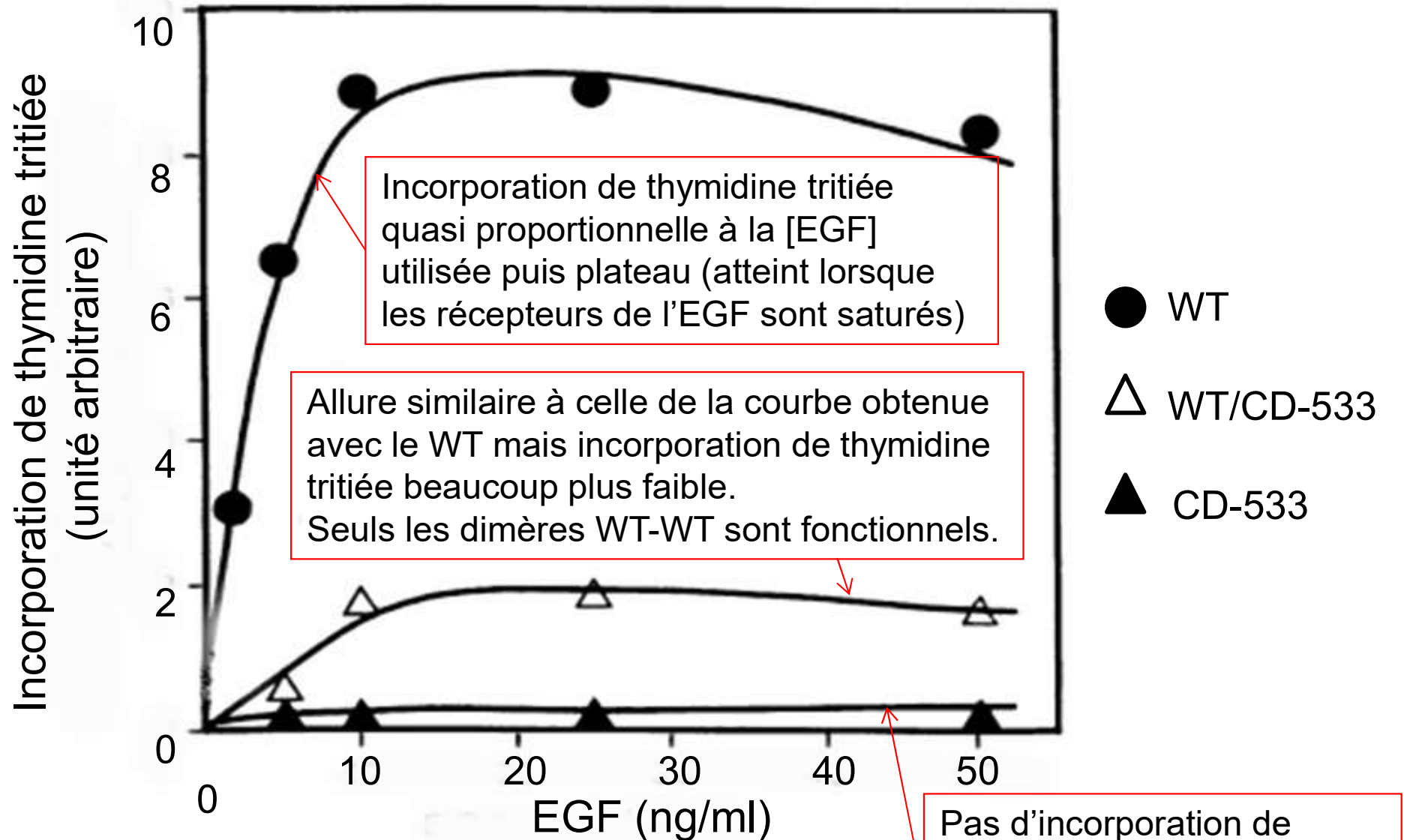
Incubation des cellules exprimant le récepteur sauvage ou le récepteur tronqué ou les deux à la fois pendant 30h dans un milieu contenant :

- de la thymidine tritiée
- des concentrations variables d'EGF



- Lyse des cellules
- Précipitation des macromolécules par l'acide trichloracétique
- Comptage de la radioactivité associée au précipité

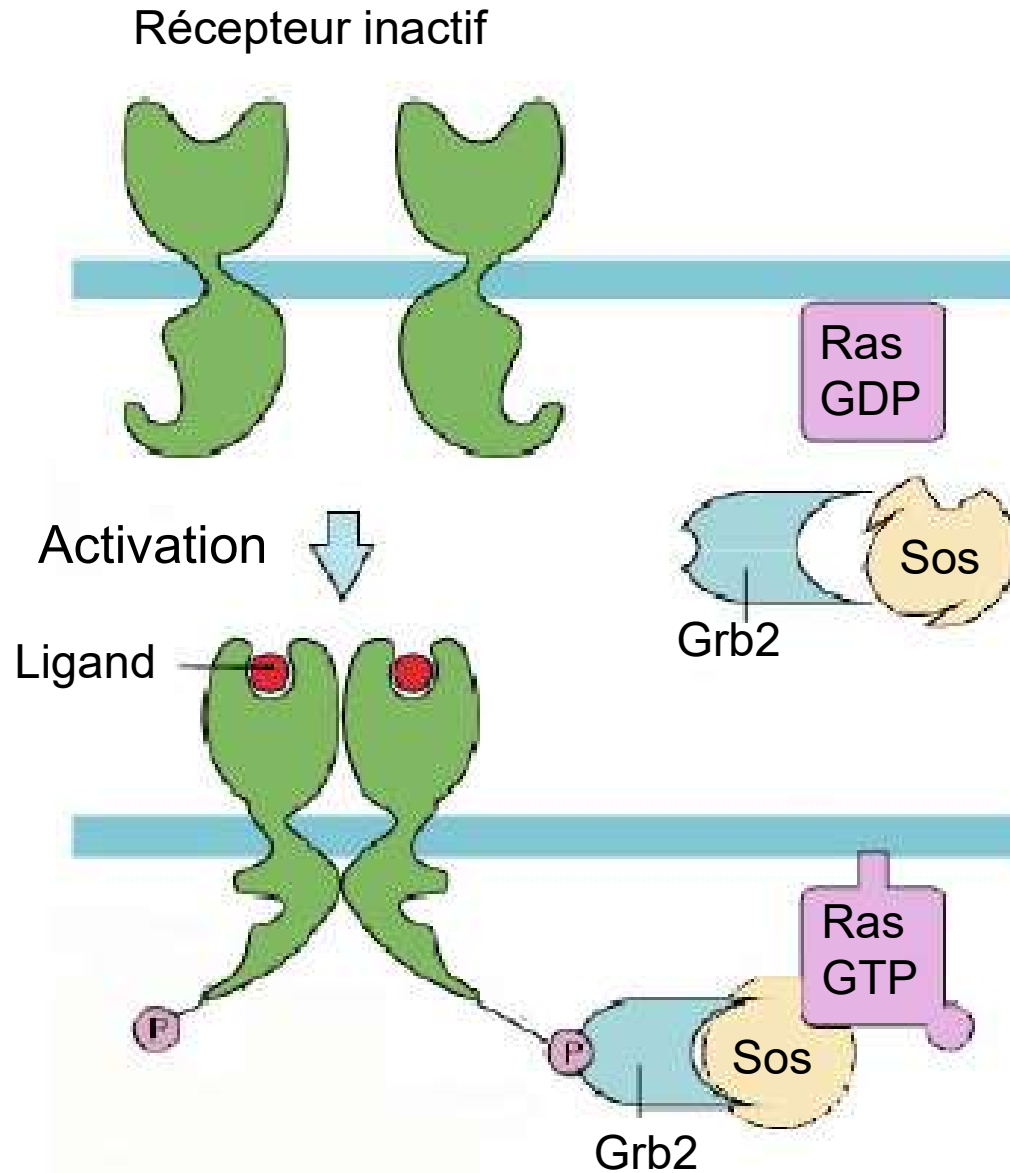
Figure 4: incorporation de thymidine tritiée dans des cellules exprimant le récepteur sauvage et/ou le récepteur tronqué et stimulées par des concentrations variables d'EGF.



Q8. Les hétérodimères WT/CD-533 sont non fonctionnels puisque la sous-unité CD533 ne peut pas phosphoryler la sous-unité WT et vice versa.

Q9.

Voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) (1)



Grb2 (growth receptor binding protein):
protéine adaptatrice

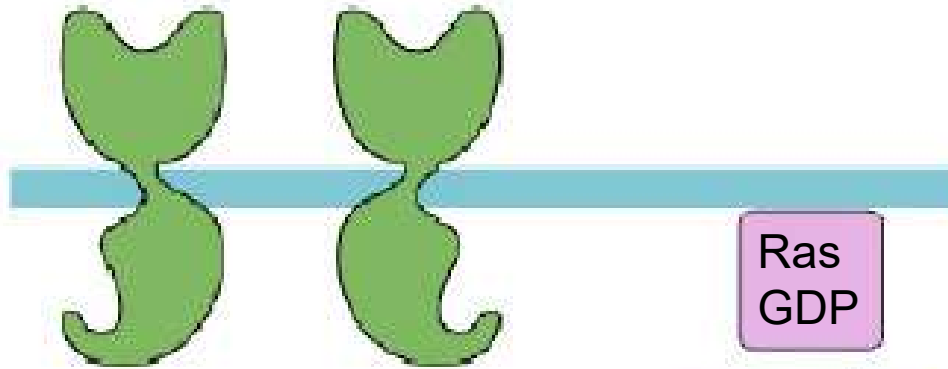


Les domaines SH2, PTB, SH3, PH (etc, etc...) permettent l'assemblage de complexes de signalisation



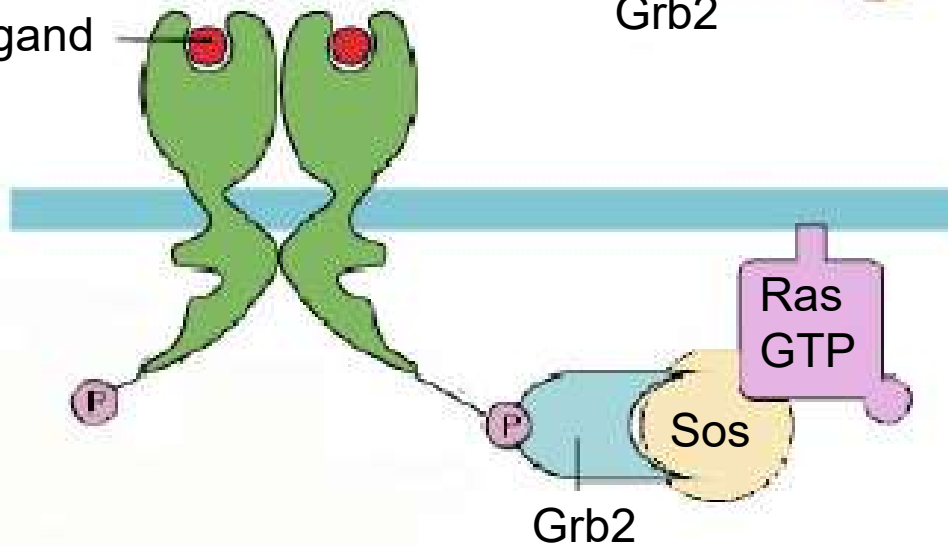
Voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) (1)

Récepteur inactif



Activation

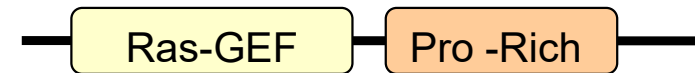
Ligand



Grb2 (growth receptor binding protein):
protéine adaptatrice

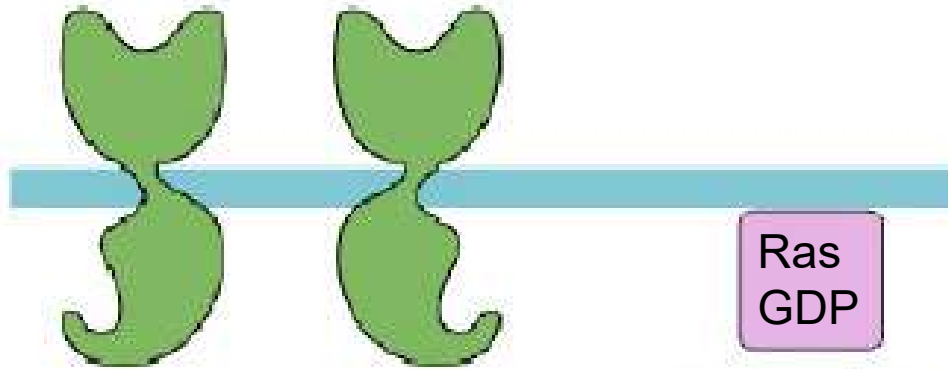


Sos (Son of Sevenless):
protéine stimulant l'échange GDP->GTP
au niveau de ras



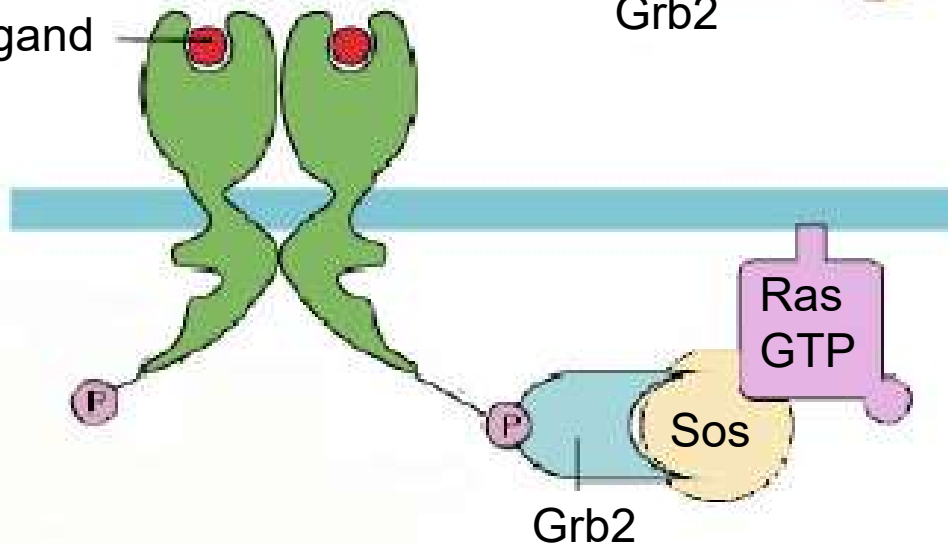
Voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) (1)

Récepteur inactif



Activation

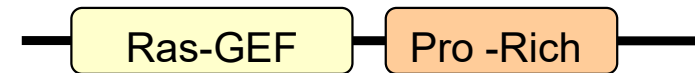
Ligand



Grb2 (growth receptor binding protein):
protéine adaptatrice



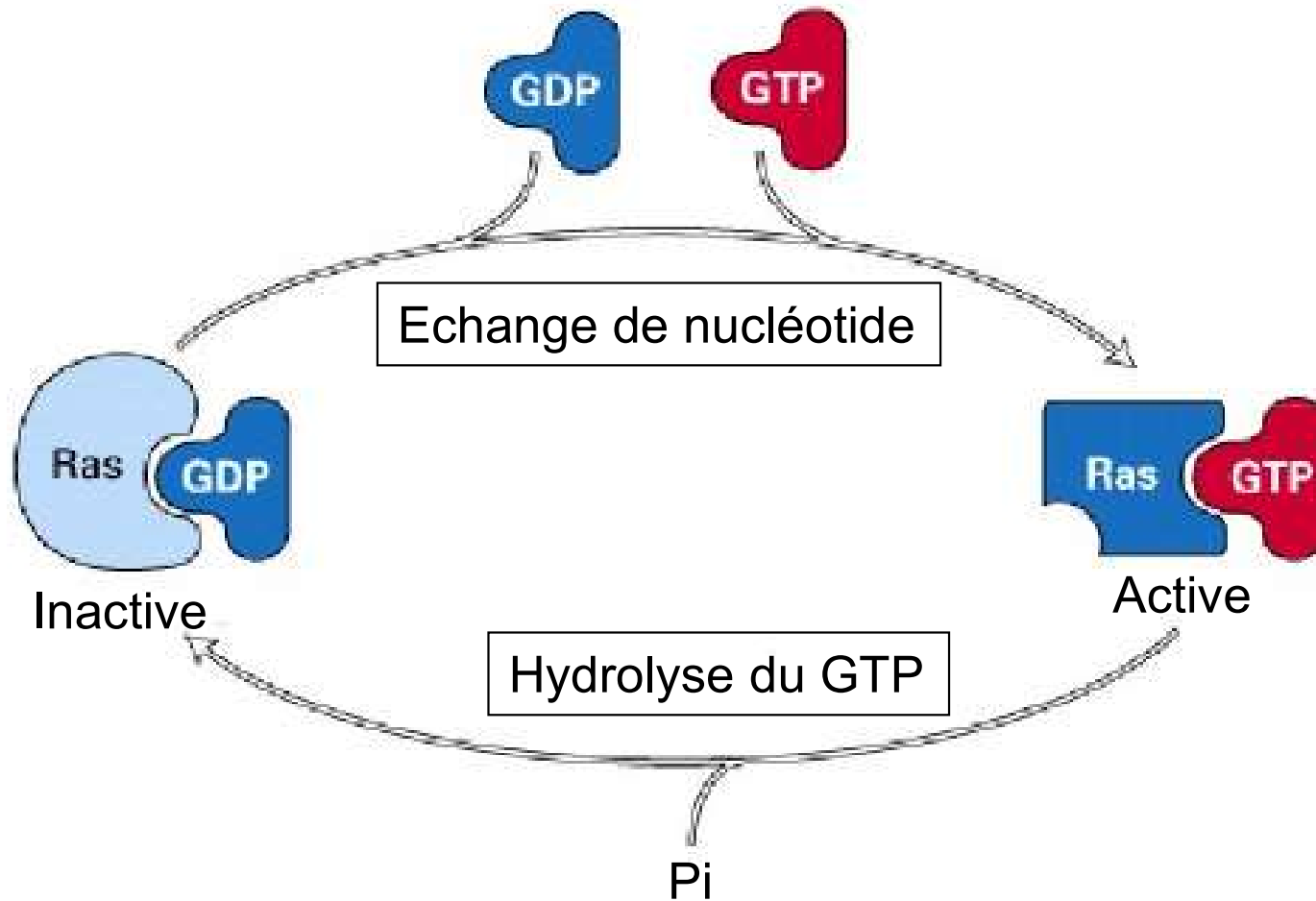
Sos (Son of Sevenless):
protéine stimulant l'échange GDP->GTP
au niveau de ras



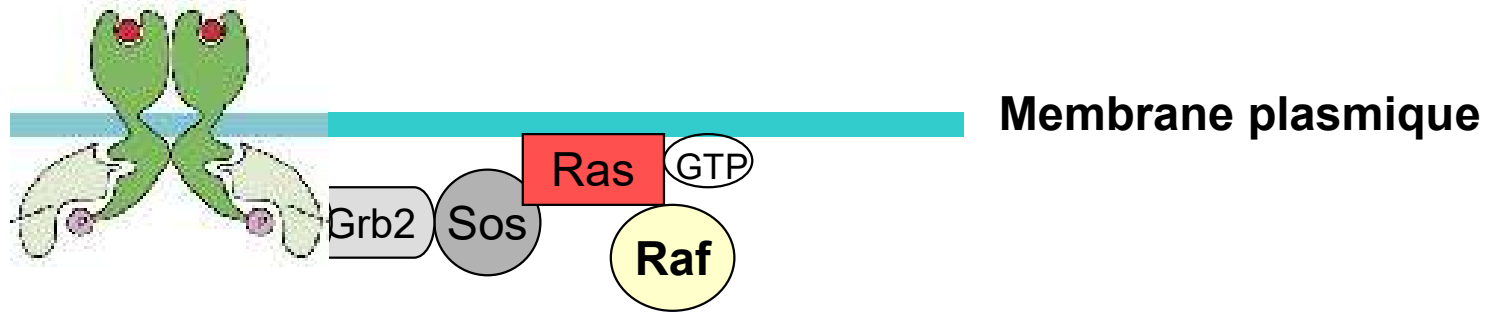
Ras: Petite protéine G monomérique

Voie des MAPK (mitogen activated protein kinase) (2):
cycle d'activation et d'inactivation de Ras

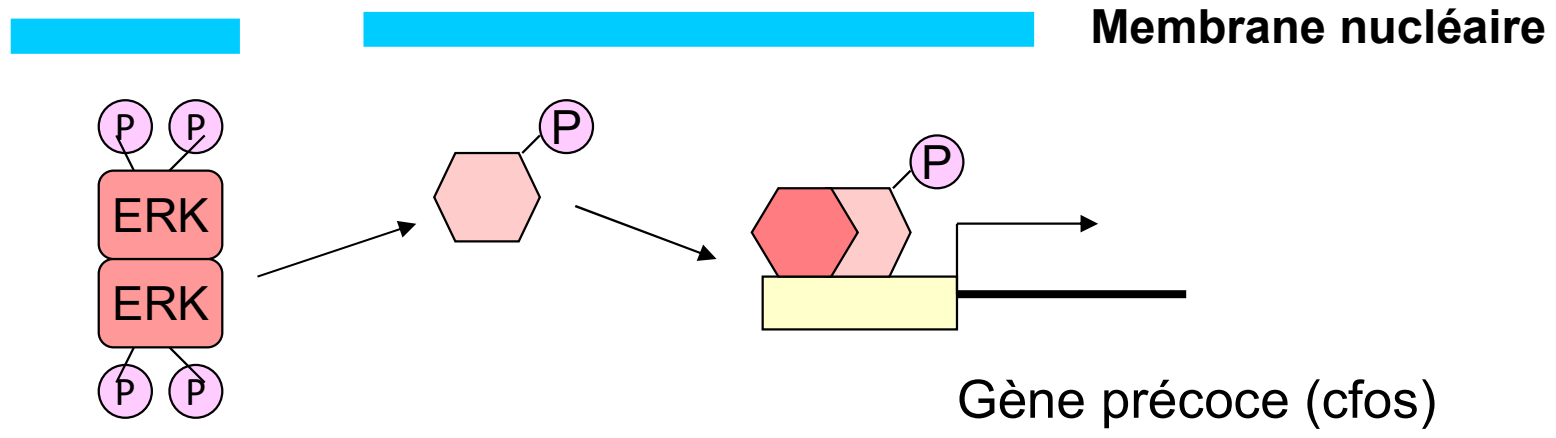
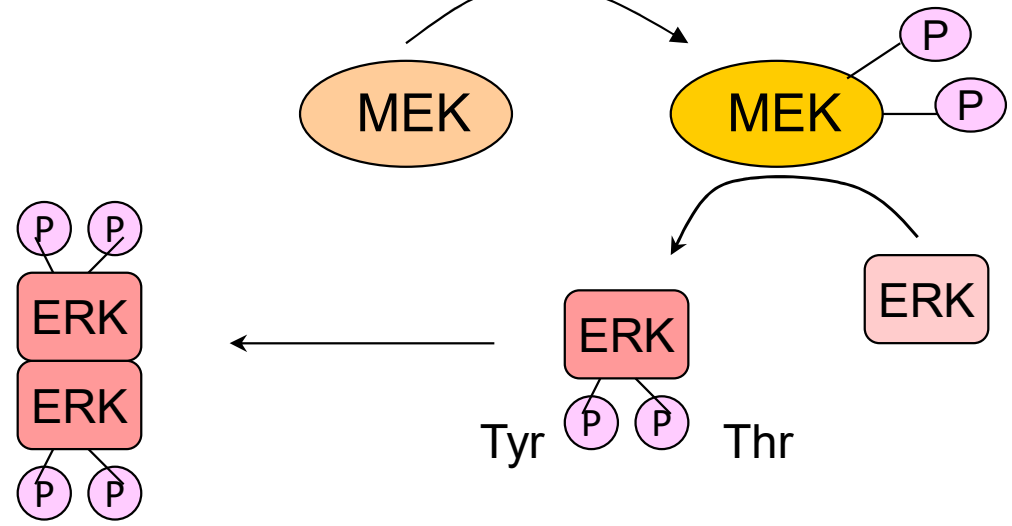
GEF: guanine nucleotide exchange factor



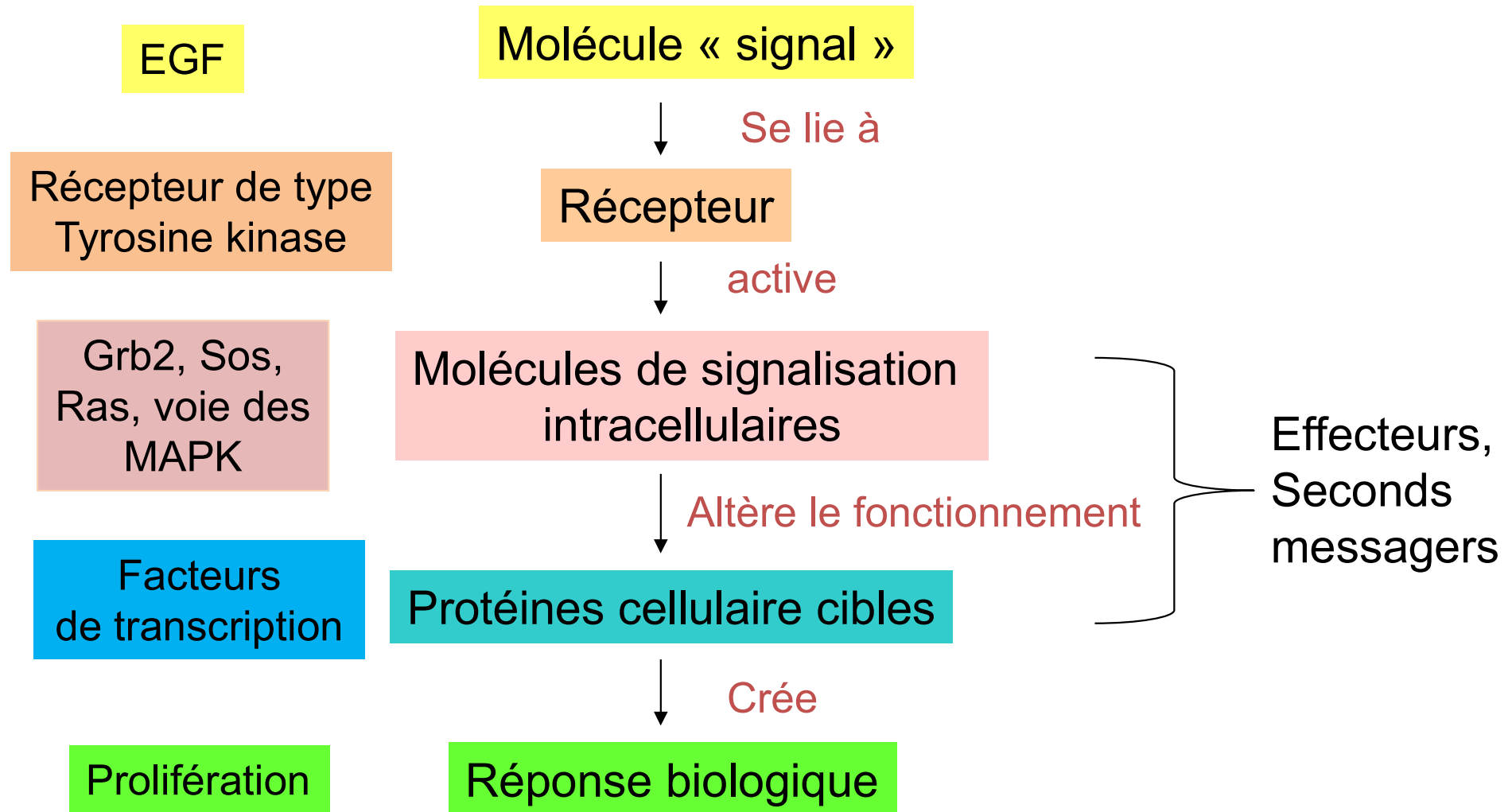
GAP: GTPase activating protein



Raf : MAPKKK
 MEK : MAPKK
 ERK : MAPK



Transformation du signal en réponse biologique: Voies de signalisation



En conclusion,

10. L'addition d'EGF au milieu de culture de cellules épithéliales provoque :

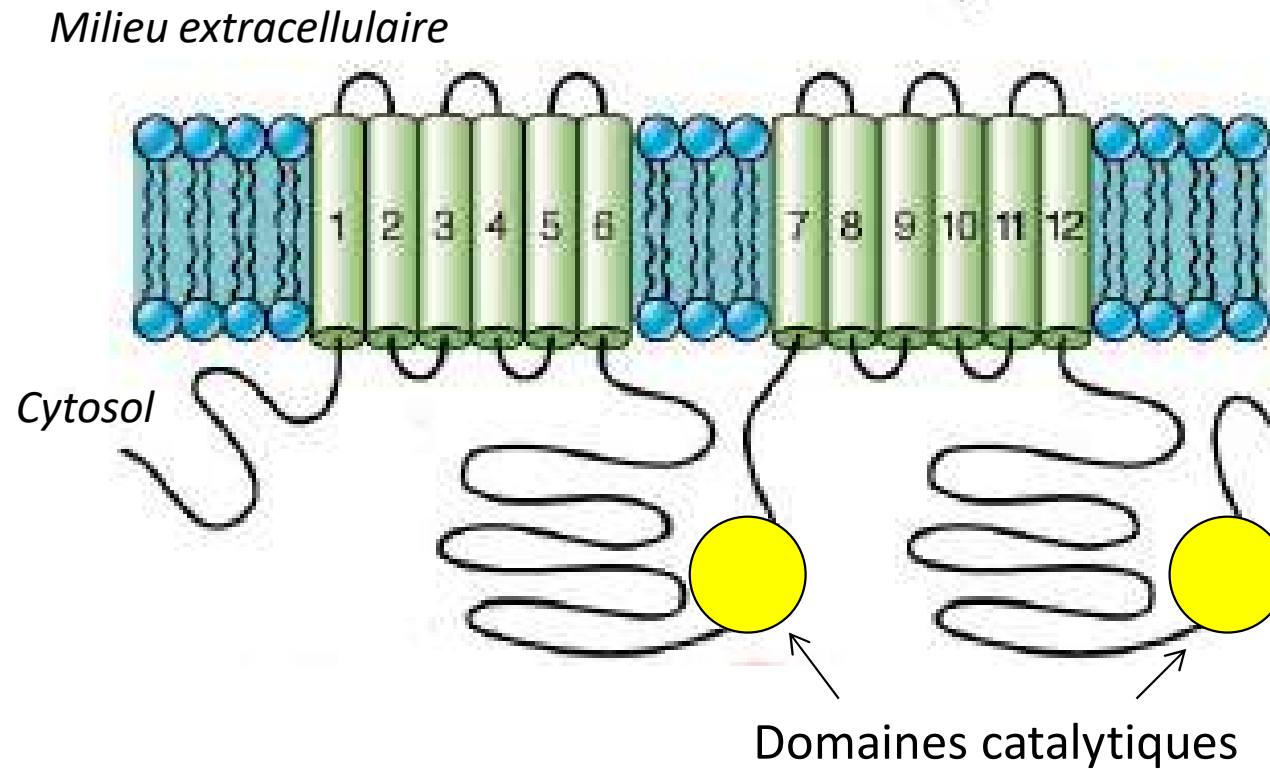
- a. La translocation d'une MAP kinase vers le noyau.
- b. l'activation d'une protéine G hétérotrimérique.
- c. Une phosphorylation des récepteurs de l'EGF sur les résidus thréonine.
- d. La liaison du récepteur de l'EGF à des protéines contenant des domaines SH2.
- e. La prolifération des cellules.

Exercice 2

Q1a. Quelle est l'action de l'adénylate cyclase ?

Q1a.

Structure et fonction de l'adénylate cyclase



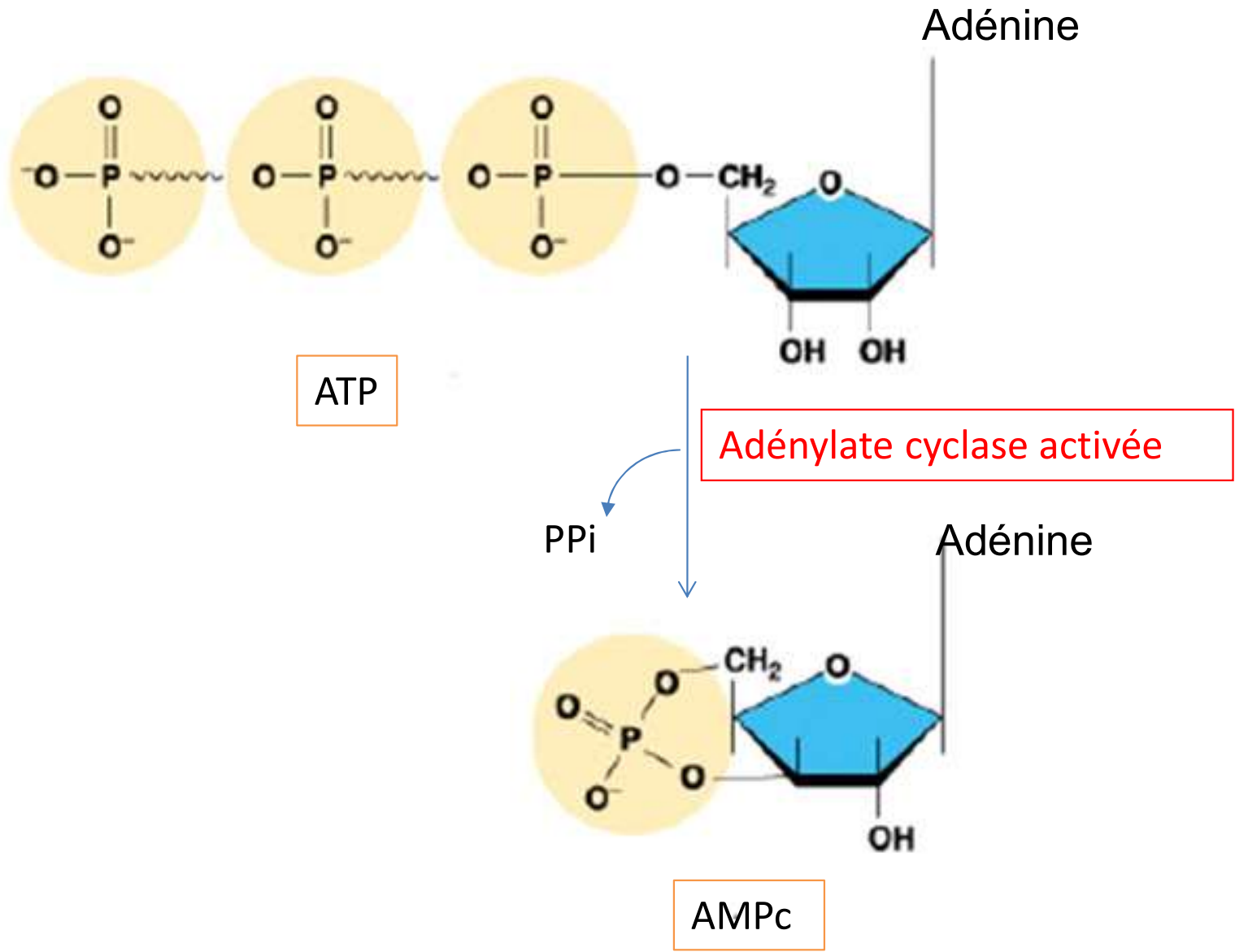
Structure:

12 segments transmembranaires
2 domaines catalytiques

Activité enzymatique:

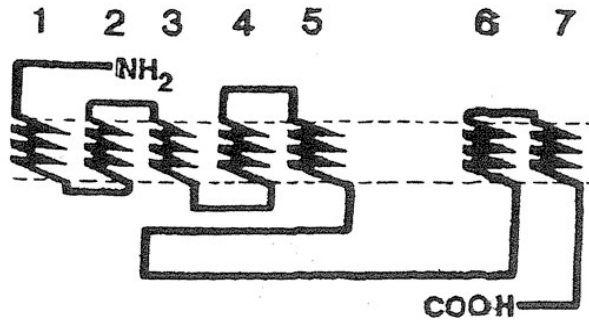
Catalyse la production d'AMPc

Synthèse de l'AMPc

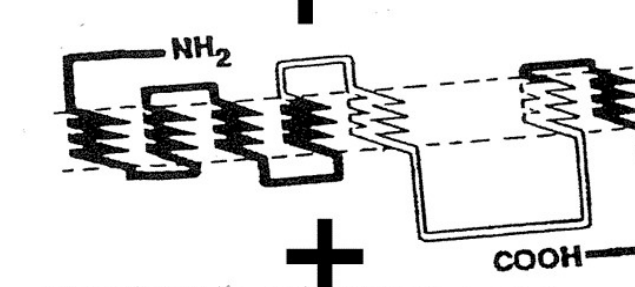
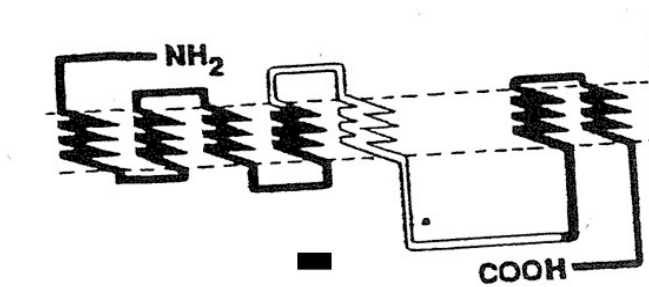
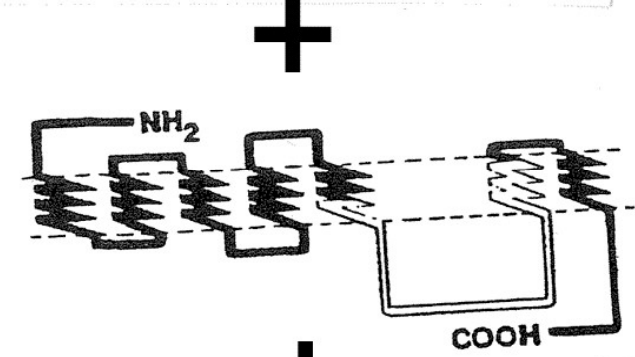
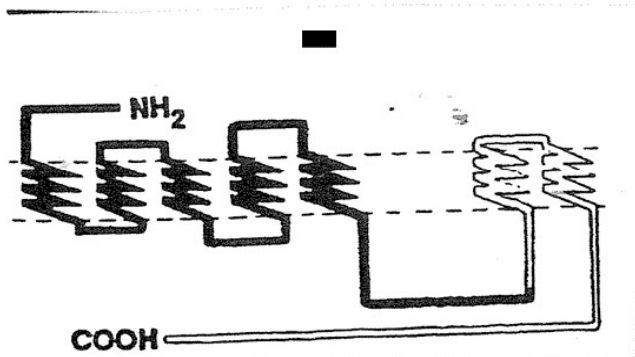
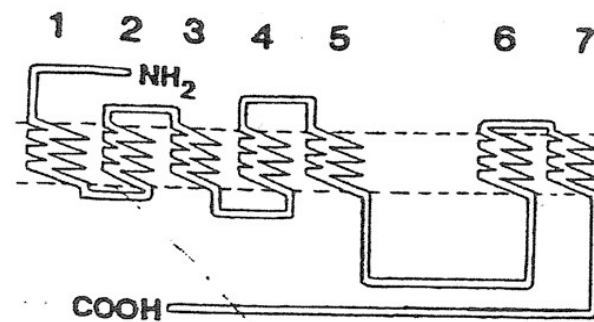


Q1b. Que déduisez-vous des résultats présentés ci-dessous

Récepteur
 α -adrénergique



Récepteur
 β -adrénergique



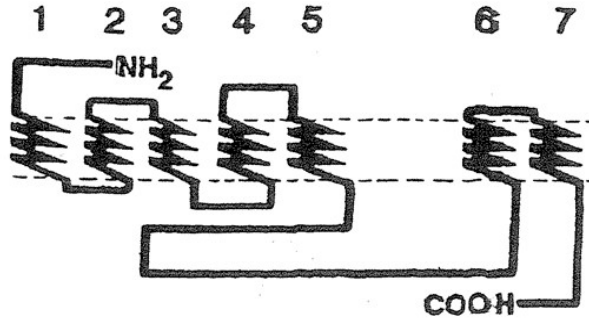
Stimule l'adénylate cyclase



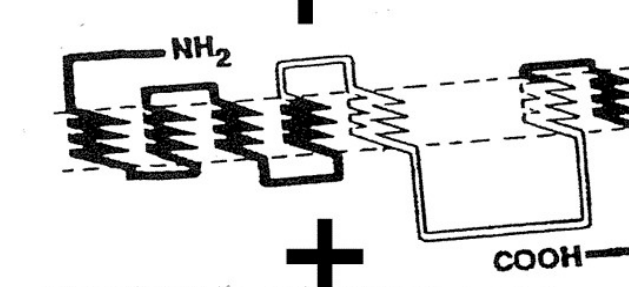
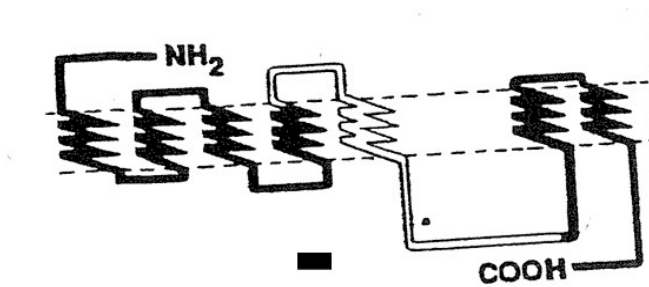
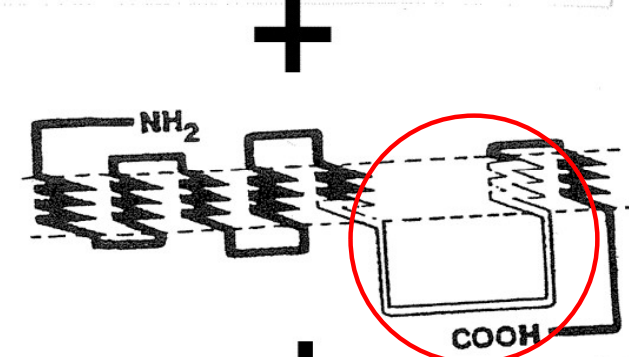
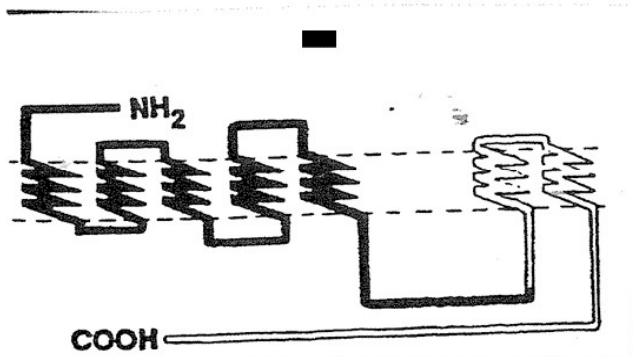
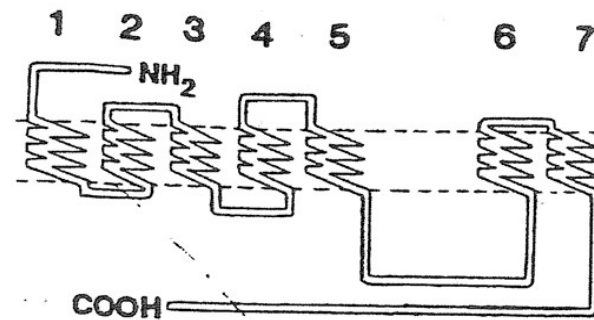
Inhibe l'adénylate cyclase

Q1b. Que déduisez-vous des résultats présentés ci-dessous

Récepteur
 α -adrénergique

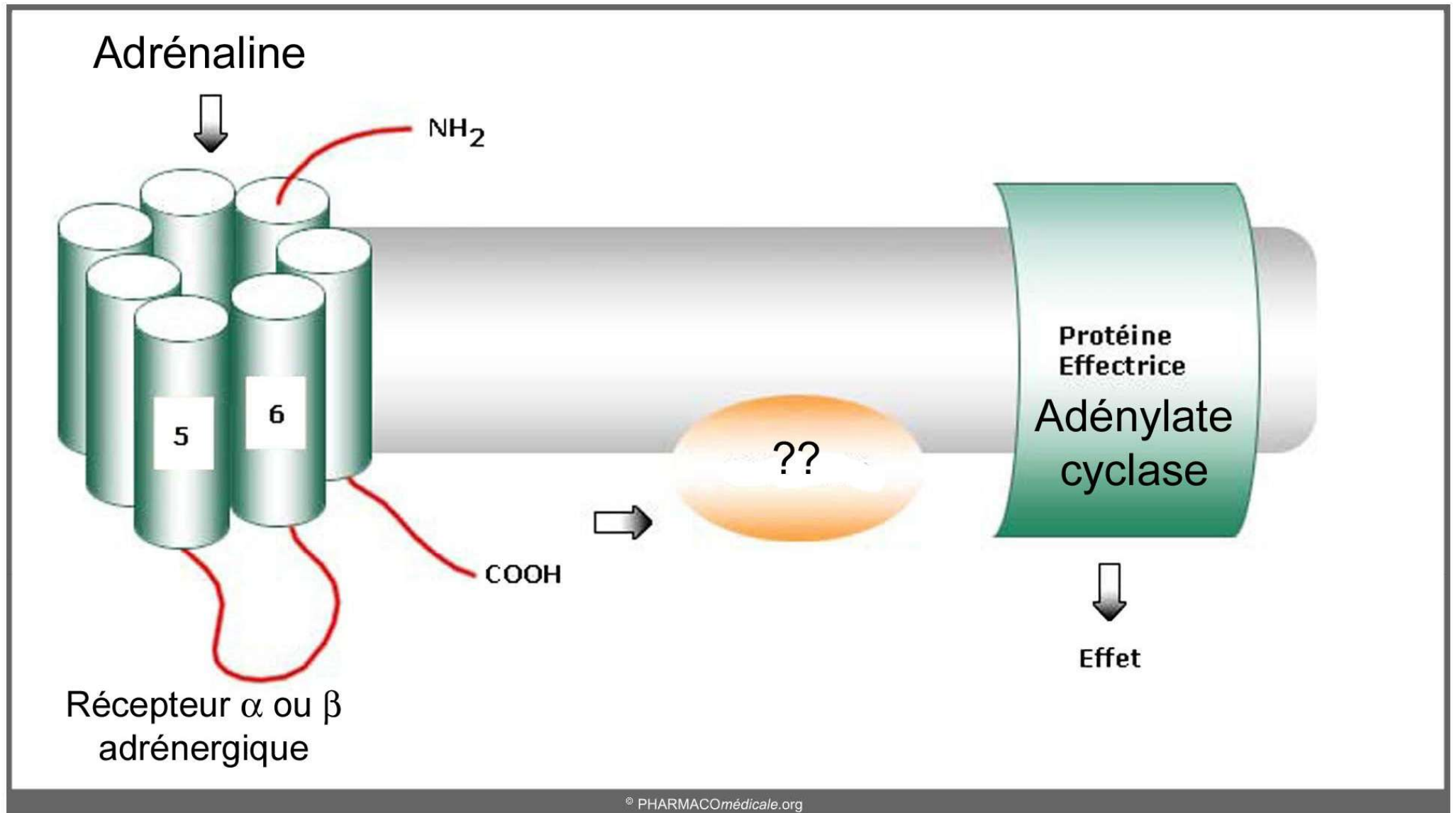


Récepteur
 β -adrénergique



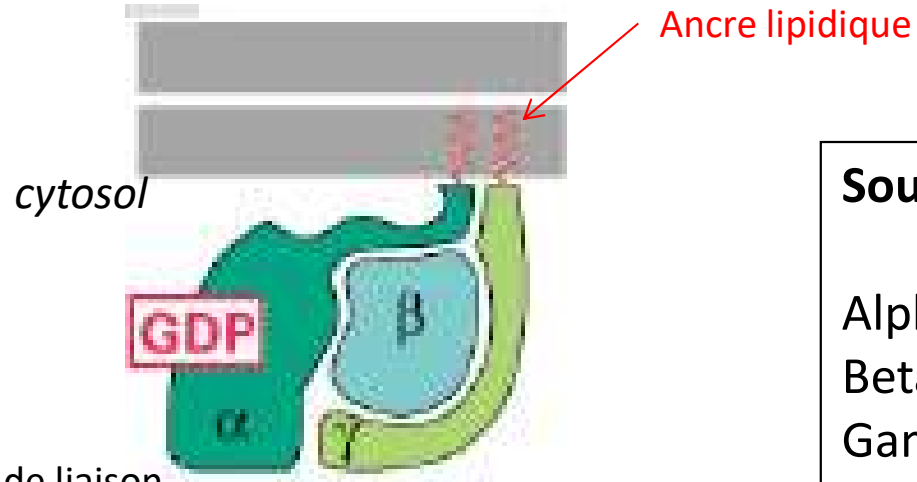
Le remplacement de la 3^{ème} boucle intra-cytoplasmique et du 6^{ème} domaine transmembranaire du récepteur α -adrénergique par la 3^{ème} boucle intra-cytoplasmique et le 6^{ème} domaine transmembranaire du récepteur β -adrénergique conduit à une chimère capable d'activer et non plus d'inhiber l'adénylate cyclase.

Q2. Quelle protéine peut se lier au récepteur β -adrénergique et aller stimuler l'adénylate cyclase ?



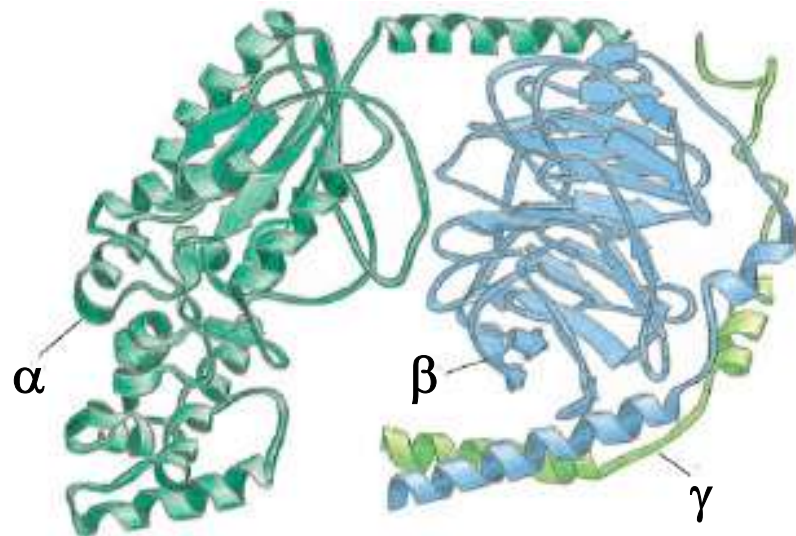
Structure et classification des protéines G hétérotrimériques

Milieu extracellulaire



Site de liaison
des nucléotides à guanine
et activité GTPase

Sous-unité	no de gènes	masse mol.
Alpha α	16	39-52 kDa
Beta β	5	36 kDa
Gamma γ	12	7-8 kDa



4 sous-familles:

(la sous-unité α donne le nom à la protéine G)

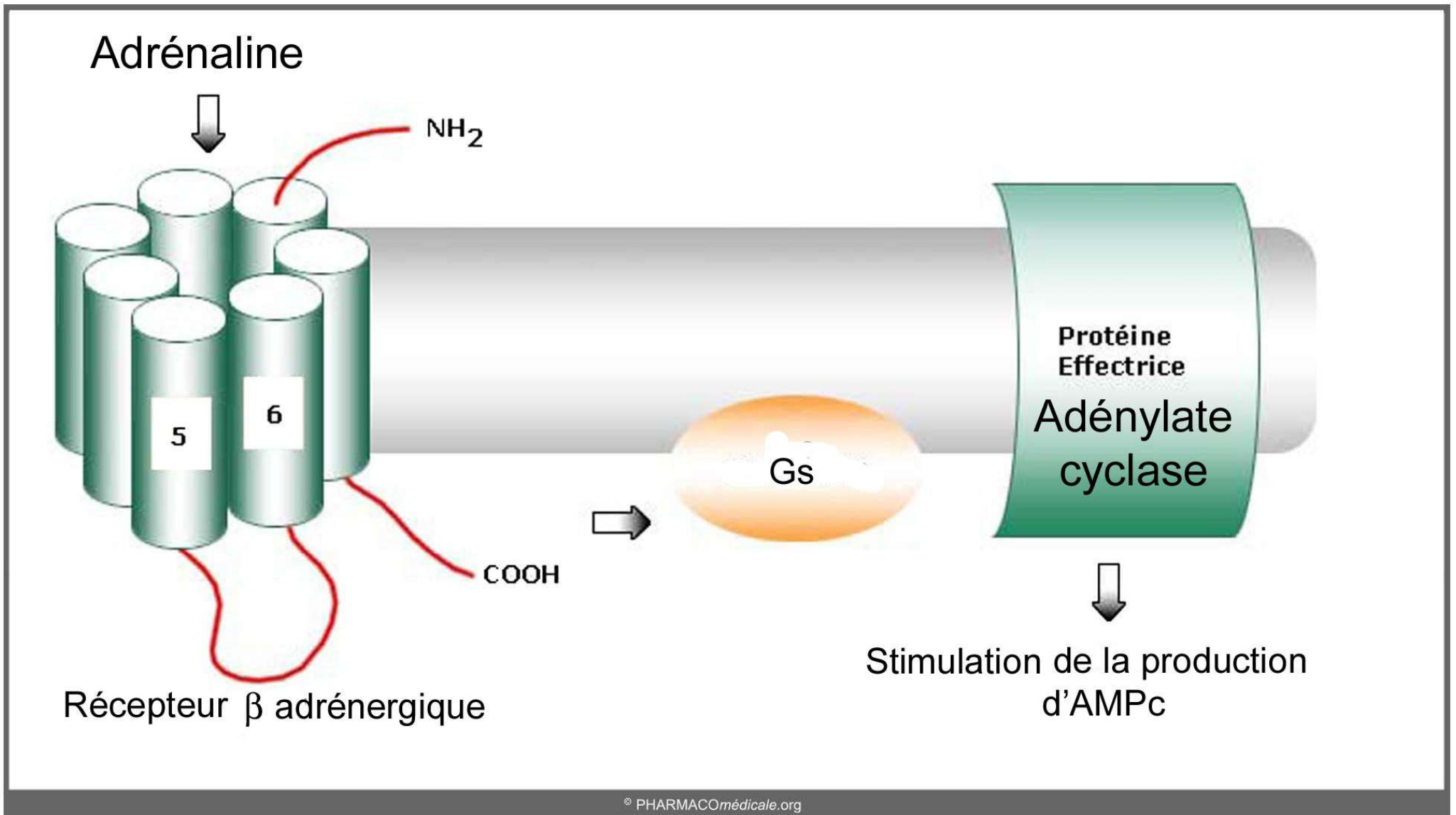
Gs : Gs, Golf

Gi : Gi1, Gi2, Gi3, Goa, Gob, Gt1, Gt2, Gz

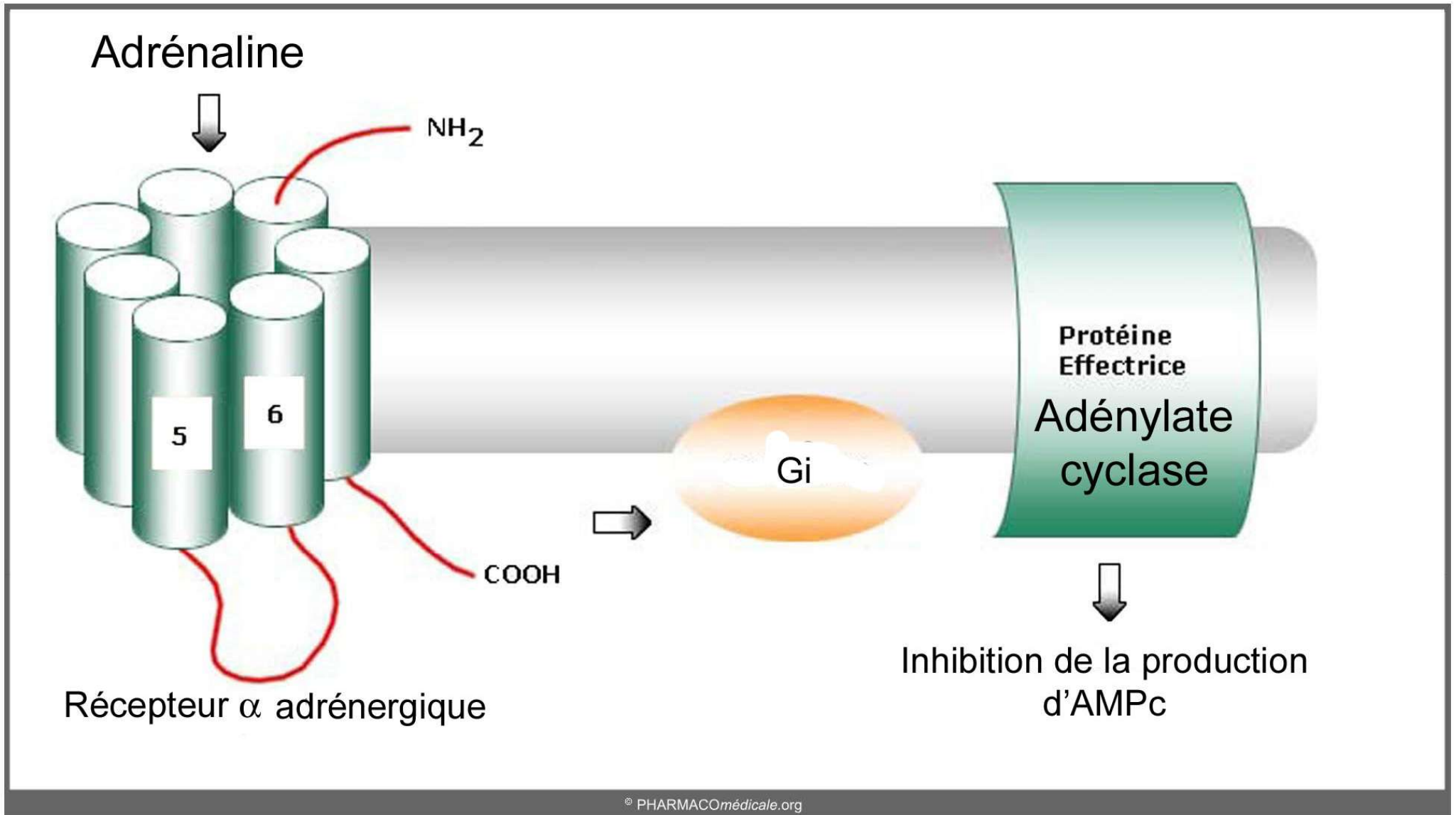
Gq/11 : Gq, G11, G14, G15, G16

G12 : G12, G13

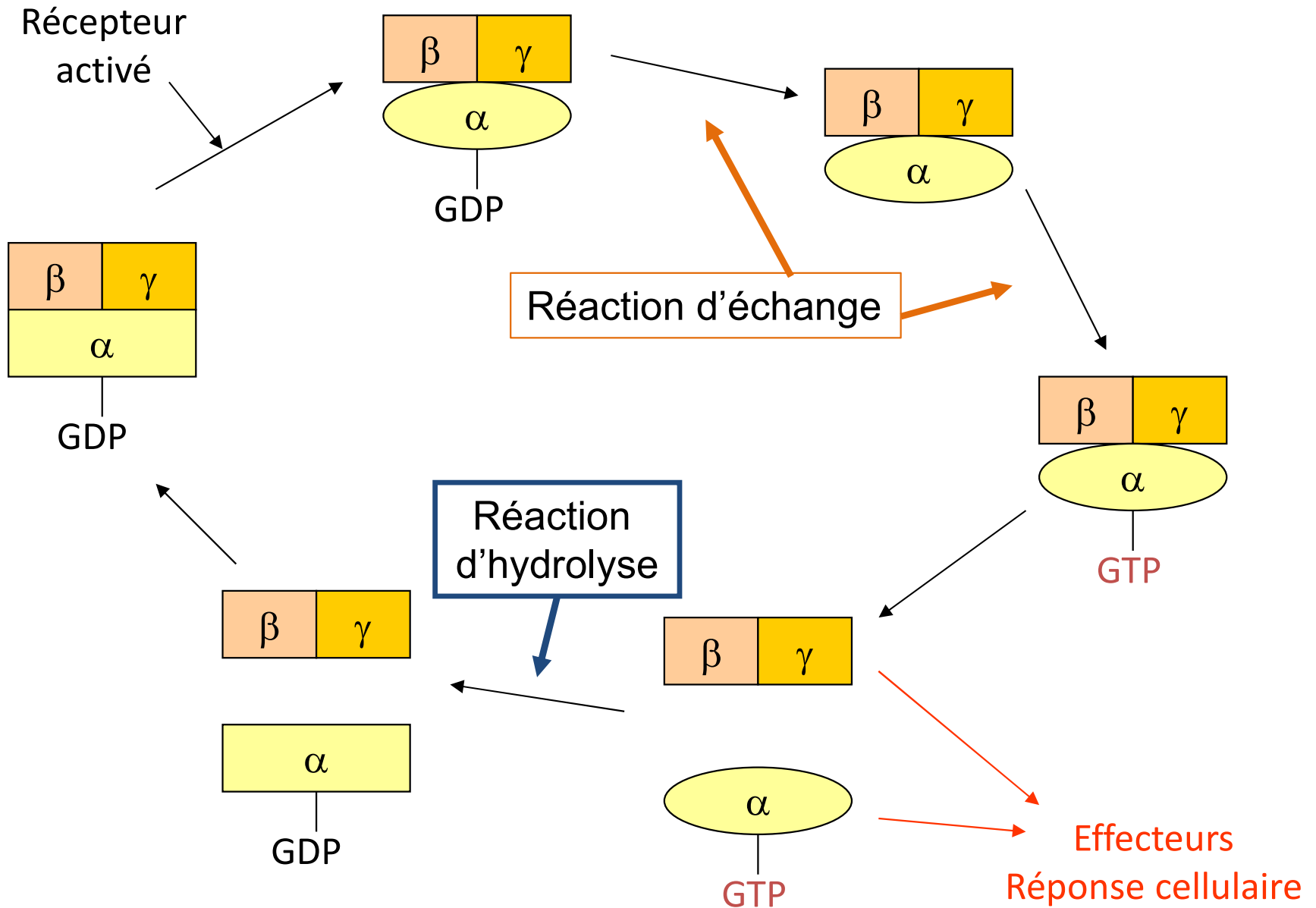
Le récepteur β -adrénergique est couplé à l'adénylate cyclase via Gs



Le récepteur α -adrénergique est couplé à l'adénylate cyclase via Gi



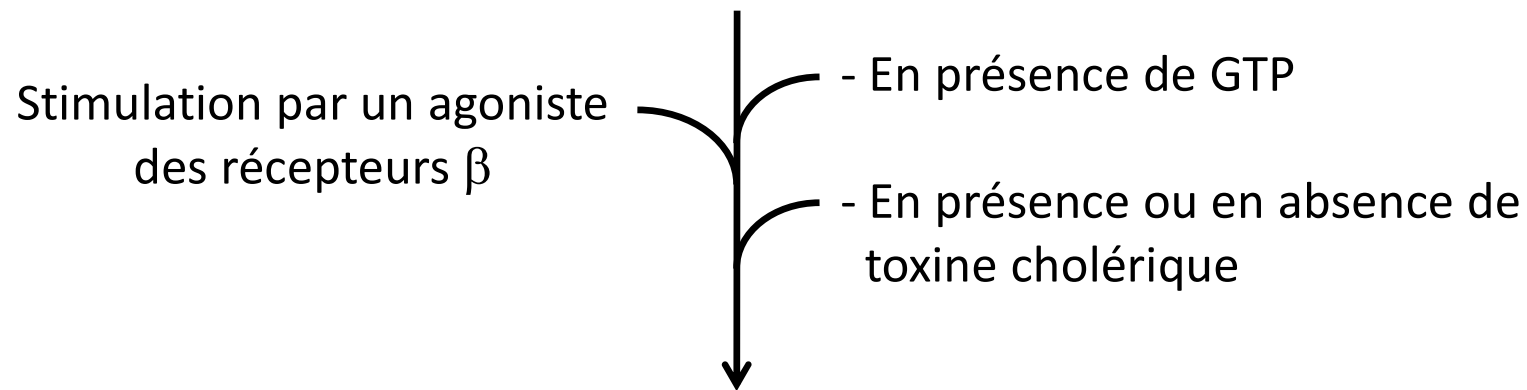
Cycle d'activation-désactivation des protéines G trimériques



La toxine cholérique est capable de se lier à la sous-unité α de la protéine Gs.
Cette liaison affecte-t-elle le fonctionnement de la protéine Gs ? Si oui, comment ?

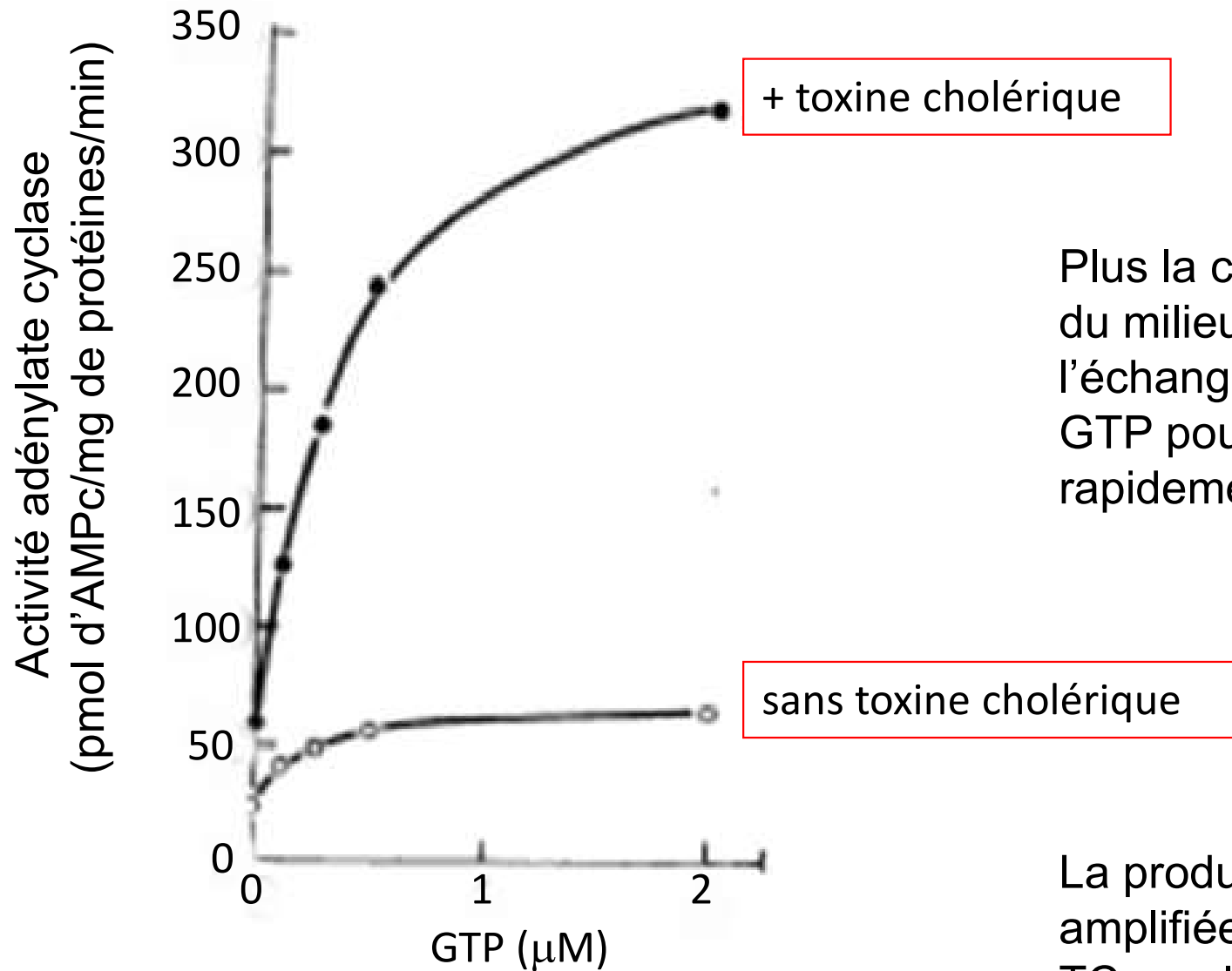
figure B: protocole expérimental

Membranes d'érythrocytes + cytosol



Mesure de la quantité d'AMPc produite

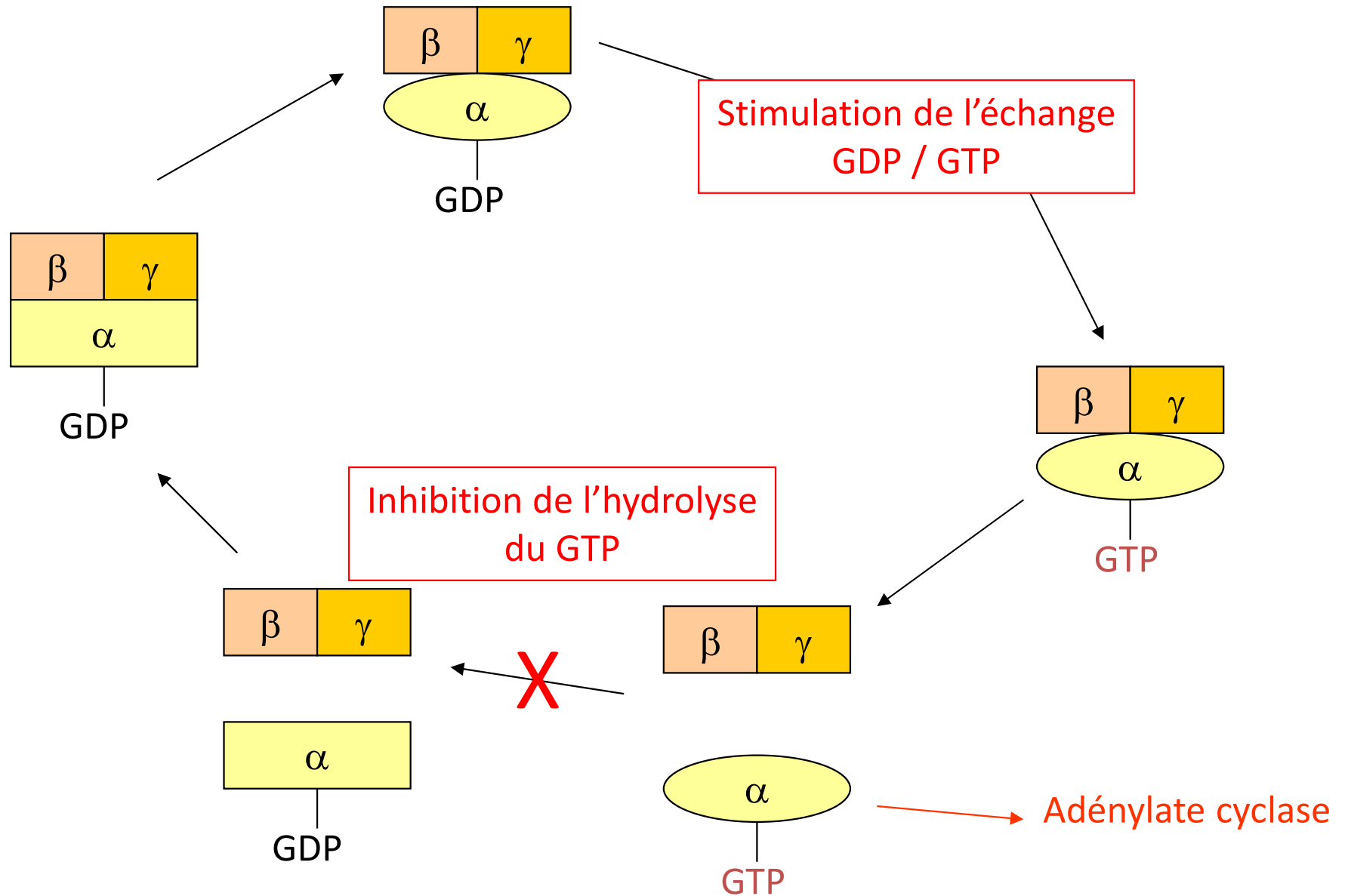
Q3. Commentez ces résultats :



Plus la concentration en GTP du milieu est élevée, plus l'échange du GDP contre du GTP pourra se faire rapidement.

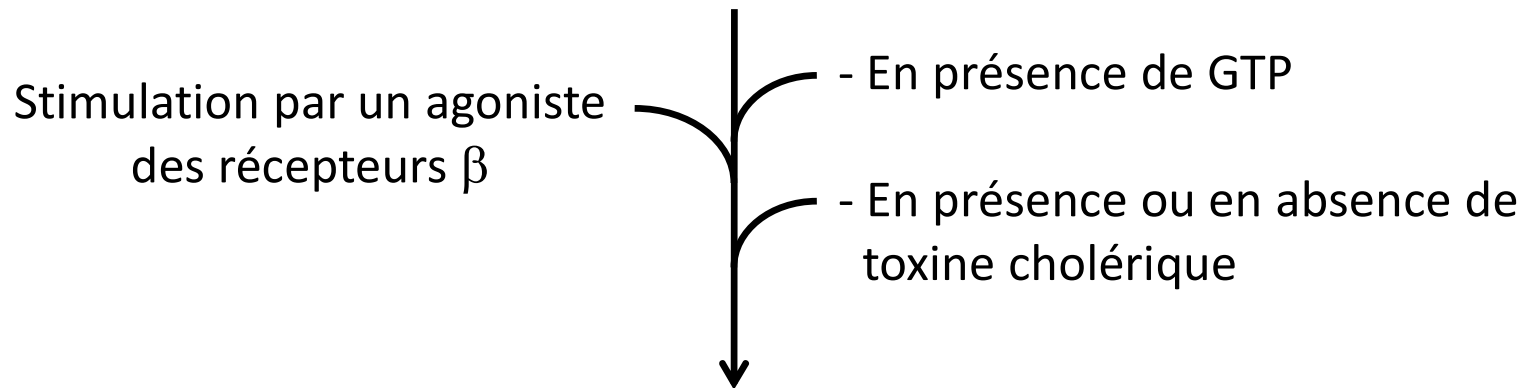
La production d'AMPc est amplifiée en présence de TC, quelle que soit la [GTP] du milieu.

Sites d'action possibles de la toxine cholérique?



Exercice 3, figure C: protocole expérimental

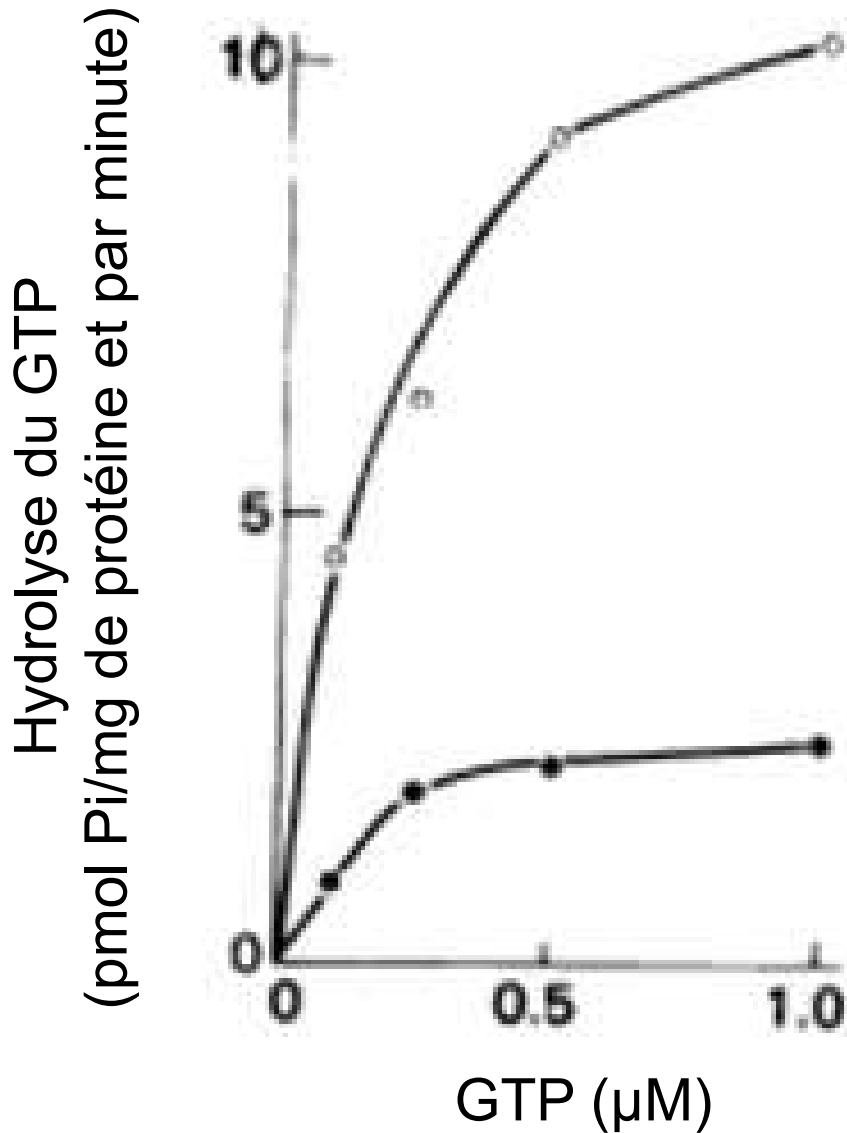
Membranes d'érythrocytes + cytosol



Mesure de l'hydrolyse du GTP

Q4a. Cette expérience permet de déterminer si l'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase est liée à une activation plus rapide de Gs (du fait d'une accélération de la vitesse d'échange du GDP contre du GTP) ou à une inhibition de la désactivation de Gs (du fait d'une inhibition de l'activité GTPasique de la sous-unité α_s).

Figure C



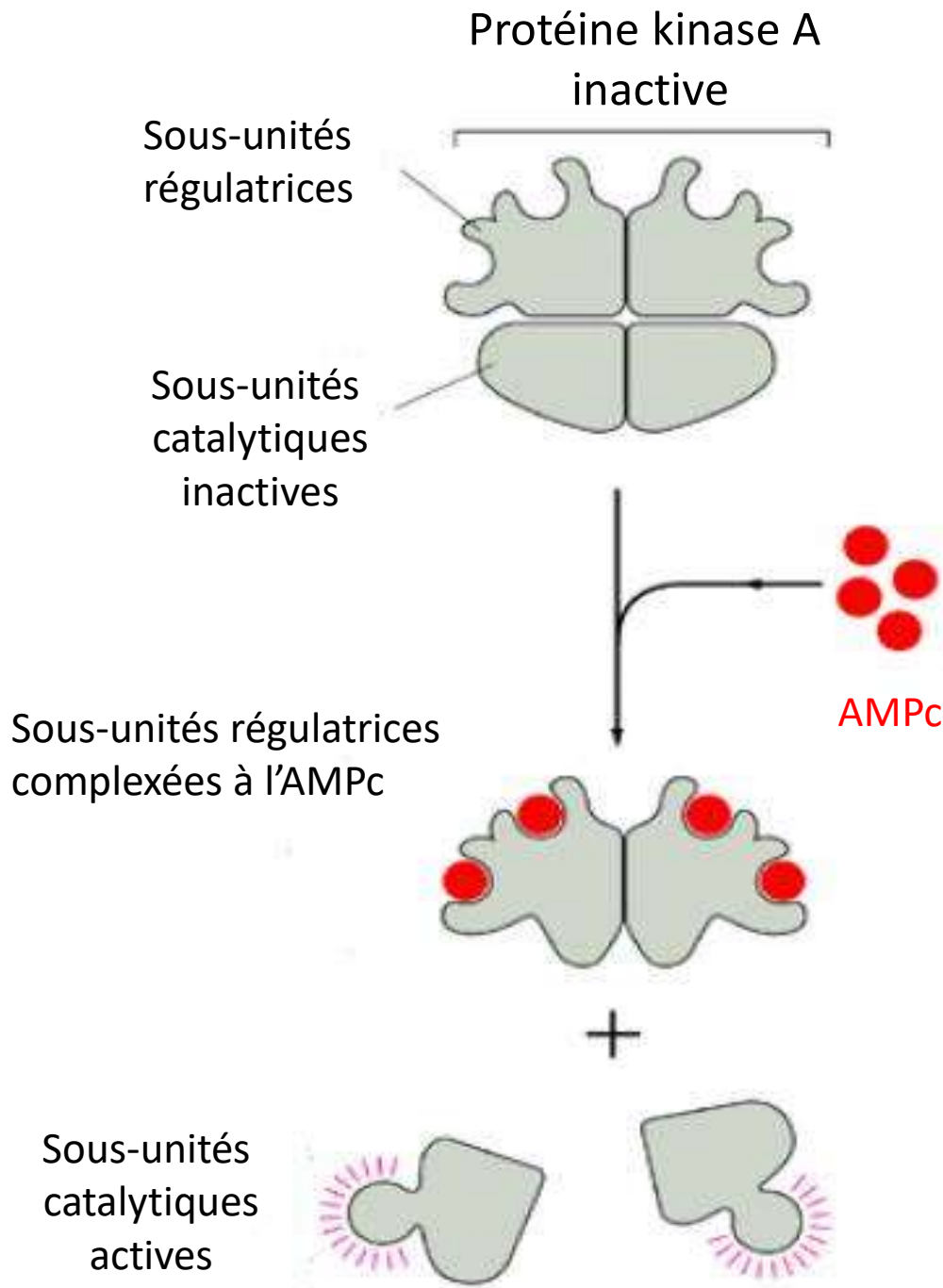
sans toxine cholérique

Q4b. En présence de toxine cholérique, la vitesse d'hydrolyse du GTP est diminuée quelle que soit la [GTP] du milieu.

avec toxine cholérique

Q5. La TC empêche donc probablement la désactivation de αs en inhibant son activité GTPasique

Q6. Protéine Kinase A



Activité enzymatique:
Sérine/thréonine kinase

Cibles:
CREB (facteur de transcription)
Rho (petite protéine G)
Glycogène synthase
Etc, etc...

Activités cellulaires régulées par la PKA:
Expression de gènes
Trafic intracellulaire
Migration
Métabolisme