

2019-2020

Université 8 Mai 1945 - GUELMA

Département de Biologie

Semestre 06

3^{ème} année Licence : Biologie Moléculaire

Module : Signalisation et Régulation de l'Activité Génique

Chapitre : III

Bases moléculaires de signalisation par les récepteurs Tyrosine Kinase

1 INTRODUCTION

2 MÉCANISMES D'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS TYROSINE KINASE (RTK)

2.1 La structure des RTK

2.2 Activation des RTKs

2.2.1 Fixation de ligand

2.2.2 Dimérisation des récepteurs

2.2.3 Autophosphorylation des tyrosines

3 ACTIVATION DE LA CASCADE DES MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAP KINASES)

3.1 Facteurs de transcription activés par les MAP Kinases : AP1 (Activator Protein-1)

3.1.1 Le complexe AP-1

4 ACTIVATION DE LA VOIE DE LA PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE (PI3K)

4.1 Activité lipide Kinase de la PI3K

4.2 Classes de la PI3K

4.2.1 Les Phosphoinositides 3 kinases de classe I

4.2.1.1 Classe IA

4.2.1.2 Classe IB

4.2.2 Définition et structure de la PI3K de classe Ia

4.2.2.1 Sous-unité catalytique P110

4.2.2.2 Sous-unité régulatrice P85

4.2.2.3 Rôle des sous unités de la PI3K

4.3 Mécanisme d'activation des PI3K par les RTK

4.3.1 Activation directs « la voie PI3K/AKT »

4.3.1.1 Activation de la protéine Akt (PKB)

4.3.1.1.1 Structure de Akt

4.3.1.1.2 Mécanisme d'activation de AKT

4.3.1.1.3 Recrutement de la PDK (Phosphoinositide-dependent kinase 1)

4.3.2 Activation par la protéine adaptatrice IRS (Insulin receptor substrat 1)

4.3.2.1 Récepteur de l'insuline (Insulin Receptor « IR »)

4.3.2.2 Les protéines IRS

4.3.2.3 Les molécules IRS sont à la base de la première voie de signalisation intracellulaire de l'insuline

4.3.2.3.1 La voie Ras/MAPK :

4.3.2.3.2 La voie PI3K /AKT

4.3.3 Activation par la protéine Ras

4.3.3.1 Activation de la voie RAS/MAPK

1 Introduction

- A l'heure actuelle, il existe environ 58 récepteurs à activité tyrosine kinase.
- Ces récepteurs se regroupent en plusieurs familles, selon le type de ligand capable de les activer, leur fonction biologique et la séquence de leur domaine kinase :
- On dénombre 20 familles de récepteurs tyrosine kinases.
- Parmi ces différentes familles, on distingue les récepteurs aux facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR), les récepteurs à l'insuline (InsulinR), les récepteurs aux facteurs de croissance des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) (**figure 01**).

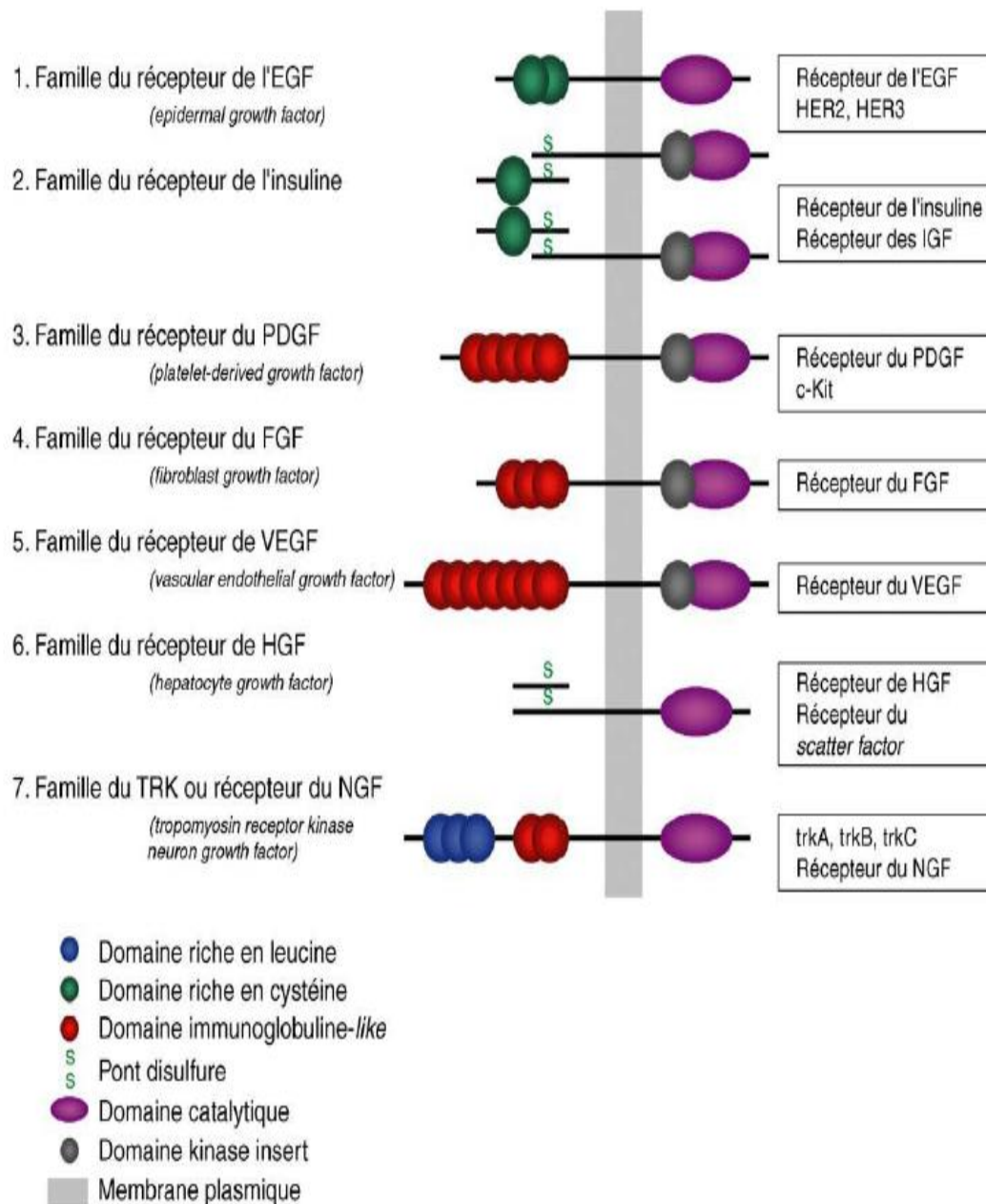


Figure 01 : Principales familles de récepteurs tyrosine kinase (RTK) : propriétés structurales, membres constitutifs.

2 Mécanismes d'activation des récepteurs Tyrosine Kinase (RTK)

2.1 La structure des RTK

- Les RTK sont généralement sous forme de monomères qui se dimérisent lorsqu'un ligand se lie au récepteur.
- Ils possèdent trois domaines très distincts : **extracellulaire**, **transmembranaire** et **intracellulaire**.

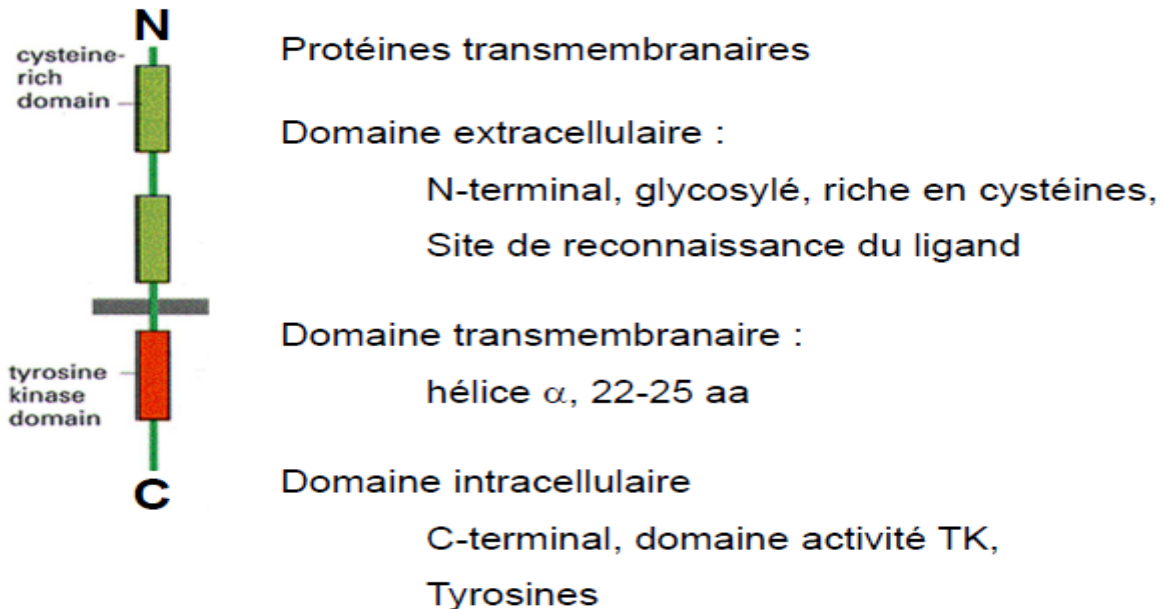


Figure 02 : Structure générale d'un récepteur Tyrosine Kinase. Dans ce cas de figure, le domaine extracellulaire est riche en cystéine « chez d'autres RTK on trouve d'autres motifs ».

- **Le domaine extracellulaire :**
 - ✓ Il est responsable de la liaison du récepteur avec son ligand.
 - ✓ Il est très différent d'une famille de récepteur à une autre, due à la spécificité de ligand que chaque famille de RTK lie.
 - ✓ De nature polypeptidique, il est constitué d'un arrangement entre des domaines semblables aux immunoglobulines ou *Ig-like*, des domaines semblables à la fibronectine III, des domaines riches en cystéines et des domaines semblables à l'EGF.
- **Le domaine transmembranaire :**
 - ✓ Il permet l'ancrage du récepteur à la membrane. Il est constitué de 25 acides aminés hydrophobes disposés de façon à former une hélice alpha (α) à un seul passage transmembranaire. Il est impliqué dans la dimérisation du récepteur.
- **La portion intracellulaire :**
 - ✓ Elle comprend une région **juxtamembranaire**, un **domaine TK** et une **région carboxy-terminale** (C-terminale).
 - Le domaine **juxtamembranaire** a une taille d'environ 30 acides aminés. Il est impliqué dans la

régulation et la signalisation du récepteur, par exemple en recrutant des protéines menant à sa dégradation ou d'autres protéines de signalisation.

- Le domaine **TK** possède un site de liaison à l'ATP, nécessaire à la phosphorylation, et un site de liaison au substrat. Ce domaine TK permet le transfert du phosphate γ de l'ATP vers l'hydroxyle des tyrosines des protéines cibles (**figure 03**) et/ou du récepteur lui-même, c'est ce qu'on appelle l'**autophosphorylation**.
- La région carboxy-terminale (C-terminale) présente des tyrosines pouvant être phosphorylées par le récepteur lui-même (**autophosphorylation**) ou par d'autres kinases, qui serviront alors de sites d'ancrage à des protéines de la signalisation.

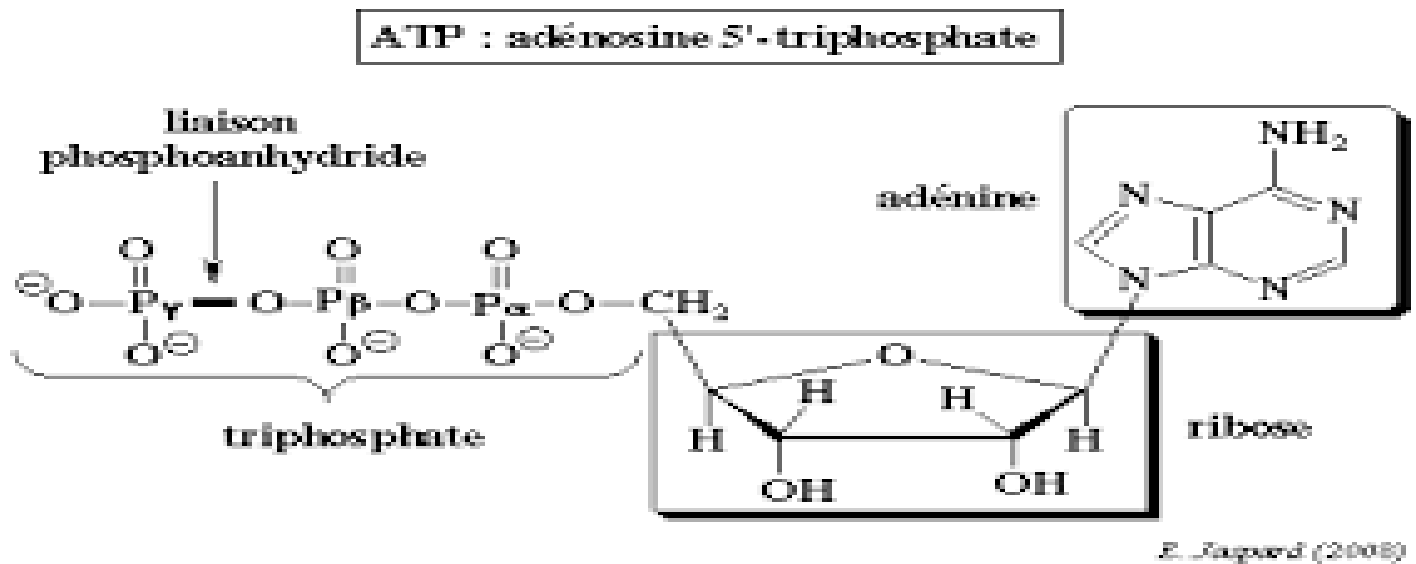


Figure 03 : Groupement Phosphate coupé par le domaine TK.

2.2 Activation des RTKs

2.2.1 Fixation de ligand

- L'élément déclencheur de l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase est **la fixation** de ligand, qui conduit à la **dimérisation non covalente** des récepteurs (**figure 04**).

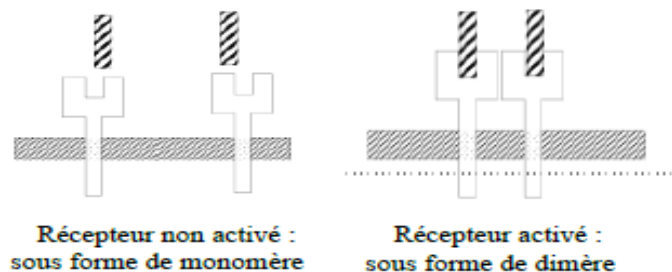


Figure 04 : Dimérisation du récepteur après fixation du ligand bivalent.

- **Remarque :** l'interaction avec le récepteur peut être médiée par un ligand bivalent ou sous forme de dimère.

2.2.2 Dimérisation des récepteurs

- La fixation du ligand au domaine extracellulaire stabilise le dimère actif : **stimulant** ainsi l'**activité tyrosine kinase**.
- La dimérisation non covalente des RTKs, induite ou stabilisée par la fixation de ligand, est le mécanisme déclencheur de l'**autophosphorylation** des tyrosines.
- Cette autophosphorylation est de 02 types :
 - L'autophosphorylation des tyrosines peut être **cis**, dans ce cas :
 - ✓ La phosphorylation des résidus tyrosine situé dans la partie cytoplasmique est effectué par le domaine kinasique de chaque monomères, du récepteur dimérisé, indépendamment l'un de l'autre (**figure 05**).
 - La **cis** autophosphorylation est probablement due à un changement conformationnel provoqué par la fixation de ligand sur le récepteur.

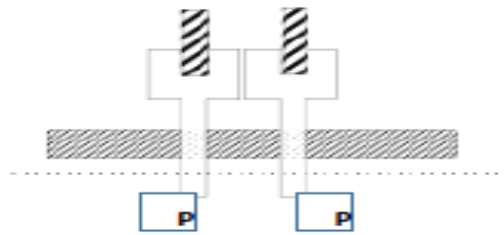


Figure 05 : Autophosphorylation des sites tyrosines situées dans la partie cytoplasmique par chacun des monomères dimérisé.

- L'autophosphorylation des tyrosines peut être **trans**, dans ce cas :
 - ✓ la phosphorylation des résidus tyrosine situés dans la partie cytoplasmique du dimère **est croisée**. C'est-à-dire, les deux monomères du récepteur dimérisé se phosphorylent de part et d'autre au niveau des tyrosines porté par chacun d'eux. (**figure 06**).
 - La **trans** autophosphorylation ne nécessite aucun changement conformationnel : le simple effet de proximité engendré par la dimérisation suffit à déclencher la phosphorylation des tyrosines.

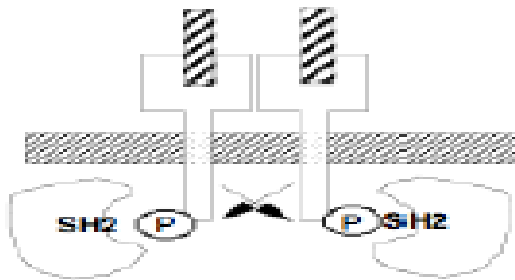


Figure 06 : Trans- autophosphorylation (entre les deux monomères) des résidus tyrosine situés dans la partie cytoplasmique du dimère et fixation des protéines de signalisation à domaine SH2 par exemple.

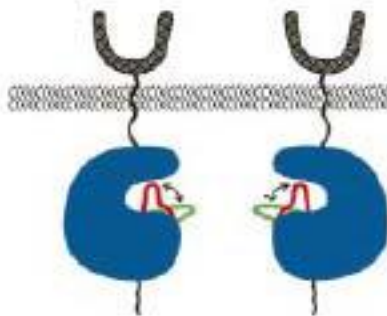
Remarque : L'autophosphorylation semble s'effectuer en général en « *trans* ».

2.2.3 Autophosphorylation des tyrosines

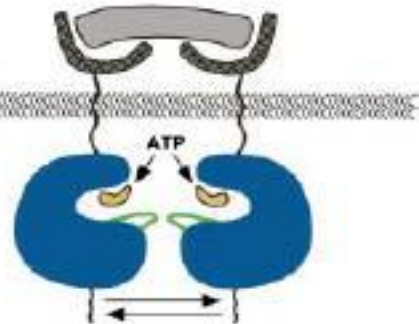
– D'après un **modèle de stimulation de l'activité** tyrosine kinase par dimérisation des récepteurs, il existe (**figure 07**) :

- Une **boucle activatrice** qui est présente dans les **domaines tyrosine kinase** cytoplasmiques.
 - ✓ Sous forme monomérique, l'accès au site actif du domaine tyrosine kinase est partiellement obstrué par la boucle activatrice.
 - ✓ En conformation fermée, cette boucle empêche la fixation du substrat **et de** l'ATP.
 - ✓ Lorsque les résidus tyrosines appartenant à la boucle sont phosphorylés par un récepteur voisin (**trans - autophosphorylation**), elle se stabilise dans une conformation ouverte laissant l'accès libre au site actif tyrosine kinase.

1. récepteur monomérique inactif



2. Trans-autophosphorylation



3. Active phosphorylated receptor dimer

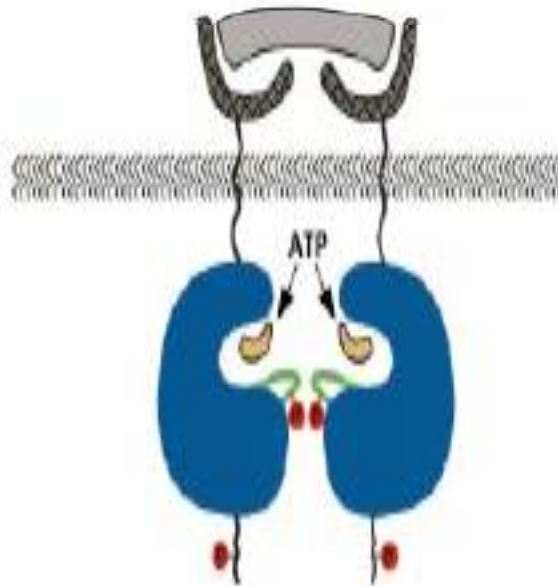


Figure 07 : La boucle activatrice des RTKs est relativement mobile et adopte de nombreuses conformations. La conformation majoritaire (verticale) interfère avec la fixation de substrat et donc empêche la fixation d'ATP. La conformation horizontale de la boucle activatrice est compatible avec la fixation d'ATP. En l'absence de ligand, la probabilité de *trans* autophosphorylation est faible. La fixation de ligand au domaine extracellulaire augmente la concentration de récepteur et permet ainsi la *trans* autophosphorylation de la boucle activatrice et déplace l'équilibre vers une conformation active permettant la fixation de substrat et d'ATP. La boucle activatrice contient entre 1 et 3 tyrosines.

3 Activation de la cascade des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP kinases)

- La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK fait partie des voies de signalisation des MAP Kinases chez les RTK.
- La protéine RAF est une MAP3K activée par la protéine RAS, qui va activée la protéine MEK (MAP2K), qui active *in fine* la MAPKinase **ERK**.
- La protéine ERK activée est alors transloquée dans le noyau où elle va activée de nombreux facteurs de transcription, comme ETS, **FOS**, **JUN**, MYC SP1, ELK1, ou une kinase de la famille MK qui induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération. L'activation de cette cascade de signalisation est représentée ci-après (**figure 08**) :

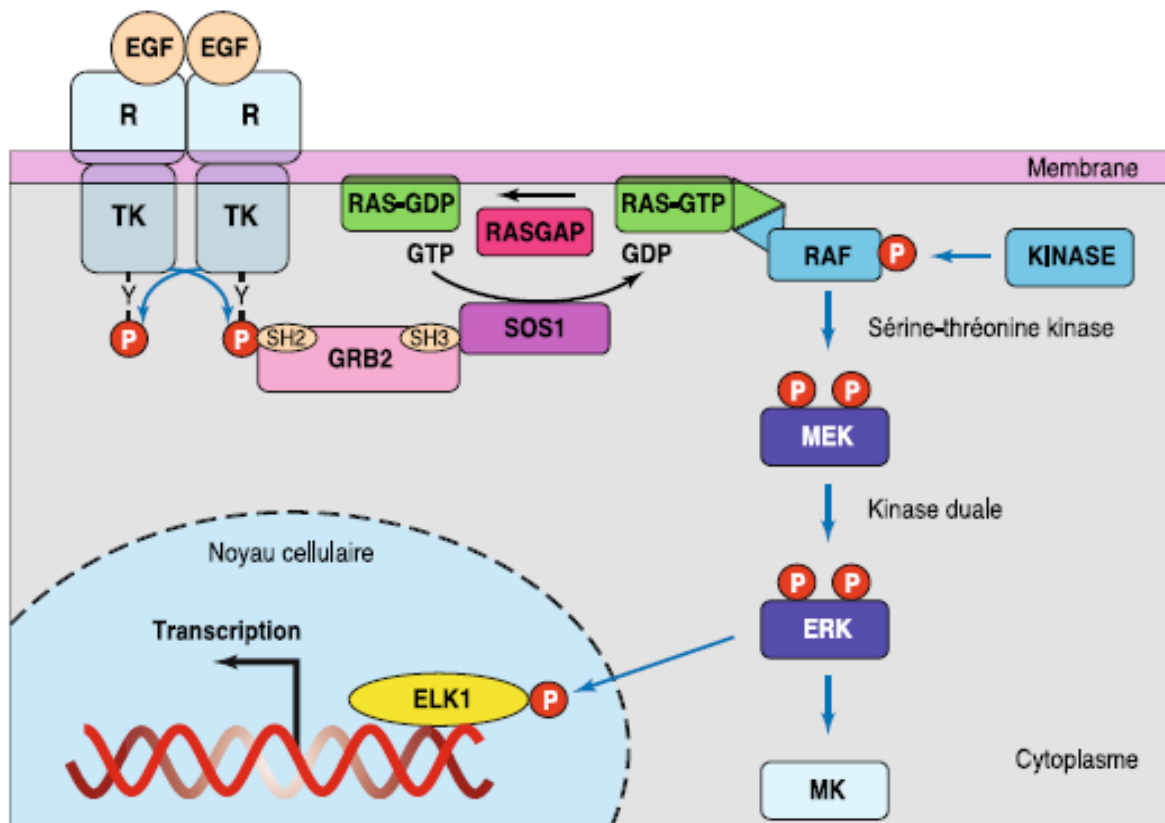


Figure 08 : Activation de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK par les RTK.

3.1 Facteurs de transcription activés par les MAP Kinases : AP1 (Activator Protein-1)

3.1.1 Le complexe AP-1

- Activator protein-1 (AP1) est un effecteur de plusieurs voies de signalisation qui est impliqué dans une multitude de processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, la réponse inflammatoire et la migration cellulaire.

– (AP-1) constitue un terme général désignant un facteur de transcription dimérique constitué de deux sous-unités appartenant aux familles : Jun (c-jun, junB, junD), Fos (c-fos, fra-1, fra-2) et ATF (*Activating transcription factor*).

– Les protéines de la famille Fos sont incapables de former des **homodimères** ou des **hétérodimères** entre eux. Par contre, les protéines de la famille Jun, peuvent former des homodimères et hétérodimères entre eux et aussi avec les membres de la famille de Fos.

– Le complexes AP-1 peuvent directement interagir avec la machinerie basale de transcription ou avec des coactivateurs pourvus d'activités susceptibles de décompacter localement la chromatine (CBP, *CREB-Binding Protein*).

– Le complexe AP-1 reconnaît une séquence spécifique **TRE** ((12-O-tétra-decanoylphorbol-13-acétate (**TPA**) Responsive Element)) sur l'ADN. AP-1 se fixe sur les séquences correspondant au palindrome consensus heptamérique **TGA(C/G) TCA**.

– Les MAP kinases ERK, ainsi que les kinases des modules JNK et p38, sont capables de phosphoryler et d'activer les éléments des complexes AP1.

Exemple : AP-1 peut aussi être induit en réponse à plusieurs stimuli différents dont des interleukines et des facteurs de croissance. Une induction à l'IL-1 conduit à l'activation de la MAP kinase 3 (MK3), ce qui active la MAPK « **Jnk** » qui a son tour active AP-1 (**figure 09**).

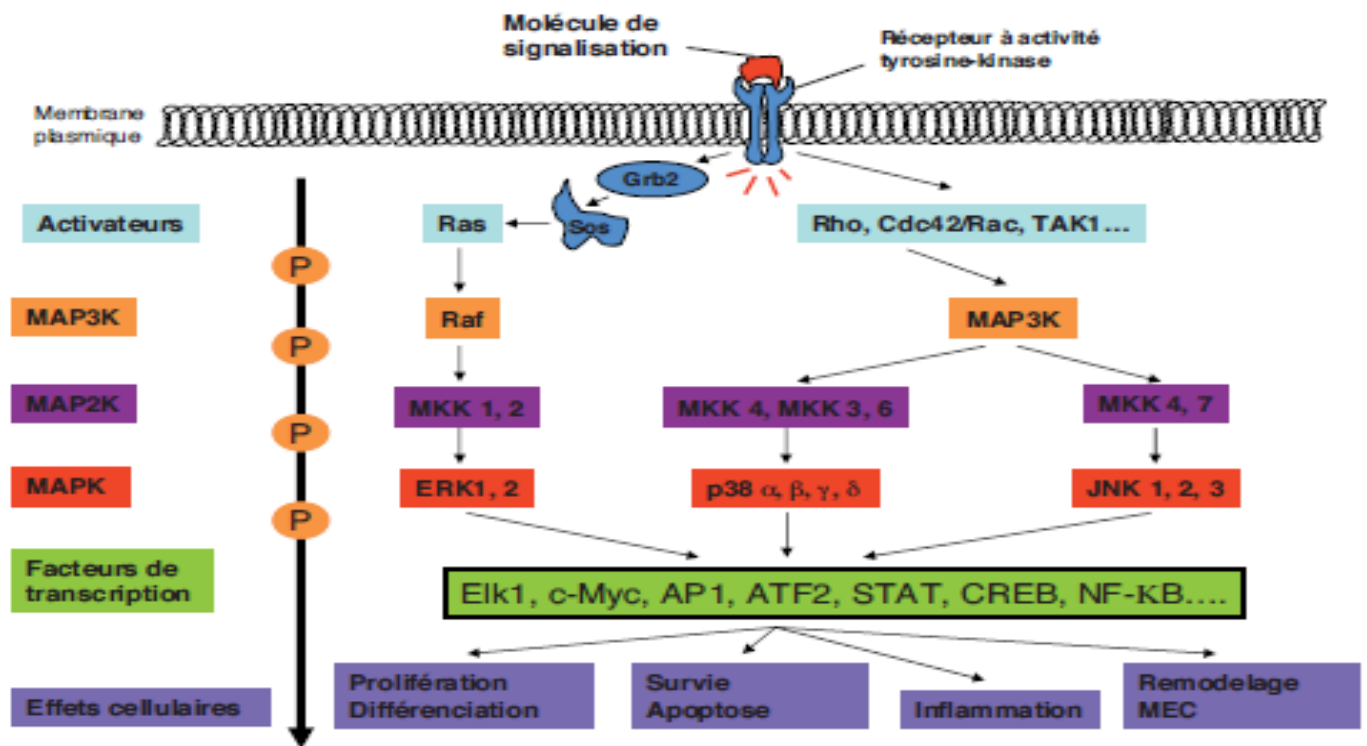


Figure 09 : Les voies des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) sont divisées en trois voies : ERK (extracellular signal-regulated kinases), p38 et JNK (C-Jun Nterminal kinases). Ces trois protéines ont plusieurs isoformes et sont les dernières protéines kinases des trois voies respectives. Chaque protéine-kinase est activée par des MAPK kinases (MKK ou MAP2K) spécifiques qui elles-mêmes sont activées par d'autres kinases, les MAPK kinase-kinases (MAP3K). Les MAP3K ont des activateurs spécifiques en fonction du signal extracellulaire initial et du type de cellule.

4 Activation de la voie de la phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

4.1 Activité lipide Kinase de la PI3K

- Les PI3-kinases sont impliquées dans les voies de signalisation régulant la prolifération, la différenciation, l'organisation du cytosquelette, la prévention de l'apoptose, le transport de glucose et le trafic vésiculaire.
- Cette kinase est capable de catalyser la phosphorylation en position 3'-OH du noyau inositol des phosphoinositides, d'où le nom qu'on l'on connaît aujourd'hui : Phosphoinositide 3 kinase ou « PI3K »
- Ses substrats comprennent le phosphatidyl inositol (PI), la phosphatidyl-4-phosphate (PI(4)P) et le phosphatidyl-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) pour donner respectivement le phosphatidylinositol-3'-phosphate (PI(3')P), le phosphatidylinositol-3', 4- bisphosphate (PI(3',4)P₂) et le phosphatidylinositol-3', 4, 5-triphosphate (PI(3', 4, 5)P₃) (**figure 10**)

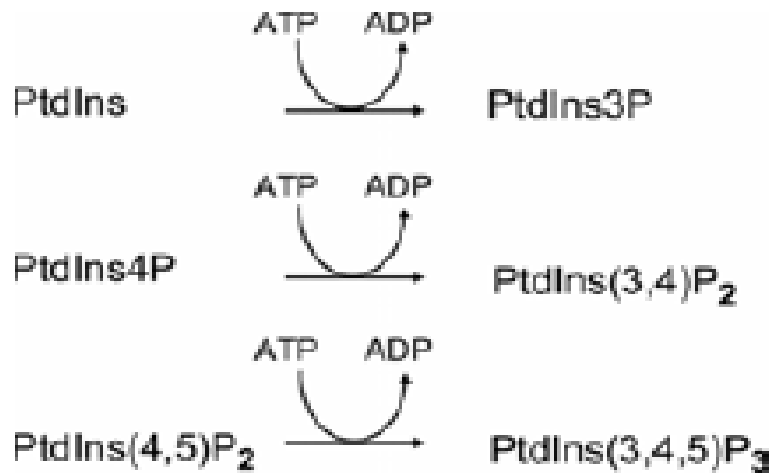


Figure 10 : Réactions catalysées par les PI3K *in vitro* : Abréviations : PtdIns : phosphatidylinositol ; PtdIns3P : phosphatidylinositol 3-phosphate ; PtdIns4P : phosphatidylinositol 4-phosphate ; PtdIns(3,4) P₂ : phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate ; PtdIns(4,5) P₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PtdIns (3, 4,5) P₃ : phosphatidylinositol 3, 4,5-trisphosphate ; ATP : adenosine triphosphate ; ADP : adenosine diphosphate.

4.2 Classes de la PI3K

- Il existe au total huit PI3K chez les mammifères, qui ont été divisées en trois classes I, II et III sur la base de leurs homologies de séquences, de leur préférence au substrat *in vitro*, de leur mode d'activation et de régulation et dans leur distribution dans les tissus.
- **Les PI3K de classe I** sont considérées comme les principales enzymes productrices de 3-phosphoinositides, leur substrat préférentiel étant le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4, 5P₂).
- Les PI3K de classe II, quant à elles, seraient un moyen alternatif de produire du PI3P dans certains contextes cellulaires d'activation des récepteurs ou lors de l'endocytose.

- Les PI3K de classe III seraient à l'origine de la formation du phosphatidylinositol 3- phosphate (PI3P) qui est particulièrement important pour le passage des protéines de la membrane plasmique vers les lysosomes et les endosomes.

4.2.1 Les PhosphoInositides 3 kinases de classe I

- Les PI3K de la classe I régulent la croissance et/ou le métabolisme.
- Les PI3Ks de classe I sont plutôt cytosoliques, elles deviennent majoritairement membranaires suite à un stimulus.
- Les PI3K de classe I sont des hétérodimères composés d'une sous-unité **catalytique** de 110 kDa (p110) associée de manière non covalente à une des différentes sous-unités **adaptatrices/régulatrices**.
- En fonction des **partenaires de régulation** et en fonction des **mécanismes d'activation**. Cette classe est subdivisée en deux sous-classes : **classe IA** et **classe IB**.
 - Les PI3-kinases de classe IA sont **activées** par des récepteurs à activité **tyrosine-kinase** *via* le recrutement de leur sous-unité régulatrice qui contient des domaines SH2 (*Src homology 2*).
 - La PI3K de classe IB est **activée** par les récepteurs couplés aux **protéines G**, par l'intermédiaire des sous-unités β/γ des protéines G heterotrimeriques.

4.2.1.1 Classe IA

- Il existe trois isoformes de sous-unités **catalytiques** dans la classe IA (P110 α , P110 β , P110 δ) qui interagissent avec les différents isoformes de sous-unités régulatrices : p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α et p50 α .
- Les sous-unités catalytiques de la PI3K présentent une double activité kinase :
 - elles phosphorylent les phosphoinositides en position D3 du cycle inositol,
 - et possèdent également une activité sérine kinase capable de phosphoryler la sous unité régulatrice p85 sur la serine 608 ainsi que la protéine IRS-1.
- Les PI3K de classe IA seraient majoritairement recrutées par la signalisation issue du récepteur de l'insuline et des protéines IRS.

4.2.1.2 Classe IB

- Cette classe n'est présente que chez les mammifères et est principalement exprimée dans les leucocytes.
- Pour ce qui est de la classe Ib de la PI3K, la seule sous unité catalytique identifiée est la P110 γ qui est associée à une sous unité régulatrice de 87 ou 101 kDa (P101 ou P87).
- Ces deux isoformes utilisent le phosphoinositide « PI » : PI(4) P ou PI(4,5) P2 pour produire principalement PI (3, 4,5) P3 dans les cellules.
- Elle est activée par les récepteurs couplés aux protéines G par l'interaction directe avec la sous-unité G $\beta\gamma$.
- Cette classe de molécules joue un rôle important dans des processus tels que les allergies, l'inflammation ou encore la contraction cardiaque.

4.2.2 Définition et structure de la PI3K de classe IA

4.2.2.1 Sous-unité catalytique P110

- Les trois isoformes P110 (P110 α , P110 β et P110 δ) contiennent depuis leur extrémité amino-terminale un domaine de liaison à P85 suivi d'un site d'interaction avec Ras (sous sa forme GTP) (**figure 11**).

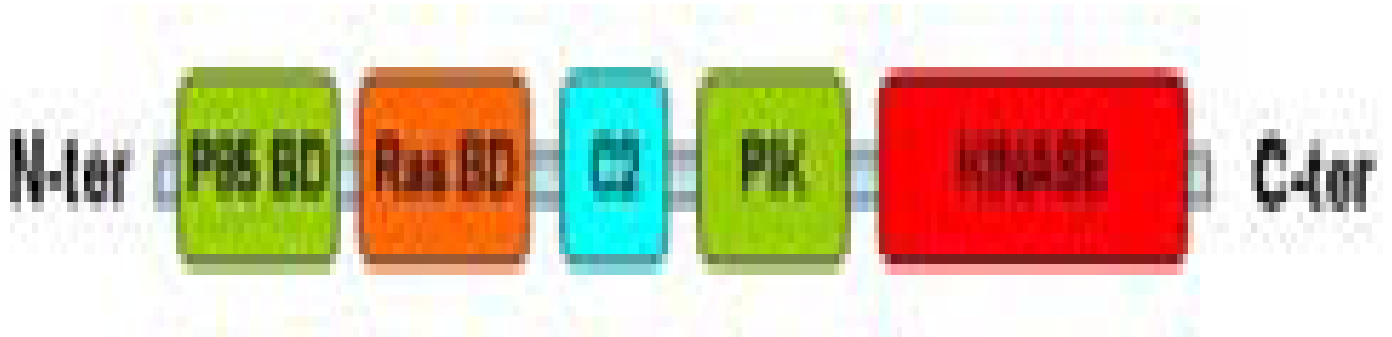


Figure 11 : Sous-unité catalytique P110 : P85 BD : domaine de liaison à P85, Ras BD : domaine de liaison à Ras, domaine C2, domaine PIK, Kinase : domaine à activité catalytique.

- On trouve ensuite un domaine C2 liant les phospholipides (de façon calcium dépendante), une région « PIK homology ».
- Enfin, le domaine catalytique est trouvé en position carboxy-terminale.
- **Remarque :** L'isoforme p110 δ se distingue des deux autres isoformes par la présence d'un domaine supplémentaire, un domaine PH situé dans la partie N-terminale de la molécule.

4.2.2.2 Sous-unité régulatrice P85

- On dénombre 5 isoformes de la sous-unité régulatrice de la PI3K : **P85 α** , P50 α , P55 α , **P85 β** et P55 γ .
- Il est fréquent de trouver le terme « P85 » utilisé comme raccourci pour nommer les sous-unités régulatrices de la PI3K de classe IA.
- Les sous-unités régulatrices (P85 α et P85 β) sont composées de multiples domaines (**figure 12**) :
 - En position amino-terminale, se trouve un domaine SH3 (Src Homology domain 3) suivi de deux boîtes riches en prolines P1 et P2 entourant un domaine nommé BH pour BCR Homology (BCR pour Breakpoint Cluster Region), qui va permettre l'interaction avec les molécules liant le GTP telles que RAS.
 - Du côté carboxy terminal, on trouve deux domaines SH2 (Src Homology domain 2) qui ceinturent le domaine inter-SH2 (i-SH2).
 - Le domaine iSH2, domaine super enroulé (coiled-coiled), se lie au domaine RBD de la P110 α .

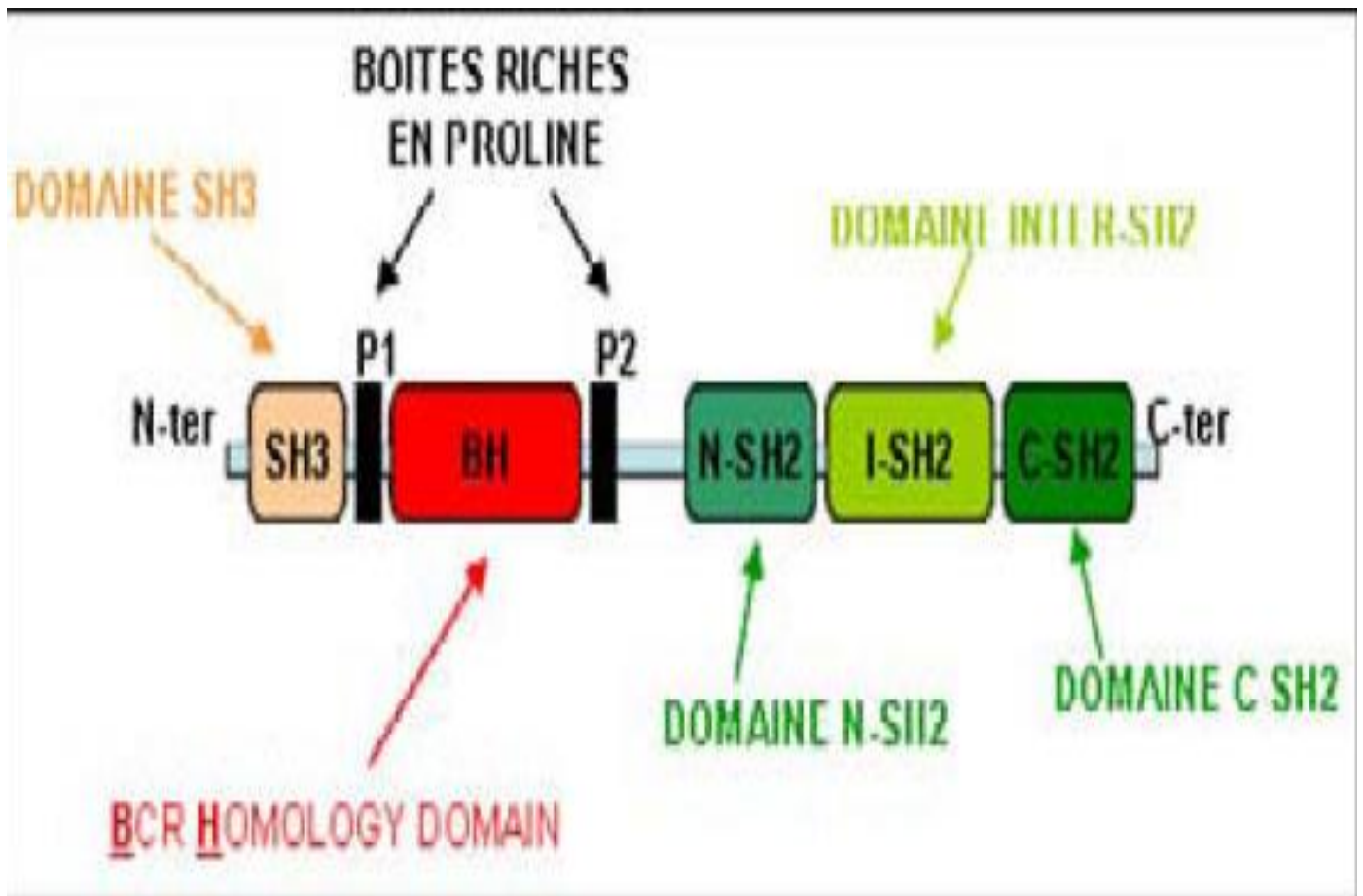


Figure 12 : Description de P85, sous-unité régulatrice de la PI3K de classe IA.

4.2.2.3 Rôle des sous unités de la PI3K

– La régulation de la PI3K de classe IA passe par la sous-unité régulatrice, celle-ci va permettre la relocalisation du complexe à la membrane à proximité de ses substrats :

- Par l'intermédiaire de ses domaines SH2 la sous-unité régulatrice va se lier aux tyrosines phosphorylées, qui sont incluses dans les motifs YXXM qui se trouvent soit sur le récepteur ou soit sur une protéine adaptatrice.
- Cette première étape permet donc le recrutement de la PI3K à proximité de ses substrats à la membrane plasmique et l'augmentation de son activité par changement conformationnel permettant sûrement l'éloignement de p110 des domaines inhibiteurs SH3 et BCR de p85.

4.3 Mécanisme d'activation des PI3K par les RTK

4.3.1 Activation directs « la voie PI3K/AKT »

- La PI3K est et un effecteur direct des RTK (c'est la voie PI3K/AKT) (**figure 13**) :
- Après activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase par exemple : un facteur de croissance GF, la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase, dotée d'un domaine SH2, se lie à une tyrosine phosphate du récepteur.
- La sous-unité catalytique de la PI3 kinase, p110, ainsi activée réalise alors la phosphorylation du PIP2 en PIP3.

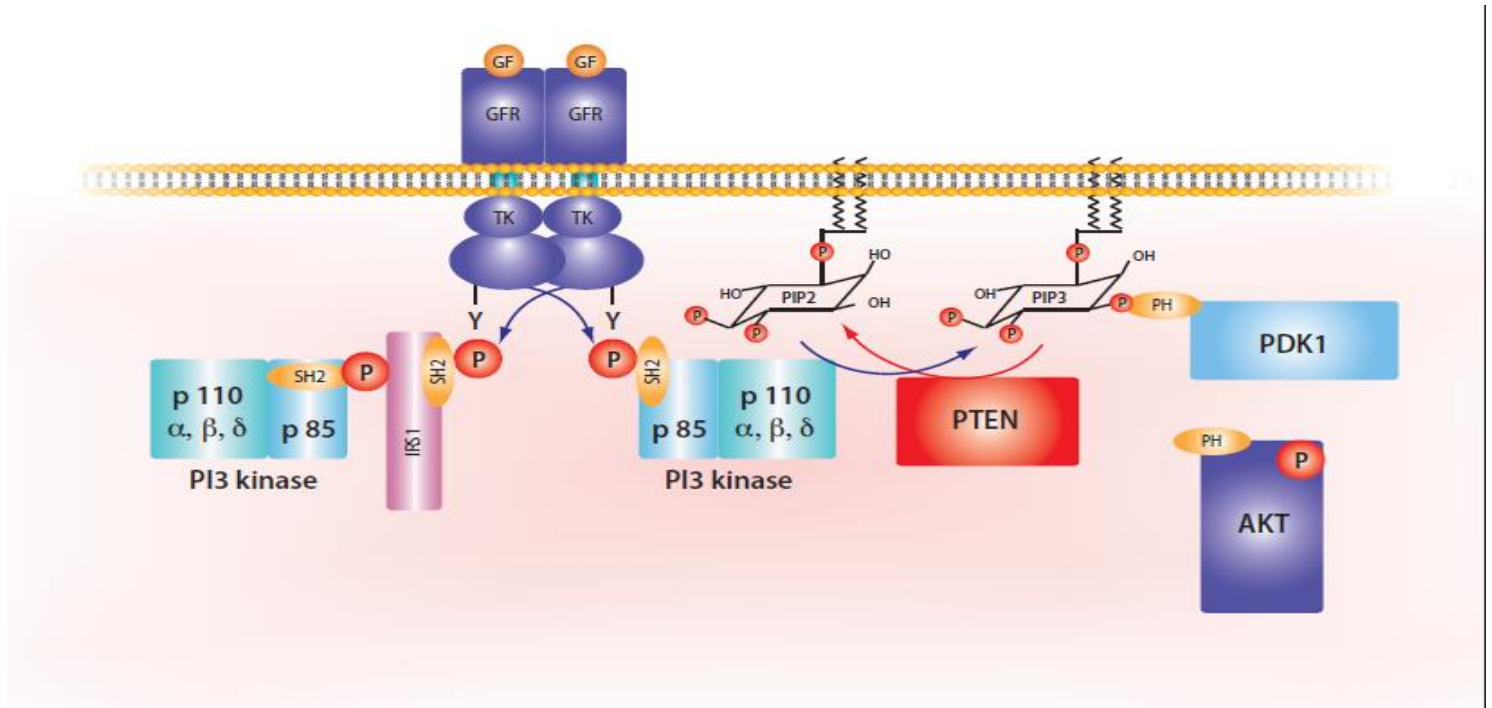


Figure 13 : Voie de la PI3 kinase, du récepteur à activité tyrosine kinase à la kinase AKT.

– La présence de ce groupement phosphate à cet endroit précis constitue le signal qui permet l’activation de la voie : il est reconnu par des protéines possédant un domaine PH (*Plekstrin homology domain*), en particulier deux sérine/thréonine kinases :

- PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase*),
- et AKT (PDK1 étant capable de phosphoryler AKT au niveau d’un résidu thréonine en 308).

– L’action de la PI3K est contrebalancée par celle d’une phosphatase appelée PTEN (*phosphatase and tensin homolog on chromosome 10*), qui hydrolyse spécifiquement le groupement phosphate en 3 du phosphatidylinositol-3, 4,5-triphosphate.

– Cette phosphatase est par conséquent responsable du contrôle négatif de la voie de la PI3K, qui est en œuvre dans la majorité des tissus qui n’ont pas de raison fonctionnelle de proliférer. Ainsi, lorsqu’elle est activée, la voie PI3K/AKT protège les cellules de l’apoptose.

– **Remarque :** Une protéine intermédiaire, IRS1 (*insulin substrate 1*) est parfois nécessaire à l’activation de la p85 après sa phosphorylation par le récepteur et sa reconnaissance par la p85 (partie gauche du schéma).

4.3.1.1 Activation de la protéine Akt (PKB)

4.3.1.1.1 Structure de Akt

- Akt est une Sérine/Thréonine kinase.
- La famille des kinases Akt comptent trois membres Akt1(PKB α), Akt2 (PKB β) et Akt3 (PKB γ).
- La protéine AKT contient plusieurs domaines (**figure 14**) :
 - en position amino-terminale, on trouve le domaine **PH** pour **P**leckstrin **H**omology liant des

phosphoinositides.

- en position centrale on trouve le domaine catalytique CAT "domaine Kinase" où se trouve Thr308 dans Akt1 (Thr309 dans Akt3).
- et enfin on trouve l'extension C-terminale EXT qui contient un élément régulateur HM pour Motif Hydrophobe où se trouve Ser473 dans Akt1 (Ser474 dans Akt2, Ser472 dans Akt3).
- ✓ les motifs HM vont servir d'ancrage aux kinases comme p70 S6K, PKC, SGK qui se lieront en même temps à la PDK1 (*Phosphatidyl inositol-dépendant kinase 1*)



Figure 14 : Structure générale de AKT.

4.3.1.1.2 Mécanisme d'activation de AKT

- En absence de stimulation, AKT est inactive et cytosolique mais elle est mobilisée vers la membrane plasmique lors d'une stimulation.
- Ce processus requiert l'activation de la PI3K et la production de PI(3,4) P2 et PI (3, 4,5) P3 nécessaire au recrutement de la protéine Akt au niveau de la membrane plasmique et lient ces phosphoinositides par son domaine PH.
- Ce recrutement membranaire va induire un changement conformationnel d'Akt et un rapprochement avec la protéine kinase PDK1 qui va phosphoryler le résidu de Thr308 situé dans la boucle d'activation du domaine kinase.
- La phosphorylation sur Thr308 active partiellement Akt, une pleine activation de Akt nécessite la phosphorylation sur un deuxième site, la sérine 473 par une sérine/thréonine kinase, la PDK2.

4.3.1.1.3 Recrutement de la PDK (Phosphoinositide-dependent kinase 1)

- PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase) est une sérine/thréonine kinase.
- La production de PIP3 par la PI3-kinase permet le recrutement au niveau de la membrane plasmique de l'enzyme PDK-1 par le biais du domaine PH situé à proximité de son extrémité C-terminale.
- Il est à noter que PDK1 est constitutivement active, son activité étant indépendante de la liaison de son domaine PH aux phosphoinositides, celle-ci ne servant qu'à réguler sa localisation membranaire.
- PDK1 va phosphoryler le résidu de Thr308 qui est situé dans la boucle d'activation du domaine kinase d'AKT.
- La colocalisation d'Akt avec PDK1 est nécessaire pour la phosphorylation de la Thr308.

4.3.2 Activation par la protéine adaptatrice IRS (Insulin receptor substrat 1)

4.3.2.1 Récepteur de l'insuline (Insulin Receptor « IR »)

- Le récepteur de l'insuline appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase.
- Le récepteur de l'insuline est un **hétérodimère** composé de deux sous-unités α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux sous-unités β transmembranaires possédant le domaine tyrosine kinase (**figure 15**).

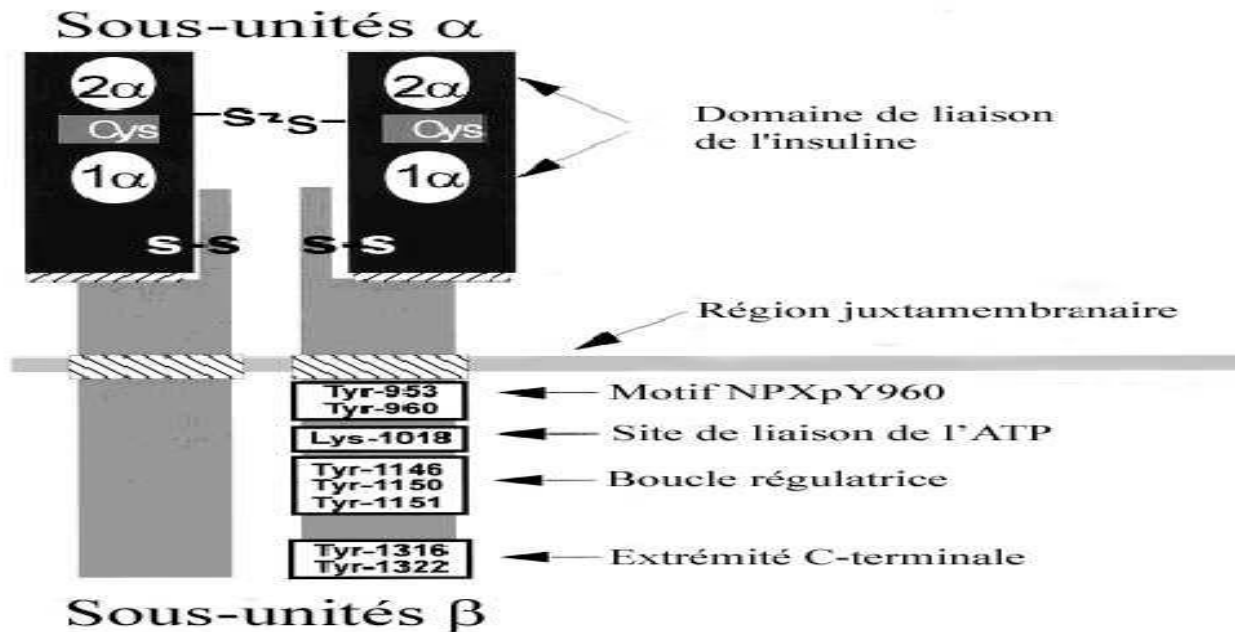


Figure 15 : Structure du récepteur de l'insuline.

- L'insuline active son récepteur en se liant à l'une des deux sous-unités α et induit des modifications de conformation responsables de l'activation du domaine tyrosine kinase d'une des deux sous-unités β .
- L'activation du récepteur de l'insuline par son ligand induit la phosphorylation d'un certain nombre de tyrosines, qui sont :
 - La phosphorylation de la tyrosine 960 (Tyr960) située dans le domaine juxtamembranaire, qui est essentielle à la liaison des **substrats du récepteur de l'insuline IRS (Insulin Receptor Substrate)**. Ces IRS présentent un domaine de liaison aux phosphotyrosines (PTB) selon le motif reconnu NPXpY960.
 - La phosphorylation des tyrosines 1146, 1150 et 1151 (Tyr1146, Tyr1150 et Tyr1151) dans le domaine tyrosine kinase servirait pour sa part à moduler l'ampleur de l'activité tyrosine kinase du récepteur.

4.3.2.2 Les protéines IRS

- Il existe aujourd'hui au moins six isoformes IRS : quatre isoformes IRS nommées IRS-1 à IRS-4 connues chez différents mammifères et deux autres protéines détectées chez l'homme et nommées IRS5/DOK4 et IRS6/DOK5.
- D'un point de vue structurel, les protéines IRS présentent dans leur **partie N-terminale** un domaine PTB ainsi qu'un domaine PH (pleckstrin homology domain).

- Le domaine PH (« *Pleckstrin homology* ») qui permet aux IRS de se lier aux phosphoinositides membranaires qui va leur permettre de se rapprocher de IR.
- Le domaine PTB (phosphotyrosine-binding domain constitué d'environ 200 résidus d'acides aminés. Il se lie au site de liaison NPXY sur la région **justamembranaire** du récepteur de l'insuline.
- La **partie C-terminale**, de longueur et de séquence variable entre les membres de la famille des IRS, contient de nombreux motifs de phosphorylation sur les résidus de Tyr (plusieurs motifs consensus YXXM).
- La phosphorylation sur les résidus de Tyrosine par IR crée des sites d'ancrages pour les protéines ayant un domaine SH2 comme la sous unité P85 α de la PI3K, Shc, Grb2...

4.3.2.3 Les molécules IRS sont à la base de la première voie de signalisation intracellulaire de l'insuline

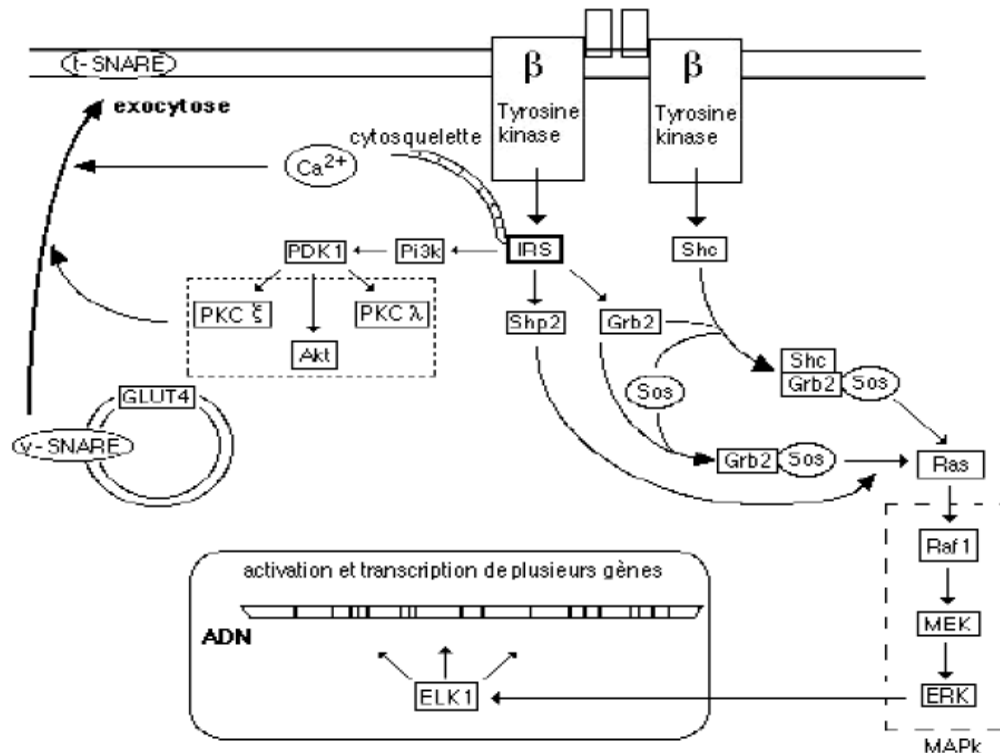
- Les deux principales voies de signalisation stimulées en réponse à l'insuline sont : la voie PI3K/Akt et la voie MAPK.
 - La voie MAPK va être initiée grâce à Grb2 associée par l'intermédiaire de Shc ou par les IRS au récepteur. Cette voie va jouer un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire.
 - La voie PI3K/AKT, activée par **liaison indirecte** de la sous-unité p85, par l'intermédiaire de IRS1, au récepteur.

4.3.2.3.1 La voie MAPK :

- Cette voie va jouer un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire.
- Cette voie va être initiée grâce à Grb2 associée au récepteur par l'intermédiaire de Shc ou par les **IRS**.
 - ✓ La protéine Grb2 avec son domaine SH2 interagit avec les phosphotyrosine de **IRS-1** ou de **Shc** (**figure 16**).
 - Shc joue un rôle similaire à celui d'IRS et présente 2 domaines de liaison à des phosphotyrosines, un domaine PTB et un domaine SH2, mais pas de domaine PH.
 - ✓ la protéine Grb2 est constitutivement associée à SOS (Son of Sevenless), un facteur d'échange nucléotidique pour la protéine Ras (Ras GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factor*).
 - L'association constitutive entre ces deux protéines Grb2/SOS est médiée par le domaine SH3 situé en N-terminal de Grb2, qui reconnaît une région riche en prolines dans le domaine C-terminal de SOS.
 - ✓ SOS catalyse l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras (membre de la famille des petites protéines G ayant une activité GTPase). En effet, Sos favorise le passage de la forme Ras-GDP inactive à la forme Ras-GTP active.
 - ✓ L'interaction **IRS** ou Shc avec /Grb2/SOS permet le recrutement de Sos vers la membrane où est localisée la protéine Ras.
 - ✓ Ces associations mènent à l'activation des kinases de la cascade de signalisation mitogénique de la

voie MAPK.

- Ainsi, Ras-GTP active recrute vers la membrane la MAPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase ou **Raf** : Ras activated factor) qui est activée par phosphorylation.
- La MAPKKK activée active par phosphorylation la MAPKK ((MAP-kinase-kinase ou MEK) qui elle-même active par phosphorylation la MAPK ((MAP-kinase ou ERK, Extracellular-signal Regulated Kinase).
- La MAPK activée, après transfert dans le noyau, active par phosphorylation des facteurs de transcription de gènes précoces (ex : c-jun, c-fos : l'hétérodimère Fos/Jun constitue le facteur de transcription AP-1) qui codent pour des facteurs de transcription d'une deuxième vague de gènes.
- Ces derniers codent pour des protéines responsables de l'engagement de la cellule dans la mitose. L'action mitogène de l'insuline la fait appartenir à la grande famille des facteurs de croissance.



Akt : sérine / thréonine kinase	PKC : protéine kinase C
ELK1 : facteur promoteur de transcription	Ras : rat sarcoma viral oncogene homolog
ERK : extracellular signal regulated kinases	protéine G à bas poids moléculaire
GLUT4 : perméase du glucose	-se lie au GTP
Grb2 : growth factor receptor bound protein 2	Shc : src homology and collagen protein
IRS : Insulin Receptor Substrate	Shp2 : phospho-tyrosine phosphatase
MAPK : mitogen activated protein kinases	SNARE : Soluble N ethylmaleimide-sensitive
PDK1 : protéine kinase	factor attachment protein receptors
PI3K : phosphatidyl-inositol 3 kinase	Sos : son of sevenless
	-facteur d'échange de la guanosine

Figure 16 : Présentation des deux voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K initié par les IR.

4.3.2.3.2 La voie *PI3K /AKT*

- Cette voie est impliquée dans la croissance cellulaire, dans la résistance à l'apoptose, ou dans la migration et l'invasion cellulaires.
- Le récepteur de l'insuline semble incapable d'activer directement p85- Ptdlns3-K.
 - ✓ En fait, la stimulation de l'activité kinase du récepteur, consécutive à la fixation de l'hormone, aboutit à la phosphorylation sur une tyrosine de p 185-**IRS- 1** qui va interagir alors avec le domaine SH2 de la p85-Ptdlns3-K et l'active (**figure 13** : partie gauche du schéma).
- La sous-unité régulatrice P85 de PI3K ainsi recrutée par ses domaines SH2 aux tyrosines phosphorylées de l'IRS-1 est activée.
- La sous-unité catalytique de la PI3 kinase, p110, réalise alors la phosphorylation du PIP2 en PIP3, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases telles que la PDK et **AKT**.
 - En effet le PIP3 recrute à la membrane des protéines kinases dépendantes du phosphatidylinositol (phosphatidylinositol-dependent kinases ou PDK). Les PDK activent par phosphorylation des protéines kinases B ou AKT.
- Les AKT activées phosphorylent plusieurs protéines cibles, parmi lesquelles, des protéines impliquées dans la translocation des vésicules de GLUT4 du cytoplasme vers la surface de la membrane plasmique (**figure 16**).

4.3.3 Activation par la protéine Ras

4.3.3.1 Activation de la voie *RAS/MAPK*

- Suite à la stimulation des récepteurs à activité tyrosine kinase, des tyrosines phosphorylées du récepteur vont servir de sites d'ancrage à des protéines adaptatrices à domaine SH2 comme **Grb2** (growth factor receptor binding Homology 2) ou Shc, Ainsi :
 - Shc par son domaine PTB se lie au récepteur et ce dernier la phosphoryle sur une tyrosine.
 - **Grb2** se lie à la tyrosine phosphorylée de Shc, par son domaine SH2. Cependant **Grb2** peut aussi **se lier directement** au récepteur (**figure 17**).
 - Par ses deux domaines SH3, Grb2 est constitutivement associée au domaine carboxy terminal riche en proline de Sos (Son of sevenless), le facteur d'échange de la petite protéine G Ras. Ainsi, la liaison de Sos au récepteur par l'intermédiaire de Grb2 permet, à la petite protéine G Ras, sa relocalisation membranaire proche de son substrat qu'elle va activer.
 - recrutement de la protéine (sérine-thréonine kinase) Raf (MAPKKK), vers la membrane plasmique, phénomène initié par Ras-GTP. Raf est activée.
 - phosphorylation de MAPKK par Raf et activation.
 - phosphorylation de MAPK par MAPKK et activation.
 - translocation de MAPK au niveau du noyau et l'expression de gènes codant pour des facteurs de

transcription (*c-FOS*) et autres (*c-MYC*, *c-JUN* ou *JUNB*) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1 (**figure 17**).

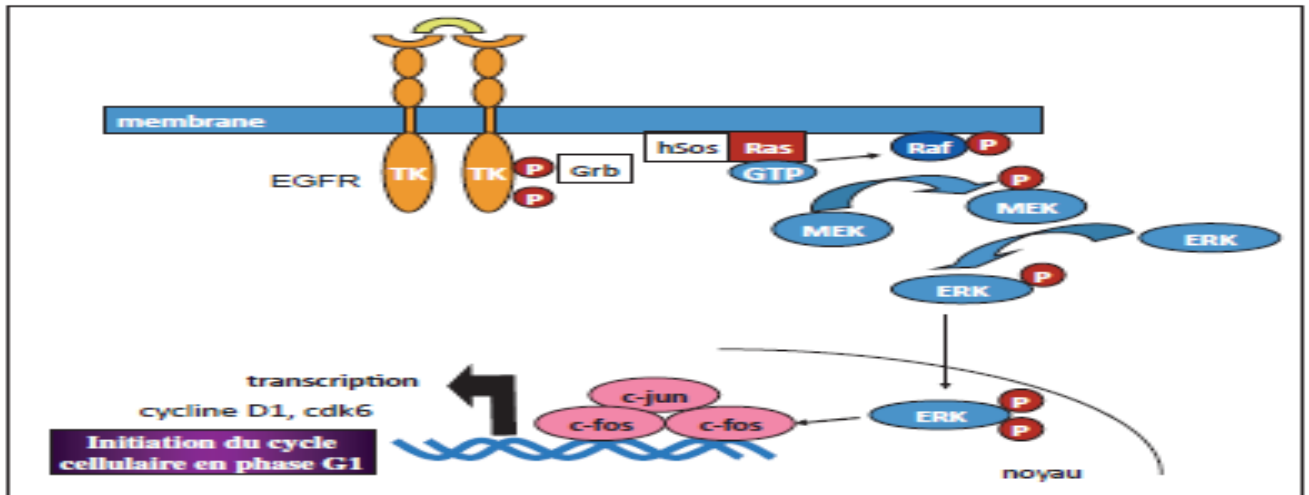


Figure 17 : Schéma simplifié de la voie RAS/MAPK. Activation de la voie PI3K par RAS.