

Chaire Internationale

M. Stuart EDELSTEIN, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Les mécanismes de la transduction du signal en biologie

Les systèmes de contrôle des processus biologiques au niveau moléculaire dépendent des protéines régulatrices qui modulent leur activité en fonction des signaux reçus. Les études de la fixation coopérative d'oxygène par l'hémoglobine ont joué un rôle décisif dans la compréhension des protéines régulatrices, aboutissant à un modèle simple, basé sur des transitions de conformation avec conservation de symétrie : le modèle de Monod, Wyman et Changeux (modèle MWC). Les transitions permettent des interactions entre sites « allostériques » de spécificité distincte, sans contact direct. Les interactions allostériques peuvent être considérées comme la clé du phénotype, en parallèle avec l'ADN comme la clé du génotype. Les mêmes principes s'appliquent aux récepteurs membranaires, notamment au premier récepteur étudié au niveau moléculaire, le récepteur nicotinique d'acétylcholine. Certaines mutations dans les gènes des récepteurs nicotiniques modifient le canal ionique et se caractérisent par une activité spontanée (« constitutive »), par exemple, celles des syndromes myasthéniques congénitaux. Dans le contexte du modèle MWC, ces mutations produisent une répartition des états conformationnels qui rendent la transition vers l'état actif plus facile. En conséquence, certains « antagonistes » deviennent « agonistes ». D'autres classes de récepteur sont aussi des protéines allostériques, notamment la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Des mutations constitutives (aussi appelées « gain de fonction ») dans les gènes pour plusieurs de ces récepteurs sont aussi à l'origine de maladies génétiques. Les cours sur ces sujets font le point sur les différentes protéines (d'abord les protéines solubles, et en suite les protéines membranaires) impliquées dans les systèmes de régulation et examinent de manière critique la pertinence du modèle MWC.

I. Protéines solubles

1) *L'hémoglobine et les origines de l'allostérie*

Les interactions entre sous-unités des protéines de liaison coopérative de ligand produisent une courbe sigmoïde. Deux mécanismes peuvent expliquer ces courbes par rapport aux interactions entre sous-unités accompagnant la fixation du ligand : « facilitation » ou « contrainte ». En d'autres termes, pour le cas de « facilitation », les interactions entre sous-unités sont plus fortes en présence du ligand, tandis que pour le cas de « contrainte », les interactions entre sous-unités sont moins fortes en présence du ligand. On constate que pour tous les systèmes examinés en détail, c'est une « contrainte » qui est à la base de la fixation coopérative.

Le premier modèle moderne pour l'hémoglobine est celui de Gilbert Adair de 1925, basé sur une série de quatre étapes différentes de fixation d'oxygène. Le passage du modèle séquentiel d'Adair au modèle concerté de Monod, Wyman et Changeux en 1965 a marqué une simplification. Pour ce dernier, la liaison coopérative d'oxygène est la conséquence des transitions entre deux états quaternaires non-coopératifs : un état T, stable en l'absence d'oxygène, mais avec une faible affinité pour l'oxygène et un état R, peu présent en l'absence d'oxygène, mais avec une forte affinité pour l'oxygène. Un tel système est conditionné par un équilibre entre ces deux états, même en l'absence d'oxygène.

Ce modèle est superbement illustré par un paradoxe. Le mono-oxyde de carbone (CO) qui manifeste une affinité pour l'hémoglobine 200 fois plus forte que l'oxygène, est un poison, tandis que le mono-oxyde d'azote (NO) qui manifeste une affinité pour l'hémoglobine 1000 fois plus forte que le CO, est un médicament. La clé de l'énigme est révélée par une autre observation. Un individu peut survivre avec une perte de 50 % de son sang, mais pas avec 50 % des sites de l'hémoglobine occupés par CO. La fixation de CO sur ces sites bloque l'hémoglobine dans l'état R et la transition à l'état T, nécessaire pour la libération d'oxygène dans les poumons, ne se fait pas. Par contre, le NO bloque l'hémoglobine dans l'état T, ce qui est un moindre mal, et le rôle vasodilatateur de NO peut fonctionner.

2) *L'anémie falciforme*

Une autre illustration de la présence des deux états est apportée par la mutation des chaînes β responsable de l'anémie falciforme (β 6 Glu \rightarrow Val). La conséquence de cette mutation est l'assemblage des molécules d'hémoglobine mutée en fibres de 14 brins, mais uniquement dans l'état T, pour lequel les chaînes β sont écartées par rapport à leur position dans l'état R. Seule la position dans l'état T permet l'assemblage en fibres. L'hémoglobine de l'anémie falciforme est un modèle pour d'autres maladies « conformationnelles » telles que la maladie d'Alzheimer ou celle provoquée par des prions.

3) *Les enzymes allostériques*

Cette classe d'enzymes est caractérisée par une courbe sigmoïde d'activité en fonction de la concentration du substrat (liaison coopérative) et la modulation de l'activité par des effecteurs. De plus, ces enzymes manifestent, dans certaines conditions, une désensibilisation par rapport aux effecteurs, accompagnée par une perte de liaison coopérative. Tous les enzymes allostériques sont construits de plusieurs sous-unités autour des axes de symétrie. Pour quelques exemples, il y a une spécialisation de sous-unités (ou domaines), les uns portant le site catalytique (liaison de substrat), les autres portant le site régulateur (liaison d'effecteur). Dans plusieurs cas, le site de fixation de substrat est à l'interface entre sous-unités. Les enzymes analysés sont la thréonine désaminase, l'aspartate transcarbamylase, la phosphofructokinase, la L-lactate déshydrogénase, la ribonucléotide réductase et la phosphorylase.

Plusieurs lignes d'évidence montrent que le modèle MWC est capable d'expliquer simplement les propriétés de ces enzymes, notamment la courbe en cloche de n-Hill (un indice de liaison coopérative) versus $\log L$ (la constante d'équilibre entre l'état T et l'état R).

4) *Répresseurs et facteurs de transcription*

Le modèle classique de régulation génétique est l'opéron de lactose, compris actuellement sur la base des complexités d'opérateurs et des transitions du répresseur. D'autres informations importantes ont été obtenues avec des protéines d'activation, par exemple la CAP. Il existe aussi une multiplicité de facteurs de transcription, y compris pour la régulation circadienne et les effets de colinéarité entre position des gènes et expression dans le corps (*hox*).

5) *Prions*

Une autre illustration des maladies « conformationnelles » concerne les prions. Prusiner en 1982 a proposé que les dépôts d'amyloïdes cérébraux étaient constitués par une protéine représentant le constituant fonctionnel majeur de la particule infectante, transmissible à l'animal. Elle fut baptisée **prion** pour *proteinaceous infectious particle*, ou PrP pour *protease resistant protein*.

L'ultracentrifugation des homogénats de cerveau et l'exposition du sédiment ainsi obtenu à la protéinase K conduisirent à une digestion partielle de ce sédiment, d'où fut extraite une protéine de poids moléculaire égal à 27 à 30 kDa. Cette protéine issue du cerveau d'animaux infectés fut baptisée PrP^{Sc} (pour *scrapie*) ou PrP^{Res} (pour sa résistance partielle à la protéinase).

Parallèlement, la mise en évidence de PrP ARN messenger dans les tissus et les cerveaux sains, non infectés, a conduit à la découverte d'une forme cellulaire normale de la PrP, baptisée PrP^C (pour cellulaire). L'hypothèse que l'agent causal

est un prion est largement confirmée, mais la conversion *in vitro* fait toujours défaut. Il faut expliquer la contradiction apparente entre la réaction lente d'assemblage et l'homogénéité de la durée de vie des souris infectées. La spécificité des souches de prions est aussi difficile à concevoir sans détermination de la structure de PrP^{Sc}, mais pourrait être expliquée par le concept de quasi-équivalence.

II. Récepteurs membranaires

1) Propriétés générales

Les origines de la notion de récepteur remontent aux études sur les récepteurs contrôlés par la nicotine de Langley vers 1904. Plusieurs particularités des récepteurs allostériques contrôlés par le ligand sont constatées :

- a) Structures limitées au plan de la membrane ;
- b) Diversité par pseudo symétrie de sous-unités non identiques ;
- c) États fonctionnels désensibilisés favorisés par le ligand ;
- d) Activation transitoire, visualisée par des expériences cinétiques.

Les récepteurs membranaires existent en plusieurs catégories : récepteurs contrôlés par le ligand ou le voltage, récepteurs couplés aux protéines G, et récepteurs kinases. Parmi les récepteurs contrôlés par le ligand ou le voltage, il y a deux grandes superfamilles : récepteurs pentamériques avec *cys-loop* et récepteurs tétramériques avec *P-loop*. Des avancées dans les études de structure atomique ces dernières années nous donnent une base structurale pour l'explication des fonctions.

2) Rapport structure-fonction du récepteur nicotinique

Les études structurales doivent être examinées par rapport à la modélisation fonctionnelle pour rendre compte de l'activation par 2 ACh, mais aussi les ouvertures spontanées et les phénotypes non conventionnels (conversion d'antagonistes compétitifs en agonistes) par des mutations pléiotropes. Il faut aussi expliquer les transitions vers les états désensibilisés et la récupération sans passage par l'état actif, établir la correspondance entre les courbes dose-réponse et les enregistrements de canaux uniques, tout en représentant les données avec un minimum de paramètres variables et en formulant des tests décisifs pour distinguer entre modèles.

3) Rapport structure-fonction des récepteurs du glutamate

Pour les membres de la famille des récepteurs du glutamate, le défi principal est de comprendre la structure tétramérique en relation avec la structure atomique du domaine de liaison du glutamate et des changements conformationnels lors de la fixation du glutamate. Il faut aussi distinguer les contributions des récep-

teurs NMDA aux notions de la structure de la famille de ces récepteurs. Les différentes informations sont intégrées sans un modèle de la structure oligomérique basée sur un dimère de dimères. Le mécanisme au niveau du canal peut être mis en relation avec les canaux de potassium.

4) *Canaux de potassium*

Dans cette famille de canaux contrôlés par le voltage, des progrès récents ont été réalisés grâce aux travaux sur des structures des canaux bactériens dans le laboratoire de MacKinnon. Les résultats révèlent la structure du filtre de sélectivité, de la région de contrôle de conductance (*gate*) et du domaine du détecteur de voltage. Les structures d'un état ouvert (MthK) et d'un état fermé (KcsA, KvAP) ont été visualisées. Les rapports entre canaux de potassium et récepteur de glutamate suggèrent un mécanisme basé sur l'écartement des domaines de fixation du glutamate.

5) *Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)*

Les (RCPG) constituent une grande famille avec une gamme très large de ligands différents. Cette famille de sept hélices transmembranaires est décrite sur la base de modèles obtenus par l'étude des cristaux de la rhodopsine. Pour les divers membres de la grande famille de RCPG, il est aussi possible d'appliquer le modèle de transitions conformationnelles (MWC), tout en gardant les différences fondamentales entre récepteurs ionotropiques et récepteurs métabotropiques. Le rôle de la dimérisation et les conséquences des mutations constitutives et des agonistes inverses sont aussi à la pointe des réflexions.

6) *Régulation de récepteurs membranaires*

La plasticité, telle que *long term potentiation* et *long term depression* (LTP et LTD), se manifeste au niveau postsynaptique par des changements dans l'expression de gènes déterminés par des flux de Ca^{2+} et des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation. Une position clé est occupée par la *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (*CaM KII*) grâce à sa bistabilité et son interaction avec la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Il y a aussi des contributions des récepteurs métabotropiques du glutamate et des réserves intracellulaires de Ca^{2+} sous contrôle des récepteurs de ryanodine et d' IP_3 . Cette plasticité s'opère dans diverses régions du cerveau et a été illustrée en détail en étudiant la mémoire et le rôle des récepteurs NMDA de l'hippocampe. Des facteurs présynaptiques sont aussi impliqués.

PUBLICATIONS

2003

GRUTTER T., PRADO DE CARVALHO L., LE NOVERE N., CORRINGER P.J., EDELSTEIN S., CHANGEUX J.P. (2003), *EMBO J.* **22** : 1990-2003. An H-bond between two residues from different loops of the acetylcholine binding site contributes to the activation mechanism of nicotinic receptors.

EDELSTEIN S.J. (2003), *Biophys Chem.* **100** : 117-121. John Edsall and ligand-linked subunit interactions in hemoglobin.

DISTINCTIONS

2003

Chevalier dans l'Ordre National de la Légion d'Honneur (décret du Président de la République Française en date du 4 juin 2003).