

Réponse aux questions...

Mutations su(var) et en(var) : ces mutations correspondent à des pertes de fonction des gènes : le gène ne s'exprime pas normalement, la fonction normalement effectuée par le gène ne s'effectue plus. Dans le cas des mutations su(var), ça décondense l'hétérochromatine puisque ça reverse le phénotype.

Quand le produit normal du gène est une protéine hétérochromatique, quand il est muté, avec une mutation qui correspond à une perte de fonction du gène, il n'est plus une protéine. La fonction qui code pour l'hétérochromatine est perdue pour la cellule. L'hétérochromatine ne se forme plus, et donc elle se décondense et le gène White va pouvoir s'exprimer malgré l'inversion qu'il a subie lors de la mutation initiale.

En ce qui concerne les mutations su(var) et en(var), le point important est que leur phénotype correspond à une perte de fonction. Le prof n'a jamais dit que les mutations su(var) permettaient de reverser l'inversion du gène White ! Vous vous rappelez que le gène White est localisé sur une partie distale du chromosome X, et la variégation se produit après un réarrangement du chromosome suite à une irradiation, qui place le gène White à proximité de la région centromérique, donc à proximité de l'hétérochromatine péricentriolaire.

Les mutations su(var) auraient pu inverser l'inversion, c'est-à-dire rétablir la localisation normale du gène, mais c'est pas le cas. Le gène White est toujours à proximité du centromère, simplement l'hétérochromatine se fait moins bien car un gène de l'hétérochromatine a été muté.

Les sites hypersensibles correspondent-ils au promoteur ou aux régions régulatrices c'est-à-dire enhancer, silencer, insulateur ?

Oui effectivement on trouve des sites hypersensibles dans les régions régulatrices qu'elles soient proximales ou distales, comme les silenciers, insulateurs, et enhanceurs.

La méthylation de l'ADN se fait avant ou après la réplication de l'ADN ? Elle se fait après la réplication, et pour être précis juste après la réplication car souvent les DNA méthyl-transférases sont couplées directement aux ARN polymérases.

Nucléosome = ADN + histones (H2a H2b H3 H4)

Est-ce qu'on considère le cholestérol comme seul polycyclique alors qu'il existe des glycolipides ? En fait le cholestérol, de part sa structure polycyclique, est une structure hydrophobe et va s'incorporer dans la bicouche lipidique.

Signaux d'adressage des mitochondries : il existe deux types de signaux d'adressage des mitochondries : un N-term clivable et un autre interne non clivable. La référence est le cours du professeur Desnuelles.

Le prof a présenté la phagocytose comme un système d'endocytose. L'endocytose par récepteur interposé n'est pas la phagocytose. L'endocytose est un phénomène général, par contre la phagocytose se rencontre dans des circonstances physiologiques particulières, dans certaines cellules comme les macrophages et les polynucléaires.

La phagocytose concerne l'endocytose de particules volumineuses dans une vacuole que l'on appelle le phagosome.

Les mécanismes de fusion membranaire v-snare et t-snare peuvent s'appliquer aux lysosomes ? On ne sait pas exactement comment se fait la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes. Est-ce que c'est direct, progressif, une fusion qui fait intervenir des t-snare et v-snare ? On ne sait pas. Il y a un certain nombre de cas où ça fait intervenir des v-snare et des t-snare, donc ils ne sont pas tout à fait incompatibles avec le trafic des lysosomes.

En fait, certains lysosomes peuvent effectuer de l'exocytose = lysosomes sécrétoires. Ça concerne que quelques types cellulaires, notamment les cellules du système immunitaire. Ces lysosomes vont se mettre à fusionner avec la membrane plasmique et déverser dans le milieu extérieur leur contenu.

La transcytose, notamment par rapport au TD : un des items du TD pouvait être interprété de différentes façons. Les vésicules de stockage sont alimentées par le processus de transcytose. C'est faux dans le sens que les vésicules de stockage ne sont pas alimentées par le phénomène de transcytose, mais effectivement le stockage peut être un intermédiaire dans un processus de transcytose.

« La voie de la transcytose comprend des endosomes de recyclage où les protéines de la membrane plasmique endocytée peuvent être mis en réserve jusqu'à leur enrôlement. » c'est-à-dire que c'est la transcytose qui alimente le stockage. Il y a donc une confusion.

L'acidification des lysosomes : le devenir du complexe récepteur-ligand est différent. Dans le cas du transport des particules LDL dans l'endosome vous avez une acidification progressive qui provoque la dissociation des récepteurs. Il y a des associations protéine-protéine qui ne sont pas tous strictement identiques, qui n'ont pas le même déterminisme chimique, et qui sont donc plus ou moins sensibles à des différences de pH. Il se trouve que la nature a sélectionné une interaction récepteur-LDL qui est sensible au bas pH, ce qui permet de libérer la particule et de recycler le récepteur. Dans le cas du transport de la transferrine, la nature a sélectionné un autre type d'interaction chimique entre le récepteur et la transferrine qui, elle, est résistante au bas pH. Ce n'est pas l'acidification qui provoque la forte association, simplement cette association est résistante à l'acidification. C'est une propriété intrinsèque de ces récepteurs-ligand, une propriété différente du groupe LDL-récepteur.

Dans le cas du GPI, le phosphatidyl inositol est couplé à un oligosaccharide pour former le GPI. Ce type d'ancrage glycolipidique concerne les protéines exposées sur le feuillet externe de la membrane plasmique.

Dans le cas de TFIIIG et TFIIJ, ces fractions ont une activité mais elles n'ont pas été purifiées suffisamment pour pouvoir connaître précisément leur composition polypeptidique.

Les insulateurs font partie des éléments distaux puisqu'ils contrôlent leur action à distance et peuvent être localisés très loin du gène et de son promoteur.

Méthylation/Acétylation : notion très importante : la méthylation de l'histone peut être à la fois une modification activatrice de la transcription dans le cas de la méthylation au niveau de la lysine 4, et répressive dans le cas de la méthylation de la lysine 9. Il existe des méthylations d'arginine qui sont effectuées par des catégories d'enzymes différentes. Le prof n'en a pas parlé spécifiquement car on ne sait pas tout.

Ce qu'on appelle une enzyme c'est une protéine qui vraiment a une réaction de catalyse chimique. Dans le cas des chaperons c'est plus une affaire de concentration. Il n'y a pas de catalyse directement sur le produit de la réaction.

Où s'effectue l'épissage ? On ne sait pas tout, la question est encore en suspend. Le prof ne peut donc pas donner des certitudes mais il y a quelques éléments de réponse. Il y a beaucoup de sous structures qui permettraient de stocker des facteurs impliqués dans l'épissage. C'est le cas des granules interchromatiniens et des corps de Cajal.

Est-ce que l'épissage se fait dans ces zones d'assemblage ou de stockage ? On a une bonne raison de penser que non... On ne trouve pas des ARN qui viennent juste d'être transcrits = ARN naissants, aussi bien dans ces corps de Cajal que dans ces granules interchromatiniens. On pense que l'épissage se fait ailleurs, dans les fibrilles périchromatiniennes, structures qui peuvent, à la différence des granules interchromatiniens et des corps de Cajal, se localiser avec les transcrits naissants, et contiennent des facteurs d'épissage. On peut supposer que c'est là que se fait au moins une partie de l'épissage. Mais ce n'est pas une question techniquement tranchée, on ne sait pas encore comment ça se passe, notamment sur le couplage entre transcription, sa maturation et aussi son exportation.

Transition métaphase/anaphase : Globalement, cette transition est un point crucial de la mitose. Elle se fait par protéolyse qui va détruire la sécurine et libérer la séparine. Tout ça est piloté par le couple cdk1-cycline B, tout ça est sous le contrôle du point de surveillance mitotique qui contrôle que tous les centromères soient bien attachés.

La destruction en fin de mitose de la cycline de cdk1- cycline B : une fois que les chromosomes avaient migrés au bout du fuseau, il y avait une activation du complexe cdk1-cycline B qui se fait également par l'intermédiaire du complexe associé au ligand, associé à une protéine CDH1 (et non pas cdc20), pour inhiber la cycline B et entraîner sa dégradation.

En fait, ça sert à quoi de supprimer la cycline B ? La réponse globale c'est qu'on a besoin de déphosphoryler un certain nombre de protéines de la cellule pour permettre toutes les étapes nécessaires à la sortie de la mitose.

Dans le cas de la myosine II (impliquée dans la séparation des cellules), pour qu'elle puisse assurer sa fonction elle a besoin d'être déphosphorylée et pour ça il faut enlever la kinase de la cellule qui va contrecarrer finalement l'action de la phosphatase.

C'est un élément essentiel.

Compléments de cours centrés sur de nouvelles notions qui sont liées à des modifications, ce sont des révisions placées dans le contexte de la transformation cancéreuse.

Annexe 1, schéma 1

La maladie cancéreuse est une maladie de l'homéostasie cellulaire qui correspond à un déséquilibre entre la vitesse de prolifération et la vitesse de mort des cellules. Ce qu'on voit au niveau cellulaire, ça se retrouve d'un point de vue moléculaire, et ce qui a permis une avancée très importante dans ce domaine = découverte de gènes mutés dans ces mécanismes de déséquilibre de l'homéostasie cellulaire.

On distingue deux catégories de gènes exprimés de manière normale dans les cellules et ces gènes contrôlent cette balance de l'homéostasie cellulaire entre prolifération et arrêt de la prolifération. Pour chaque tissu ces gènes s'expriment de manière spécifique pour assurer cet équilibre. Dans les cas des cancers, essentiellement par le phénomène de mutation, l'expression ou l'activité de ces gènes va être modifiée, et donc la balance aussi.

En fonction du type d'effet sur cette balance, on distingue les oncogènes qui vont avoir, une fois mutés, la propriété de favoriser la prolifération, dans des conditions supra physiologiques si vous voulez. A l'inverse il y a un certain nombre de gènes qui vont être réprimés et qui correspondent à un frein à la prolifération = gènes suppresseurs de tumeur.

Donc les oncogènes sont les accélérateurs et les gènes suppresseurs de tumeur sont les freins à la prolifération. Dans une situation normale, les freins et la pédale d'accélérateur sont appuyés de manière donnée par rapport au tissu.

Si un tissu a une activité prolifératrice et un renouvellement élevé, donc le frein va être mis en veilleuse. Quand il y a un déséquilibre on est dans le cadre de la pathologie.

C'est important de comprendre qu'il n'y a pas de gènes dans la nature qui sont des oncogènes. Ce mot a été créé par l'homme. Ce sont des gènes qui ont des fonctions normales au sein de la cellule, qui sont souvent des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (contrôle, signalisation), et quand ils sont mutés ils deviennent des oncogènes.

De même que ces gènes suppresseurs de tumeur servent à d'autres fonctions dans la cellule, notamment ce sont des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, des gènes de réponse au stress.

Autre notion qui se surajoute et qui est importante : les mutations responsables de la formation d'oncogènes sont des mutations qui correspondent à des gains de fonction pour la cellule. La cellule a acquis une nouvelle propriété par action de ce gène.

Par contre, les gènes suppresseurs de tumeurs correspondent souvent à des pertes de fonction, donc à des mutations récessives. Les oncogènes sont souvent des mutations dominantes.

Annexe 1, schéma 2

Expérience très célèbre pour la découverte des oncogènes (1976) : à cette époque on connaissait le cancer, et on soupçonnait que des gènes étaient impliqués dans ces phénomènes, mais ces gènes n'étaient pas connus. Un chercheur s'est dit « si ces gènes existent, il suffit que je les introduise dans une cellule normale, et le gène une fois introduit va rendre cette cellule cancéreuse, et j'aurais découvert un gène responsable du cancer. »

On aurait la possibilité technique pour repérer ce gène parmi des milliers de gènes.

On a fait l'expérience avec des cellules de souris : le chercheur a pris de l'ADN dans l'hypothèse qu'il existait des gènes avec un effet dominant, et donc si ces gènes avaient un effet dominant, en les transfectant on pourrait repérer cette propriété de conservation. Il a donc extrait de l'ADN de tumeurs humaines et a simplement transfecté de manière très sauvage des cellules de souris avec ces gènes. Donc on intervient sur le phénotype pour repérer la cellule de souris qui devient cancéreuse.

Parmi les propriétés des cellules cancéreuses :

Quand une cellule normale se divise, après la confluence elle va arrêter de se diviser. Il va y avoir un signal qui est lié au contact intercellulaire et qui va dire à la cellule d'arrêter de se diviser.

Très souvent les cellules cancéreuses perdent cette propriété d'inhiber la prolifération quand elles arrivent toutes au contact. C'est la perte d'inhibition de contact.

Les cellules qui perdent cette inhibition de contact vont continuer à se diviser et vont former des foyers, des colonies qu'on peut très facilement visualiser.

Si une de ces cellules normales de souris devient cancéreuse elle va former un foyer. On peut isoler ces cellules du foyer, en extraire l'ADN et pour essayer de purifier le gène humain présent dans le génome de souris, on va le retransfecter dans des cellules normales : on purifie le gène. Une fois qu'on a purifié le gène humain, il va falloir le cloner. Le seul gène humain qu'il peut y avoir dans ces cellules tumorales c'est un oncogène.

Donc comment repérer un gène humain parmi les gènes de souris ?

Tous les génomes eucaryotes sont remplis de petites séquences d'ADN qui ne codent pas pour des protéines = séquences répétées. Il y en a beaucoup et certaines familles de ces séquences répétées sont très spécifiques des espèces, c'est-à-dire que leur séquence ne se trouve que dans cette espèce et pas dans une autre.

En fait, la sonde ADN qui correspond à ces séquences répétées, devient une sonde diagnostic d'une espèce.

Chez l'homme il existe des séquences répétées particulières = séquences « alu » qu'on trouve que dans le génome humain, dispersées de partout. Pratiquement tous les gènes sont associés à une séquence « alu » chez l'homme, mais il n'y en a pas chez la souris.

C'est la deuxième bonne idée des chercheurs : Ils ont criblé une bande qui a été faite à partir de l'ADN de ces souris cancéreuses avec une sonde ADN, en utilisant comme séquence de la sonde une séquence « alu ».

Seuls les vecteurs, en l'occurrence un virus qui affecte les bactéries qui s'appellent un phage, qui contiennent le gène humain contiennent le gène « alu ». Donc ce phage, au final, devrait contenir un oncogène, et effectivement, après séquence de l'ADN compacté dans ces vecteurs, ils ont trouvé un gène et ont étudié sa fonction.

Ils ont pu confirmer que ces cellules de souris sont devenues cancéreuses à cause du gain de fonction apporté par ce gène, qu'on a appelé oncogène.

C'est vraiment l'expérience historique qui a permis de découvrir les oncogènes.

Annexe 2, schéma 1 et 2

Comme il s'agit d'un gain de fonction (mutation dominante), il suffit d'avoir une seule mutation sur un des deux chromosomes homologues. On a soit des mutations dominantes, il peut y avoir modification de la séquence de la protéine qui joue son rôle normal dans la cellule pour la faire agir de manière particulièrement active.

Il y a un autre type de mutation qui consiste à surexprimer le gène : la séquence de la protéine est la même, il n'y a pas de mutation, simplement la quantité du gène dans la cellule va être plus importante que la normale, ce qui correspond à un gain de fonction.

Ces surexpressions se font soit parce que le segment de l'ADN a été quantifié, c'est-à-dire que il y a eut réarrangement du chromosome, et ce gène se trouve souvent amplifié. Ça donne parfois une mutation dans la région régulatrice qui va faire un chromosome encore plus actif.

Le troisième type d'évènement : il y a des virus oncogènes qui apportent des oncogènes, ils sont transduit par ces virus. Ces virus ont joué un rôle très important, parce que beaucoup d'oncogènes ont été découvert grâce à l'étude de ces virus. Donc mutation dominante, surexpression, transduction virale : c'est une seul évènement. Tout cela contraste avec la situation de l'autre catégorie de gène. Comme ces gènes correspondent à des pertes de fonction il faut maintenant deux évènements pour qu'ils puissent perdre leur fonction protectrice vis-à-vis de la cancérisation.

C'est un évènement plus rare, heureusement, et souvent il faut à la fois plusieurs mutations qui associent souvent des mutations dans les oncogènes et dans les gènes suppresseurs de tumeur. C'est important car on peut naître avec une mutation dans les gènes suppresseurs de tumeur (situation d'hétérozygotie).

Exemple historique : gène du Rétinoblastome (Rb), tumeur de la rétine qui s'exprime chez l'enfant et qui peut avoir pour origine une mutation germinale d'un des deux allèles du gène Rb, ce qui fait que la probabilité d'apparition d'une seconde mutation somatique est très élevée puisqu'on a déjà une première mutation germinale.

La probabilité d'avoir deux mutations somatiques va être beaucoup plus basse. Ces patients qui naissent avec cette mutation hétérozygote de la protéine Rb ont une très grande probabilité de faire un rétinoblastome, c'est-à-dire que c'est en étudiant ces familles que le gène du rétinoblastome a été identifié. Mais il existe plein d'autres gènes suppresseurs de tumeur : p53 peut être muté à l'état hétérozygote dans différents syndromes, par exemple le syndrome de Li-Fraumeni.

Ce sont des individus qui ont une très haute probabilité de développer des cancers, bien plus que la population normale.

Identification des mécanismes cellulaires associés à ces gènes, et pendant ces vingtaines d'années une explosion de mécanismes : la biologie cellulaire a beaucoup bénéficié de ces travaux. En fait la situation paraissait de plus en plus complexe, car à une tumeur donnée correspondaient plusieurs mutations.

En 2000, un américain a fait un gros travail d'analyse de toutes les données connues sur les oncogènes pour essayer de rationaliser notre vision des processus de transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse.

En réfléchissant et en analysant l'ensemble de ces données, il a pu dégager un certain nombre de catégories fonctionnelles que devait acquérir nécessairement la cellule cancéreuse. Conceptuellement encore maintenant on vit vraiment sur ce travail.

Une cellule pour devenir cancéreuse, elle doit acquérir un certain nombre de propriétés. Peu importe comment elle acquière ses propriétés et l'ordre dans laquelle elle les acquière, mais elle doit les acquérir sinon elle ne sera pas cancéreuse. L'étude de chacune de ces propriétés devient essentielle.

Propriétés :

- perte de la sénescence
- autonomie de croissance
- contrôle anormal du cycle
- résistance à l'apoptose
- néo-angiogénèse : force l'organisme à créer de nouveaux vaisseaux dans la tumeur pour permettre la circulation.
- invasion et métastases : propriétés acquises au fur et à mesure de la progression de la maladie cancéreuse
- + instabilité génétique : c'est pas parce qu'une stabilité génétique qu'elle devient cancéreuse. Par contre, le fait que la cellule devienne instable génétiquement va favoriser l'apparition de mutations, qui elles, vont être responsables de l'acquisition de ces différentes propriétés. Il va pas y avoir forcément 6 mutations. Une seule mutation peut permettre à une cellule cancéreuse d'obtenir plusieurs propriétés en même temps. A l'inverse, les propriétés peuvent être acquises par plusieurs mutations. Il n'y a pas un nombre identique de mutations et de propriétés acquises par la cellule.

1) La sénescence

Annexe 2, schéma 3

On distingue 3 grandes catégories pour laquelle une cellule arrête de proliférer.

Elle va rentrer en sénescence. Il y a un arrêt permanent dans le cycle cellulaire : la cellule s'arrête à la transition G1-S dans la plupart des cas. Parfois dans certains cas la cellule s'arrête plutôt en G2/M.

A l'inverse, on a un phénomène cellulaire qui ressemble à la sénescence, qui est la quiescence. C'est un arrêt réversible du fait de la possibilité pour ces cellules de revenir dans le cycle cellulaire si les conditions sont à niveau correctes, par exemple si on leur donne des facteurs de croissance. Une cellule sénescence restera bloquée dans le cycle même si on lui donne tous les facteurs de croissance du monde.

La mort cellulaire se fait souvent par apoptose (autre mode de mort cellulaire : nécrose).

Ces différents arrêts de prolifération que ce soit par un arrêt permanent ou réversible, donc la sénescence ou la quiescence, répondent à un certain nombre de situations, notamment la situation de stress.

Annexe 3, schéma 1

Rupture de l'homéostasie cellulaire = stress. Souvent ces cellules sont capables de répondre à ces conditions de stress en déclenchant ces mécanismes cellulaires.

Quels sont les stress responsables de la sénescence ?

- Stress intrinsèques = endogènes
- Stress extrinsèques qui viennent de l'extérieur de la cellule.

Dans le stress intrinsèque, il y a un type de stress qui est presque physiologique, qui est un raccourcissement de l'extrémité des chromosomes.

Les chromosomes eucaryotes sont linéaires et ont des structures particulières qui protègent leurs extrémités : les télomères. Ces télomères ont des problèmes pour se répliquer. Quand les polymérase arrivent à la fin du chromosome elles ne savent pas faire et sont incapables de répliquer les télomères. Ça fait partie d'un processus normal.

Chaque fois qu'on divise nos cellules, on perd un bout de télomère. Au début ça n'est pas grave mais au bout d'un certain temps ça devient grave parce qu'à force de raccourcir les chromosomes on va commencer à entamer l'activité des gènes essentiels à la vie de la cellule.

La cellule a une parade à ça. Au bout d'un certain nombre de divisions où les télomères se sont raccourcis, la cellule va reconnaître ces télomères trop courts et va déclencher un arrêt de la prolifération. C'est un processus physiologique = processus endogène. Finalement c'est pour ça qu'une cellule normale ne peut effectuer qu'un nombre limité de divisions parce qu'elle va être inhiber par la quantité d'ADN qui se trouve à l'extrémité du chromosome. Quand la cellule à une quantité d'ADN télomérique maximale, elle a une capacité proliférative importante, et quand elle est vieille, en fin de vie, les cellules se sont déjà divisées un certain nombre de fois, il y a aura une capacité proliférative moins importante.

Quand une cellule devient un peu folle et va se diviser de manière anormale, elle va très rapidement brûler ses réserves télomériques, et la cellule va se défendre en activant le mécanisme de sénescence pour empêcher cette cellule de proliférer anormalement.

Le système de défense est dépassé par les évènements.

Autre catégorie de stress qui va déclencher la sénescence : ce sont les radicaux libres qui vont entraîner une rupture dans l'ADN, ces oncogènes sont considérés comme un stress par la cellule et vont déclencher la sénescence. Cette cellule sénescence est particulière, ce n'est pas simplement qu'elle va arrêter de se diviser, elle va devenir plus grande, va s'élargir. Cette réponse au stress rentre dans une catégorie plus générale de la réponse des cellules au stress.

Annexe 3, schéma 2

Ce schéma reprend un certain nombre de notions déjà dites mais son objectif est de donner une vision générale de la réponse des cellules au stress.

On a une liste non exhaustive des différents types de stress.

Les stress endogènes = intrinsèques : il y a une division anormale, votre cellule va considérer que c'est un stress et va déclencher ces processus.

Le stress oncogénique est essentiel, c'est-à-dire qu'une cellule qui exprime un oncogène, l'expression de cet oncogène va être ressentie par la cellule qui va apporter une réponse.

Simplement le fait de respirer est un stress endogène : la production de radicaux libres peut être dangereuse s'ils sont produits en trop grande quantité.

Le fait de respirer, de diviser nos cellules (réplication), est déjà un danger pour la cellule. On survit à ces stress, sauf qu'un certain nombre de personnes pensent que c'est l'accumulation de ces stress qui contribuent au vieillissement de l'organisme.

Il y a des situations exogènes qui vont déclencher ces stress : conditions de culture, les métaux lourds, l'infection considérée comme un stress : la cellule va répondre par le système immunitaire, et la réponse de l'organisme à l'infection s'apparente à une réponse au stress. Il y a aussi l'oxygène, l'ischémie, la chaleur, le froid....

Il s'agit pour les cellules d'une réponse centrale : je reconnais le stress par un système de surveillance = check point. Après, je vais intégrer ces différentes formes de stress. Tous ces éléments pour reconnaître le stress vont converger vers une voie commune, vers certains facteurs moléculaires communs à la cellule dont la protéine p53. Une fois que je converge vers ces régulateurs généraux, je vais ensuite transduire et amplifier le signal du stress et agir sur les cibles : la transcription ou certaines modifications post-traductionnelles.

Modifier le programme de la cellule c'est la sénescence, la quiescence, généralement dans des situations où le stress sera trop important et où la cellule ne sera pas capable de réparer elle va déclencher son suicide (mort programmée) : l'apoptose.

Et puis elle va essayer de réparer. Il y a donc une série de défenses : les défenses endogènes et exogènes.

Dans les défenses endogènes : tous les mécanismes de réparation de l'ADN, des réactions de détoxification et de manière générale les chaperons moléculaires.

Dans les défenses exogènes : les réponses pro ou anti inflammatoires, une modification de l'adhésion des cellules, la formation de vaisseaux sanguins par exemple quand il y a un stress hypoxique (absence d'oxygène) cela va être intégré par les cellules correspondantes qui vont envoyer des molécules pour former de nouveaux vaisseaux sanguins : néo-angiogénèse.

Deux points sont un peu mystérieux : il y a des cellules qui s'adaptent au stress et d'autres cellules qui deviennent dépendantes. L'adaptation ça veut dire que la cellule va reprendre ses divisions alors même que l'origine du stress n'a pas été réparée. Par exemple une cassure de l'ADN ne va pas être réparée, mais la cellule va continuer à se diviser. C'est dangereux pour elle car au bout d'un certain nombre de divisions, elle aura complètement perdu son chromosome, et va passer par des étapes d'évaluation qui vont conduire à sa mort.

L'addiction c'est souvent ce qu'on observe dans la cancérogenèse. On s'aperçoit que certaines cellules tumorales poussent car elles ont un oncogène, mais pire que ça : leur survie dépend de la présence de l'oncogène. Si on est capable d'avoir des molécules inactivant cet oncogène on pourra soigner ce cancer. Certaines leucémies sont soignées car ce sont des situations de dépendance à l'oncogène.

Les cellules sénescents et quiescentes sont des cellules qui ne se divisent pas. Par définition, elles n'incorporent pas de précurseurs de la réplication de l'ADN. Une façon relativement peu spécifique de visualiser les cellules sénescents, c'est par technique de fluorescence des anticorps dirigés spécifiquement contre le brdU. C'est pour ça que le brdU est un précurseur fréquemment utilisé parce qu'on peut le reconnaître par des anticorps spécifiques. Il y a un marquage nucléaire dans des cellules jeunes qui prolifèrent. On voit la même population de cellules qui vont changer de forme et devenir sénescents : elles n'incorporent plus de brdU.

Autre marqueur de la cellule sénescence : la bêta galactosidase acide. La SA-bêta Gal qu'on peut mesurer dans des conditions particulières d'acidité, pour ne révéler que certaines formes de cette enzyme. On peut visualiser cette enzyme par une molécule qui s'appelle le X-gal qui donne une coloration bleue lorsque l'enzyme est présente. Dans ces cellules sénescence, l'apparition dans le cytoplasme de cette coloration bleue reflète l'expression de cette bêta galactosidase acide. C'est un marqueur très fréquemment utilisé qui reflète l'activité lysosomiale de ces cellules sénescence.

Les cellules sénescence augmentent leur nombre de lysosomes et augmentent leur nombre de bêta galactosidase acide et d'autres protéines, d'autres enzymes.

C'est une propriété remarquable des cellules sénescence mais qui peut aussi être rencontrée dans d'autres types cellulaires. C'est un bon marqueur mais non spécifique.

Ce qu'on appelle la sénescence cellulaire correspond au même phénotype.

Exemple : Lorsque le fibroblaste atteint ses limites de prolifération, subit un stress, il devient sénescence, très large avec plusieurs noyaux et devient positif à la bêta galactosidase acide, son métabolisme est actif (produit de l'ATP), mais ce même phénotype cellulaire correspond à des situations de déclenchement différentes : la sénescence répliquative pour un stress intrinsèque, et la sénescence prématurée pour un stress extrinsèque.

Annexe 4, schéma 1

Si ces différents types de stress donnaient lieu au même phénotype cellulaire, ils déclenchaient la même voie d'activation dans la cellule. C'était une voie déjà connue pour la réponse aux dommages de l'ADN. Le modèle unifié de la sénescence cellulaire : la cellule répond de manière identique aux différents stress en déclenchant la voie de réponse aux dommages de l'ADN.

Annexe 4, schéma 2

La réponse aux dommages à l'ADN est une voie de transduction du signal classique, revue en biologie moléculaire. Le signal est le dommage de l'ADN qui peut être généré par des agents génotoxiques, par d'autres voies, notamment celle du stress.

La cellule reconnaît l'ADN endommagé par des protéines senseurs. Il existe certaines catégories de protéines différentes suivant le type de dommage. Si le dommage est une partie d'ADN simple brin lié à un problème de répliquative, on va avoir une autre catégorie de protéines, si vous avez une modification de la structure des bases => autre catégorie de protéines. La cellule a toute une série de catégories de protéines capables de reconnaître les différents défauts de l'ADN.

Elles convergent toutes vers l'activation de mêmes kinases = kinases senseurs. C'est toujours le même couple de kinases : parfois l'une, parfois l'autre, parfois les deux. Ces deux kinases jouent un rôle essentiel dans tous ces mécanismes : ATM/ATR.

Ces kinases vont déclencher toute une cascade de signalisation qui dépend de protéines médiatrices et effectrices qui vont transduire et amplifier le signal par phosphorylation.

Ces protéines ont un certain nombre d'effets, et vont modifier le programme de la cellule de différentes façons. Elles vont arrêter le cycle cellulaire, généralement en G1/S, parfois en G2/M. Elles vont avoir un effet transcriptionnel, vont agir sur des gènes qui vont aider à la réparation de l'ADN et qui vont aussi aider à arrêter le cycle cellulaire, notamment un des sites transcriptionnels de p53 qui est inhibiteur de cdk : la protéine p28.

Ces kinases peuvent aussi de manière post traductionnelle. Les mêmes protéines peuvent enclencher des programmes différents en fonction de la quantité de stress, et la même p53 peut déclencher l'apoptose dans des situations de stress excessif.

Détection du dommage, activation de kinases centralisées ATM/ATR, qui va phosphoryler d'autres protéines => cascade de phosphorylation par les protéines médiatrices et effectrices aboutissant à l'arrêt du cycle, la réparation, et éventuellement l'apoptose.

L'activation de ces protéines devient un marqueur de la réponse aux dommages de l'ADN.

Parmi ces modifications des protéines effectrices, il y en a une qui est très souvent utilisée c'est une phosphorylation due à la kinase ATM d'un variant d'histone (H2ax), et très spécifiquement, en cas de dommage de l'ADN, l'activation des kinases ATM/ATR va phosphoryler ces variants d'histones H2ax ? On possède des anticorps spécifiquement dirigés contre cette forme phosphorylée d'H2ax ?

Exemple de cellules irradiées qui ont été colorées par des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée d'H2ax

En bleu, on a le marquage des noyaux et en rouge on voit les foyers qui correspondent à des cassures de l'ADN de ces noyaux liées à l'irradiation.

Cas des cellules quiescentes : on voit très peu de foyers, la plupart des noyaux est exempt de ces foyers, alors que ces mêmes cellules sénescents (elles ont épuisé leur potentiel réplicatif), elles, vont avoir dans leur noyau un grand nombre de foyers, appelés souvent foyers gamma. Si vous avez pour les mêmes cellules une coloration positive pour la bêta galactosidase, une absence d'incorporation de brdU, et l'apparition d'un foyer gamma, on considère que la présence de ces 3 marqueurs permet d'affirmer que vous avez bien des cellules sénescents.

Actuellement, beaucoup de chercheurs essaient de débusquer ces cellules sénescents dans les tissus des personnes âgées pour savoir si l'apparition de ces cellules sénescents va contribuer au vieillissement des tissus.

Annexe 5, schéma 1

Expérience très importante = découverte des oncogènes, et forme oncogénique de la protéine Ras

La protéine Ras est une protéine impliquée dans la transduction du signal et qui existe sous deux formes : forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. C'est une protéine localisée sur la face interne de la membrane plasmique, et qui répond à des récepteurs qui vont transduire le signal, par exemple de facteurs de croissance.

Lors de l'activation de cette voie de transduction du signal on va avoir normalement la formation d'une forme activée de Ras. Cette forme va se désactiver en l'absence de mitose.

Une fois activée, Ras va activer des voies de signalisation dans la cellule qui vont aboutir à la prolifération des cellules.

C'est la fonction normale de Ras. Le signal provenant de l'extérieur de la cellule est un facteur de croissance aux mécanismes intrinsèques qui va permettre à la cellule de prendre la décision de rentrer en phase S.

Quand Ras a une certaine mutation, notamment la mutation Val 12 (On appelle souvent cette forme de Ras la forme Ras V12), elle n'est plus capable de se désactiver.

Elle va restée activée tout le temps, même si les récepteurs, les facteurs de croissance et les ligands ne sont pas présents. On dit qu'il est activé de manière constitutive.

Il va rester bloqué dans cette forme activée, c'est-à-dire de manière continue pour envoyer des signaux de division.

C'est un rôle typique de l'oncogène de favoriser la prolifération. On aurait pu penser que l'expression de cet oncogène particulier dans les cellules normales va les transformer en cellules cancéreuses. Mais à la surprise des chercheurs : ils se sont aperçu que les cellules normales dans lesquelles on force l'expression de la protéine Ras, au lieu de stimuler encore plus la prolifération des cellules, cela va entraîner leur sénescence.

Ce sont des expériences de transfection. Vous transfectez soit un vecteur X, soit un vecteur dérivé comme la forme oncogénique de Ras qui reste constitutivement actif avec différents types cellulaires. Des cellules humaines, des cellules de souris, peu importe. Vous avez des cellules qui continuent à se diviser car elles n'ont pas atteint leur limite de prolifération. Par contre, certaines cellules, au lieu d'hyper proliférer, d'abord elles vont changer de forme, elles vont moins se diviser, elles ne vont pas incorporer le brdU, et quand on fait un marquage à la bêta galactosidase, on s'aperçoit de l'apparition de cellules bleues.

Ça veut dire qu'en fait la réponse cellulaire à un stress c'est la sénescence. C'est une façon pour la cellule de se protéger de la formation d'un cancer.

Pour qu'un cancer se forme, les chercheurs ont démontré qu'il fallait à la fois activer cet oncogène et d'inactiver les voies de réponse aux dommages qui permettent de déclencher la sénescence.

Si on regarde dans ces cellules sénescents, les pressions de régulateurs du cycle par la technique Western Blot (détection de protéines par des anticorps spécifiques : immunodétection)

Donc ici il y a deux situations : la situation contrôle avec le vecteur VEC, et la situation avec l'oncogène RasV12.

Dans le vecteur VEC, la protéine p53 ne s'exprime pas.

Vous voyez ici l'illustration des voies de transduction du signal, une surexpression de p53 qui va agir comme un facteur de transcription va stimuler la synthèse de la protéine p21.

Par une autre voie, on a une augmentation de la CDKI qui va freiner p16 et qui va favoriser la déphosphorylation de la protéine Rb qui est essentielle pour la transition G1/S.

Si vous inhibez dans ces cellules les voies inhibitrices de la réponse aux dommages, la cellule ne va plus rentrer en sénescence puisque les voies de réponse aux dommages ont été inhibées.

Vous avez enlever le frein et vous avez appuyé sur la pédale d'accélérateur, la cellule va avoir tendance à appuyer très fort sur la pédale de frein en exprimant p53 et p21, et là la cellule cancéreuse va désenclencher ce frein en mutant quelques protéines p.

Les fibroblastes ne peuvent pousser que s'ils sont attachés à un support pour établir des contacts avec la matrice extra cellulaire. Et ici elle confond le plastique avec la matrice extra cellulaire, c'est pour ça que ces cellules peuvent pousser sur le plastique. (Toutes les cellules humaines ne peuvent pas pousser sur le plastique.) Par contre, si vous mettez des cellules en suspension, elles ne peuvent pas s'attacher, elles vont être incapables de se diviser. C'est ce qu'il se passe quand vous emprisonnez ces cellules dans l'agar mou.

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses, c'est de perdre cette spécificité du contexte pour se diviser, elles peuvent se diviser en ayant perdu tout contact avec la matrice extra cellulaire, et donc les cellules cancéreuses vont former des colonies dans l'agar mou. C'est très pratique et très utilisé pour déterminer le pouvoir tumorigène d'une cellule.

C'est une expérience de laboratoire, et on peut se demander si finalement c'est ce qu'il se passe vraiment.

Annexe 5, schéma 2

Exemple des naevi et des mélanomes :

Ce sont donc des taches que l'on a sur la peau qui correspondent à une accumulation de mélanocytes. Ce que l'on sait c'est que la plupart des grains de beauté que vous avez sur vous empêche l'activation d'un oncogène. Il y a une mutation qui apparaît de temps en temps dans les mélanocytes, et quand cette mutation apparaît, ce mélanocyte va être stimulé de manière plus importante que la normale. Au bout d'un certain temps, ces mélanocytes vont arrêter de se diviser car ils vont activer un oncogène qui va donc inhiber les divisions. Donc en fait les grains de beauté sont des accumulations de cellules sénescents dans un état précancéreux.

Dans de rares cas, il peut y avoir l'apparition d'une deuxième, voire d'une troisième mutation qui va inactiver le gène suppresseur de tumeur pour libérer la cellule de la sénescence, et comme cette cellule va exprimer un oncogène Ras, cet oncogène va tellement s'exprimer qu'il va former malheureusement un cancer. Ça c'est vraiment l'illustration de la sénescence pour se défendre contre l'apparition de cancer.

Ce qui est vrai pour le mélanome est vrai pour beaucoup d'états précancéreux.

2) Autonomie de croissance

Annexe 5, schéma 3

La cellule eucaryote a besoin de signaux pour se diviser, elle a besoin finalement qu'on lui en donne l'ordre. Si elle-même secrète ses propres signaux de division, elle va devenir indépendante. Elle va devenir folle et se mettre à se diviser de manière inconsidérée. Beaucoup d'oncogènes dont Ras contribuent à l'autonomie de croissance.

Comment ça se passe de manière générale ?

Il suffit de prendre des grandes étapes de la voie de transduction du signal et on y trouve des exemples très diversifiés qui reviennent toujours avec la même propriété : l'autonomie de croissance. Il y a soit production par la cellule cancéreuse de ses propres facteurs de croissance (stimulation autocrine), elle va s'autostimuler. Elle peut modifier la composition des récepteurs et des facteurs de croissance. Ces récepteurs, par exemple, peuvent se mettre à reconnaître de manière beaucoup plus sensible ces facteurs de croissance, et s'activer de manière beaucoup plus importante que la normale et elle peut bloquer de manière constitutive les voies de transduction du signal à l'intérieur de la cellule.

Exemple : la protéine RasV12 qui correspond à une forme active de cette protéine nécessaire à cette conduction intracellulaire.

Il y a donc une modification de l'expression de différentes protéines qui ont toutes pour conséquence de créer cette autonomie de croissance de la cellule cancéreuse.

Annexe 6, schéma 1

Exemple : facteur de croissance PDGF

C'est une cellule tumorale qui va surexprimer un facteur de croissance pour créer une autonomie.

Comment peut-on le déterminer expérimentalement ?

Outre le fait qu'on peut observer qu'une cellule tumorale se cancérisse, comment démontrer la causalité entre cette surexpression et la formation d'une nouvelle protéine ?

On peut essayer de reconduire le processus de cancérisation en laboratoire. Ce sont des cellules qui ont été rendues immortelles, c'est-à-dire qui sont incapables de rentrer en sénescence car les voies de réponse aux dommages de l'ADN ont été inhibées, et qui ne sont pas tumorigènes.

C'est important : l'immortalisation des cellules est une des propriétés qui va faire qu'une cellule va devenir cancéreuse mais elle n'est pas suffisante.

On peut très bien avoir des cellules immortelles mais qui ne sont pas tumorigènes, c'est-à-dire qui sont incapables de former des tumeurs. Très souvent, le laboratoire va tester la capacité d'une cellule à faire une tumeur. On les injecte dans des souris qui sont immunodéprimées pour pouvoir supporter des cellules qui viennent de l'humain. C'est ce qu'on appelle des xénogreffes. On peut les injecter sous la peau, et si les cellules ne sont pas tumorigènes elles vont être éliminées assez rapidement, alors que si ce sont des cellules tumorigènes elles vont former des tumeurs. Par contre, si on force ces cellules immortelles à surexprimer PDGF, cette surexpression de PDGF est suffisante pour former la tumeur, donc on peut établir le lien de causalité entre la surexpression de PDGF et la tumorigénicité de ces cellules.

Annexe 6, schéma 2

Exemple de Ras : Dans 25% des cancers on a l'expression d'une forme constitutive de Ras.

3) Contrôle anormal du cycle

La transition G1/S se fait par l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la phase S sous l'action des protéines de la famille E2F. Ces protéines E2F vont pouvoir agir comme facteurs de transcription, soit se libérer d'un facteur inhibiteur qui est la protéine pRb (se lie à E2F quand elle n'est pas phosphorylée).

Quand pRb est phosphorylée pendant la phase G1, elle va se libérer du facteur E2F et permettre la transition normale.

Cette transition normale est détournée par les cellules cancéreuses de différentes façons.

Une façon de la détourner c'est d'inactiver complètement le signal de pRb, E2F va être libre d'agir quand il veut, et donc on va avoir une suractivation de la transition G1/S.

Une autre façon c'est d'amplifier des cyclines importantes pour la phosphorylation de pRb. Deux étapes de phosphorylation de pRb sous l'action de cycline D-CDK4 et de cycline E-CDK2 mais aussi des inhibiteurs de cdk qui sont des gènes suppresseurs de tumeur = cdk1 qui sont p15 /p16 et p21/p22. Ils agissent à différents niveaux de l'activation de cette phosphorylation de pRb. (Le prof rappelle que p21 est un gène régulé par p53)
Une autre façon c'est évidemment d'inactiver ces gènes suppresseurs de tumeurs. On rencontre dans un certain nombre de tumeurs, le gène p16 qui est inactivé et qui va donc favoriser la transition G1/S. Et enfin p53 va entraîner la surexpression de p21 dans beaucoup de cancers.

4) **Instabilité génétique**

L'instabilité génétique est une propriété nécessaire à l'accomplissement de la transformation de la cellule. La fréquence d'apparition des mutations à l'état normal n'est pas suffisante pour expliquer l'apparition des cancers, simplement parce que la probabilité serait trop faible pour l'apparition de plusieurs mutations. En fait la cellule cancéreuse est également caractérisée par d'autres modifications qui vont augmenter la fréquence des mutations.

Annexe 7, schéma 1

La vision exacte

Ce qu'on appelle l'évolution clonale des tumeurs. Vous avez donc un élément : le triangle représente une expansion clonale des cellules => situation normale

Si au bout d'un certain nombre de divisions une deuxième mutation apparaît dans une seule des cellules de la descendance de la cellule initiale, elle va former un nouveau clone. Un certain ordre est nécessaire pour l'apparition de cancer.

Si la probabilité d'apparition des mutations dans cette zone est beaucoup plus importante, vous allez accélérer le processus et on va avoir avec effet mutateur l'apparition d'un cancer beaucoup plus rapidement, qui va être compatible avec la biologie de la cellule.

C'est pour ça qu'on a des cancers et c'est aussi pour ça qu'on a plus de chance d'avoir un cancer quand on est âgé.

Annexe 7, schéma 2

Une vision très générale : on a deux situations qui sont contre sélectionnées au cours des mutations.

Une situation où la cellule va avoir des taux de mutation très élevés (courbe rose). Donc comme on a des taux de mutation très élevés, on a des mutations qui vont avoir pour conséquence des pathologies comme les cancers mais qui vont aussi avoir des effets bénéfiques en permettant, suivant les origines de s'adapter plus rapidement au processus de sélection de la vie.

Donc on a soit une mort immédiate, soit on peut s'adapter à cette nouvelle situation.

A l'inverse, si on a des systèmes de réparation extrêmement efficaces on va encore réduire la probabilité de faire des mutations. Après on sait vraiment pas quoi faire au niveau individuel par contre le groupe d'individus auxquelles vous appartenez, une ou plusieurs génération pourra muter ; Parce qu'il sera incapable de s'adapter à des modifications du contexte. C'est ce qu'on appelle la mort évolutive.

C'est pour ça qu'un organisme normal a été sélectionné pour être « équilibré » entre ses deux extrêmes
Le cancer est une maladie de ce déséquilibre.

NB : Je vous conseille vivement d'aller regarder les photos et les schémas en couleur mis à votre disposition dans la section « téléchargement PCEM1 » sur le site <http://www.carabinsnicois.fr>
C'était le dernier cours du professeur Gilson, on vous souhaite bon courage pour la suite, ne lâchez rien !! ☺