

7. Les récepteurs couplés à la protéine G

7.1. Structure des RCPG

Les récepteurs couplés à la protéine G (RCPGs) forment une classe de récepteurs qui fonctionnent de façon similaire et présentent les propriétés suivantes (Fig. 7.12):

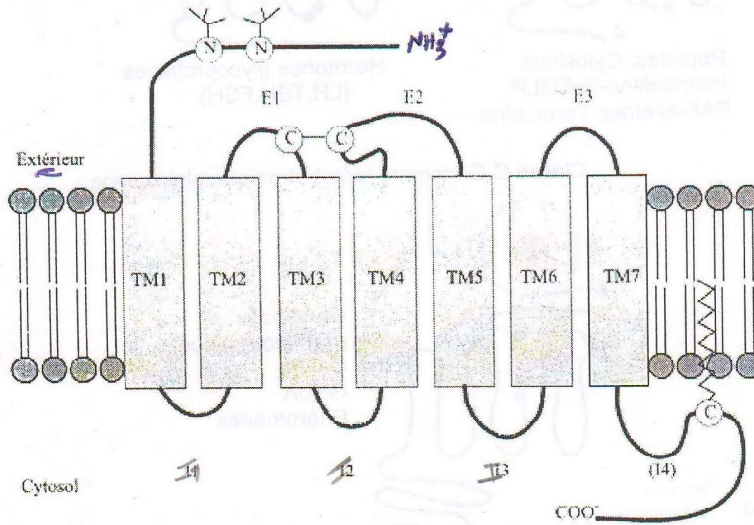


Figure 7.12

L'extrémité N-terminale de la protéine est extracellulaire. L'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. On peut observer 3 boucles extracellulaires (nommées E1-E3) et 3 boucles intracellulaires (I1-I3). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles, de type N-glycosylation, acylation par des composés lipidiques (formant parfois une pseudo-quatrième boucle intracellulaire (I4), formation de ponts disulfures entre les chaînes latérales de 2 résidus de Cys. La séquence d'acides aminés contient 7 segments d'environ 22-24 acides aminés hydrophobes qui semblent former 7 hélices α transmembranaires. La boucle I3 et le C-terminal faisant face au cytosol sont importants pour les interactions avec la protéine G.

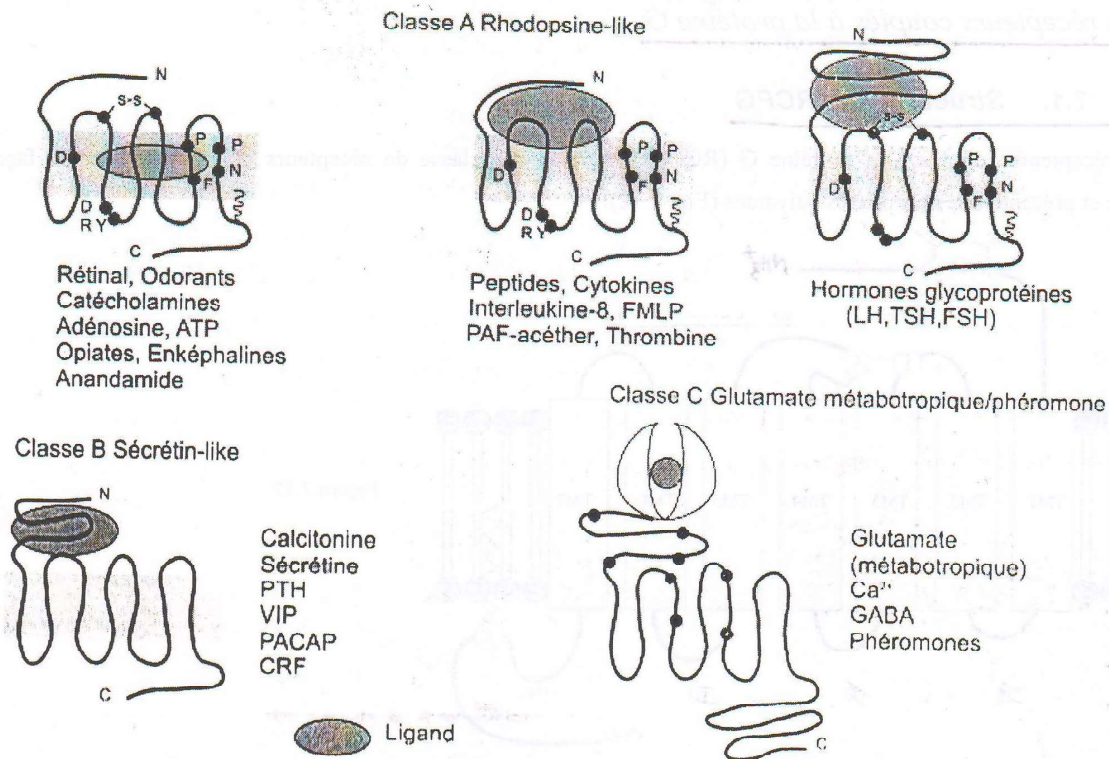


Figure 7.13. Les cercles noirs correspondent aux résidus amino acides conservés. Noter la différence dans les sites d'interaction du ligand avec le récepteur

Il existe environ 150-200 sous-types de récepteurs couplés aux protéines G qui ont été clonés à ce jour. Il y a approximativement 350 RCPGs non-sensoriels dont 270 sont dans la famille A (Type I, rhodopsine-like), 65 dans la famille B (Type II, sécrétine-like) et 15 dans la famille C (Type III, récepteurs-like du glutamate métabotrope) (Fig. 7.13). Ces familles présentent peu ou pas de similitude dans leurs séquences, mais possèdent tous 7 segments transmembranaires. D'autres classes sont reconnues chez d'autres espèces (Class D Fungal pheromone, Class E cAMP receptors (Dictyostelium), Frizzled/Smoothed family).

Les sites d'interaction entre le récepteur et le ligand varient selon le type de récepteur et de ligand (Fig. 7.13):

- Les récepteurs de petites molécules telles les catécholamines présentent un site de liaison souvent situé au niveau des régions transmembranaires des récepteurs.
- Les peptides et les cytokines sont souvent reconnus au niveau des boucles extracellulaires et de l'extrémité N-terminal.

Le site de liaison des hormones glycoprotéiques se localise dans la très longue extrémité N-terminal.

- Le glutamate et le calcium se lient à un domaine de l'extrémité N-terminal. Dans le cas du calcium, ce sont des clusters d'acides aminés chargés négativement qui vont reconnaître le cation.

- La thrombine active ses récepteurs selon un mode d'action particulier : l'hydrolyse et la libération d'un petit peptide au niveau N-terminal du récepteur qui servira comme ligand.

7.2. Les protéines G et la transduction du signal

Les protéines G hétérotrimériques sont des partenaires spécifiques dans la transmission des signaux via les récepteurs à 7 segments transmembranaires; d'où leur nom de RCPG. De très nombreux signaux extracellulaires (hormones, stimuli sensoriels) se lient et activent les RCPGs. Les récepteurs activés activent à leur tour les protéines G hétérotrimériques liées à la membrane qui servent de médiateurs et d'amplificateurs relayant les signaux externes vers les molécules effectrices intracellulaires.

Une caractéristique commune des protéines G est leur construction à partir de 3 sous-unités: une grande sous-unité α de 39-46 kDa, une sous-unité β de 36 kDa et une petite sous-unité γ de 8 kDa. (Fig. 7.14).

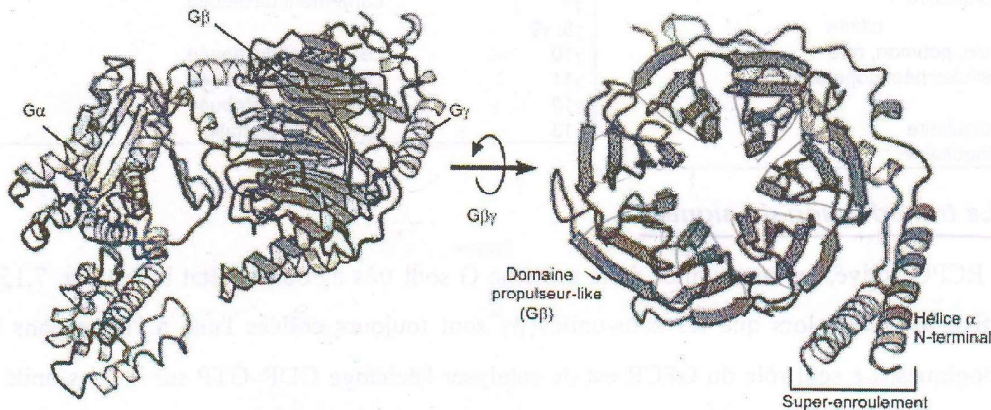


Figure 7.14. Gauche: Schéma en ruban de la protéine G hétérotrimériques. Les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G. Droite: Vue illustrant l'interaction entre les sous-unités β et γ . Les hélices de la sous-unité γ s'enroulent autour de la sous-unité β . La structure en propulseur à 7 lames de la sous-unité β est apparente à droite après rotation du complexe.

Les trois sous-unités montrent une grande diversité de sorte qu'il y a plus 20 sous-unités α , 6 sous-unités β et 14 sous-unités γ (Tab. 7.4). Certaines sous-unités sont ubiquitaires alors que d'autres sont trouvées uniquement dans des tissus spécialisés. Des douzaines de combinaisons $G\alpha\beta\gamma$ sont possibles entre les diverses formes des trois sous-unités. Ceci permet à la cellule de prendre en charge les nombreux signaux différents qu'elle reçoit.

La plupart des fonctions de transmission du signal par la protéine G sont réalisées par la sous-unité α . Puisque différentes protéines G interagissent avec des partenaires très différents, il y a de très grandes différences dans la structure des sous-unités α . Les protéines peuvent être classées en 4 familles sur la base de leurs séquences d'acides aminés (Tab. : G_s activant l'adényl cyclase, G_i inhibant l'adényl cyclase, G_q activant la phospholipase C (PLC) et G_{12} présumée activer la phospholipase D.

Tableau 7.4. Classification des trois sous-unités (α , β , γ) des protéines G.

Nom	Expression	Nom	Expression
Sous-unités α		Sous-unités β	
classe $G_{\alpha s}$		$\beta 1$	Largement distribuée, bâtonnets rétiens
$G_{\alpha s}$	Ubiquitaire	$\beta 2$	Largement distribuée
$G_{\alpha olf}$	Epithélium olfact., cerveau	$\beta 3$	Largement distribuée, Cônes rétiens
classe $G_{\alpha i/o}$		$\beta 4$	Largement distribuée
$G_{\alpha i1}$	Largement distribuée	$\beta 5$	Principalement le cerveau
$G_{\alpha i2}$	Ubiquitaire	Sous-unités γ	
$G_{\alpha i3}$	Largement distribuée	$\gamma 1; \gamma_{rod}$	Bâtonnets rétiens, cerveau,
$G_{\alpha o}$	Neuronal, neuroendocrine	$\gamma 14; \gamma_{cone}$	Cônes rétiens, cerveau
$G_{\alpha z}$	Neuronale, plaquettes	$\gamma 2; \gamma 6$	Largement distribuée
$G_{\alpha gust}$	Cellules gustatives	$\gamma 3$	Cerveau, sang
$G_{\alpha t-r}$	Bâtonnets rétiens, Cellules gustatives	$\gamma 4$	Cerveau et autres tissus
$G_{\alpha t-c}$	Cônes rétiens	$\gamma 5$	Largement distribuée
classe $G_{\alpha q/11}$		$\gamma 7$	Largement distribuée
$G_{\alpha q}$	Ubiquitaire	$\gamma 8; \gamma 9$	
$G_{\alpha 11}$	Presque ubiquitaire	$\gamma 10$	Largement distribuée
$G_{\alpha 14}$	Rein, poumon, rate	$\gamma 11$	Largement distribuée
$G_{\alpha 15/16}$	Cellules hématopoietiques	$\gamma 12$	Largement distribuée
classe $G_{\alpha 12/13}$		$\gamma 13$	Bourgeons gustatifs
$G_{\alpha 12}$	Ubiquitaire		
$G_{\alpha 13}$	Ubiquitaire		

7.3. La transduction du signal

En absence de RCPG activé, les sous-unités de la protéine G sont très associées (état basal, Fig. 7.15a). La sous-unité α fixe le GDP, alors que les sous-unités $\beta\gamma$ sont toujours collées l'une à l'autre dans les conditions physiologiques. Le seul rôle du GPCR est de catalyser l'échange GDP-GTP sur la sous-unité α . Les GPCRs sont donc des facteurs d'échange similaires aux facteurs d'échange de la guanine (GEF) ou des facteurs de libération du GDP (GRF) des petites protéines G monomériques (Ras, Rho et Rac). L'état actif (Fig. 7.15a) est caractérisé par une sous-unité α vide et une forte interaction entre le GPCR et la protéine G (état de haute affinité pour les agonistes). Dans la cellule, cet état a une durée de vie très courte. Le GTP, qui a une concentration cellulaire plus élevée que celle du GDP, se lie rapidement à la sous-unité α , conduisant à la dissociation des partenaires ($\beta\gamma$). Il est connu depuis longtemps que l'hydrolyse spontanée du GTP déterminée avec des protéines G purifiées est trop lente pour rendre compte des processus physiologiques de désactivation in vivo. Au moins 15 membres de la famille des RGS (protéines régulatrices du signal G) sont décrits pour leur intervention dans l'activation de l'hydrolyse du GTP. Les sous-unités G_{α} liées au GTP et le complexe $G_{\beta\gamma}$ sont alors capables d'interagir avec des protéines effectrices et de réguler leurs fonctions (Tab. 7.5).

La sous-unité α de G comprend deux domaines (Fig. 7.15b). Un domaine d'environ 170 acides aminés structuellement similaire à la protéine Ras, contient le site d'échange du nucléotide. L'autre domaine de 133 acides aminés fonctionne comme une GTPase-activating protein (GAP). L'interaction du complexe hormone-récepteur avec G inactive entraînerait un mouvement des 2 domaines l'un par rapport à l'autre. Ce

mouvement ouvrirait une fente à travers laquelle le GDP est libéré et le GTP pourrait accéder au site de fixation (Fig. 7.15b).

La protéine G alterne donc entre un état actif (fixation du GTP) et un état inactif (fixation du GDP) et fait la navette entre le récepteur et le(s) effecteur(s). De cette manière la protéine G fonctionne comme un transducteur de signal, relayant le changement de conformation du récepteur à l'effecteur.

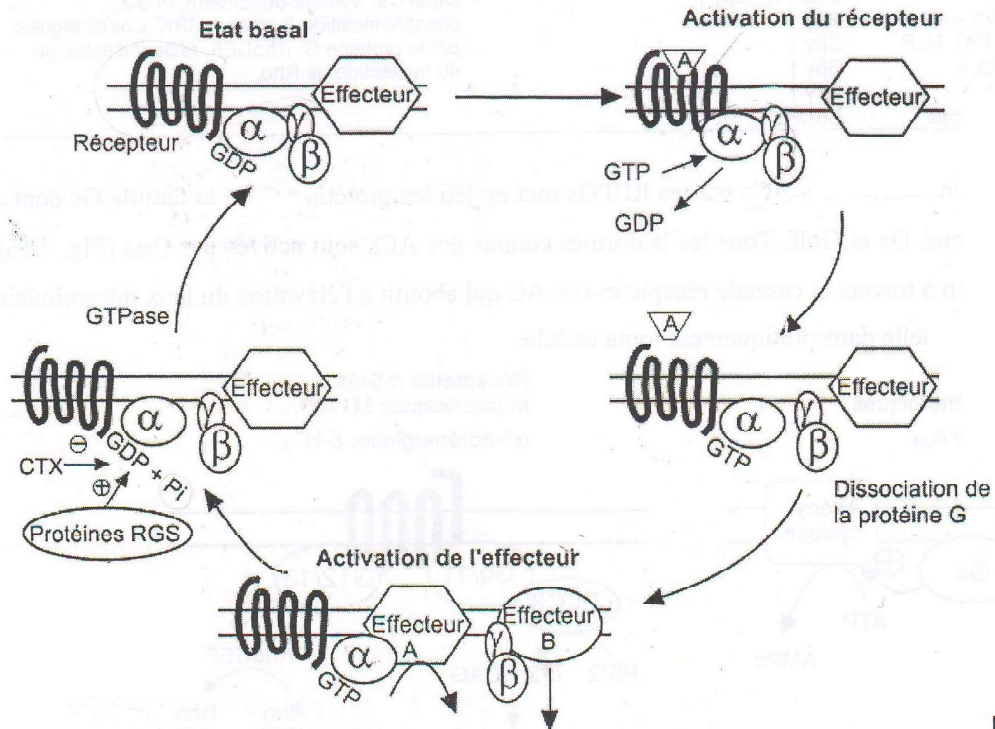


Figure 7.15a

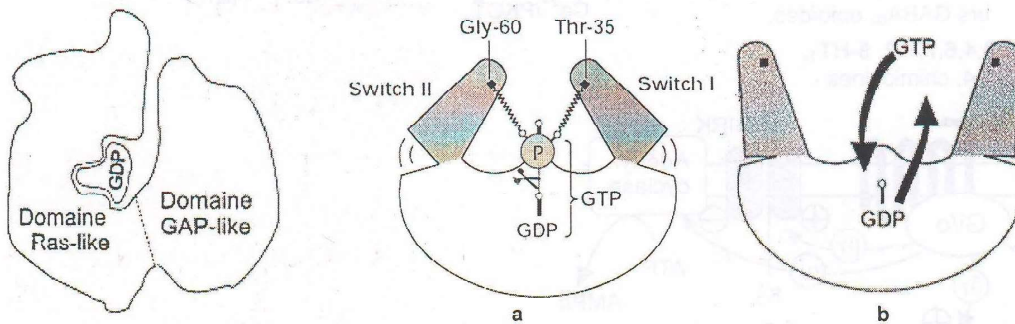


Figure 7.15b. (Gauche) Organisation de la $G\alpha$. (Droite) Activation (état on) et inactivation (état off) de $G\alpha$. A l'état on, les deux domaines switch I et switch II sont liés au phosphate terminal du GTP par l'intermédiaire des résidus Thr et Gly (conservés) (a). La libération du phosphate catalysé par la GTPase relâche les deux interrupteurs (I, II) dans une nouvelle conformation, l'état off (b). Dans cet état, $G\alpha$ peut libérer le GDP et fixer de nouveau le GTP.

Tableau 5. Effecteurs régulés par les protéines G hétérotrimériques

Effecteur	Sous-type	Régulation par protéine G	
AC	I – IX	G α s $\uparrow$; G α i/o/z $\downarrow$, G $\beta\gamma$ $\downarrow$	AC, adényl cyclase; PDE, phosphodiésterase; PLC, phospholipase C; GIRK, canal K ⁺ rectificateur régulé par la protéine G; VDCC, canal Ca ²⁺ voltage-dépendent; PI-3-K, phosphoinositide 3-kinase; GRK, kinase régulée par la protéine G; RhoGEF, facteur d'échange du nucléotide de Rho.
PDE	6 γ (bâtonnet) 6 γ (cône)	G α t _r $\uparrow$ G α t _c $\uparrow$	
PLC	β 1 – 4	G α q/11 $\uparrow$, G $\beta\gamma$ $\uparrow$	
GIRK	GIRK(1 – 4)	G $\beta\gamma$ $\uparrow$	
VDCC	Type P/Q, N, R	G $\beta\gamma$ $\downarrow$	
PI3K	PI-3K β , γ	G $\beta\gamma$ $\uparrow$	
GRK	GRK2, 3	G $\beta\gamma$ $\uparrow$	
Rho-GEF	Divers types	G α 12/13 $\uparrow$	

La régulation stimulatrice des ACs par les RCPGs met en jeu les protéines G de la famille Gs dont deux membres sont connus, Gs et Golf. Tous les isoformes connus des ACs sont activés par G α s (Fig. 7.16). La voie de signalisation à travers la cascade récepteur–Gs–AC qui aboutit à l'élévation du taux intracellulaire de l'AMPc est opérationnelle dans pratiquement toute cellule.

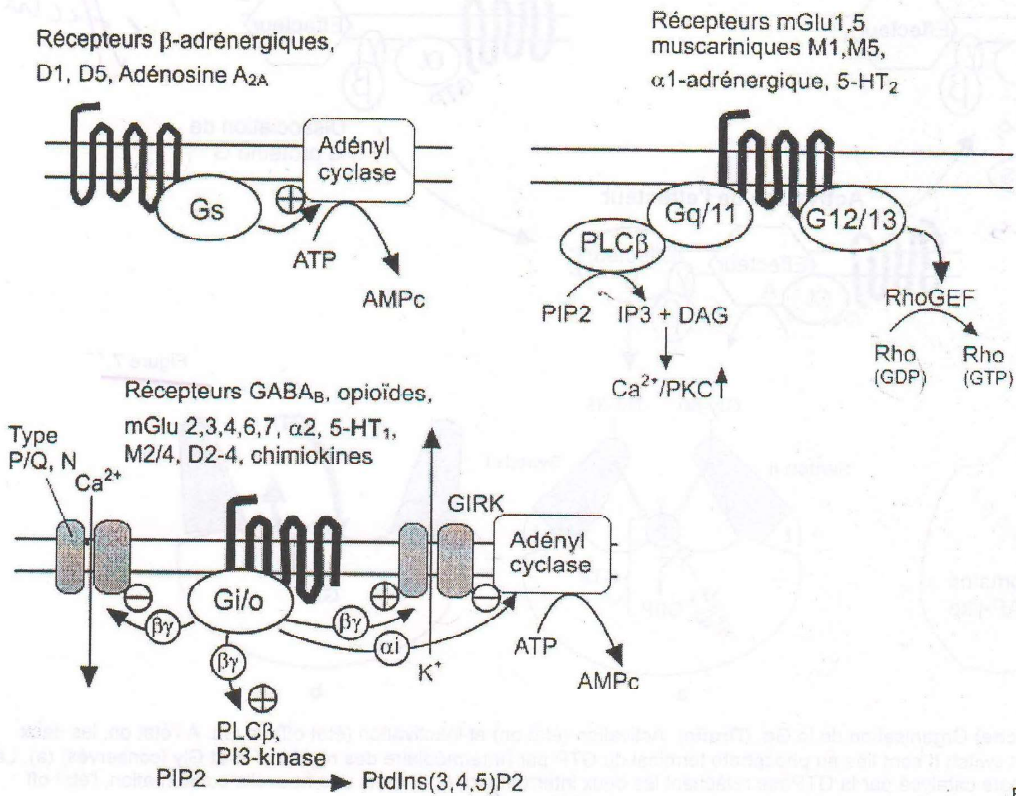


Figure 7.16

Les membres de la famille Gi sont responsables de l'inhibition de divers types d'adényl cyclases. A cause de leur taux élevé dans les cellules, les protéines Gi représentent une importante source de G $\beta\gamma$ qui peut réguler une variété d'effecteurs cellulaires. A la différence des autres protéines G, il apparaît que la plupart des effets de l'activation de Go passent par sa sous-unité G $\beta\gamma$. Les principaux effets de Gi sont d'inactiver les

canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, d'activer les canaux GIRK et d'intervenir dans la voie de médiation par la PLC et la PI3-kinase (Fig. 7.16).

Les membres de la famille $\text{G}\alpha_q$ ($\text{G}\alpha_q$ et $\text{G}\alpha_{11}$) sont impliqués dans la régulation insensible à la toxine pertussique des isoformes de la $\text{PLC}\beta$. La voie de signalisation par $\text{G}\alpha_q/11$ a pour effet d'augmenter l'activité de la PKC et la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Les protéines G12 et G13 constituent les membres de la famille G12 et apparaissent être exprimées de manière ubiquitaire. Les mutants $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ constitutivement actifs entraînent l'activation de l'échangeur Na/H. et de la phospholipase D (PLD), ils sont également capables d'induire la formation des fibres de stress d'actine de manière dépendante de Rho (Fig. 13).

7.5. Modifications irréversibles des protéines G.

Un certain nombre de toxines bactériennes peuvent modifier irréversiblement les protéines G: la toxine du choléra et la toxine de *Bordetella pertussis*.

La toxine de *Vibrio cholerae* est un hétérodimère dont l'une des sous-unités est une enzyme qui traverse la membrane plasmique et pénètre à l'intérieur de la cellule où elle catalyse l'addition covalente de l'ADP-ribose du NAD^+ intracellulaire sur $\text{G}\alpha$ près du site de fixation du GTP (Fig. 7.17). La sous-unité $\text{G}\alpha$.ADP-ribosylée peut activer normalement l'adényl cyclase mais ne peut pas hydrolyser le GTP en GDP; $\text{G}\alpha$ reste donc activée en permanence et active continuellement l'adényl cyclase. Comme conséquence le taux d'AMPc est augmenté de plus de 100 fois à l'intérieur de la cellule. La toxine pertussique catalyse l'addition de l'ADP-ribose sur les sous-unités $\text{G}\alpha_i$.

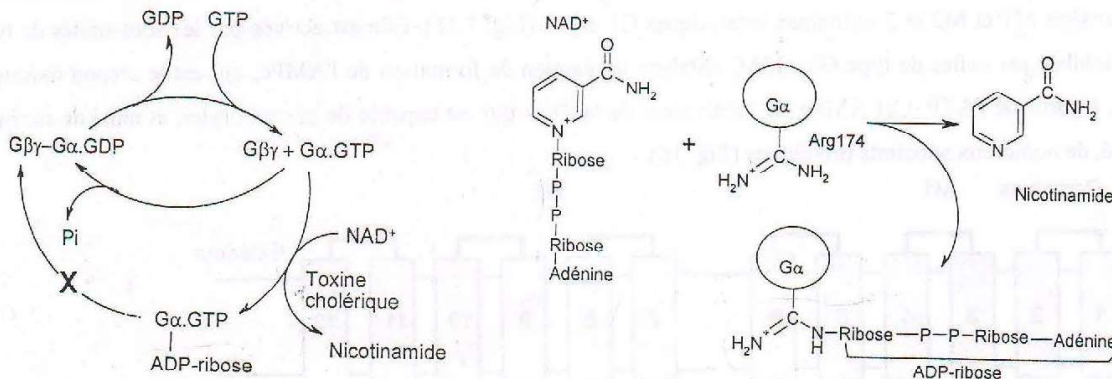


Figure 7.16

8. La voie de signalisation par l'AMPc

Les signaux provenant des récepteurs stimulateurs (R_s) couplés à G_s et inhibiteurs (R_i) couplés à G_i convergent vers l'enzyme amplificatrice adényl cyclase (AC) qui forme l'AMPc à partir de l'ATP (Fig. 7.17). En plus de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), plusieurs protéines comme les canaux commandés par les nucléotides

cycliques (CNGs), les phosphodiesterases (PDEs) et les protéines d'échange du nucléotide activées par l'AMPc (guanine nucleotide-exchange proteins activated by cAMP, EPACs) fixent l'AMPc pour devenir activées. L'activation localisée de telles protéines de liaison de l'AMPc devrait alors servir comme un moyen de propager diverses réponses (Fig. 17)

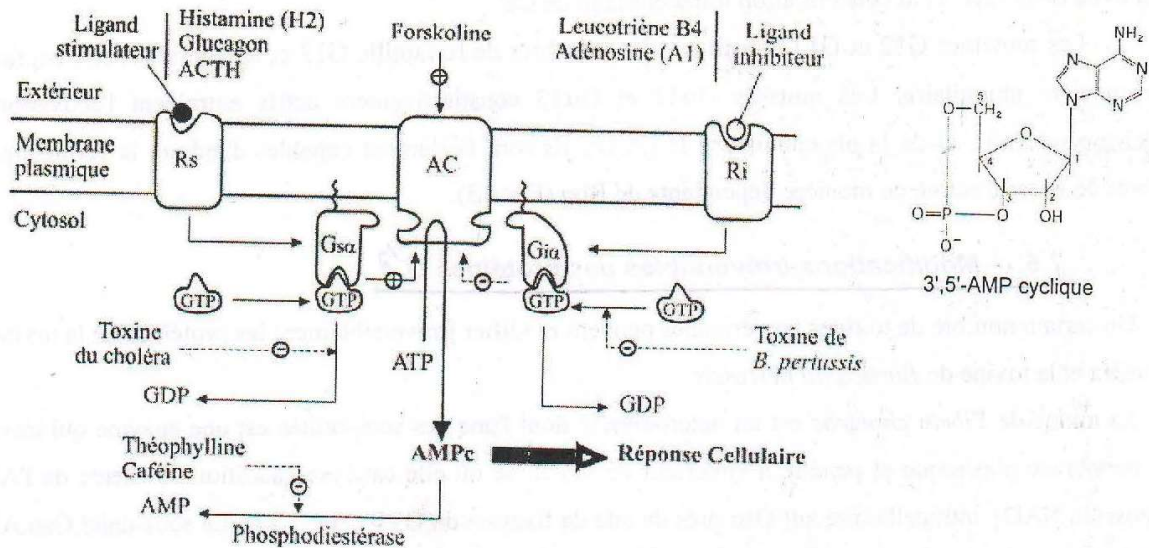


Figure 7.17

8.1. L'adényl cyclase

Il existe à ce jour 9 isoformes connues de l'adényl cyclase (AC). C'est une enzyme membranaire, avec 2 domaines membranaires M1 et M2 et 2 domaines catalytiques C1 et C2 (Fig. 7.18). Elle est activée par les sous-unités de type Gsa et inhibée par celles de type Gia. L'AC catalyse la réaction de formation de l'AMPc, qui est le second messager produit, à partir de l'ATP. Cet AMPc est l'activateur de la PKA qui est capable de phosphoryler, et ainsi de moduler l'activité, de nombreux substrats protéiques (Fig. 16).

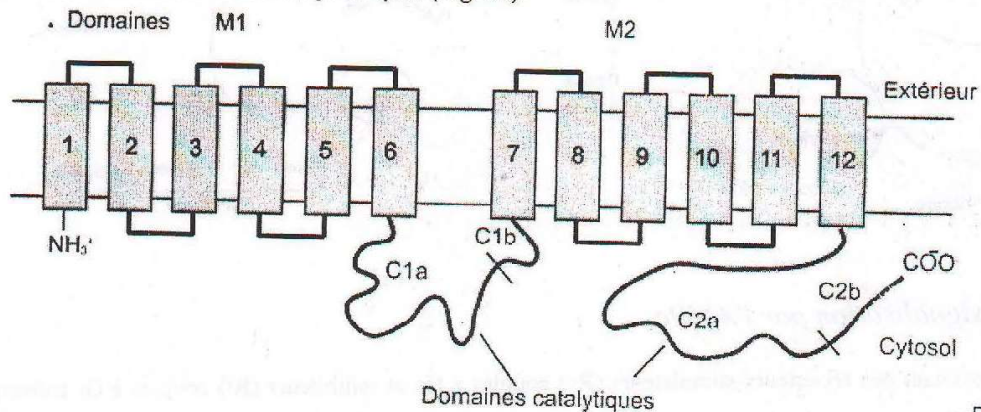


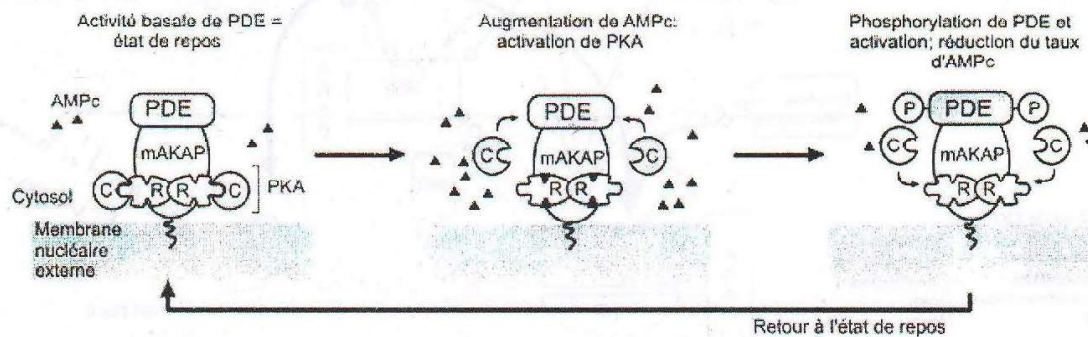
Figure 7.18

8.2. La protéine kinase AMPc-dépendante

Les divers effets de l'AMPc passent par l'action de diverses protéines kinases AMPc-dépendantes (PKA) qui

modifient l'activité d'enzymes spécifiques dans divers types cellulaires (Fig. 7.20).

Les PKA sont des tétramères composées de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Dans leur forme tétramérique, les PKA sont inactives. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités R entraîne la dissociation des deux sous-unités C. Chaque sous-unité R fixe deux molécules d'AMPc de manière coopérative. Les protéines d'ancrage de la PKA (AKAP, PKA-anchoring proteins) contrôlent la spécificité de la transduction du signal AMPc en plaçant la PKA près des effecteurs et substrats spécifiques canaux, récepteurs, mitochondrie, centriole, cytosquelette, etc. Les protéines AKAP sont des protéines d'échafaudage qui forment des complexes en fixant la PKA, une phosphodiesterase et une protéine phosphatase pour contrôler l'activité de la PKA, de l'AMPc et des protéines substrats (7.19).



L'AMPc peut activer des voies intracellulaires en se fixant et en modulant l'activité d'une famille de canaux ioniques commandés par des nucléotides cycliques. Ces canaux sont des canaux cationiques relativement non sélectifs, ils conduisent le Ca^{2+} qui active la CaM et les kinases CaM-dépendantes (CaMK). Ces canaux sont aussi perméables au Na^+ et K^+ , ce qui peut modifier le potentiel de membrane des cellules excitables (Fig. 7.20).

La régulation de la transcription par la PKA (Fig. 7.20) est principalement réalisée par la phosphorylation directe des facteurs de transcription CREB (cAMP-responsive element-binding protein), CREM (cAMP-responsive-element-binding modulator) et ATF1 (activating transcription factor). La phosphorylation de ces facteurs est cruciale puisqu'elle permet leur interaction avec les coactivateurs de la transcription CPB (CREB-binding protein) et p300. Il devient clair que les membres de la famille CREB jouent des rôles importants dans les réponses nucléaires à toute une variété de stimuli externes. De manière similaire à CREB, la phosphorylation du NF- κ B (Nuclear factor - κ B) par la PKA est nécessaire pour l'activation de la transcription.

Finalement, l'AMPc pourrait moduler directement la voie MAPK en se fixant à EPAC pour l'activer (EPAC [exchange protein directly activated by cAMP], est une protéine d'échange du GTP de la petite GTPase Rap1) (Fig. 7.20). Le rôle de Rap1 serait d'activer la Raf-B et/ou d'inhiber la voie Ras-Raf.

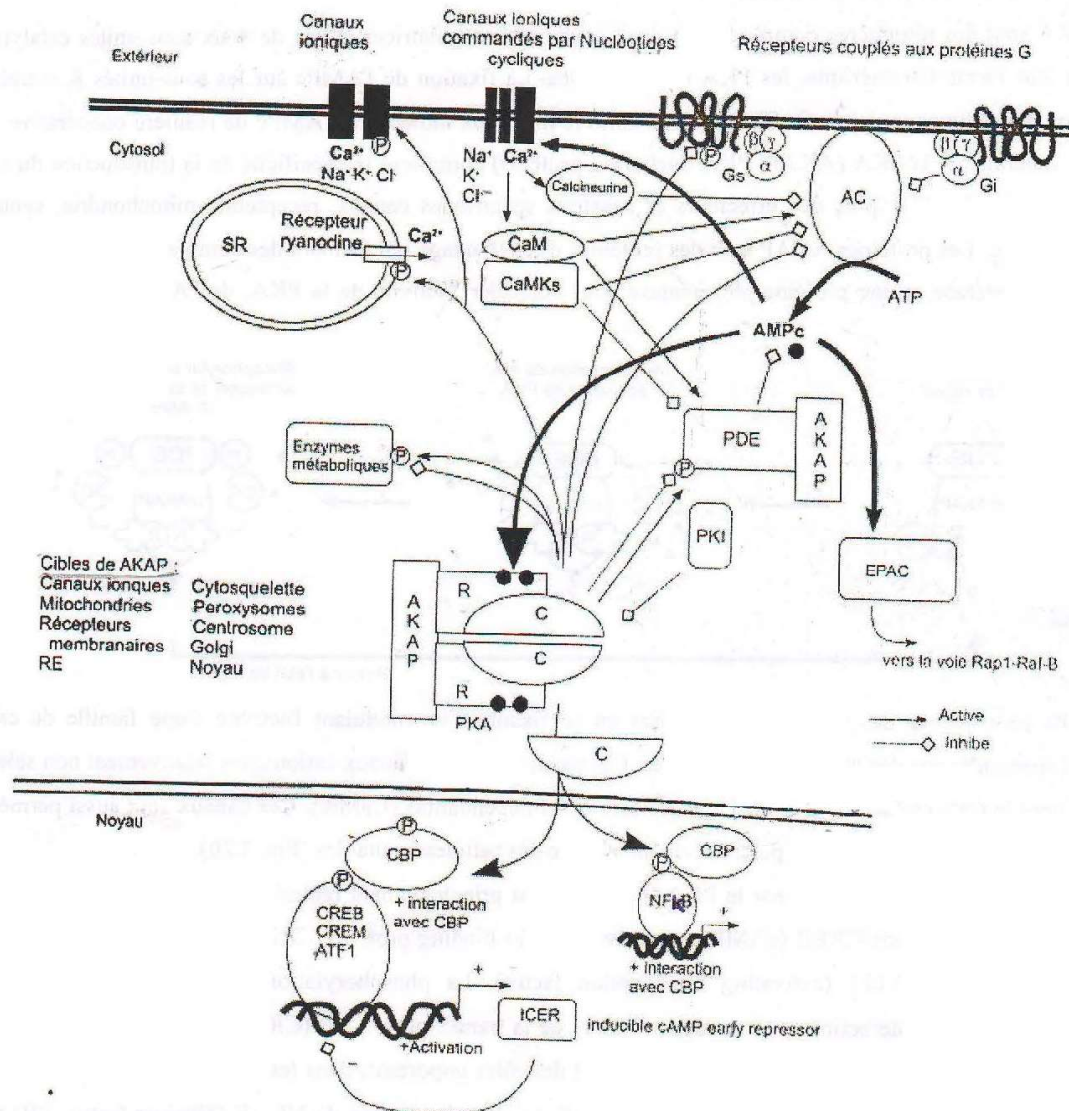


Figure 7.20

8.3. Arrêt de la réponse cellulaire

L'hydrolyse rapide du GTP fixé à G_{α} inverse l'activation de l'adényl cyclase et entraîne l'arrêt de la réponse cellulaire à moins que la concentration de l'hormone reste suffisamment élevée pour former de nouveaux complexes hormone-récepteur. La présence continue de l'hormone est donc nécessaire pour une activation continue de l'adényl cyclase.

L'hydrolyse de l'AMPc est catalysée par une AMPc phosphodiésterase (PDE3, 4, 7, 8, 10). La PDE1 est activée par une élévation du Ca^{2+} intracellulaire à la suite de l'interaction de l'enzyme avec le complexe Ca^{2+} -calmoduline.

La PDE est soumise à un contrôle par feed-back. Deux mécanismes de feedback ont été décrits, l'un à court terme ou rapide et l'autre à long terme (Fig. 7.21). A la suite de l'activation de la PKA par l'AMPc, l'enzyme phosphoryle

PDE3A/B ou PDE4D3 selon le type de cellule. Cette phosphorylation augmente l'activité de la PDE et diminue le taux d'AMPc. L'accumulation à long terme de l'AMPc produit une augmentation de l'activité de la PDE, conduisant à la synthèse de novo des formes courtes de la famille PDE4, par exemple PDE4D1/2

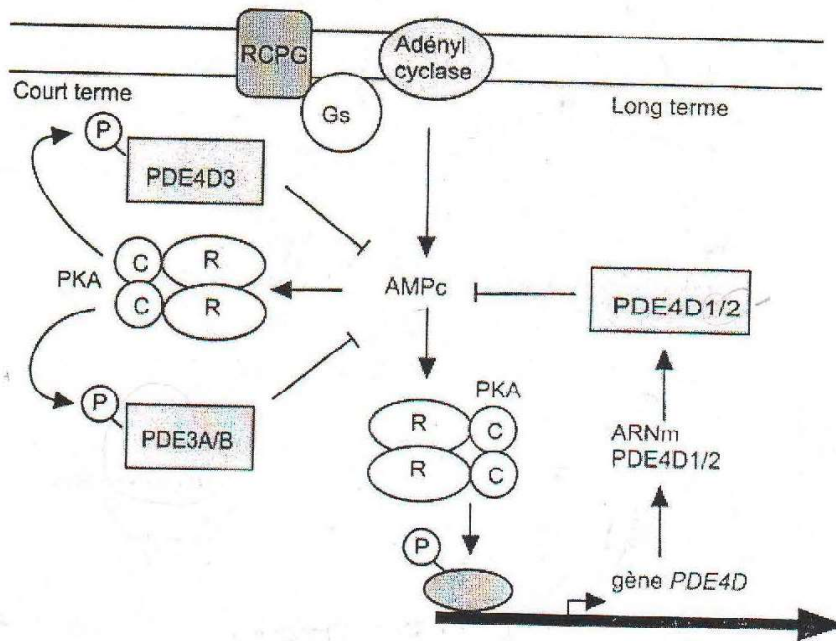


Figure 7.21