Tables des matières

Le trafic vésiculaire 4

1. Le trafic vésiculaire - les bases 4

1.a. Les voies de trafic entre les compartiments lors de la sécrétion et de l'absorption de matériel 5

1.a.1. Le trafic vésiculaire est indispensable pour la physiologie 5

1.a.2. Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire 6

1.a.3. Pourquoi une cellule eucaryote possède-t-elle différents compartiments? 6

1.a.4. La plupart des organelles sont formées à partir du RE et sont connectées entre elles par le trafic vésiculaire 6

Autoradiographie 8

1.a.5. Une approche plus moderne: L'expression de protéines chimériques fluorescentes (GFP, green fluorescent protein) 8

1.a.6. Les grandes lignes des voies de sécrétion et d'endocytose 10

1.b. Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et la fusion des vésicules 13

1.b.1. La voie de sécrétion: RE-à- l'appareil de Golgi, exemple fondamental du transport vésiculaire 13

1.b.1.a. Les fonctions du réticulum endoplasmique 13

Fluide extracellulaire 14

1.b.2. Intégration d'une protéine cargo dans une vésicule de transport 15

1.b.3. Vésicule de transport naissante observée par microscopie électronique 18

1.b.4. Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et la fusion des vésicules 19

1.b.5. Un transport actif pour surmonter la viscosité du cytosol 19

1.b.6. Les déficiences des protéines motrices et leurs conséquences 20

1.b.7. Un désassemblage actif du manteau expose la machinerie de fusion et permet l'accostage 20

1.b.1. Le cycle des protéines Rab régule l'association de celles-ci à la membrane et l'activation de leurs effecteurs 21

1.b.3. La machinerie de fusion est réactivée après la fusion 25

1.c. Comment les protéines sont triées entre les différents compartiments 26

1.c.1. Comment se font la spécificité et l'identité des compartiments? 26

1.c.2. Des vésicules de transport agissent à beaucoup – mais pas à toutes les étapes du transport 27

1.c.3. Mécanismes de recyclage: Les protéines résidente du RE échapées sont recyclées depuis l'appareil de Golgi par un récepteur dédié à cette tâche 32

1.d. Autres mécanismes de tri des protéines: Le transport sans liaison directe du cargo La maturation et la fusion de compartiments en entier 33

1.d.1.Le transport vers le Golgi: Les citernes cis sont générées par une fusion "homotypique" entre les vésicules venant du RE 33

1.d.2. Le transport intra-Golgi: maturation des citernes par récuperation de protéines résidentes 33

2. Le trafic vésiculaire – mécanismes et physiologie 35

2.a. L'exocytose régulée et constitutive 36

2.a.1. L'exocytose: Sécrétion de protéines à la membrane plasmique 36

2.b. L'endocytose 37

2.b.1. Les voies d'endocytose 38

2.b.1.a. 38

2.b.1.a.1. 38

2.b.1.a.2. 39

2.b.1.b 39

2.b.1.b.1. 40

2.b.1.b.2. 41

2.c. La formation de corps multi-vésiculaires et le trafic vers les lysosomes 42

2.c.1. Dégradation lysosomale (I): La voie MVB 43

2.c.2. Dégradation lysosomale (II): L'autophagie 44

2.d. Matériaux supplémentairs: Aspects spéciaux du trafic vésiculaire 46

2.d.1. La Transcytose des anticorps dans les embryons 46

2.d.2.La transmission des signaux synaptiques 47

2.d.3.Comment mesurer une réaction de trafic? 47
3. La glycosylation 48
3.a. Les groupes sanguins humains sont déterminés par glycosylation 49
3.b.Hydrates de carbone et glycosylation – un aperçu rapide 49
3.b.1. -Hydrates de carbone et glycosylation -définitions et fonctions 50
3.b.2. Structure des hydrates de carbone - variabilité et nomenclature 52
3.b.3. Biosynthèse des différents types de protéines glycosylées 56
3.b.4. Lipides glycosylés, ancres GPI 66
3.b.5. Conséquences des défauts de glycosylation: maladies 67
4. La biogenèse des mitochondries 67
4.a. Organisation des mitochondries 68
4.a.1. Les mitochondries sont divisées en quatre sous-compartiments 68
4.a.2.Les mitochondries peuvent se diviser et fusionner, selon le cycle cellulaire et les conditions environnementales 68
4. b. Fonctions 69
4.b.1. Fonctions mitochondriales dans les cellules mammifères 69
4.b.2. Des enzymes oxido-reductrices portent souvent des centres réactifs composés de fer et de sulfure; ces centres sont assemblés à l'intérieur des mitochondries 69
4.b.3. Résultat finale des activités bioénergétiques des mitochondries: CO_2 et ATP 69
4.b.4. La glycolyse: Conversion du glucose en pyruvate dans le cytosol 69
4.b.5. Le cycle d'acide citrique dans les mitochondries 70
Le cycle produit 70
4.b.6. L'oxydation du pyruvate en CO_2 à l'intérieur des mitochondries dirige l'export de protons à partir de la matrice vers l'espace inter-membranaire 71
4.b.7. Conversion de l'énergie fournie par oxidation de NADH 71
4.b.8. La F-ATPase est une turbine moléculaire entraîné par des protons 72
4. c. Système génétique 72
4.c.1.Les mitochondries contiennent leur propre génome, exprimée à l'intérieur de l'organelle 72
4.c.2.Les génomes mitochondriaux sont petits 73
4.c.3.Le code génétique des mitochondries diffère de celui du noyau, au moins pour quelques codons 73
4.c.4. Les mutations de l'ADN des mitochondries sont responsables de nombreuses maladies 74
4. d. Assemblage 75
4.d.1. Les mitochondries sont synthétisées à partir des protéines de deux différentes sources 75
4.d.2.Import dans la matrice 75
4.d.3.Les forces conductrices de l'import des protéines mitochondriales: potentiel de membrane et ATP 76
4.d.4.La séquence de signalisation ("présequence") pour import dans la matrice 76
4.d.5.Deux séquences signal sont nécessaires pour le tri à l'intérieur de la membrane interne 77

Cellule et tissus
- Biologie des cellules
- Membranes et trafic vésiculaire

Membranes et trafic vésiculaire

Lipides et structure des membranes (2 heures)

• Énumérer les fonctions et caractéristiques des membranes cellulaires et leur composants lipidiques (Phospholipides, Sphingolipides, Glycolipides, Cholestérol, etc..)
• Expliquer les principes de la formation des membranes, micelles et liposomes
• Restituer le modèle de "mosaïque fluide" des membranes cellulaires et définir les "radeaux lipidiques"
• Énumérer les catégories des protéines transmembranaires, et décrire leur topologie et leurs fonctions
• Expliquer la voie de synthèse et triage de protéines intégrées dans les membranes ou secrétées dans le milieu extracellulaire
• Désigner la fonction de la séquence signal des peptides naissants
• Décrire la fonction et la structure de la particule de reconnaissance du signal (SRP) et du récepteur pour la SRP et le translocon
• Distinguer les mécanismes de la production des protéines transmembranaires à hélice alpha de Type I et Type II.

Transport vésiculaire (4 heures)

• Caractériser et différencier les voies de trafic entre les compartiments lors de la sécrétion et de l'absorption de matériel
• Caractériser et différencier les mécanismes moléculaires régissant la formation et la fusion des vésicules
• Caractériser et différencier comment les protéines sont triées entre les différents compartiments.
• Caractériser et différencier d'autres mécanismes de tri des protéines :
• Le transport sans liaison directe du cargo .
• La maturation et la fusion de compartiments en entier
• Caractériser et différencier des voies de trafics spécifiques :
• L'exocytose régulée et constitutive
• L'endocytose
• La formation de corps multivésiculaires et le trafic vers les lysosomes
• La Transcytose des anticorps dans les embryons
• L'invasion des virus dans une cellule humaine

La glycosylation (2 heures)

• Décrire, classifier, nommer les hydrates de carbone
• Définir les formes de glycosylation et leurs fonctions
• Connaitre les structures des hydrates de carbone et leur variabilité
• Connaitre et appliquer la nomenclature des hydrates de carbone
• Caractériser et différencier la biosynthèse des différents types de protéines glycosylées
• Connaitre et différencier des protéines N- et O- glycoconjuguées
• Connaitre et différencier les protéoglycanes et leurs fonctions
• Connaitre des lipides glycosylés et les ancres GPI et leurs fonctions physiologiques
• Connaitre les conséquences des défauts de glycosylation: maladies.

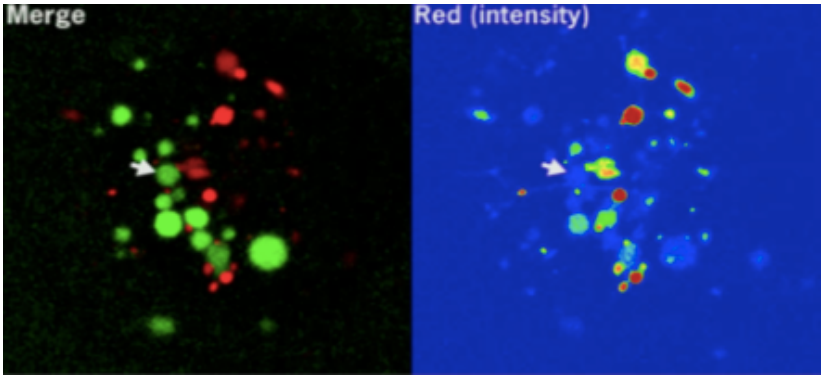
Biogenèse des mitochondries (2 heures)

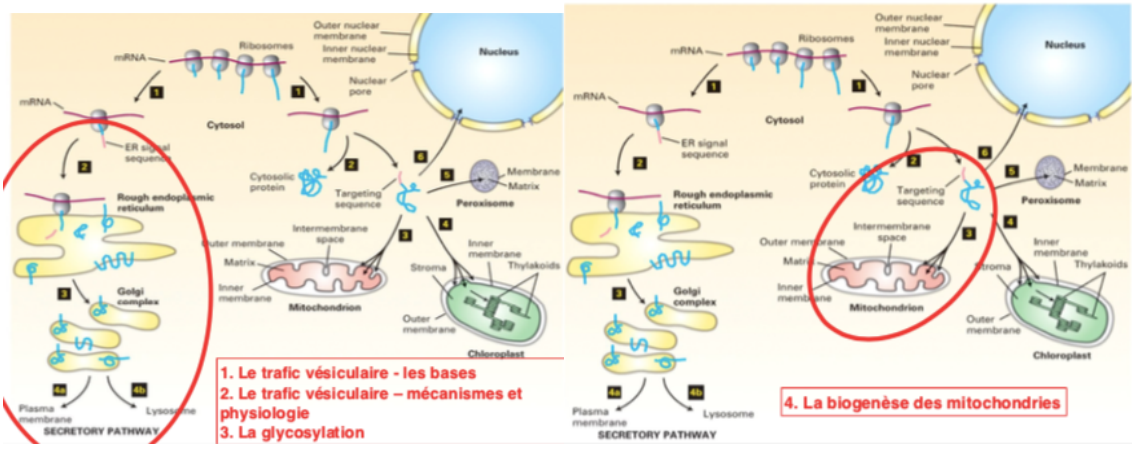
• Connaitre l'organisation des mitochondries
• Caractériser et différencier les fonctions de mitochondries
• Comprendre le système génétique des mitochondries et les conséquences pour leur évolution et leur biogenèse.
• Caractériser et différencier les voies de biosynthèse des protéines mitochondriales
• Caractériser et différencier les différents chemins et étapes de l'importation des protéines mitochondriales et leurs forces motrices.

Le trafic vésiculaire

Le trafic vésiculaire

1. Le trafic vésiculaire - les bases
   - ✓ Les voies de trafic entre les compartiments lors de la sécrétion et de l'absorption de matériel
2. Le trafic vésiculaire – mécanismes et physiologie
   - ✓ Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et leur fusion
3. La glycosylation
   - ✓ Comment les protéines sont triées entre les différents compartiments
4. La biogenèse des mitochondries
   - ✓ Autres mécanismes de tri des protéines: Le transport sans liaison directe du cargo
   - La maturation et la fusion de compartiments en entier

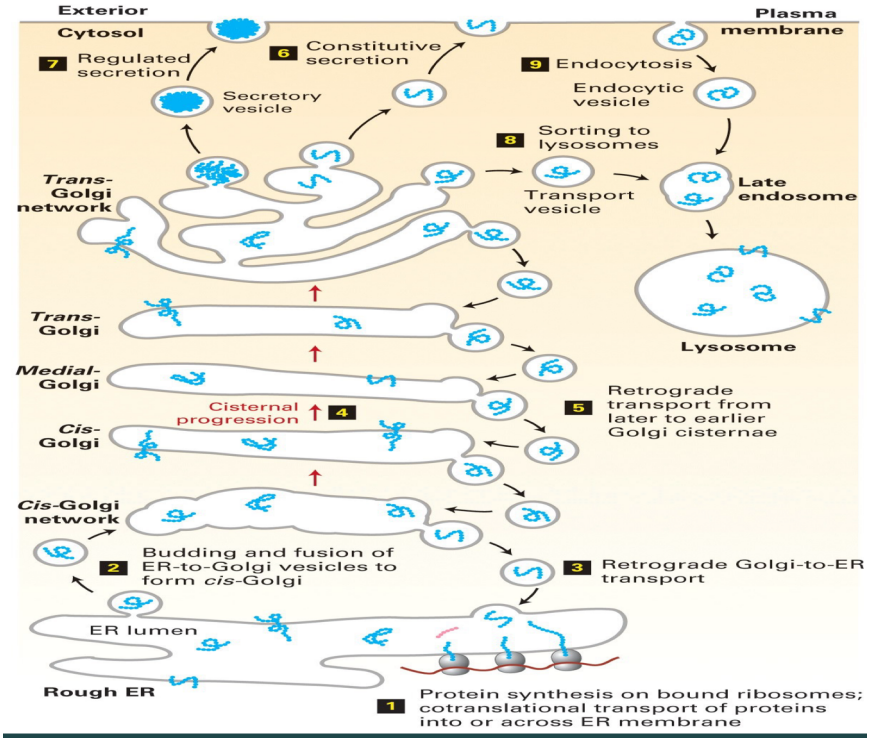




1. Le trafic vésiculaire - les bases

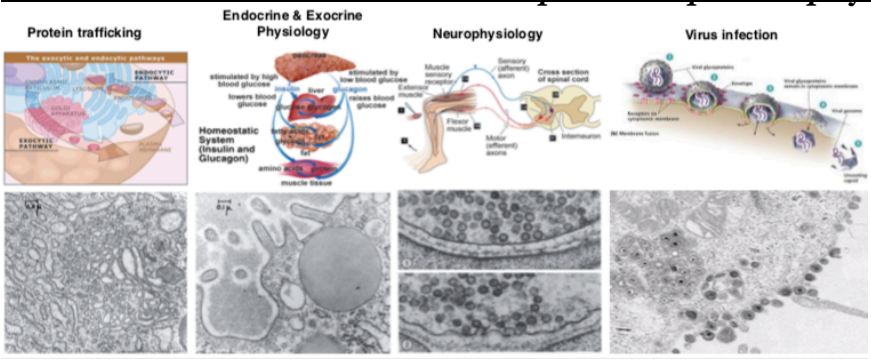
Le trafic vésiculaire
Sujets présentés:
✓ Les voies de trafic entre les compartiments lors de la sécrétion et de l'absorption de matériel
✓ Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et leur fusion

✓ Comment les protéines sont triées entre les différents compartiments
✓ Autres mécanismes de tri des protéines: Le transport sans liaison directe du cargo La maturation et la fusion de compartiments en entier



1.a. Les voies de trafic entre les compartiments lors de la sécrétion et de l'absorption de matériel

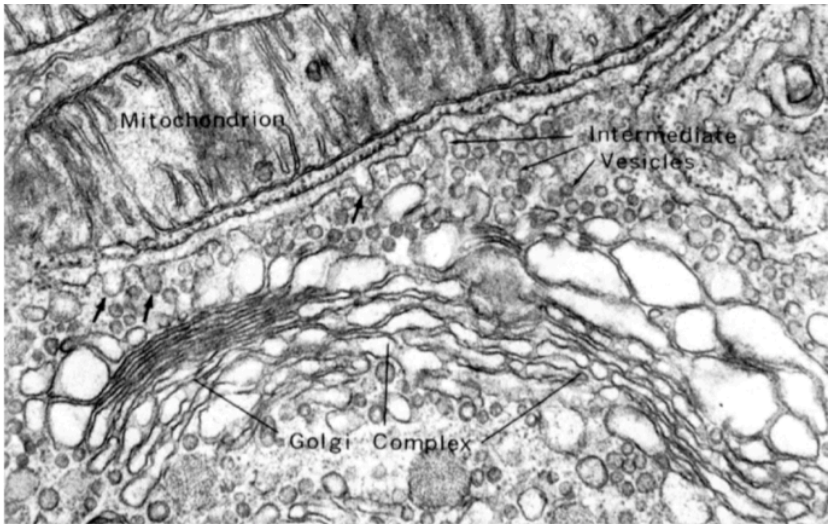
1.a.1. Le trafic vésiculaire est indispensable pour la physiologie



1.a.2. Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire

Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire

Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
		Utilisez ce chiffre pour trouver la maladie sur www.omim.org		
Combined deficiency of coagulation factors V and VIII	Autosomal recessive	227300	ERGIC-53 ER-Golgi intermediate compartment sorter (*LMAN1*). MCFD2 Forms a complex with ERGIC-53 (*MCFD2*)	Defective secretion of coagulation factors V and VIII due to disturbed sorting to ER-Golgi carrier vesicles
Hermansky-Pudlak syndrome (HPS)	Autosomal recessive	203300	Type 2 Adaptor-related protein complex 3 beta-1 subunit (*AP3B1*). Types 1, 3-8 Components of the biogenesis of lysosome-related organelles complexes 1 to 3 (BLOC1 to BLOC3) (*DTNBP1* encodes dysbindin, *BLOC1S3*; *HPS3*, *HPS5*, *HPS6*; *HPS1*, *HPS4*)	Defective biogenesis of lysosome-related organelles (melanosomes, platelet dense granules, lamellar bodies of type II alveolar epithelial cells, T-lymphocyte lytic granules); leakage of lysosomal membrane proteins to cell surface



1.a.3. Pourquoi une cellule eucaryote possède-t-elle différents compartiments?

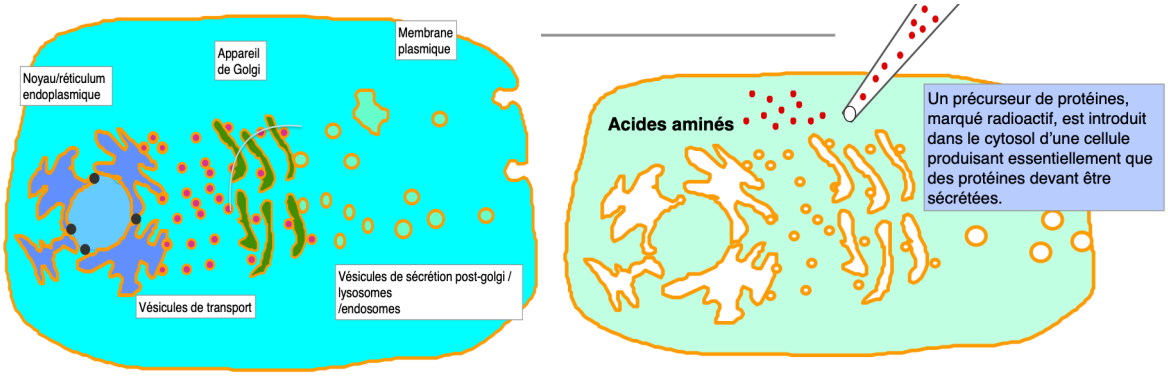
➢Chaque compartiment possède des fonctions différentes dans la modification, le tri, la sécrétion, l'absorption et la dégradation des protéines, des lipides et des sucres.

➢L'avantage: chaque compartiment peut fournir un environnement chimique différent, optimisé à sa fonction spécifique

➢Questions-clés:

- Comment se fait l'échangé entre les compartiments?
- Comment, malgré ces échanges, chaque compartiment garde son identité chimique?
- Quelles sont les chemins suivis par le flux de matériel entre les compartiments?

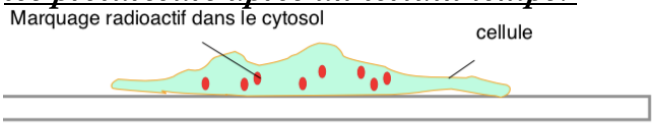
1.a.4. La plupart des organelles sont formées à partir du RE et sont connectées entre elles par le trafic vésiculaire

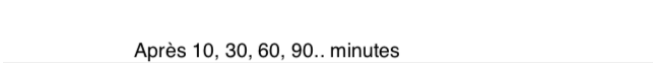


Un précurseur de protéines, marqué radioactif, est introduit dans le cytosol d'une cellule produisant essentiellement que des protéines devant être sécrétées.

Expérience clé: Microscopie électronique – autoradiographie

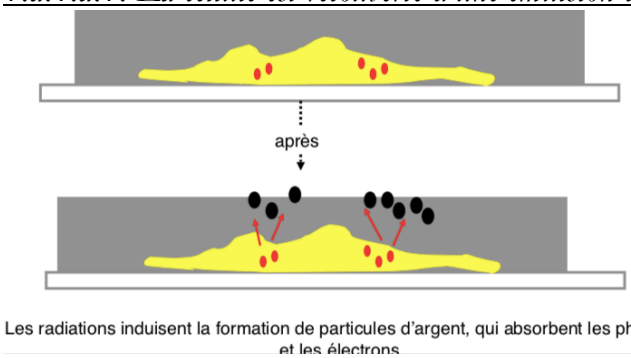
1.a.4.a. Où se trouveront les protéines/lipides radioactifs synthétisés à partir de ces précurseurs après un certain temps?





Marquage radioactif dans le cytosol ---cellule

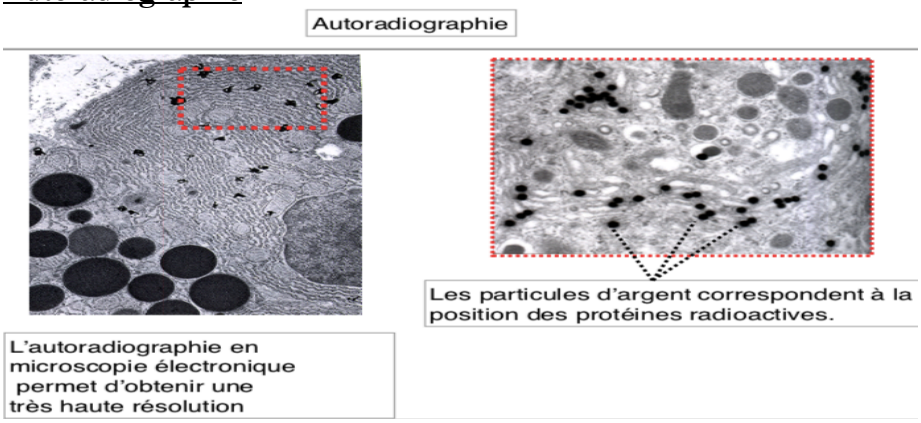
1.a.4.a.1. La cellule est recouverte d'une émulsion d'argent radio-sensible



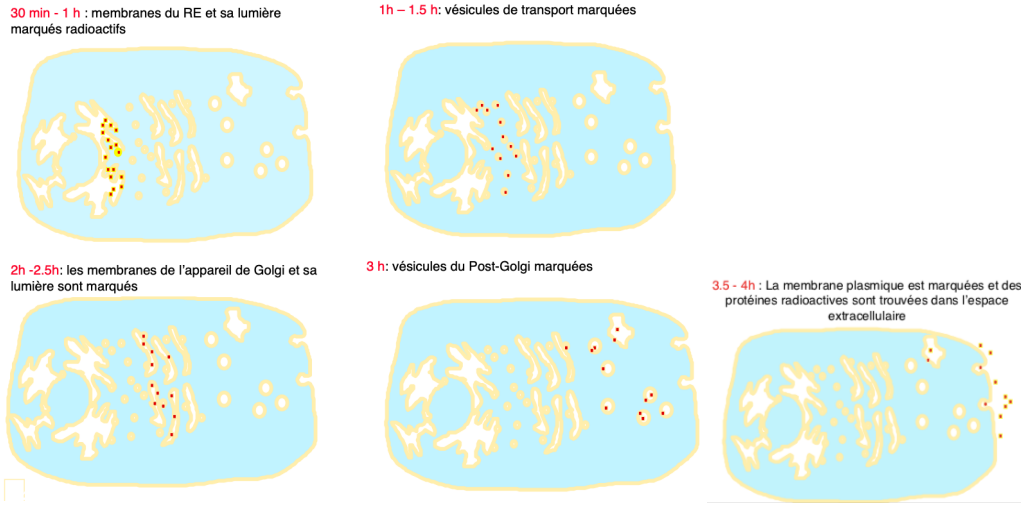
Les radiations induisent la formation de particules d'argent, qui absorbent les photons et les électrons

Les radiations induisent la formation de particules d'argent, qui absorbent les photons et les électrons.

Autoradiographie



L'autoradiographie en microscopie électronique permet d'obtenir une très haute résolution
Les particules d'argent correspondent à la position des protéines radioactives.



30 min - 1 h : membranes du RE et sa lumière marqués radioactifs
1h – 1.5 h: vésicules de transport marquées
2h -2.5h: les membranes de l'appareil de Golgi et sa lumière sont marqués
3 h: vésicules du Post-Golgi marquées
3.5 - 4h : La membrane plasmique est marquées et des protéines radioactives sont trouvées dans l'espace extracellulaire

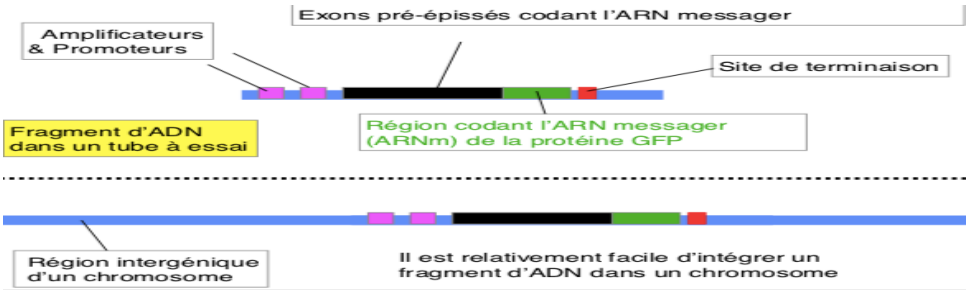
1.a.4.b. Conclusions de ces expériences de "pulse-chase":

Conclusions de ces expériences de "pulse-chase":

1. Les protéines nouvellement synthétisées dans une cellule de sécrétion migrent entre les compartiments selon l'ordre suivant:
RE-Golgi-membrane plasmique/lysosomes/ endosomes
2. Tous ces compartiments proviennent initialement du RE.
3. Durant le transfert du RE à l'appareil de Golgi et de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, ces protéines sont trouvées à l'intérieur de structure intermédiaires plus petites: " les vésicules de transport".

1.a.5. Une approche plus moderne: L'expression de protéines chimériques fluorescentes (GFP, green fluorescent protein)

Une approche plus moderne: L'expression de protéines chimériques fluorescentes (GFP, green fluorescent protein)



1.a.5.1.Des expériences de pulse-chase combinées à l'expression de protéines chimériques

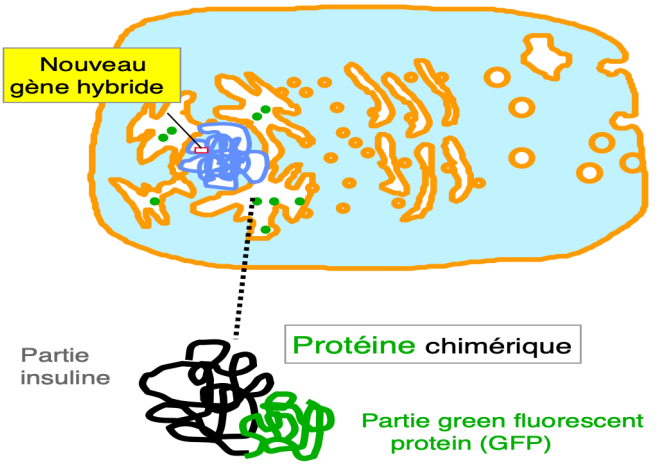
Des expériences de pulse-chase combinées à l'expression de protéines chimériques

L'expression de certains promoteurs/ activateurs peut rapidement être induite ou réprimée; exemple: le promoteur sensible à la tetracycline

De plus, l'export des protéines du RE peut être empêché en gardant les cellules à basse température (20°C)

L'expression des protéines chimériques pour une courte durée produit un "pulse".

La suppression de l'expression et l'élévation de la température permettent le "chase": une "vague" de protéines fluorescentes se déplace à travers les compartiments
Protéine chimérique

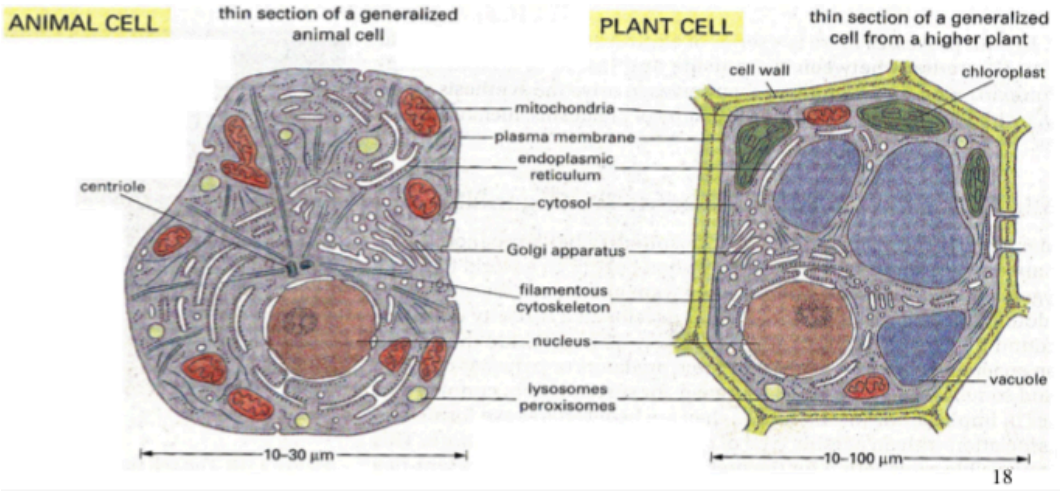


La localisation et l'apparence typiques des compartiments peuvent être utilisés pour identifier l'endroit où se trouvent les protéines chimériques

➢Le RE forme un réseau à travers l'ensemble de la cellule et autour du noyau

➢L'appareil de Golgi est souvent proche du noyau (région périnucléaire)

➢Les lysosomes, les endosomes et les mitochondries se trouvent souvent en périphérie et apparaissent comme des petits points en microscopie optique.

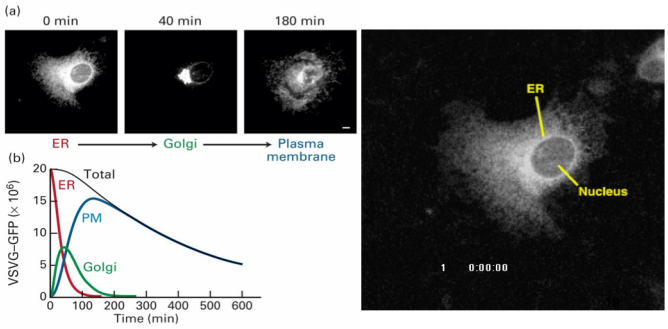


1.a.5.2. Les protéines chimériques GFP permettent de suivre la voie de sécrétion dans des cellules vivantes de mammifères

▪La protéine de sécrétion (comme modèle ici, la protéine G du virus vésiculaire stomatitis) est marqué fluorescent.

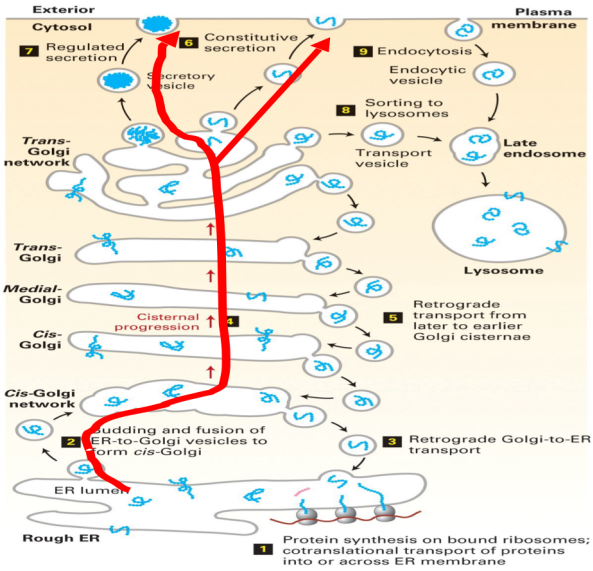
▪Initialement, elle se trouve dans le RE, puis se déplace vers l'appareil de Golgi pour atteindre finalement la membrane plasmique.

▪Sa présence dans différent compartiment peut être détecté par microscopie par fluorescence, puisque chaque compartiment possède une forme et une localisation spécifique dans la cellule.

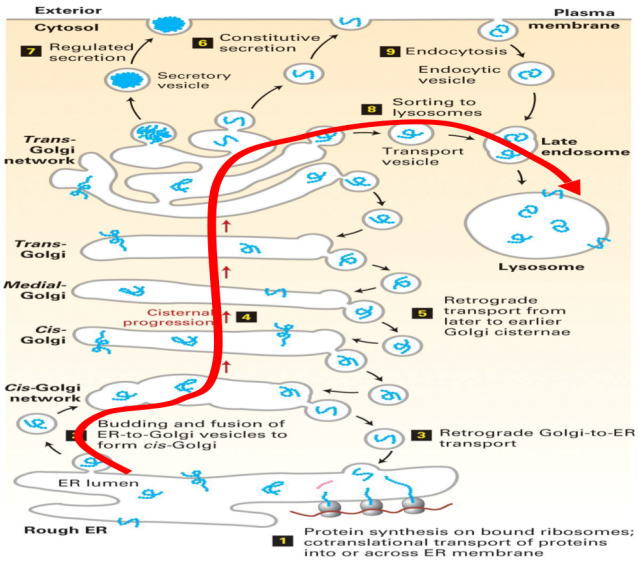


1.a.6. Les grandes lignes des voies de sécrétion et d'endocytose

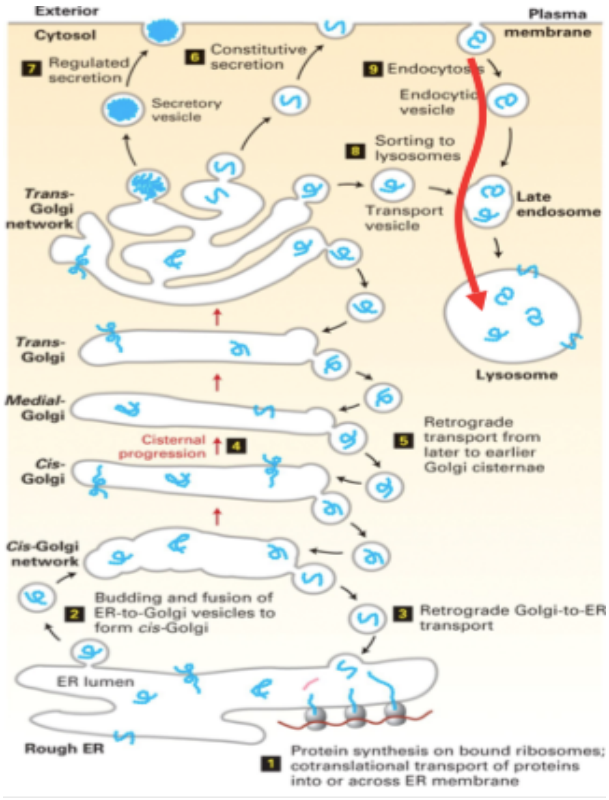
➢La voie de sécrétion: réticulum endoplasmique (RE) – appareil de Golgi – membrane plasmique



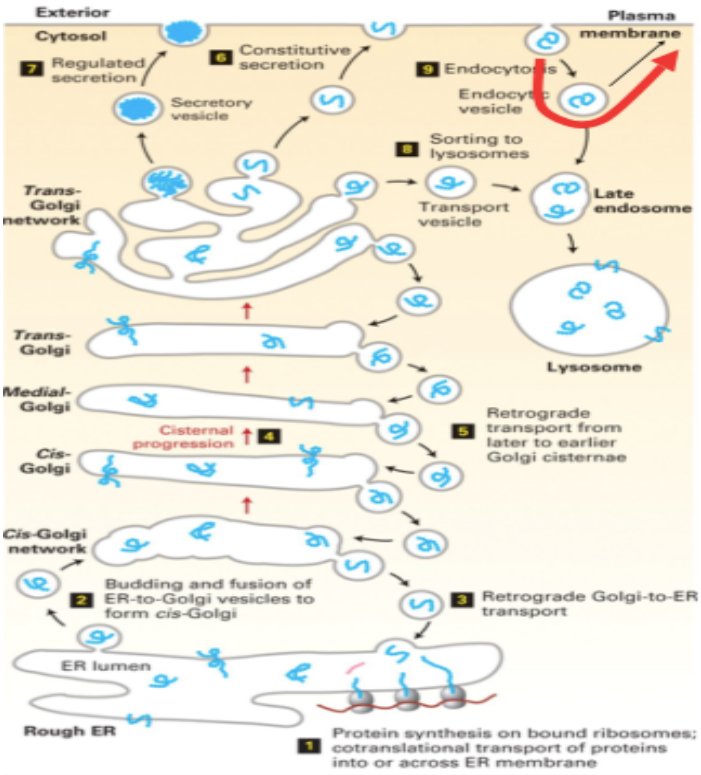
➢La voie biosynthétique lysosomale: RE-appareil de Golgi-endosomes-lysosomes



➢La voie d'endocytose: membrane plasmique - endosomes - lysosomes

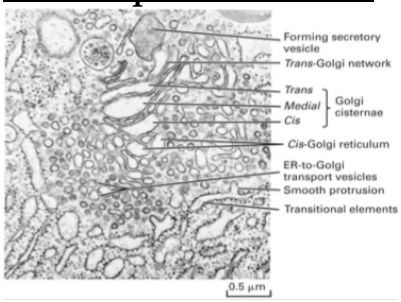


➢La voie de recyclage: membrane plasmique - endosomes – membrane plasmique



1.b. Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et la fusion des vésicules

1.b.1. La voie de sécrétion: RE-à- l'appareil de Golgi, exemple fondamental du transport vésiculaire

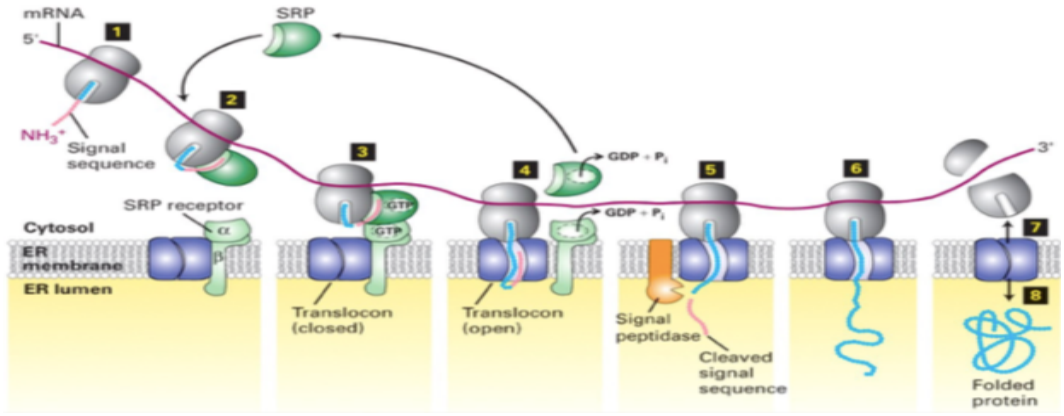


Concepts de base:

- ✓Capture des protéines cargo dans les vésicules de transport
- ✓Livraison au compartiment cible par fusion
- ✓Tri des protéines cargo initié par un signal
- ✓Homéostasie des organelles

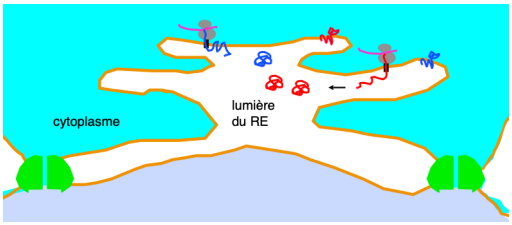
1.b.1.a. Les fonctions du réticulum endoplasmique

- ➢ Synthèse de protéines à sécréter
- ➢ Synthèse de tous les composants de l'appareil de Golgi, des endosomes, des lysosomes et de la membrane plasmique
- ➢ Glycosylation partiel (core-) des protéines
- ➢ Synthèse des lipides

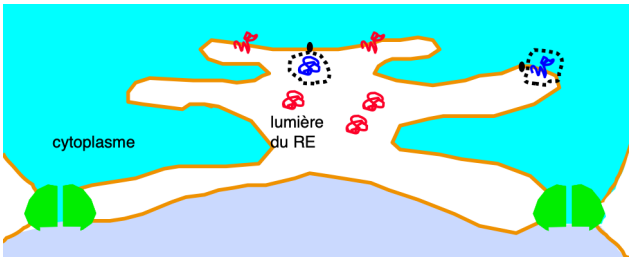


1.b.1.a.1. Quel est le destin des protéines membranaires ou luminales nouvellement synthétisées par le RE?

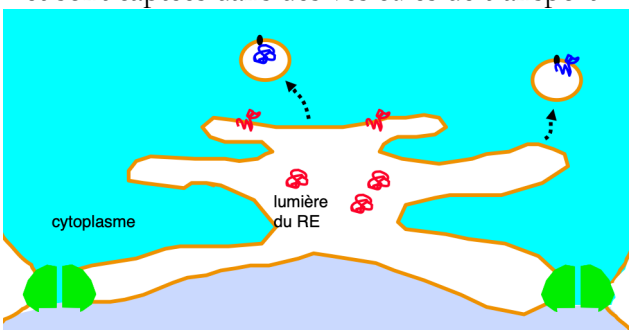
Certaines restent dans les membranes du RE et dans la lumière comme protéines fonctionnelles résidentes Certaines sont en transit et sont transportées dans différents lieux de la cellule.



Le cas le plus simple: Les protéines en "transit" se lient à des récepteurs dans la membrane du RE...

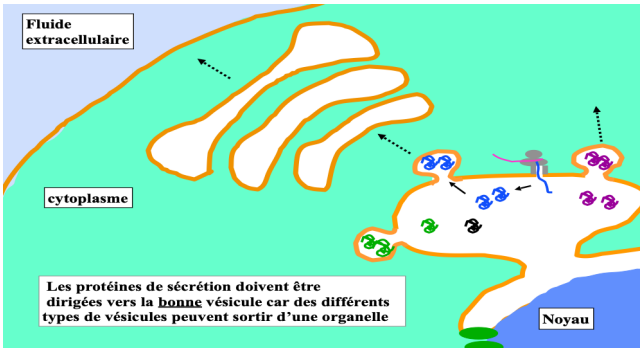


...et sont captées dans des vésicules de transport

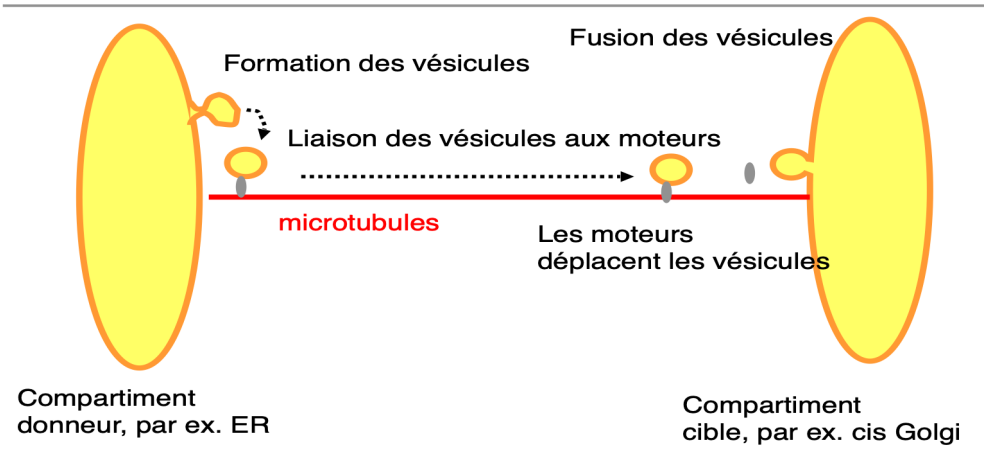


Fluide extracellulaire

Les protéines de sécrétion doivent être dirigées vers la bonne vésicule car des différents types de vésicules peuvent sortir d'une organelle

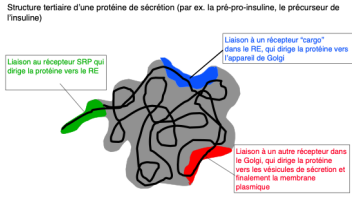


Les vésicules sont activement transportées le long des filaments d'actine ou des microtubules et finissent par fusionner avec le compartiment cible.



1.b.1.b. Le triage de protéines nécessite des séquences cibles exposées à la surface des protéines repliées

Structure tertiaire d'une protéine de sécrétion (par ex. la pré-pro-insuline, le précurseur de l'insuline)



Liaison au récepteur SRP qui dirige la protéine vers le RE

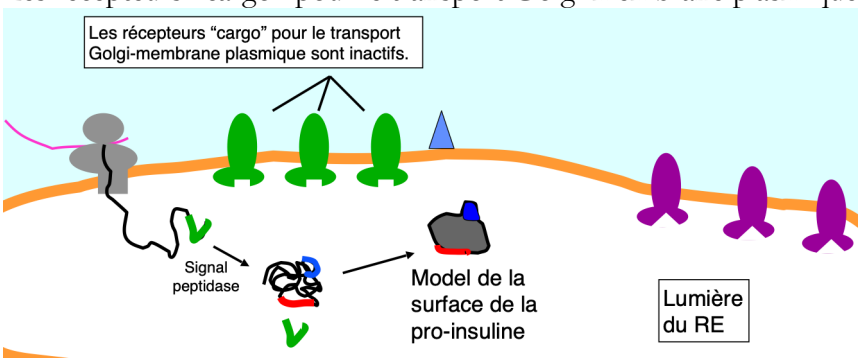
Liaison à un récepteur "cargo" dans le RE, qui dirige la protéine vers l'appareil de Golgi

Liaison à un autre récepteur dans le Golgi, qui dirige la protéine vers les vésicules de sécretion et finalement la membrane plasmique

1.b.2. Intégration d'une protéine cargo dans une vésicule de transport

Le ciblage d'une protéine (par ex. la pro-insuline) vers une vésicule de transport et la formation de cette vésicules sont deux processus reliés

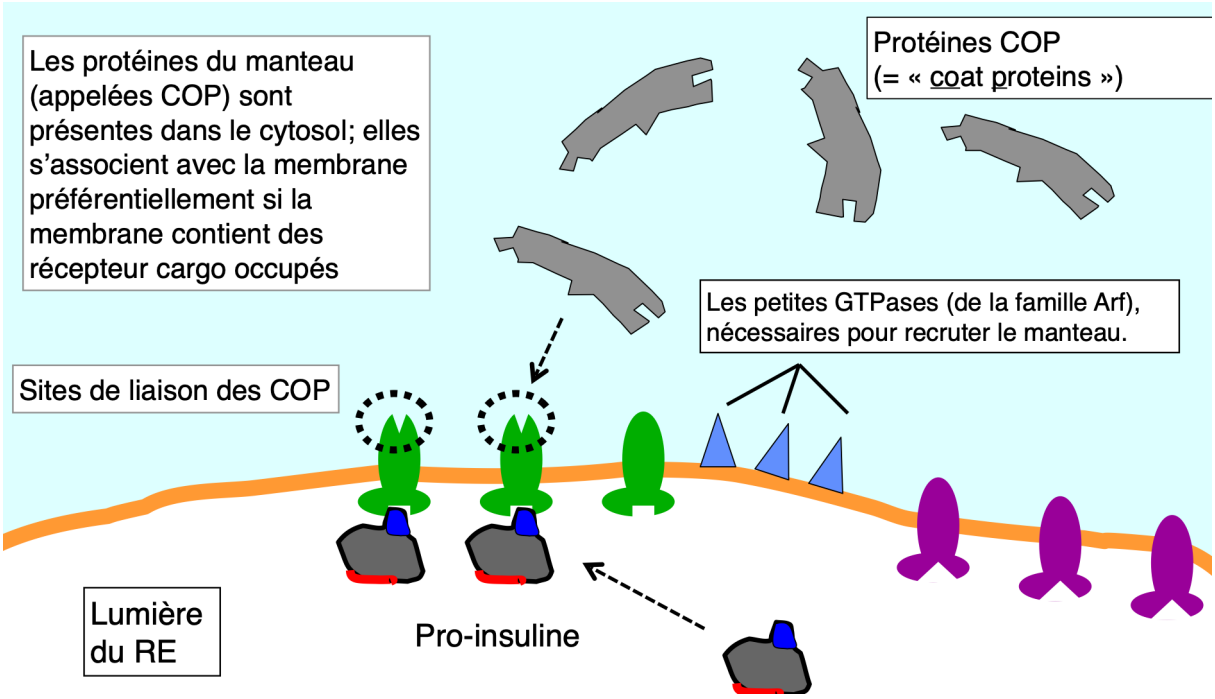
Les récepteurs "cargo" pour le transport Golgi-membrane plasmique sont inactifs.



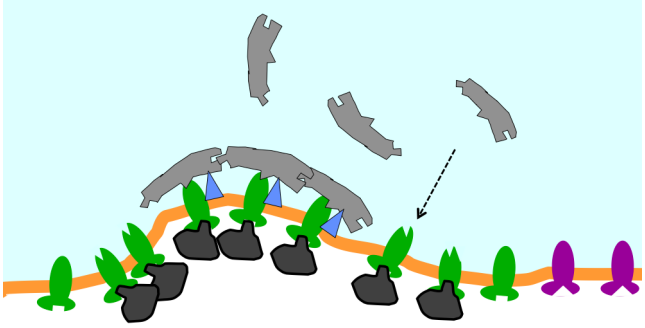
La pro-insuline se lie à une récepteur "cargo", ce qui induit un changement de conformation de la protéine, qui met en évidence les sites de liaison cytosoliques pour les protéines du manteau (ou coatomères)

Les protéines du manteau (appelées COP) sont présentes dans le cytosol; elles s'associent avec la membrane préférentiellement si la membrane contient des récepteur cargo occupés

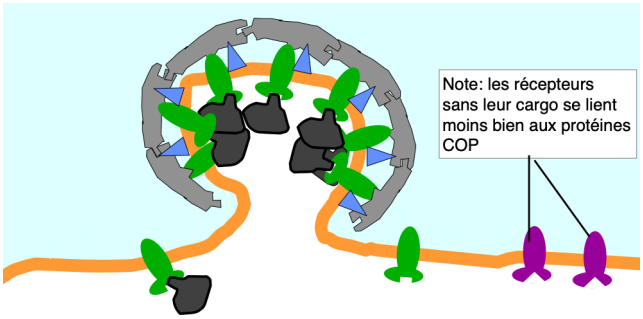
Les petites GTPases (de la famille Arf), nécessaires pour recruter le manteau.



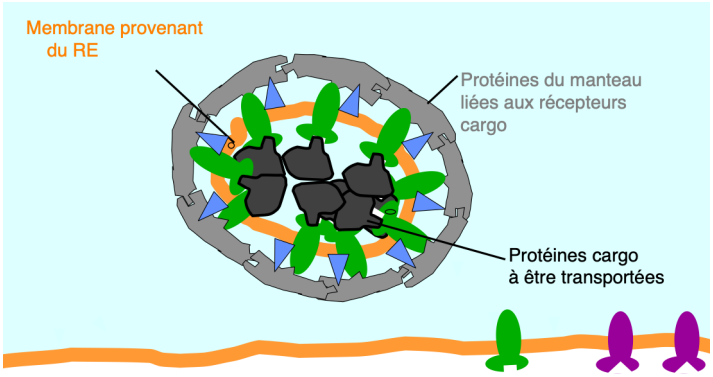
Les protéines COP se lient et s'assemblent entre elles ...



...en une structure ressemblant à un "manteau".

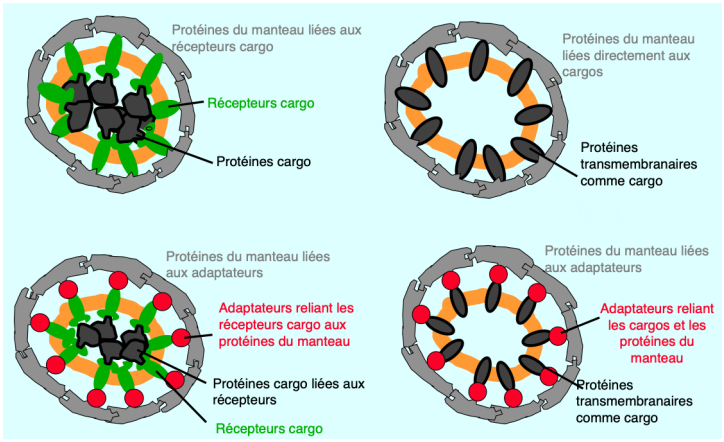


Une vésicule de transport formées contient les protéines cargo sélectionnées en concentration élevée



Membrane provenant du RE
Protéines du manteau liées aux récepteurs cargo
Protéines cargo à être transportées

1.b.2.a. Variations du thème: Les protéines cargo peuvent se lier aux protéines du manteau directement ou indirectement via des adaptateurs et des récepteurs



1.b.2.a.1. Protéines du manteau liées aux récepteurs cargo

Récepteurs cargo
Protéines cargo

1.b.2.a.2. Protéines du manteau liées directement aux cargos

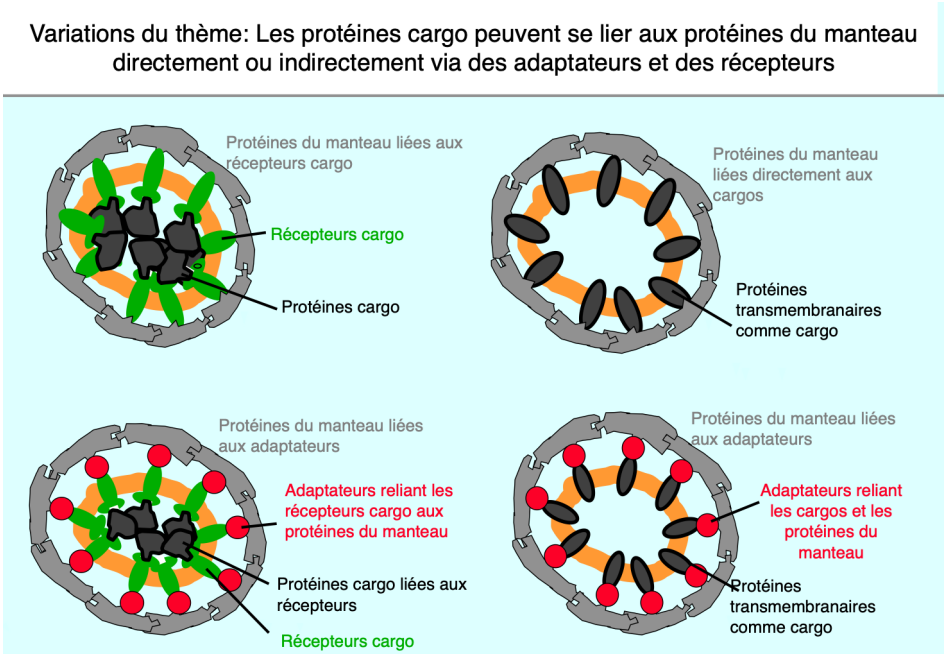
Protéines transmembranaires comme cargo

1.b.2.a.3. Protéines du manteau liées aux adaptateurs

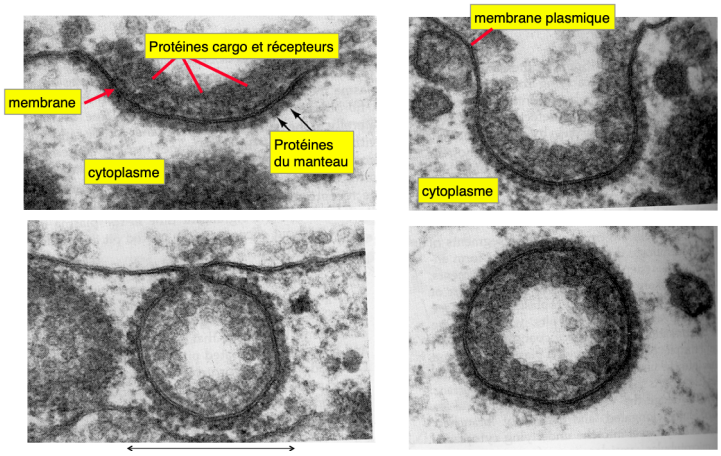
Adaptateurs reliant les récepteurs cargo aux protéines du manteau
Protéines cargo liées aux récepteurs
Récepteurs cargo

1.b.2.a.4. Protéines du manteau liées aux adaptateurs

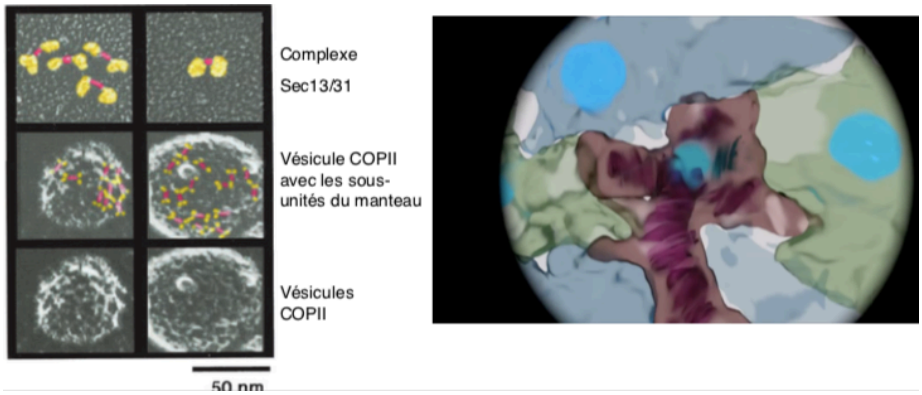
Adaptateurs reliant les cargos et les protéines du manteau
Protéines transmembranaires comme cargo



1.b.3. Vésicule de transport naissante observée par microscopie électronique



Structure des sous-unités Sec13/31 et Sec23/24 des vésicules COPII: Elles forment un manteau recouvrant l'ensemble de la surface de la vésicule



Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire

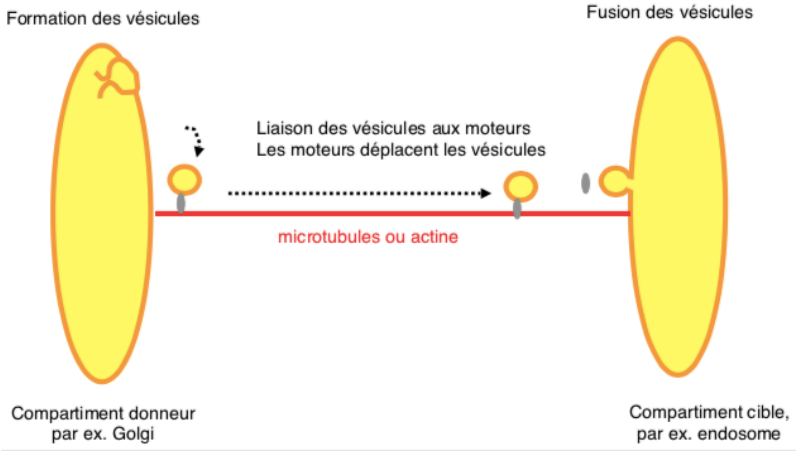
Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire

Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Cranio-lenticulo-sutural dysplasia (CLSD)	Autosomal recessive	607812	SEC23A Component of the COPII coat that functions in membrane trafficking from the ER to the Golgi (*SEC23A*)	Abnormal bone and connective tissue formation – potentially resulting from a defect in the secretion of extracellular matrix proteins; dilatation of the ER in fibroblasts, cytoplasmic mislocalization of the COPII component SEC31
Chylomicron retention disease (CMRD) Anderson disease CMRD with Marinesco-Sjogren syndrome	Autosomal recessive	246700, 607689, 607692	Sar1b Small GTPase involved in vesicle budding from ER (*SARA2*)	Accumulation of chylomicron-like particles in membrane-bound compartments of enterocytes; large lipid droplets in enterocytes

1.b.4. Les mécanismes moléculaires régissant la formation des vésicules et la fusion des vésicules

mécanismes moléculaires
fusion des vésicules

1.b.4.a. Les vésicules sont activement transportées le long des filaments d'actine ou des microtubules et finissent par fusionner avec le compartiment cible.



1.b.5. Un transport actif pour surmonter la viscosité du cytosol

1.b.6. Les déficiences des protéines motrices et leurs conséquences

Les déficiences des protéines motrices et leurs conséquences

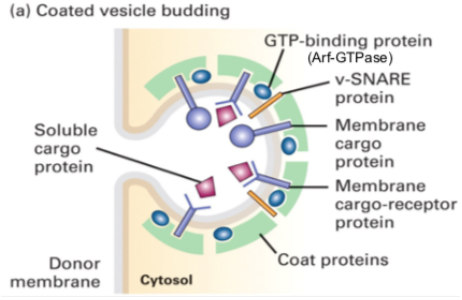
Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2A1 (CMT2A1)	Autosomal dominant	118210	KIF1B Kinesin, microtubule motor (*KIF1B*)	Defects in sensory and motor-nerve functions; disturbed axonal transport of synaptic vesicle precursor
Griscelli syndrome (GS)	Autosomal recessive	214450, 609227	Types 1 and 3 Myosin 5a; an actin-based motor (*MYO5A*)	Accumulation of melanosomes in melanocytes, defect in melanosome tethering at peripheral actin (all three types); multiple neurological defects (type 1); uncontrolled T-lymphocyte and
		256710	Type 3 Melanophilin (Slac-2) bridges between myosin 5a and Rab27a Elejalde syndrome Suggested to represent the same entity as GS1	
Huntington's disease	Autosomal dominant	143100	Huntingtin (Htt) Associates with microtubules and proteins involved in endo- or exocytic vesicle transport; antiapoptotic; involved in regulation of gene transcription; pathogenic forms contain expanded polyglutamine (polyQ) tracts (*HD*)	Accumulation of aggregated ubiquitin-conjugated proteins in neurons and glia; synapticdysfunction; selective neuronal death in cerebral cortex and striatum; polyQ-Htt disrupts microtubule association of dynactin and transport of brain-derived neurotrophic factor (BDNF);

1.b.7. Un désassemblage actif du manteau expose la machinerie de fusion et permet l'accostage

Après le détachement de la vésicule du compartiment donneur, le manteau est désassemblé.

Les complexes COPII possèdent une activité GTPase de "destruction" dans l'une de leurs sous-unités (Sar1, un membre de la famille de GTPases Arf) qui permet le désassemblage du manteau par hydrolyse du GTP. Ceci constitue une sorte de "timer" qui donne une durée de vie du manteau sur la vésicule déterminée.

Seules les vésicules non- mantelées peuvent se lier et fusionner avec la membrane acceptrice.

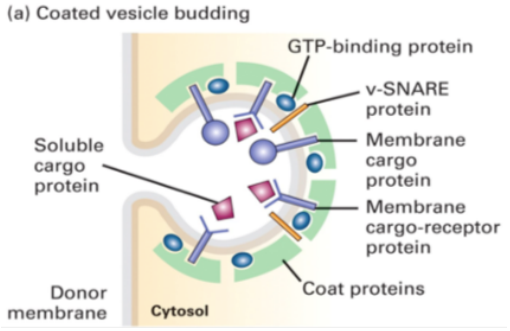


1.b.7.a. les protéines Rab et les SNAREs

Les vésicules naissantes n'incorporent pas seulement les cargos, mais également les protéines Rab et les SNAREs, qui sont requises pour la fusion avec le compartiment cible.

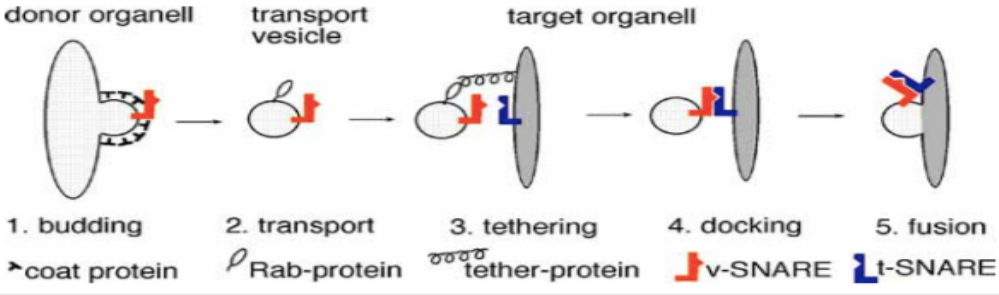
Les protéines du manteau inactivent les protéines à fusion (SNARE) pendant que la vésicule est formée

==> ce qui empêche leur activité de fusion d'avoir lieu durant cette étape!



La reconnaissance du compartiment cible par les vésicules de transport comporte deux étapes:

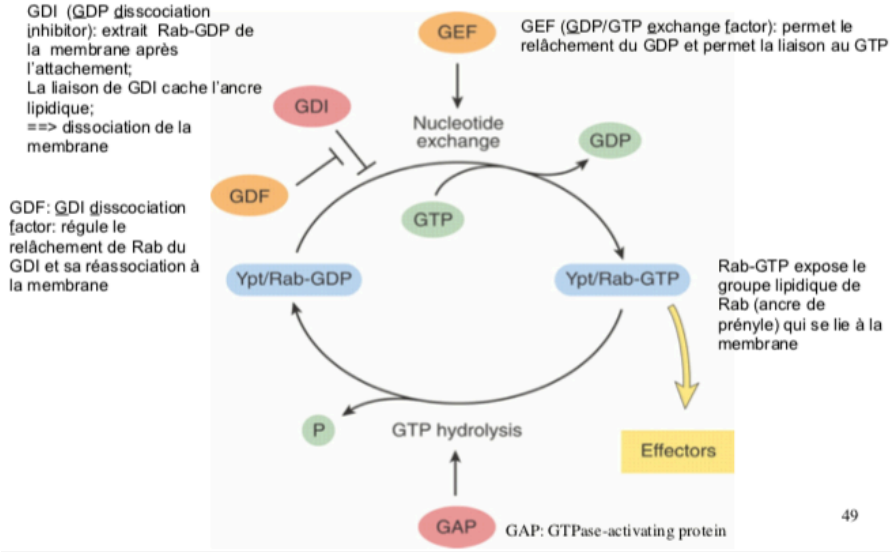
- l'accostage (tethering) et
- l'attachement (docking)



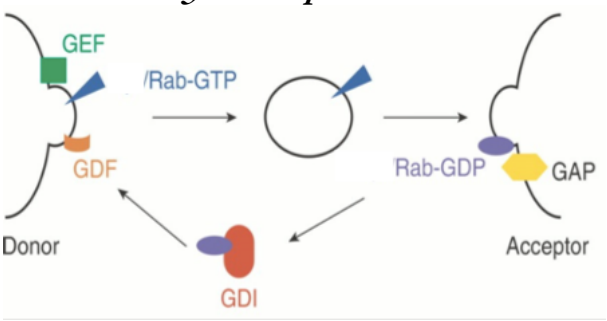
L'**accostage** est l'interaction initial et relativement faible avec la membrane cible; elle depend des protéines Rab et de leurs cofacteurs (appelés les effecteurs Rab ou tethering proteins).

L'**attachement** est une liaison ferme amenant à une apposition étroite entre la vésicule et la membrane cible; il nécessite les protéines SNARE.

1.b.1. Le cycle des protéines Rab régule l'association de celles-ci à la membrane et l'activation de leurs effecteurs



1.b.1.a. Le cycle des protéines Rab



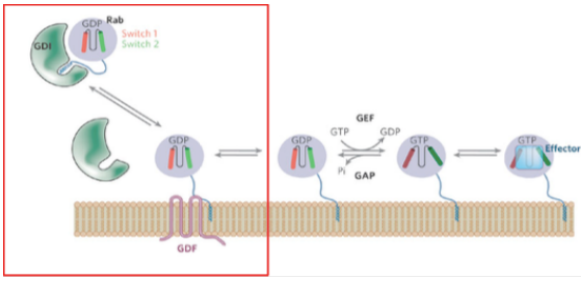
Après la fusion, le GDI aide au recyclage de Rab-GDP vers le compartiment donneur pour un nouveau cycle de transport.

Au compartiment donneur, Rab-GDP est réactivé et réincorporé à la membrane par GDF et par l'échange du GDP pour GTP

1.b.1.a.1. L'activité de GDF et GDI

GDI recouvre un ancre lipidique qui permet à la protéine Rab de s'accrocher à une membrane

GDF catalyse la dissociation de GDI et aide ainsi à réinsérer la protéine Rab dans une membrane.



1.b.1.a.2. Les GTPases Rab causent des maladies héritables

Les GTPases Rab causent des maladies héritables

Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2B (CMT2B)	Autosomal dominant	600882	Rab7a Late endosomal small GTPase (*RAB7*)	Peripheral sensory neuropathy; axonal degeneration; experiments with cultured cells suggest function of Rab7 in trafficking of neutotrophin receptors – defects of which may lead to neurodegeneration
Category B Griscelli syndrome (GS)	Autosomal recessive	607624	Type 2 Rab27a, small GTPase involved in regulated secretory processes (*RAB27A*)	macrophage activation; hemophagocytosis in multiple organs; defect in localizing secretory lysosomes to the immunological synapse in cytotoxic T cells (type 2)

Les GTPases Rab causent des maladies héritables

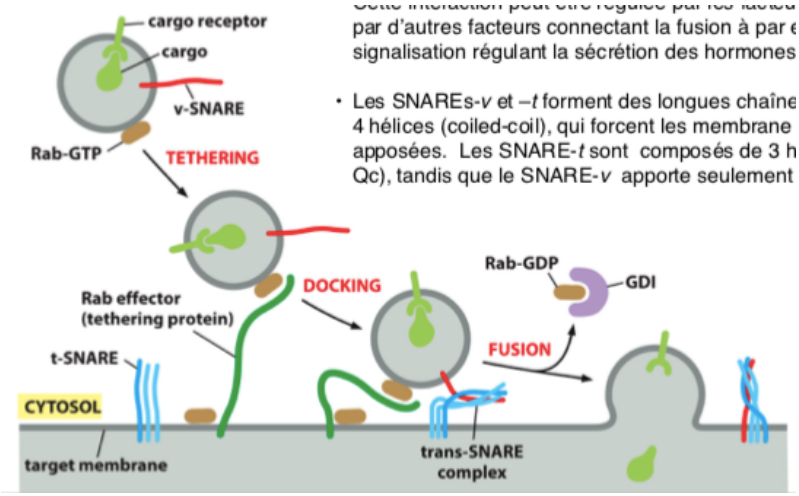
Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
X-linked non-specific mental retardation (MRX)	X-linked semidominant	309541	RabGDIα, Rab GDP dissociation inhibitor (*RABGDIA*)	Defective recycling and membrane targeting of Rab GTPases; possibly minor alterations in neuronal development
Tuberous sclerosis (TS)	Autosomal dominant	191100	Tuberin (Rab5GAP) GTPase-activating protein, modulator of endocytosis, tumor suppressor. Also shows GAP activity for the small GTPase Rap1 (*TSC2*)	Hamartomata in multiple organ systems; tumor formation; suggested defect in endocytic pathway function, leading to mis-sorting of internalized molecules that would normally undergo lysosomal degradation
Spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDT)	X-linked recessive	313400	Sedlin (homologue of *S. cerevisiae*; p20, Trs20p Component of the TRAPP complex that mediates tethering in ER-to-Golgi transport (*SEDL*)	Skeletal abnormalities and early-onset osteoarthritis; cell biological consequenses not well known; SEDL chondrocytes display excessive cytoplasm with abundant Golgi complexes and dilated rough ER

1.b.2. L'**accostage** est suivi par l'attachement, qui nécessite la formation des complexes SNARE

- Les vésicules s'attachent par formation de complexes trans entre les SNAREs vésiculaire (-***v***) et target (-***t***).

- Cette interaction peut être régulée par les facteurs de l'accostage et par d'autres facteurs connectant la fusion à par ex. les cascades de signalisation régulant la sécrétion des hormones.

- Les SNAREs-***v*** et –***t*** forment des longues chaînes de "serpentins" à 4 hélices (coiled-coil), qui forcent les membrane à être étroitement apposées. Les SNARE-***t*** sont composés de 3 hélices (Qa, Qb et Qc), tandis que le SNARE-***v*** apporte seulement une hélice (R).



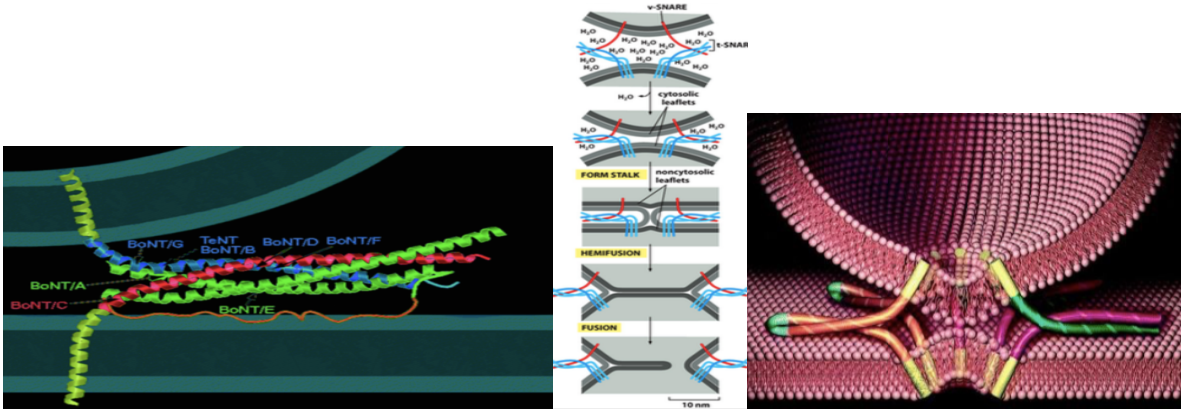
par d'autres facteurs connectant la fusion à par
signalisation régulant la sécrétion des hormones
• Les SNAREs-*v* et –*t* forment des longues chaîne
4 hélices (coiled-coil), qui forcent les membrane
apposées. Les SNARE-*t* sont composés de 3 h
Qc), tandis que le SNARE-*v* apporte seulement

1.b.2.1. Model moléculaire du complex SNARE entre deux membranes

Les complexes de SNARE-***v/t*** tiennent les membranes en contact, ce qui favorise la fusion.

Les alpha-hélices transmembranaires de SNAREs forment un continuum avec le complexe en serpentin. Ceci peut forcer les membranes à s'apposer. De plus, une tension et une déformation de la membrane se produisent, puisque les hélices alpha sont généralement des structures linéaires.

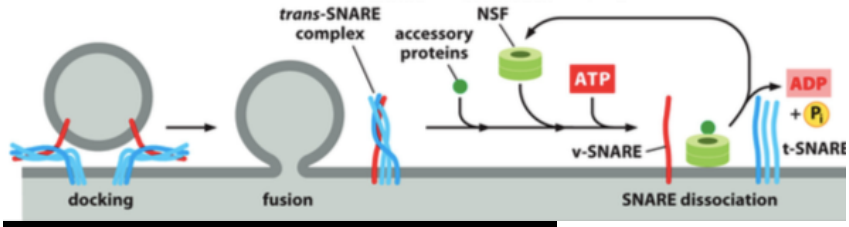
model « SNAREpin » de la fusion des membranes

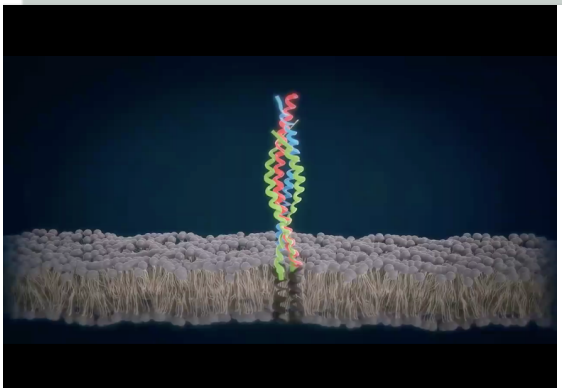


Perturbation de la structure lipidique par force mécanique

1.b.3. La machinerie de fusion est réactivée après la fusion

- Après la fusion, les SNAREs sont piégés en un complexe *v*-/*t*- inacif.
- La protéine NSF, qui est une chaperonne et une ATPase, et son cofacteur ⟨-SNAP dissocient ce complexe, réactivant ainsi les SNAREs.
- Le SNARE-*v* peut alors retourner à sa membrane d'origine.



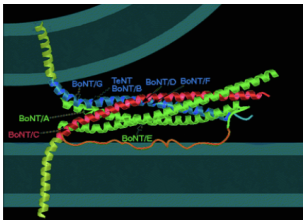


SNARE-mediated membrane fusion

1.b.3.a. Se "BOTOXer" = détruire les SNAREs de ses neurones

Note: Les SNAREs sont aussi des cibles potentielles pour des toxines naturelles: la neurotoxine botulique (BoNT) et la toxine du tétanos (TeNT). Ces toxines sont des protéases sécrétées par les bactéries (Clostridium botulinum, Clostridium tetani), qui coupent les SNAREs nécessaire pour l'exocytose des neurotransmetteurs à la synapse. Une faible quantité de toxine peut tuer une cellule!

Les sites de clivage sur les SNAREs de ces différentes toxines sont indiqués.



1.b.3.b. Quelques conséquences de mutations dans les protéines SNARE

Quelques conséquences de mutations dans les protéines SNARE

Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Cerebral dysgenesis, neuropathy, ichtyosis, and palmoplantar keratoderma syndrome (CEDNIK syndrome)	Autosomal recessive	609528	SNAP-29 SNARE protein implicated as a general regulator of membrane trafficking; modulator of synaptic transmission (*SNAP29*)	Multiple neurological defects; progressive microcephaly; accumulation of abnormal vesicles in spinous and granular epidermal layers; abnormal maturation of lamellar granules; mislocation of epidermal glucosylceramides and proteases; suggested defect in vesicle transport
Amyotrophic lateral sclerosis 8 (ALS8)	Autosomal dominant	608627	VAMP-associated protein B Implicated as SNARE regulator; localizes in ER and Golgi compartments; associates with microtubules; suggested function in the unfolded protein response (*VAPB*)	Progressive degeneration of motor neurons; possible disturbance of neuronal membrane trafficking; malfunction of VAPB to mediate unfolded protein response may contribute to motor neuron degeneration

1.c. Comment les protéines sont triées entre les différents compartiments

1.c.1. Comment se font la spécificité et l'identité des compartiments?

Les compartiments des voies de sécrétion et d'endocytose possèdent des compositions chimiques différentes, ont des différentes tâches, et leurs apparences sont différentes

- Cependant du matériel est transité en permanence par les vésicules de transport!

==> Des mécanismes sont nécessaires pour garantir la spécificité et la direction du transport

La spécificité est assurée à différents niveaux:

1. L'incorporation sélective des protéines cargo dans les vésicules de transport; les protéines résidentes des organelles restent normalement à l'intérieur, car elles ne possèdent pas de peptide-signal pour le transport.

2. La reconnaissance spécifique du compartiment cible par les protéines de l'accostage et de l'attachement (le système Rabs et SNARE)

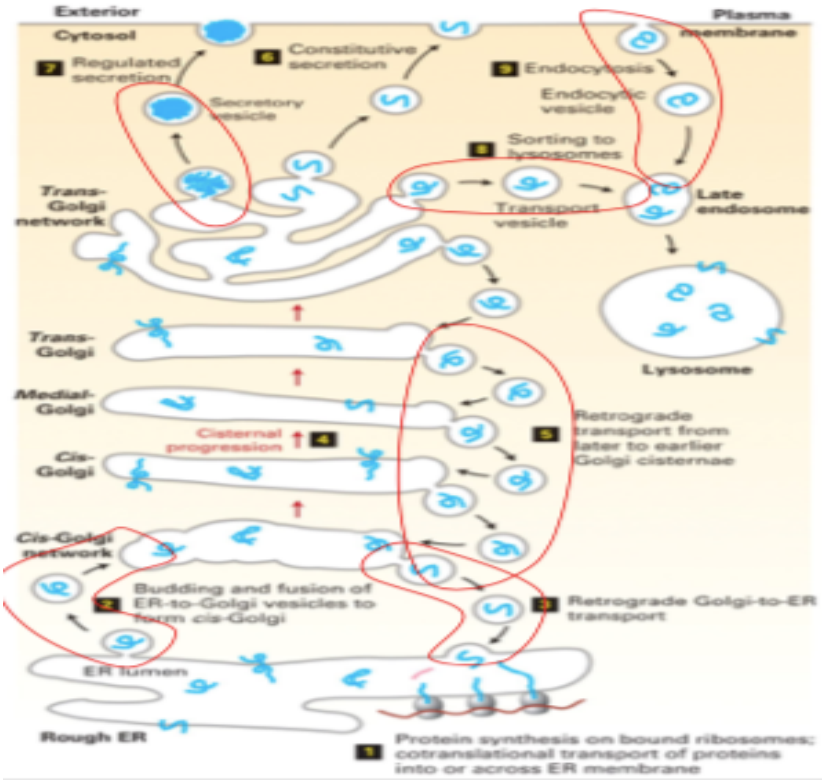
3. Les mécanismes de récupération: rapporter les protéines résidentes qui se sont échappées dans leur compartiment propre

Nous allons voir des exemples de chacun de ces mécanismes

1.c.2. Des vésicules de transport agissent à beaucoup – mais pas à toutes les étapes du transport

Elles utilisent des protéines du manteau et des adaptateurs/récepteurs différents, mais elles montrent les mêmes propriétés que les vésicules du trafic entre le RE et l'appareil de Golgi:

- ✓La capture des cargo dans les vésicules de transport
- ✓La livraison au compartiment cible par fusion
- ✓Le tri des cargo dans les vésicules par des signaux peptidiques



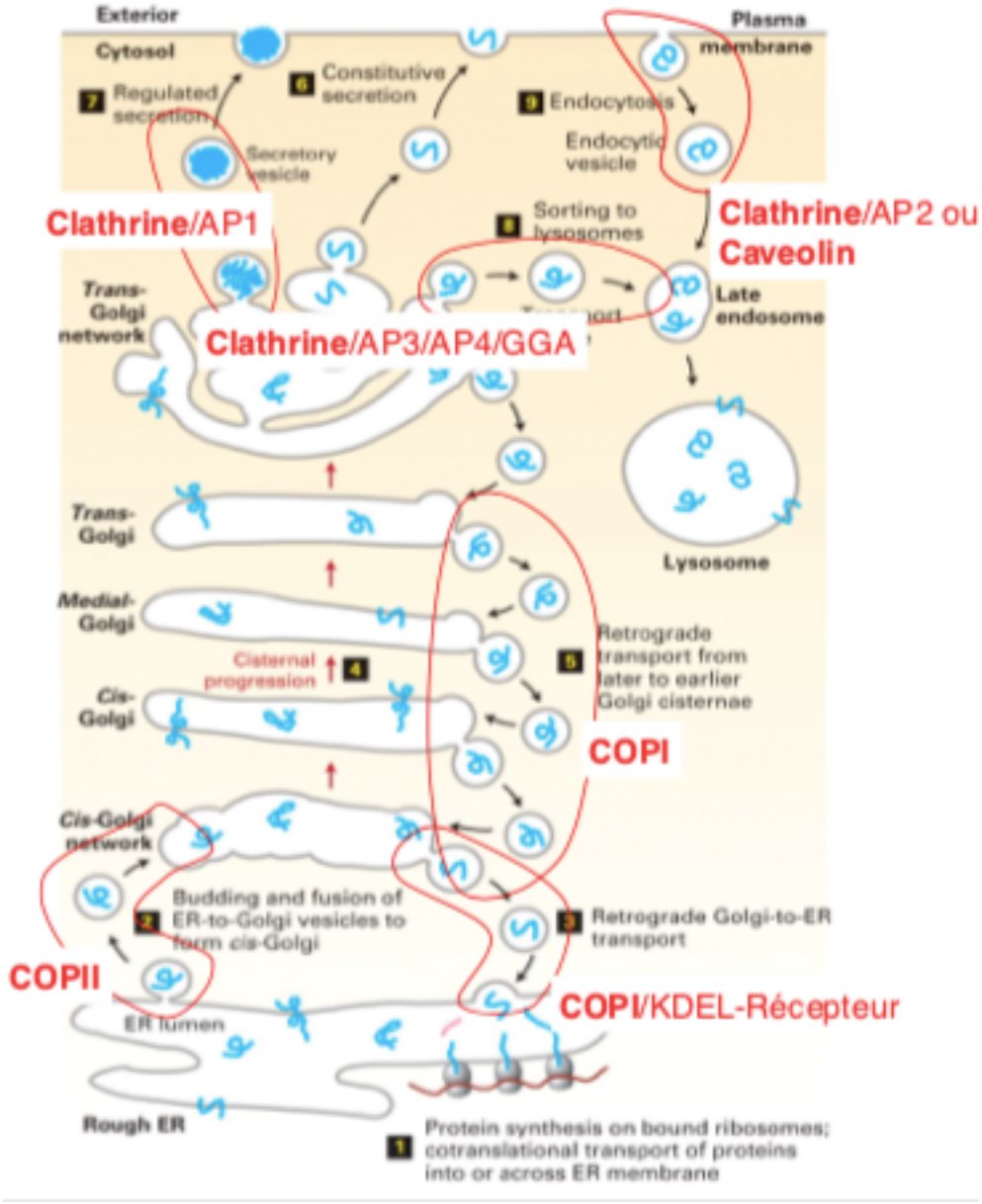
1.c.2.a. L'incorporation sélective I

L'incorporation sélective I: différentes vésicules de transport agissent à différentes étapes du transport

La formation de ces différentes vésicules dépend des différents types de manteau:

- COPI
- COPII
- Clathrine
- Cavéoline

Le spectres des protéines transportées par ces manteaux se chevauchent partiellement mais ne sont pas identique.

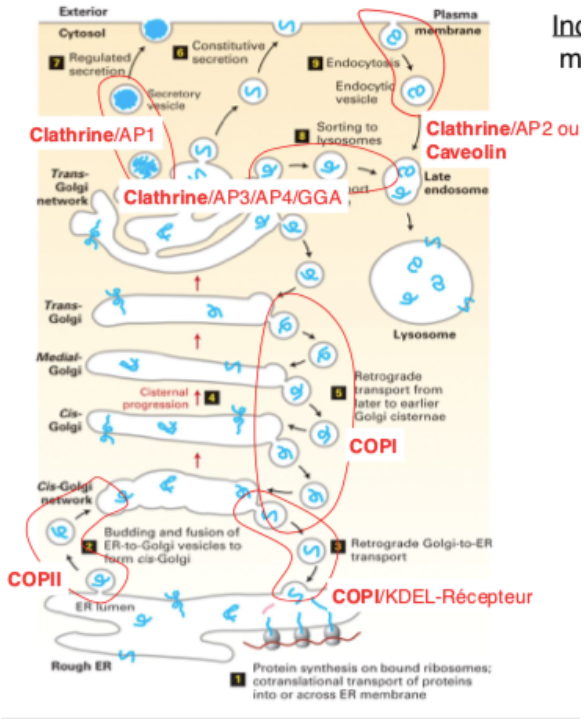


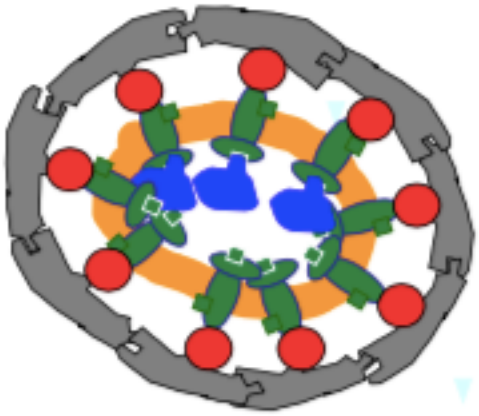
1.c.2.a. L'incorporation sélective II

Incorporation sélective II: Une protéine du manteau ne peut incorporer que certains types de cargo

Chaque manteau forme des vésicules pour des types différents de cargo, qui reconnaît des récepteurs et/ou adaptateurs différents.

Un même manteau peut s'associer avec une variété d'adaptateurs; le meilleur exemple est pour la clathrine qui peut s'associer à 6 adaptateurs.





1.c.2.a.1. Les protéines cargo utilisent une grande variété de séquences signal pour être reconnues par les récepteurs, les adaptateurs ou directement par les protéines du manteau.

Les protéines cargo utilisent une grande variété de séquences signal pour être reconnues par les récepteurs, les adaptateurs ou directement par les protéines du manteau.

TABLE 17-2 Known Sorting Signals That Direct Proteins to Specific Transport Vesicles

Signal Sequence*	Proteins with Signal	Signal Receptor	Vesicles That Incorporate Signal-bearing Protein	
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	ER-resident luminal proteins	KDEL receptor in *cis*-Golgi membrane	COPI	
Lys-Lys-X-X (KKXX)	ER-resident membrane proteins (cytosolic domain)	COPI α and β subunits	COPI	Direct
Di-acidic (e.g., Asp-X-Glu)	Cargo membrane proteins in ER (cytosolic domain)	COPII / subunit	COPII	
Mannose 6-phosphate (M6P)	Soluble lysosomal enzymes after processing in *cis*-Golgi	M6P receptor in *trans*-Golgi membrane	Clathrin/AP1	
	Secreted lysosomal enzymes	M6P receptor in plasma membrane	Clathrin/AP2	
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	LDL receptor in the plasma membrane (cytosolic domain)	AP2 complex	Clathrin/AP2	Nécessitant un adaptateur/récepteur
Tyr-X-X-Φ (YXXΦ)	Membrane proteins in *trans*-Golgi (cytosolic domain)	AP1 (μ1 subunit)	Clathrin/AP1	
	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 (μ2 subunit)	Clathrin/AP2	
Leu-Leu (LL)	Plasma membrane proteins (cytosolic domain)	AP2 complexes	Clathrin/AP2	

*X = any amino acid; Φ = hydrophobic amino acid. Single-letter amino acid abbreviations are in parentheses.

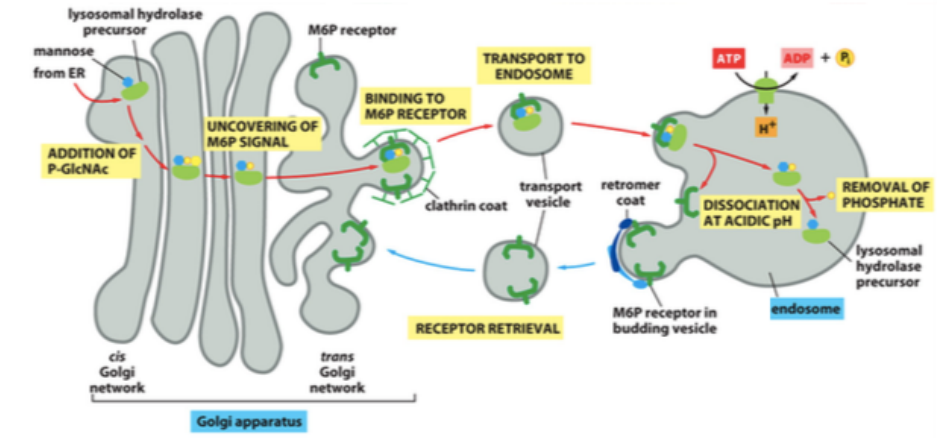
1.c.2.a.2. La voie biosynthétique vers les lysosomes et les endosomes utilise une glycosylation comme signal

La voie biosynthétique vers les lysosomes et les endosomes utilise une glycosylation comme signal

➢ Beaucoup de précurseurs des protéines destinées aux lysosomes ou aux endosomes (précoces et/ou tardives) reçoivent le Man-6-P dans le Golgi.

➢ Le récepteur au Man-6-P dans le trans-Golgi reconnaît son ligand et initie l'empaquetage dans les vésicules à clathrine destinées aux endosomes.

➢ Depuis les endosomes, les protéines suivent la voie par défaut (sans signal) vers les lysosomes.



1.c.2.a.3. Des mucolipidoses résultent de défauts dans la formation de mannose-6- phosphate sur les protéines dans l'appareil de Golgi

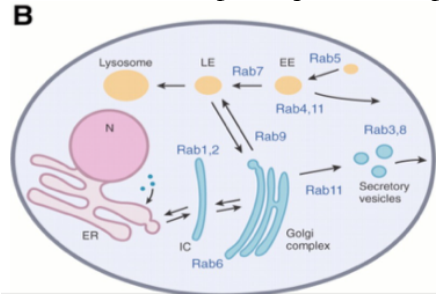
Des mucolipidoses résultent de défauts dans la formation de mannose-6- phosphate sur les protéines dans l'appareil de Golgi

Des mucolipidoses résultent de défauts dans la formation de mannose-6-phosphate sur les protéines dans l'appareil de Golgi

Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Category A Mucolipidosis II (I-cell disease) Mucolipidosis IIIA (classical pseudo-Hurler polydystrophy) Mucolipidosis IIIC (variant pseudo-Hurler polydystrophy)	Autosomal recessive	252500, 252600, 252605	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase Catalyses the formation of mannose 6-phosphate on lysosomal protein. α/β-subunits (*GNPTAB*), γ-subunit (*GNPTAG*)	Leakage of lysosomal hydrolases from cells due to lack of mannose-6-phosphate targeting signal; lysosomal accumulation of undegraded macromolecules

1.c.2.a.4. Reconnaissance spécifique du compartiment cible I : Les protéines Rab

Reconnaissance spécifique du compartiment cible I : Les protéines Rab

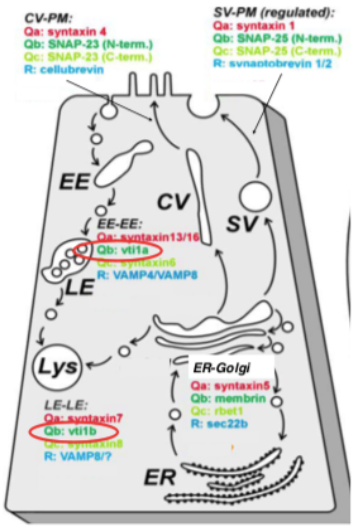


Chaque étape du trafic d'endo- et d'exocytose est caractérisée par des protéines Rab spécifiques qui coopèrent avec les protéines de l'attachement sur le compartiment accepteur.

1.c.2.a.5. Reconnaissance spécifique du compartiment cible II

Reconnaissance spécifique du compartiment cible II : Les protéines SNAREs
La fusion pendant chaque étape du trafic vésiculaire est caractérisé par des combinaisons de protéines SNAREs cognates. Un même SNARE peut participer à différentes étapes du trafic, mais la combinaison des 4 hélices des SNAREs (3 ***t***- et 1 ***v***-) est unique pour chaque étape du trafic.

- SNARE-***t*** sous-unité 1 (Q_a)
- SNARE-***t*** sous-unité 2 (Q_b)
- SNARE-***t*** sous-unité 3 (Q_c)
- SNARE-***v*** (R)

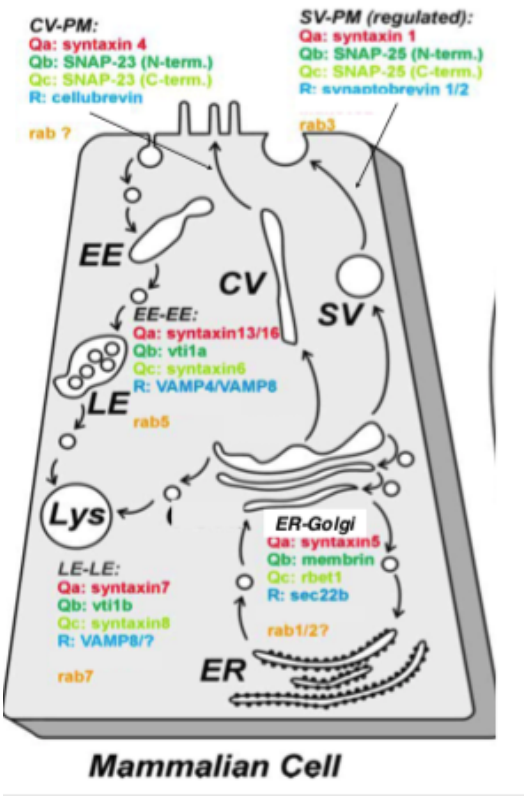


Examples de SNAREs durant une réaction de fusion dans une cellule de mammifère

1.c.2.a.6. Reconnaissance spécifique du compartiment cible III

Reconnaissance spécifique du compartiment cible III : Une combinaison de SNAREs et de Rabs
La spécificité de la reconnaissance augmente par la combinaison des membres de deux familles de protéines conservées, les SNAREs et les protéines Rab. Chaque protéine Rab ne peut interagir que avec certaines protéines SNARE

- SNARE-***t*** sous-unité 1 (Qa)
- SNARE-***t*** sous-unité 2 (Qb)
- SNARE-***t*** sous-unité 3 (Qc)
- SNARE-***v*** (R)
- Protéines Rab



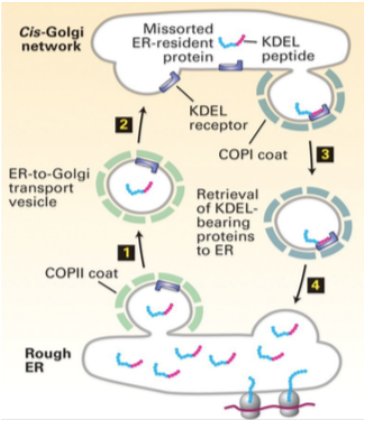
1.c.3. Mécanismes de recyclage: Les protéines résidente du RE échapées sont recyclées depuis l'appareil de Golgi par un récepteur dédié à cette tâche

Mécanismes de recyclage: Les protéines résidente du RE échapées sont recyclées depuis l'appareil de Golgi par un récepteur dédié à cette tâche

Les vésicules mantelées par COPII gèrent le transport du RE à l'appareil de Golgi

Les vésicules COPI font le transport rétrograde de l'appareil de Golgi au RE. Ceci permet de récupérer les protéines échappées.

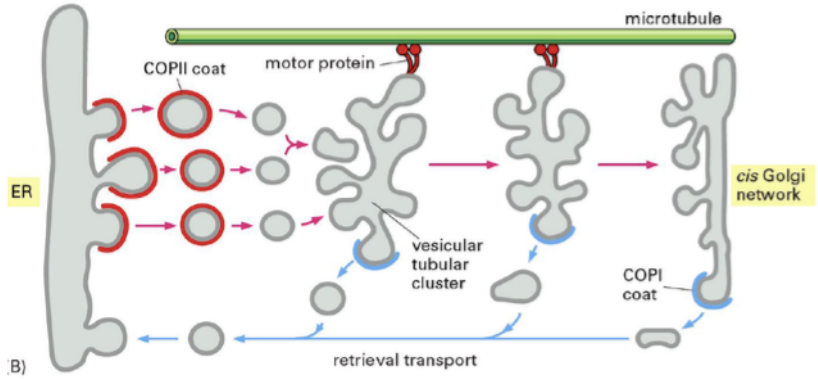
Les protéines résidentes du RE portent souvent un peptide de 4 acides aminées(KDEL). La séquence KDEL des protéines résidentes du RE qui se sont échappées peut être reconnue par des récepteurs KDEL dans l'appareil de Golgi. Ces récepteurs sont ensuite enpaqués dans les vésicules COPI et renvoyés au RE. Les récepteurs KDEL ne sont actifs que en association avec le manteau COPI, c.a.d. ils ne fonctionnent que pour le trafic retrograde.



1.d. Autres mécanismes de tri des protéines: Le transport sans liaison directe du cargo La maturation et la fusion de compartiments en entier

1.d.1.Le transport vers le Golgi: Les citernes cis sont générées par une fusion "homotypique" entre les vésicules venant du RE

Le transport vers le Golgi:
Les citernes cis sont générées par une fusion "homotypique" entre les vésicules venant du RE



➢Les nouvelles citernes sont formées à la surface cis par fusion des vésicules de transport provenant du RE.

1.d.2. Le transport intra-Golgi: maturation des citernes par récuperation de protéines résidentes

Le transport intra-Golgi: maturation des citernes par récuperation de protéines résidentes

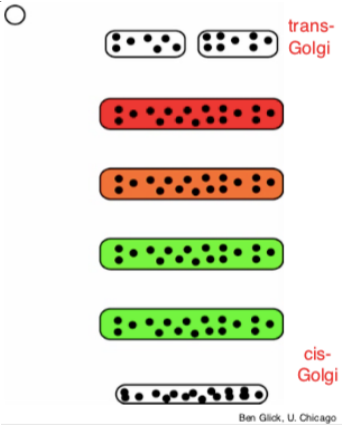
➢Les citernes maturent du cis-, par la région médiane, vers le trans-Golgi. Elles migrent avec leur contenu à travers les empilements.

➢L'appareil de Golgi est donc une organelle en flux constant.

➢Pendant que les citernes sont en maturation, les enzymes qui ne sont plus nécessaire sont recyclés par les vésicules COPI. Lorsqu'une saccule migre du cis Golgi à la région médiane, les

enzymes typiques de cette étape sont empaquetés dans une vésicule COPI et retournent en arrière pour être délivré à une saccule naissante du cis- Golgi.

➢Ceci résulte en un transport de cargo à travers l'appareil de Golgi sans reconnaissance directe. Comme conséquence, aucun signal n'est nécessaire à cette étape pour le cargo (par contre, les protéines résidentes en ont besoin pour être retenues).



1.d.2.a. Pour comparaison, l'ancien model du transport intra-Golgi par sélection positive des cargos dans les vésicules de transport

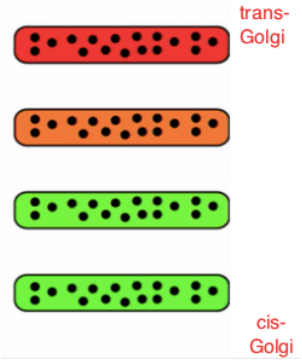
Pour comparaison, l'ancien model du transport intra-Golgi par sélection positive des cargos dans les vésicules de transport

➢Les saccules sont des structures stables.

➢ Toutes les protéines résidentes restent dans les saccules; elles ne participent pas au transport intra-Golgi.

➢Le transport via COPI enpaque les protéines cargo et les transporte d'une saccule à l'autre.

➢Ceci résulte en la sélection active de protéines cargo traversantes l'appareil de Golgi.



1.d.2.b. Autres exemples de transport passif sans reconnaissance du cargo

Autres exemples de transport passif sans reconnaissance du cargo

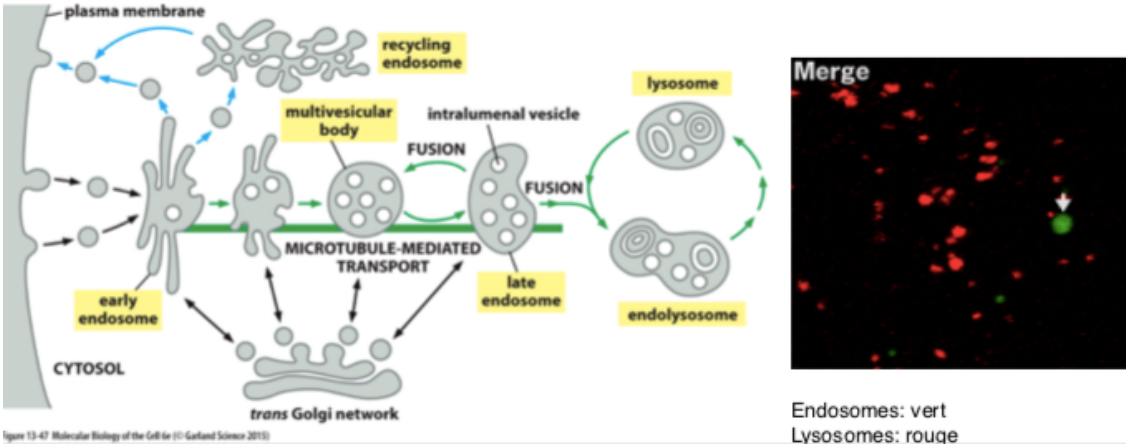
✓ La sécrétion constitutive: Des larges vésicules se séparent du réseau trans-Golgi et fusionnent avec la membrane plasmique. Les protéines devant rester à l'intérieur de la cellule sont enlevées de ces vésicules par les vésicules mantelées par la clathrine et ramenés à l'appareil de Golgi.

✓Les endosomes précoces maturent en endosomes tardifs, par un recyclage de protéines du type "précoce" et l'arrivé de protéines du type "tardif". Durant l'étape finale de fusion avec les lysosomes l'ensemble de leur contenu est transféré pour être dégradé. Les contenus devant être gardés ont été enlevé précédemment par les vésicules de transport qui retournent aux endosomes précoces ou à l'appareil de Golgi.



1.d.2.b.1 Maturation et fusion directe entre les endosomes tardifs et les lysosomes

Maturation et fusion directe entre les endosomes tardifs et les lysosomes

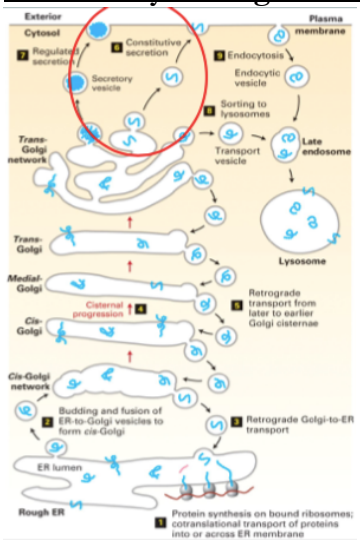


2. Le trafic vésiculaire – mécanismes et physiologie

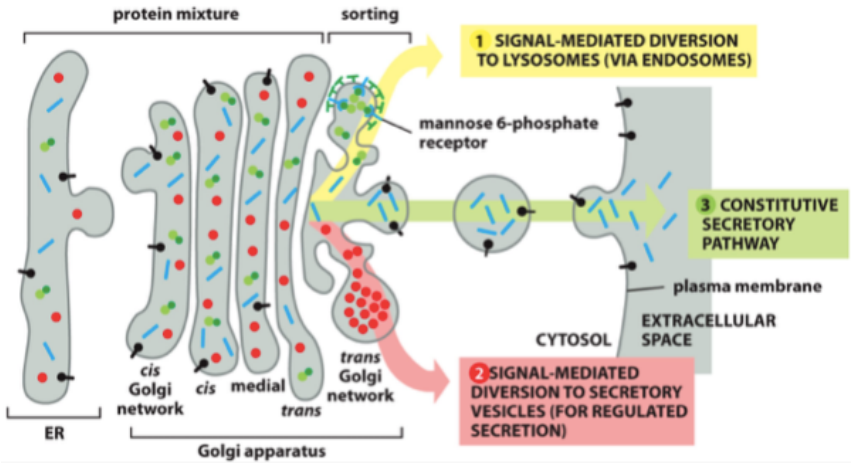
Des voies de trafic spécifiques:

- ✓ L'exocytose régulée et constitutive
- ✓ L'endocytose
- ✓ La formation de corps multi –vésiculaires et le trafic vers les lysosomes

2.a. L'exocytose régulée et constitutive



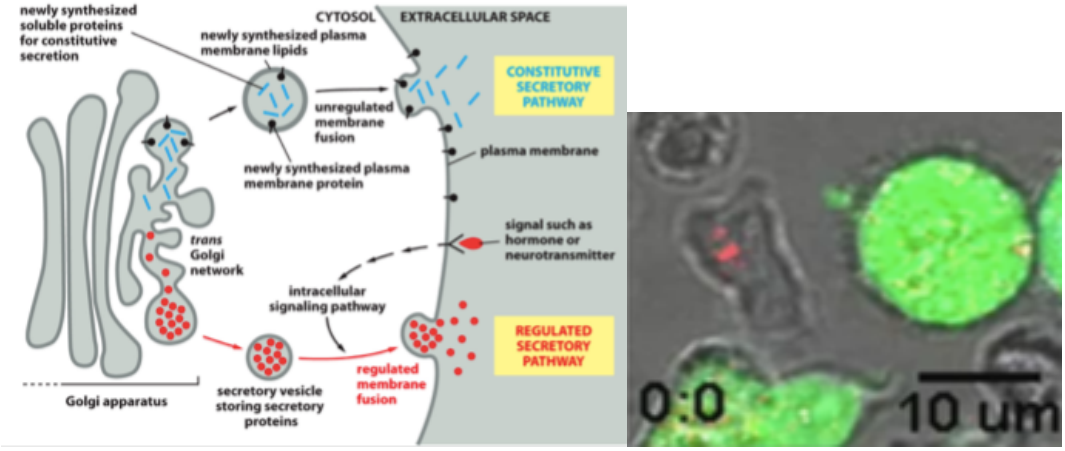
Le trans-Golgi est une station de triage dans la voie de sécrétion – Trois routes du trafic divergent à cet endroit



2.a.1. L'exocytose: Sécrétion de protéines à la membrane plasmique

L'exocytose constitutive: Les vésicules fusionnent dès leur arrivée à la membrane plasmique; Pas de signal nécessaire Exemples: Beaucoup de protéines à la MP: Les récepteurs pour les facteurs de croissance et les transporteurs des acides aminés

L'exocytose régulée: Les vésicules s'attachent à la MP. La fusion est arrêtée jusqu'à l'arrivée d'un signal. Lors de la présence de ce signal, la fusion a lieu très rapidement (1 msec - 1 sec après) Les signaux peuvent être: Un potentiel d'action des neurones, une hormone, le contact d'une cellule avec une autre etc.
Exemples: Insuline (niveau de sucre dans le sang), acétylcholine (aux synapses), granzymes (cellules T cytotoxique)

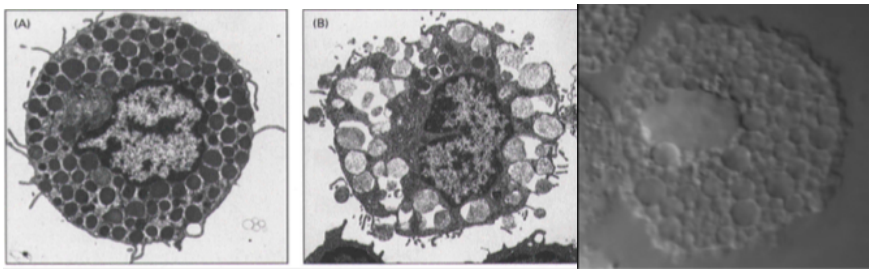


Animation: Cellule-T, contentant des vésicules remplies de granzymes (granules lytiques, rouge) reconnait une cellule infecté par un virus (marquée par un fluorophore vert soluble). La sécrétion des granules lytiques perméabilise la cellule infecté, induisant sa mort

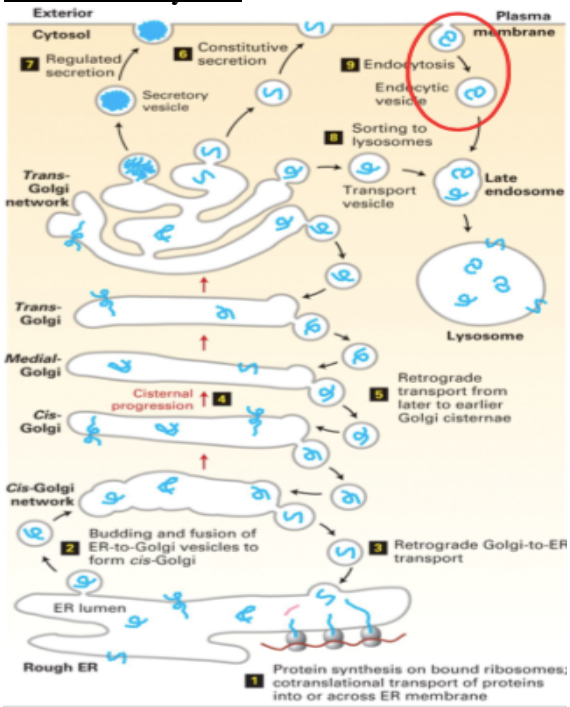
2.a.1.a. Un exemple drastique: l'exocytose dans les mastocytes

✓Des mastocytes sécrétent de l'histamine durant la réponse inflammatoire

✓La sécrétion est très synchronisée ✓La surface de la cellule augmente 3-5 fois en moins d'une seconde



2.b. L'endocytose

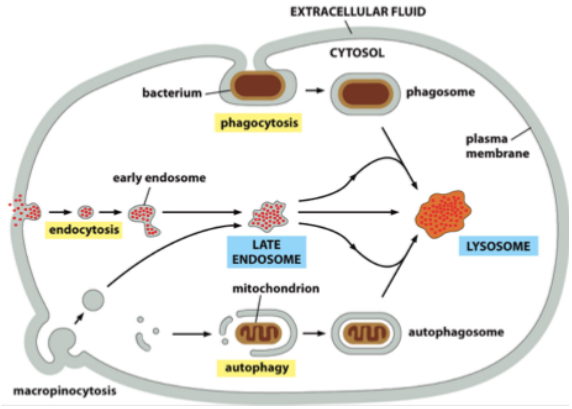


2.b.1. **Les voies d'endocytose**

➢**L'endocytose** apporte du matériel de la surface de la cellule à l'intérieur de la cellule par formation de vésicules de transport à la membrane plasmique. Le matériel est délivré vers les endosomes et finalement aux lysosomes.

➢**La phagocytose** est un type d'endocytose durant lequel la cellule internalise une grande particule comme une bactérie. Ceci est un important mécanisme de défense des cellules, par exemple contre les bactéries ou les champignons.

➢**La pinocytose** est un type d'endocytose durant lequel la cellule capte du matériel soluble dans des vésicules d'endocytose.

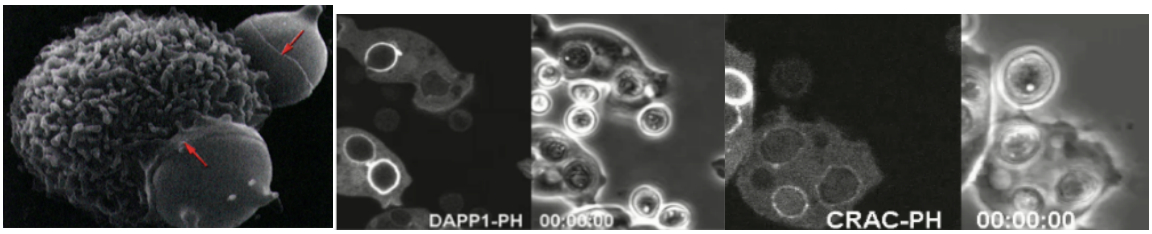


2.b.1.a. ***La phagocytose – un macrophage "mangeant" des autres cellules***

La phagocytose permet l'internalisation de grandes particules, normalement une autre cellule ou une partie d'une autre cellule

Les phagosomes sont formés par une large in- ou évagination de la membrane plasmique.

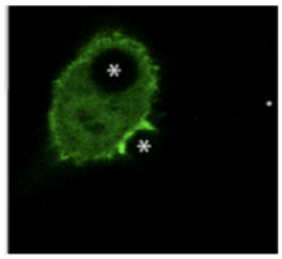
Certaines bactéries pathogéniques utilisent la phagocytose pour infecter une cellule. Cependant, elles organisent la suppression de la fusion avec les lysosomes, afin de survivre et se multiplier dans les phagosomes;
Par ex. **Mycobacterium tuberculosis**

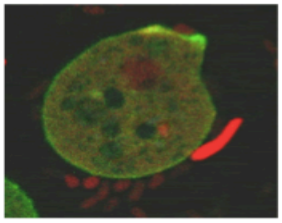


Animations:
Des macrophages pendant la phagocytose de levures. Les phagosomes sont colorées par une GFP liée à une domaine qui reconnait le phosphatidylinositol-3-phosphate et ses dérivées, localisée dans la membrane des phagosomes et des lysosomes.

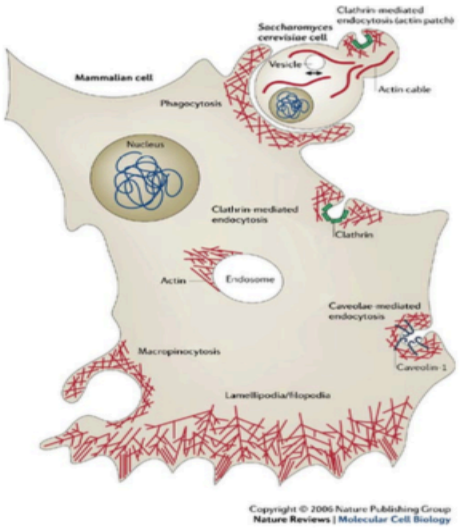
2.b.1.a.1. *Phagocytose: Une transformation du réseau d'actin forme les phagosomes sans participation de clathrine*

Phagocytose: Une transformation du réseau d'actin forme les phagosomes sans participation de clathrine





Actin-GFP
Bacteries



2.b.1.a.2. *Certains pathogènes peuvent éviter leur transfert dans les lysosomes*

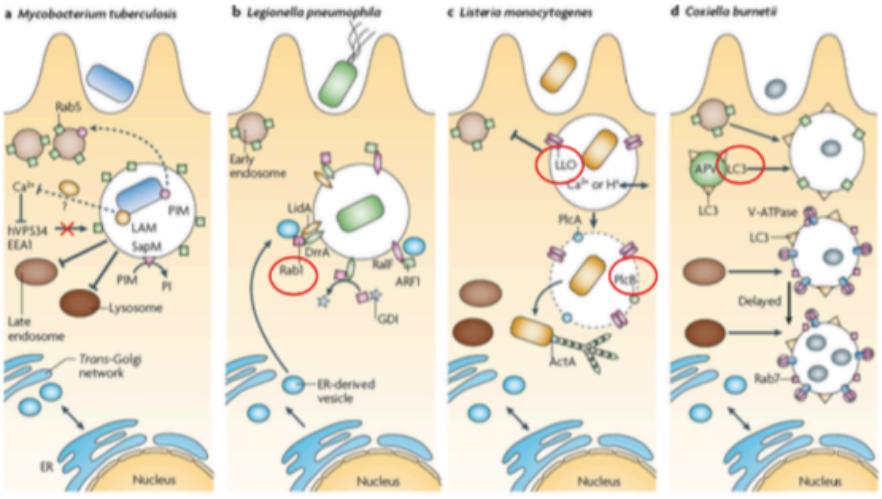


Figure 3 | **Strategies used by professional intracellular bacterial pathogens to modulate phagosome maturation.** **a** | *M. tuberculosis*. After internalization, the bacterium uses an array of effector molecules, including the lipids phosphatidylinositol mannoside (PIM) and lipoarabinomannan (LAM), and the phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) phosphatase SapM to arrest phagosome maturation at an early stage. **b** | *L. pneumophila*. This bacterium impairs fusion of the *Legionella*-containing vacuole with endolysosomal compartments, and instead promotes fusion with endoplasmic reticulum (ER)-derived membranes. **c** | *L. monocytogenes*. This pathogen evades phagolysosomal fusion after internalization by escaping the phagosome through secretion of listeriolysin O (LLO) and two phospholipases, PlcA and PlcB. Once in the cytoplasm, *L. monocytogenes* replicates and becomes motile by using actin 'comet tails' generated by the effector ActA. **d** | *C. burnetii*. Phagosomes containing this bacterium undergo delayed maturation as they fuse with autophagocytic vesicles (APVs) bearing LC3. The delay enables *C. burnetii* to acquire features that allow it to replicate in a

2.b.1.b ***L'endocytose: Des récepteurs initiant l'endocytose facilitent l'absorption de molécules spécifiques comme par ex. le cholestérol ou le fer***

L'endocytose: Des récepteurs initiant l'endocytose facilitent l'absorption de molécules spécifiques comme par ex. le cholestérol ou le fer

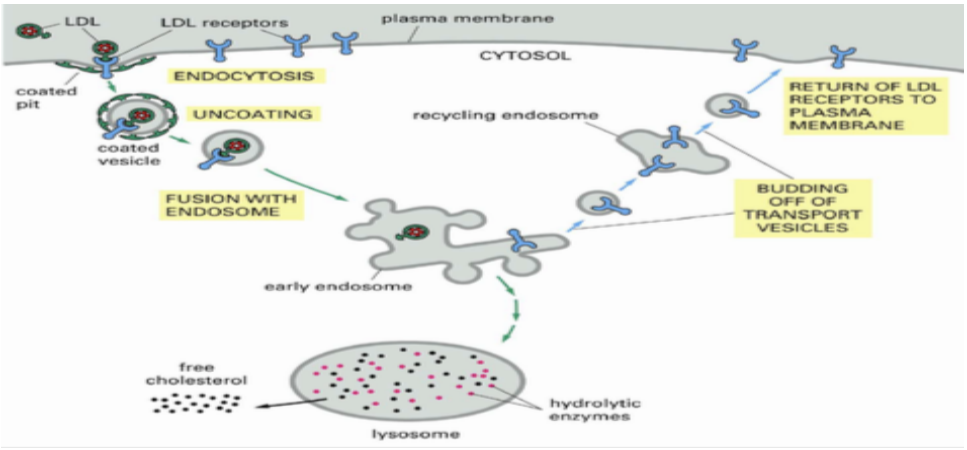
La liaison des ligands (par ex. le cholestérol contenu dans une particule lipoprotéine de basse densité, LDL = low density lipoprotein) initie un changement de la conformation du récepteur.

Ceci permet le recrutement des adaptateurs, la formation du manteau et finalement la formation d'une vésicule mantelée.

La vésicule fusionne avec l'endosome. Le pH acide dans les endosomes permet au ligand de se dissocier de son récepteur.

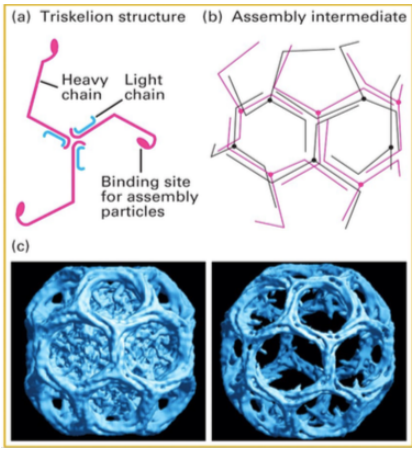
Le récepteur peut être recyclé à la membrane plasmique.

Les endosomes précoces évoluent en endosmoses tardifs et fusionnent avec les lysosomes. Leur contenu y compris les LDL sont dégradés.



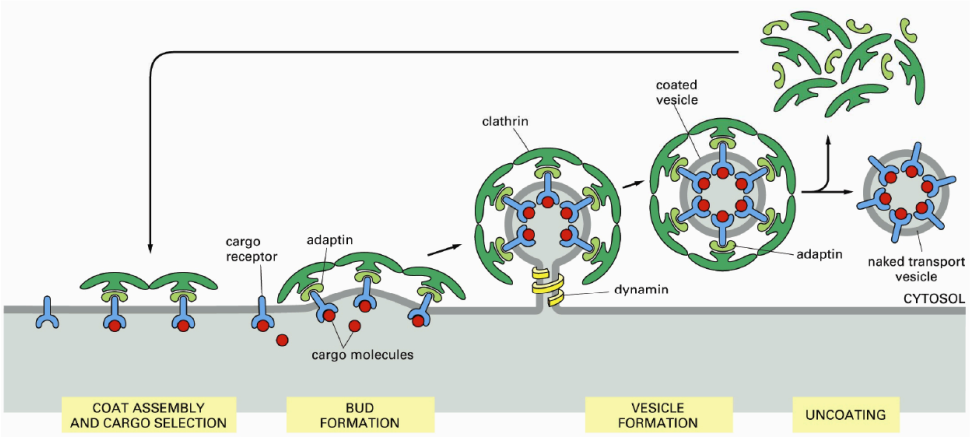
2.b.1.b.1.*Le manteau de clathrine*

La clathrine est construite de 3 sous-unités de chaînes légères et lourdes.
Elles forment un triskèle.
Les triskèles sont entrelacer de manière à construire une sorte de corbeille.
La structure et la taille de cette corbeille sont précisément définie par la taille des sous-unités.
C'est pourquoi les vésicules mantelées à la clathrine sont très homogènes, d'un diamètre de 80-100 nm.



Reconstruction du manteau de clathrine à partir de photos de microscopie électronique à haute résolution

2.b.1.b.2.*Mécanisme moléculaire de l'endocytose: Les vésicules mantelées à la clathrine ont besoin de la GTPase dynamine pour se détacher de la MP*



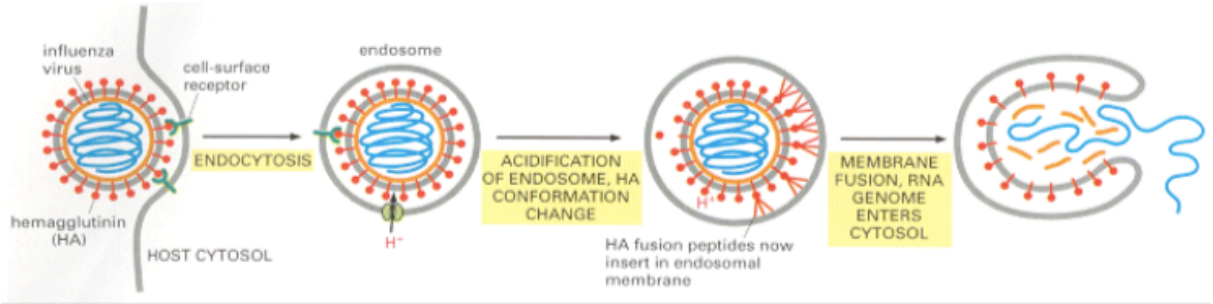
➢La structure moléculaire du polymère adaptateur-clathrine permet la déformation de la membrane, mais n'est pas suffisante pour induire la scission de la vésicule de la membrane.

➢La GTPase dynamine forme un anneau autour du coup de la vésicule.

➢L'hydrolyse du GTP induit un changement conformationnel de la dynamine qui permet le détachement de la vésicule de la membrane plasmique.

Assemblage/ desassemblage du manteau de clathrine en temps réel

Le virus Influenza infecte par endocytose



➢Le virus est enveloppé par une membrane.

➢La protéine (appelée hémagglutinine) responsable pour la fusion de la membrane virale se lie aux acides sialiques des protéines contenues dans la glycocalyx de la membrane plasmique de la cellule hôte.

➢Ceci initie l'endocytose du virus et son transfert aux endosomes.

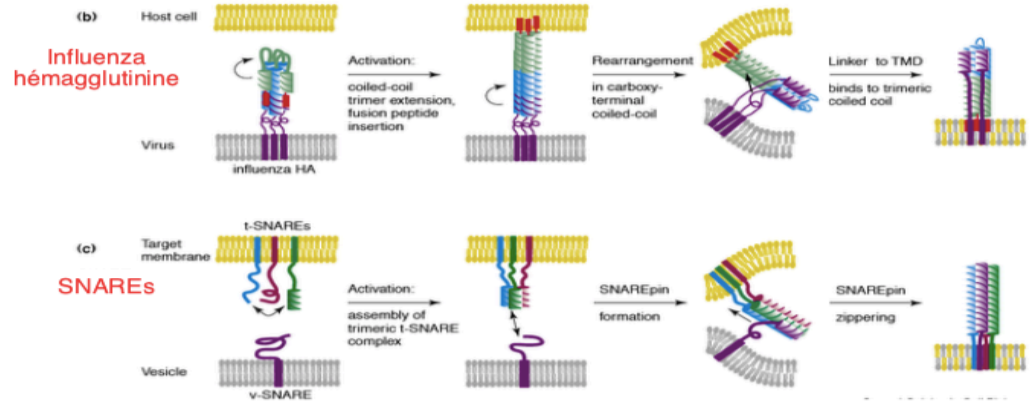
➢Le pH acide dans les endosomes active l' hémagglutinine, la protéine de fusion.

➢L'Hémagglutinine change sa conformation et initie la fusion de la membrane virale avec les endosomes.

➢Ceci relâche le core du virus avec son ARN dans le cytoplasme où le virus est ensuite répliqué.

Les protéines de fusion du virus d'Influenza s'insèrent dans la membrane de l'hôte.

Les protéines de fusion du virus d'Influenza s'insèrent dans la membrane de l'hôte. Ensuite, elles se replient afin de créer des structures en serpentin similaires à celles des complexes SNAREs

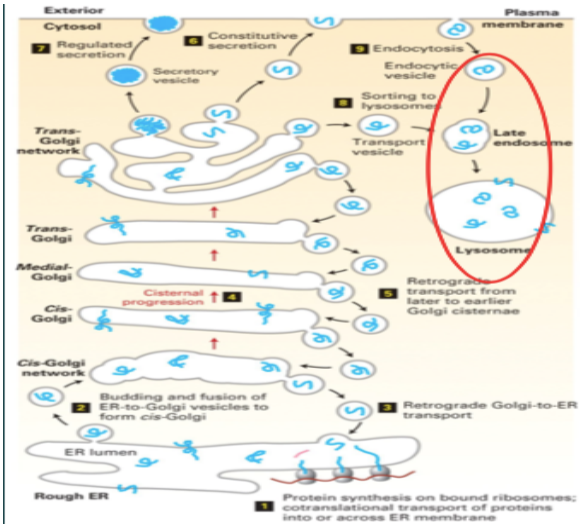


L'acidification dans les endosomes initie le repliement de l'hémagglutinine ==> la protéine expose des ancres transmembranaires supplémentaires (rouge) qui s'insèrent dans la membrane endosomale. Des changements de conformation qui suivent déforment la membrane et induisent la fusion. Le mécanisme de cette dernière étape ressemble à celui de la fusion catalysé par les SNAREs.

Des maladies liées à des molécules du trafic vésiculaire

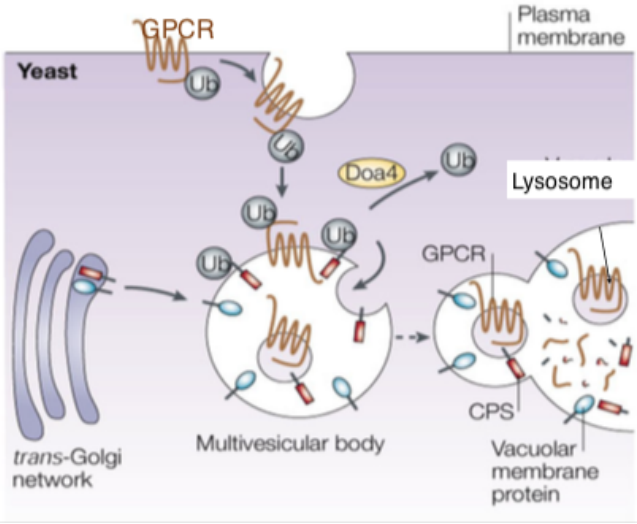
Disease	Mode of inheritance	Online Mendelian inheritance in man (OMIM) number	Defective protein (gene)	Cellular phenotype
Category A Centronuclear myopathy	Autosomal dominant	160150	Dynamin 2 GTPase involved in receptor-mediated endocytosis; vesicle formation at the trans-Golgi network and late endosomes, lipid raft internalization, actin assembly and centrosome cohesion (*DNM2*)	Centrally located nuclei in a large number of extrafusal muscle fibers; radial arrangement of sarcoplasmic strands around the central nuclei, predominance and hypotrophy of type 1 fibers; partial arrest of myofiber maturation; suggested defect in centrosome function; mild axonal defects in peripheral nerves
Charcot-Marie-Tooth disease, dominant intermediate B (CMTDIB)	Autosomal dominant	606482	Dynamin 2 See above	Axonal degeneration in peripheral nervous system myelination defects; suggested axonal transpor defects; dynamin-2-mutan forms display decreased membrane association and induce disturbances ir microtubule organization

2.c. La formation de corps multi-vésiculaires et le trafic vers les lysosomes



2.c.1. Dégradation lysosomale (I): La voie MVB

Les corps multi-vésiculaires, MVBs (« multivesicular bodies »)
- Formés par l'invagination des endosomes
- Les vésicules dans la lumière sont enrichies en protéines destinées à la dégradation par les lysosomes (par ex. les récepteurs de la MP ou les transporteurs)
- Le triage dans les MVBs dépend d'une liaison covalente entre les protéines cargo et l'ubiquitine
- Les MVB fusionnent avec les lysosomes. Cette étape du transport n'est pas du à un transport vésiculaire.
- Les vésicules contenues dans les MVBs sont digérées.
- Ce mécanisme de triage et dégradation est très important pour réguler l'abondance de récepteurs et de transporteurs à la membrane plasmique, c.a.d. pour déterminer les capacités de communication d'une cellule



Exemple: Endocytose, triage-MVB et dégradation des protéines G couplées aux récepteurs (GPCR) dans les lysosomes

La voie MVB et ses conséquences pour la signalisation cellulaire sont associées avec beaucoup de pathologies

Table 1 | Summary of the diseases in humans associated with the MVB pathway

FTLD-U, frontotemporal lobar dementia with ubiquitin-immunoreactive inclusions; HRCP1, hepatocellular carcinoma-related protein 1; Hse1, has symptoms of class E mutants 1.

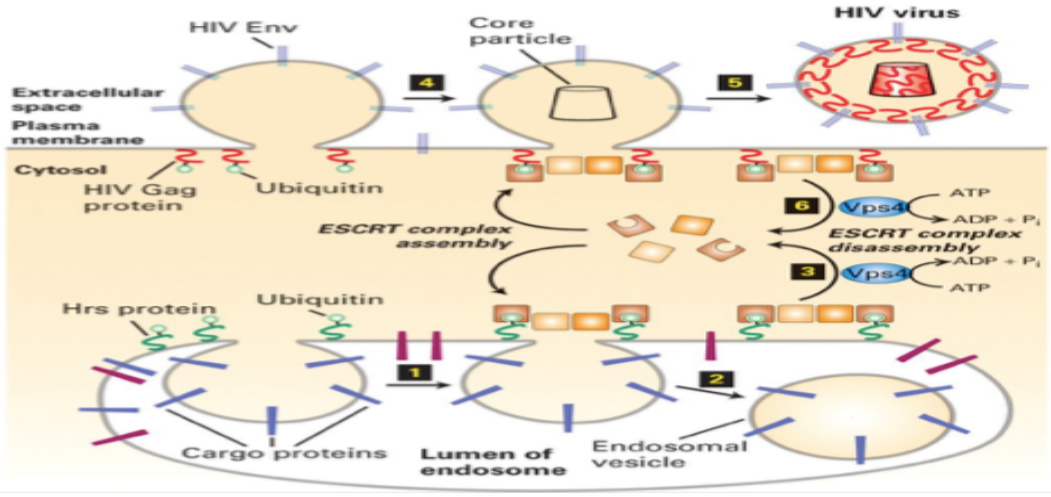
Complex	Component	Disease	Defect
Vps27–Hse1 (Hrs–STAM)	Vps27 (Hrs)	Cancer (mammary carcinomas, squamous carcinomas, glioblastomas)	EGFR degradation
ESCRT-I	Vps23 (Tsg101)	Cancer (acute myeloid leukaemia, human prostate cancer)	EGFR degradation
ESCRT-I	Vps23 (Tsg101)	Cancer (breast, cervical cancer, gastrointestinal cancer)	Alteration in levels of cell-cycle-control proteins
ESCRT-I	Vps37/HCRP1 (Vps37A)	Hepatocellular carcinoma	EGFR degradation
ESCRT-I (Tsg101)-interacting	Mahogunin	Spongiform neurodegeneration	Defective ubiquitination
ESCRT-III	Vps2 (CHMP2B)	FTD3/FTLD-U, ALS (neurodegeneration)	Disruption of endosomal trafficking
ESCRT-III	Vps24 (CHMP3)	HD, Parkinson's disease	Defects in autophagic clearance
ESCRT-III	mSnf7-1	Neurodegeneration	ESCRT-III dysfunction and autophagosome accumulation
ESCRT-III (CHMP1B)-interacting	Spastin	HSP	Unknown
ESCRT-I, ESCRT-III-associated	Tsg101 (Vps23) and Alix (Bro1)	AIDS and retroviral infections	Viral budding via the MVB pathway
ESCRT-III	Snf7 (CHMP4B)	Cataract	Defects in endosomal trafficking and maintenance of lens transparency
ESCRT-I (Tsg101)-interacting	CD2AP	Focal segmental glomerulosclerosis	Defects in MVB formation in podocytes

Exploitation des ressources cellulaires par les pathogènes: Les virus HIV abusent de la machinerie d'invagination des endosomes

Le bourgeonnement des virus de la MP est relié à la formation des MVBs

Les membranes doivent être courbées dans le même sense, c-à- d à l'extérieur du cytosol

Les virus peuvent remplacer une protéine régulatrice de la formation des MVB (Hrs) par une autre, fournissant la même activité mais localisé à la membrane plasmique. Le virus prends ainsi le contrôle de la machinerie MVB, afin de laisser des particules virales bourgeonner vers l'extérieur de la cellule.



Animation de l'infection par le virus HIV et de sa réplication

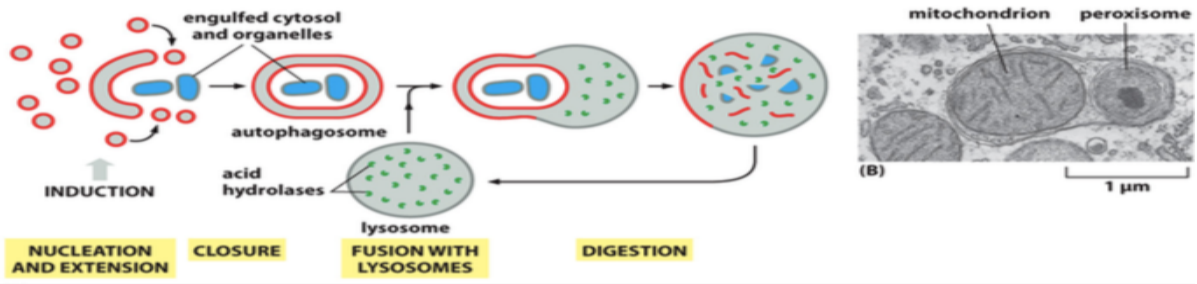
2.c.2. Dégradation lysosomale (II): L'autophagie

L'autophagie (= l'autophagocytose) est une auto-digestion contrôlée (recyclage) du matériel cytosolique ou d'organelles (peroxisomes, mitochondries) dans les lysosomes.

Les cellules activent l'autophagie en cas de stress (dans le but de mieux survivre), si elles se re-différencient (dans le but de s'adapter aux nouvelles conditions), ou comme moyen de défense contre les pathogènes intracellulaires.

Des saccules membranaires se courbent et enrobent une partie du cytosol ou d'une organelle. Ceci produit une vésicule avec une double membrane lipidique – un autophagosome.

La Fusion de la membrane externe des autophagosomes avec les lysosomes délivrent la membrane interne et son contenu pour la dégradation.



2.c.2.a. L'autophagie dans l'élimination de pathogènes

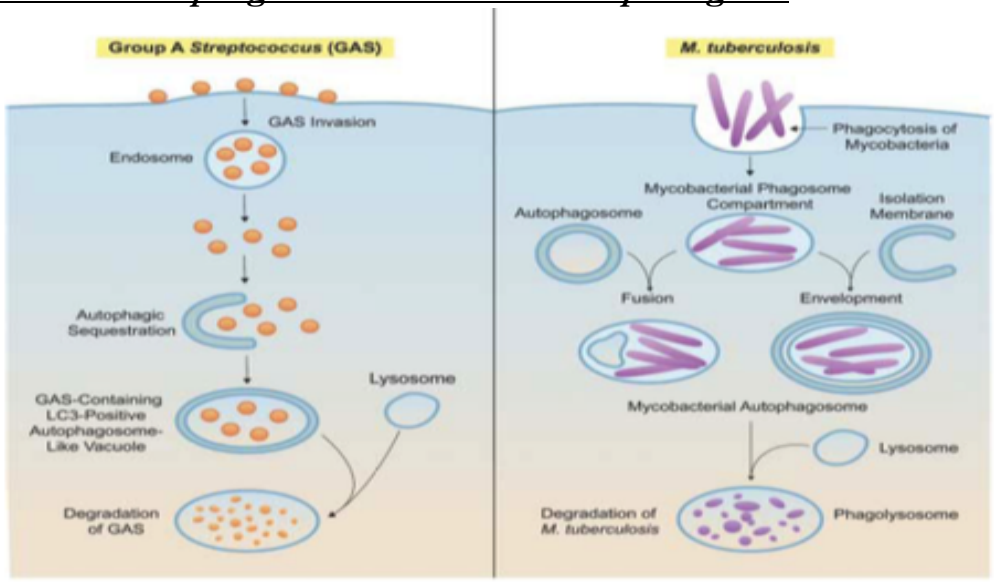


Figure 2. Xenophagy in Cellular Defense against an Invading Extracellular Pathogen, Group A *Streptococcus* (GAS), in a Nonphagocytic Cell and an Intracellular Pathogen, *M. tuberculosis*, in a Phagocytic Cell

L'interférence de pathogènes avec l'autophagie

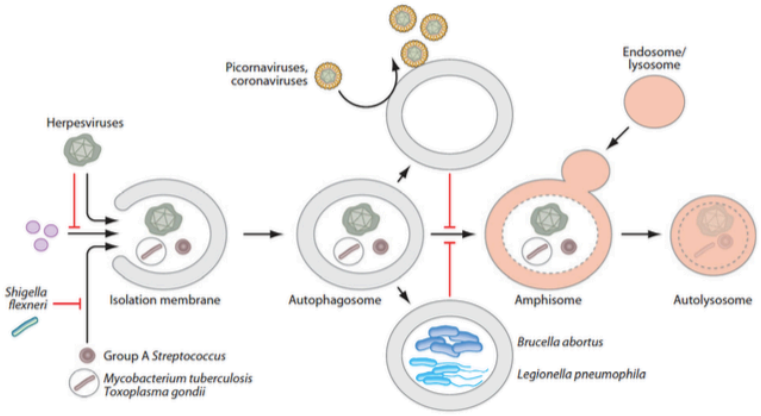


Figure 2

Innate immunity by and immune escape from macroautophagy. Both free cytosolic pathogens such as group A *Streptococcus* and microbial phagosomes containing, for example, *Mycobacterium tuberculosis* are delivered by autophagosomes for lysosomal degradation. Some pathogens interfere with macroautophagy at two steps. *Shigella flexneri* prevents its engulfment by macroautophagy, and herpesviruses inhibit autophagosome formation. Several RNA viruses (e.g., picornaviruses) and bacteria (e.g., *Brucella abortus*) seem to stabilize autophagosomes in order to replicate at their surface or within them. This autophagosome stabilization is achieved presumably by inhibition of autophagosome fusion with lysosomes.

2.d. Matériaux supplémentairs: Aspects spéciaux du trafic vésiculaire

✓ La Transcytose des anticorps dans les embryons
✓La transmission des signaux synaptiques
✓ Comment mesurer une réaction de trafic?

2.d.1. La Transcytose des anticorps dans les embryons

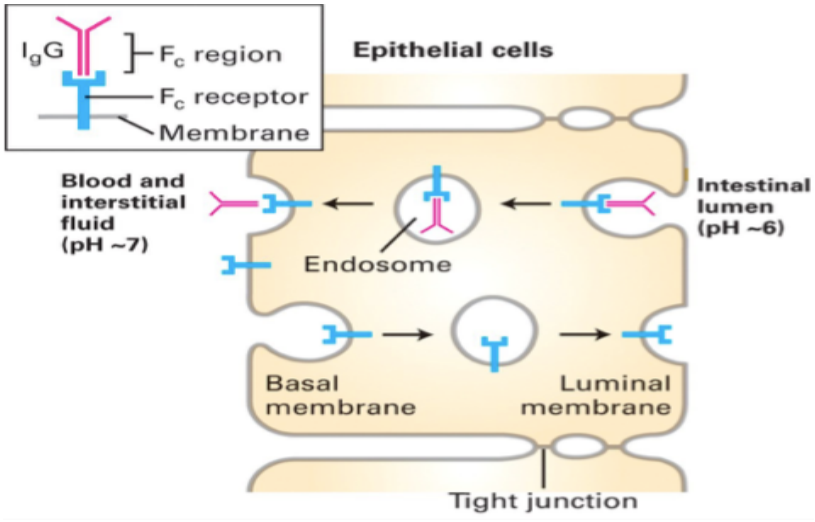
La transcytose des immunoglobulines à travers les cellules épithéliales fournit les anticorps de la mère au foetus

Le foetus avale du liquide contenant des anticorps (immunoglobulines) de la mère.

L'épithélium intestinal contient les récepteurs aux immunoglobulines (les récepteurs-Fc)

Ils lient les IgG à pH=6 (lumière intestinale) et les relâchent à pH=7 (par ex. Dans le sang/intestin du foetus)

Ceci fournit au foetus un système immunitaire intiale avant le développement de son propre système immunitaire.



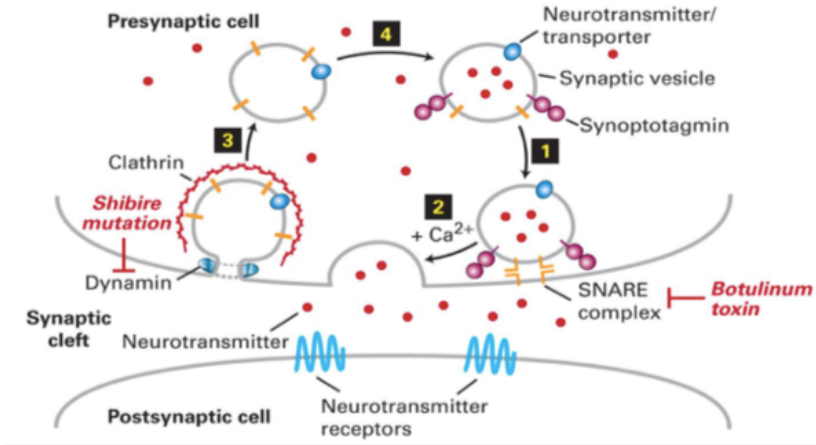
2.d.2.La transmission des signaux synaptiques

L'exocytose synaptique est spéciale, car elle est extrêmement rapide:

✓fusion en 200 µsec après un potentiel d'action!

✓ C'est une cible de la toxine botulique et du tetanos, qui sont des protéases agissant sur les SNAREs synaptiques

✓ Elles sont les toxines les plus violents connues. Une seule molécule de toxine peut inactivé un neurone!

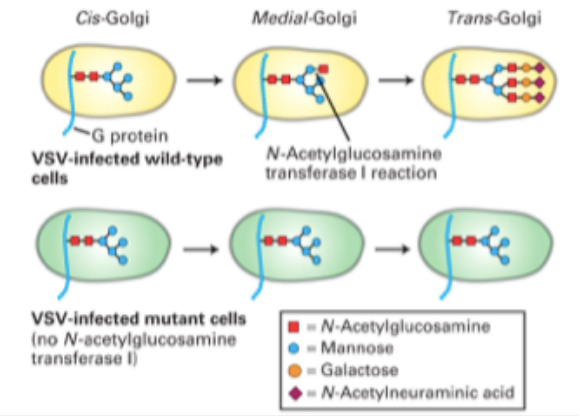


2.d.3.Comment mesurer une réaction de trafic?

Par modification covalente d'une protéine cargo!

Par ex.: Changement dans le motif de glycosylation sur la protéine G du virus vésiculaire stomatitis (VSV) naviguant à travers le Golgi

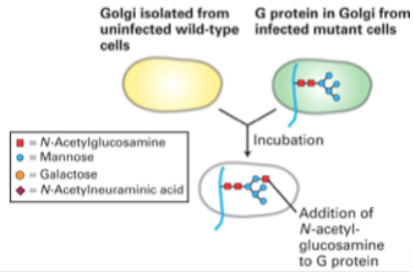
Isolation du Golgi des cellules déficiente en N-acetylglucosamine transférase et exprimant VSV-G-protein



Mélanger ce mutant de Golgi avec un Golgi sauvage n'exprimant pas VSV-G dans un test de fusion *in vitro*.

Ajout de N-Acétylglucosamine

Transfert vésiculaire de VSV-G du Golgi mutant au Golgi sauvage permet la glycosylation qui peut être détectée.



3. La glycosylation

Carbohydrates et glycosylation – un bref apperçu

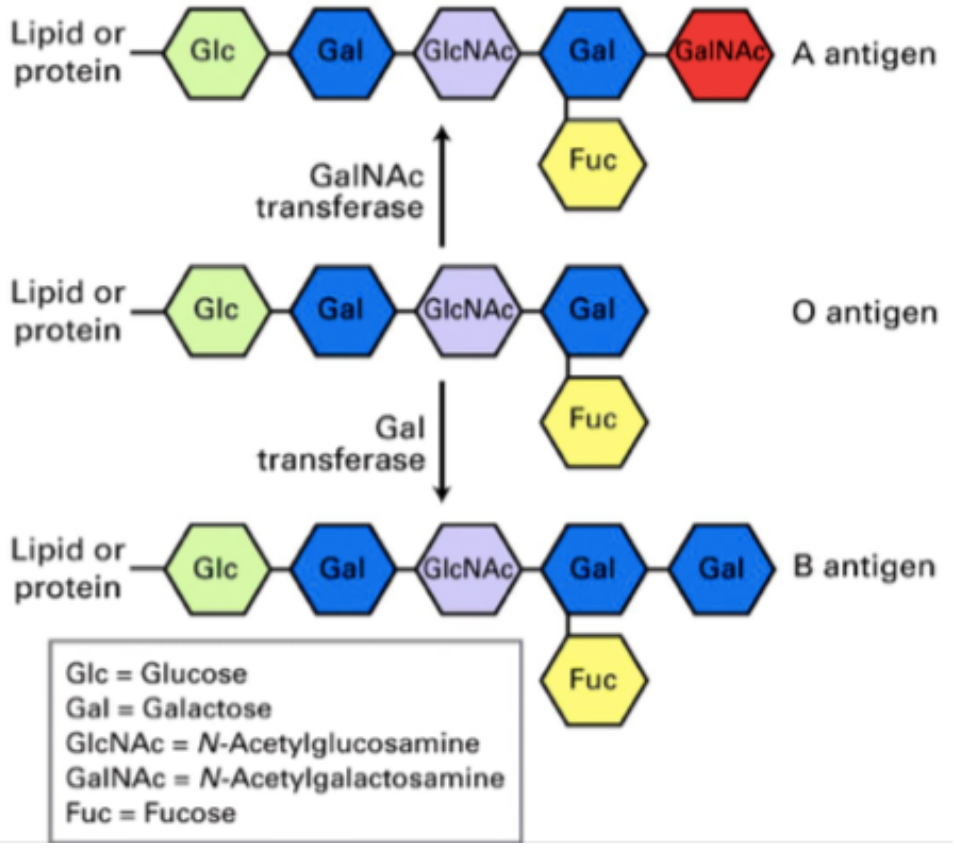
La glycosylation de la surface des cellules du sang est un déterminant majeur de compatibilité pour les transfusions sanguines

TABLE 5-2 ABO Blood Groups

Blood-Group Type	Antigens on RBCs*	Serum Antibodies	Can Receive Blood Types
A	A	Anti-B	A and O
B	B	Anti-A	B and O
AB	A and B	None	All
O	O	Anti-A and anti-B	O

*See Figure 5-16 for antigen structures.

3.a. Les groupes sanguins humains sont déterminés par glycosylation



Les chaînes glycosylées sur les protéines et les lipides de la membrane plasmique des cellules sanguines déterminent leurs propriétés immunologiques.
==> elles sont perceptibles par des tests de précipitation avec des anticorps appropriés.

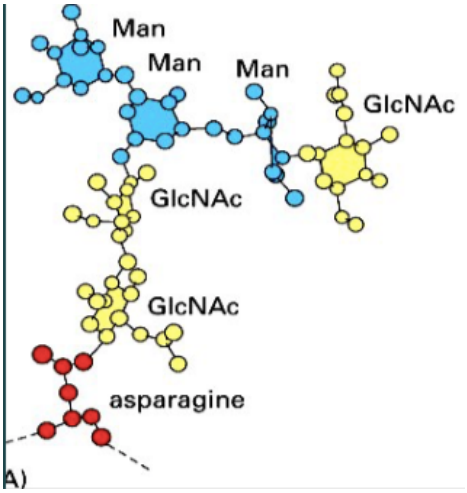
Trois groupes sanguins sont générés par la présence ou l'absence d'un N- acétylgalactosamine ou d'un galactose en position terminale.

Les personnes du groupe 0 sont des mutants auxquels manquent les galactosyltransférases responsable de cette modification !

3.b.Hydrates de carbone et glycosylation – un aperçu rapide

-Hydrates de carbone et glycosylation -définitions et fonctions
-Structure des hydrates de carbone - variabilité et nomenclature
-Biosynthèse des différents types de protéines glycosylées
- Protéines N- et O- glycoconjugées
- Protéoglycanes

-Lipides glycosylés, ancres GPI
-Conséquences des défauts de glycosylation: maladies



3.b.1. -Hydrates de carbone et glycosylation -définitions et fonctions

3.b.1.a. Hydrates de carbone (sucres)

Molécules biologiques les plus abondantes dans la nature

Formule générale: $(C{\bullet}H_2O)_n$

Composés d'unités de sucres simples (monosaccharides) ou multiples (oligo- et polysaccharides)

Rôles principaux:
- Stockage de l'énergie (par ex. le glycogène, l'amidon)
- Processus métaboliques (par ex. la glycolyse, le cycle de l'acide citrique)
- Composants blocs de construction des protéines, des lipides et de la matrice extracellulaire
- Reconnaissance entre les cellules, l'adhésion de cellules, la signalisation cellulaire

3.b.1.a.1. Polysaccharides (les glycanes)

Les sucres peuvent être polymérisés en structures supérieures.

Celles-ci peuven têtre linéaires ou ramifiées.

Les sucres dans les polysaccharides sont reliés par des liaisons glycosidiques.

Ils peuvent être homo-ou hétéro polysaccharides, c'est-à-dire qu'ils peuvent être composés de résidus de sucre identiques (par exemple, l'amylose ou le glycogène, qui sont fabriqués à partir du glucose), ou de différents sucres (par exemple les modifications N-glycane des protéines).

En général, les hydrates de carbones ont mieux hydratés que les polypeptides. Ils manquent de forces hydrophobiques qui conduisent le repliement des polypeptides en une structure compacte. Désormais les polysaccharides ont tendance à former de longues chaînes étendues. Grâce à cette propriété, le glycocalyx (voir ci-dessous) est plus épais qu'il ne le devrait, s'il était composé de peptides de masse moléculaire similaire.

3.b.1.a.2. Glycosylation des protéines

✓ La glycosylation est l'attachement de résidus de sucre aux protéines, aux lipides et aux autres éléments.

✓ De nombreuses protéines et lipides exposés à la face exoplasmique des membranes cellulaires (c-à-d. l'espace extracellulaire ou le côté luminal de toutes les organelles reliées par le traffic vésiculaire) sont glycosylés. En général, ~ 50% de toutes les protéines des eukaryotes sont glycosylées.

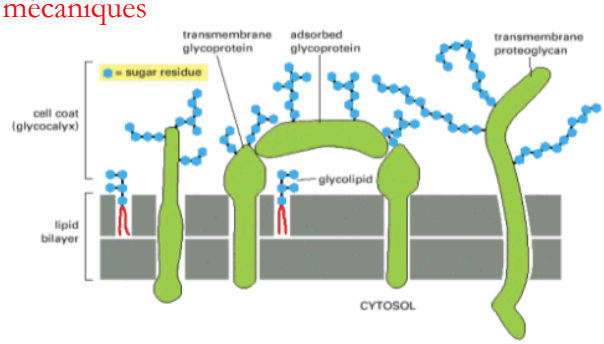
✓ Une glycosylation complexe n'est jamais constatée sur les protéines (ou, dans le cas de protéines transmembranaires, sur des parties de la protéine) faisant face au cytosol. Seuls quelques polypeptides cytosoliques sont glycosylés – et dans ce cas, uniquement par une simple N-acétylglucosamine attachée à un résidu Ser ou Thr.

✓ Les protéines membranaires et les protéines solubles sont glycosylées.

La plupart des protéines exposées à la surface de la cellule sont glycosylées

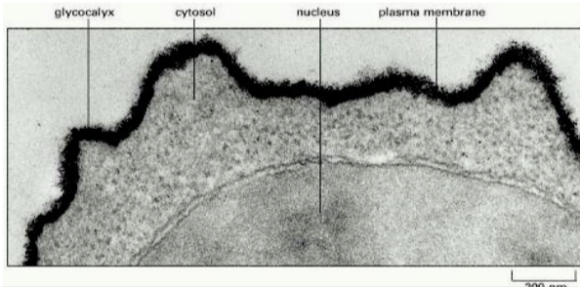
✓ Les chaînes glycosylées des protéines et des lipides forment une couche étroite autour de la membrane plasmique de cellules mammifères, appelée aussi glycocalyx

✓ L'une des fonctions supposées du glycocalyx est de protéger les cellules contre les dommages mécaniques

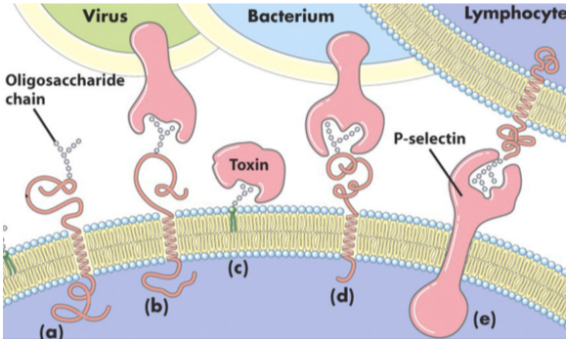


Le glycocalyx

Le glycocyalyx d'une cellule, tâcheté de ruthenium rouge, est visible par microscopie électronique et apparaît comme une couche noire épaisse, qui protège la membrane de la cellule de l'environnement



La plupart des protéines exposées à la surface de la cellule sont glycosylées



Les oligosaccharides à la surface de la cellule assument des fonctions importantes pour la communication (signalisation) cellule-cellule et pour les interactions des cellules avec la matrice extracellulaire ou des pathogènes

La glycosylation des protéines n'est pas confinée à la surface de la cellule mais se trouve également à l'intérieur des compartiments de la cellule

✓ Aussi de nombreuses protéines des organelles sont glycosylées ✓ La fonction de ces glycosylations n'est souvent pas claire

✓ Les protéines lysosomales sont rendues plus résistantes à l'attaque des protéases par la glycosylation

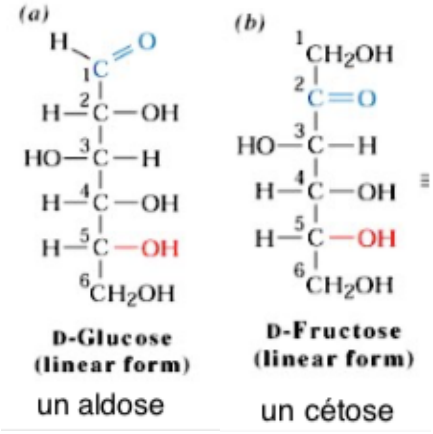
✓ La glycosylation peut aussi servir comme signal de tri; par exemple, les protéines lysosomales reçoivent une modification avec mannose-6-phosphate dans le Golgi, qui conduit à leur tri dans les vésicules de transport destinées aux endosomes tardifs.

3.b.2. Structure des hydrates de carbone - variabilité et nomenclature

3.b.2.a. Classification des monosaccharides, structure

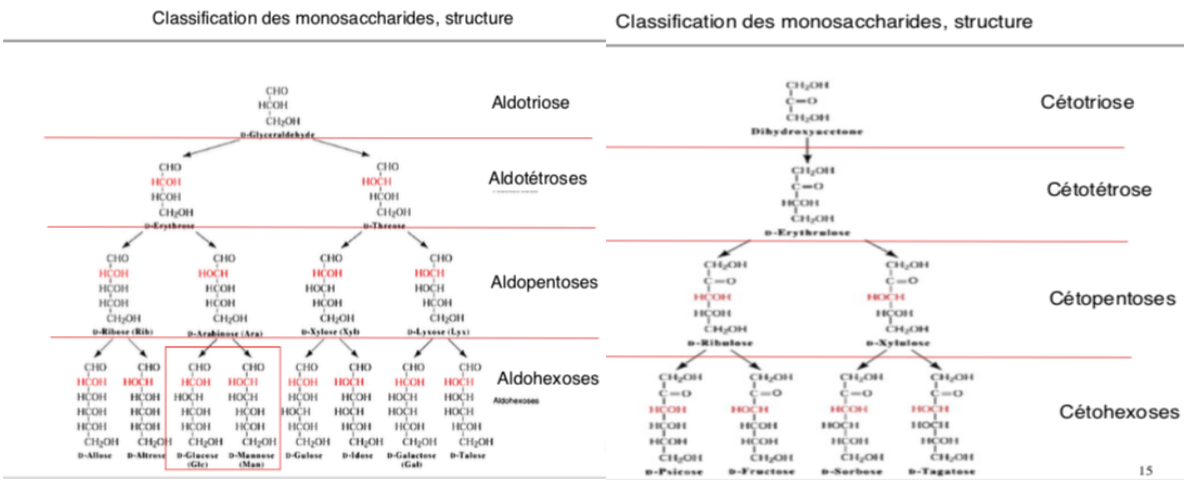
– Les monosaccharides sont des polyalcools issus du C et de H_2O

– Le classement en aldose ou cétose dépend de l'emplacement du groupe carbonyle



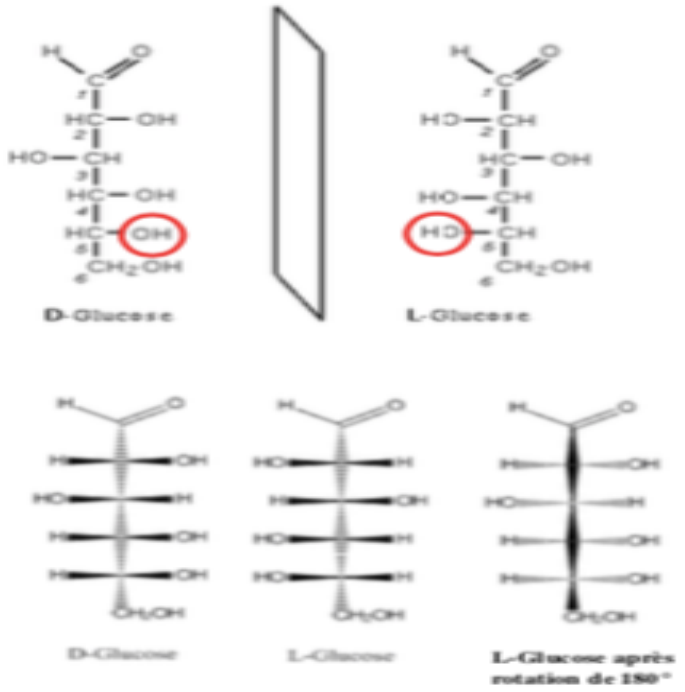
Les aldoses comportent le groupe carbonyl comme partie d'un aldéhyde à l'atome C 1
Les cétoses comportent un groupe carbonyl comme une cétone sur l'atome C 2

– Nombre d'atomes de carbone: triose, pentose, hexose, heptose



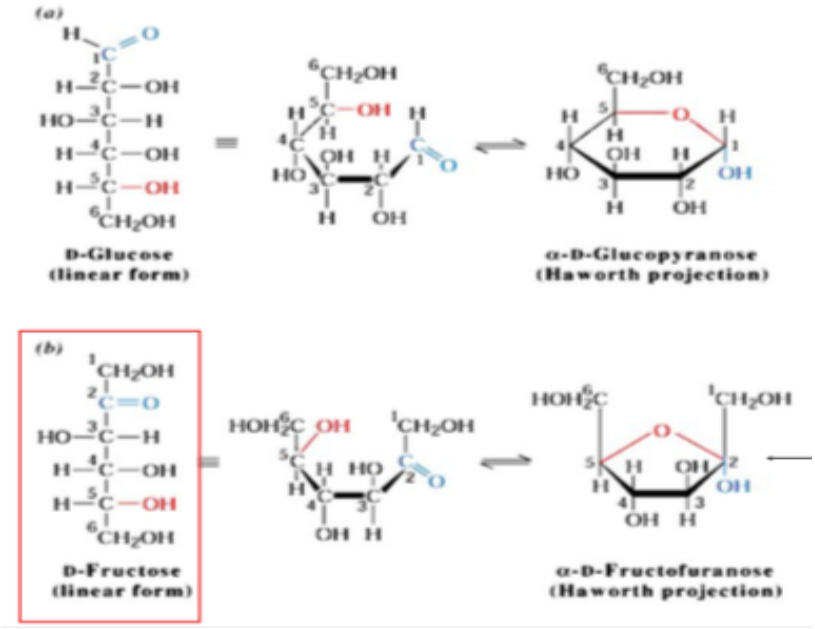
Enantioméres: Les formes d'une molécule qui ne sont pas superposable après réflexion dans un miroir. D - vs. L – sucres sont classifié en fonction de la position du groupe OH- à l'atome asymétrique C- le plus loin du groupe carbonyle.

Un atome C asymétrique (= un centre de chiralité) porte quatre différents ligands. Si ces ligands changent de place, on se retrouve avec un atome C portant les mêmes ligands mais qui ne peut pas être superposé à l'original.



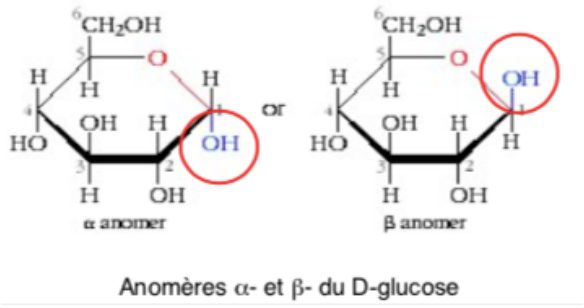
Conformation, cyclisation

- Les monosaccharides peuvent se cycliser spontanément en formant des liaisons covalents intramoléculaires entre leurs groupes carbonyl et alcool [SEP]
- Les aldohexosesforment des anneaux de pyranose (6- anneaux) [SEP]
- Les cétohexoses et les aldopentoses forment des anneaux de furanose (5- anneaux) [SEP]
- Les atomes individuels dans les anneaux sont identifiés par des chiffres [SEP]



Configuration des formes cycliques

- Les formes ⟨- et ®- deviennent perceptibles parce que la formation de l'anneau crée un nouveau centre asymétrique. Les isomères qui en résultent sont appelés anomères.
- Ils peuvent librement interconvertir dans l'eau (mais lentement). Par contraste, la conversion de l'énantiomère (entre les formes D- et L-) nécessite des enzymes.
- Les formes linéaires ne sont pas abondantes en conditions physiologiques.

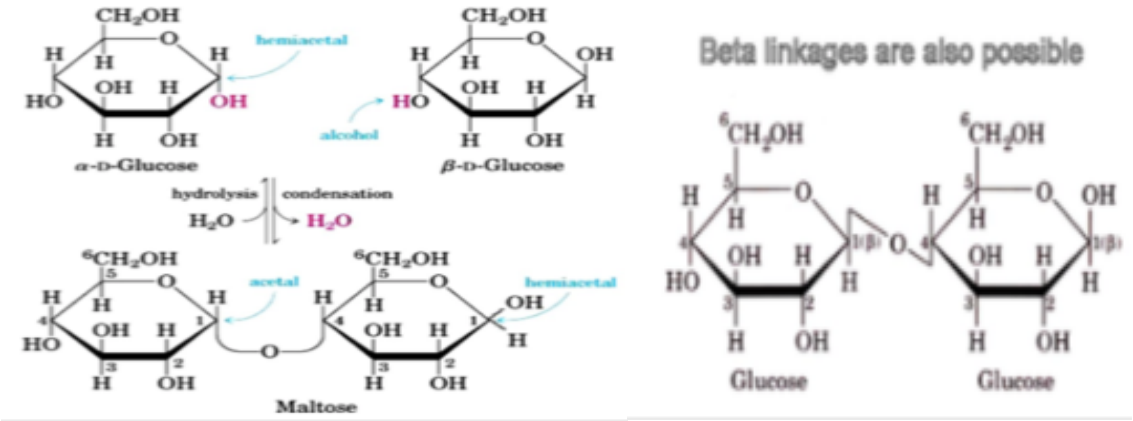


Anomères α- et β- du D-glucose

Quelques blocs de construction communs chez les hydrates de carbone



Liens glycosidiques

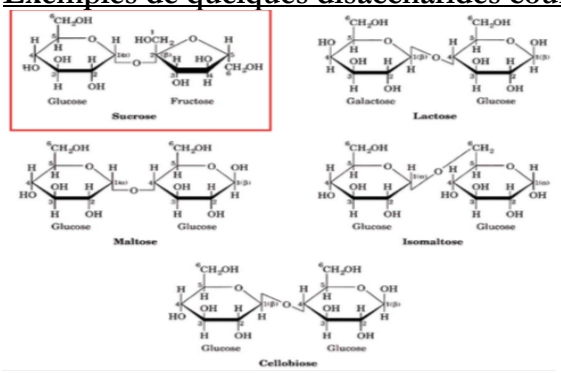


On appelle ce lien glycosidique ⟨-1,4 parce qu'il est dérivé d'un anomère-⟨ du sucre donnant le hémicétal

Remarque:

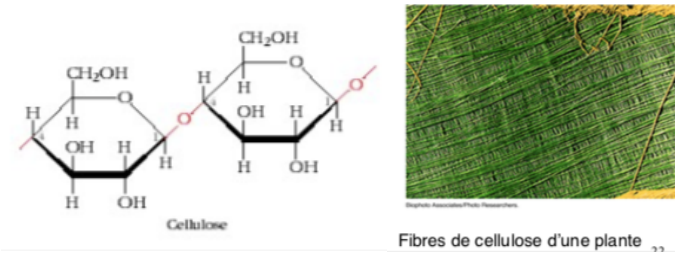
- N'importe quel groupe OH du second sucre peut être couplé à l'hémicétal (i.e. le ⟨- or ®-OH du premier sucre)
- Ainsi il y a des nombreux différents modes de liaison entre deux sucres; c'est ce qui distingue les hydrates de carbone des peptides, qui n'ont qu'un simple mode de liaison (la liaison peptidique)

Exemples de quelques disaccharides courants



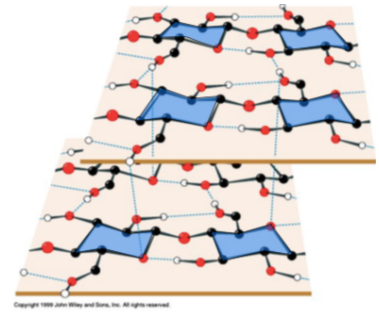
Exemples de polysaccharides structurels

- Chitin- exo skeletons (crustaceans, insects),exocyto squelettes des fungi et des algues. Polymers d'acetylglucosamine
- Cellulose–exocyto squelette des plantes, support de la charge. 50% du carbone de la biosphere Jusqu'à 15,000 résidus de glucose



Les polysaccharides forment des structures d'ordre supérieur

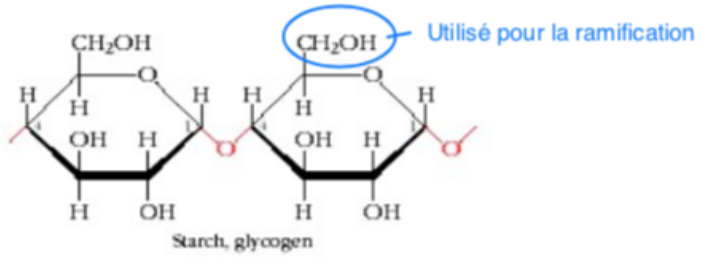
- De nombreux oligo- and polysaccharides peuvent s'associer via des ponts H- (---) pour former de plus grands aggrégats
- Il est à remarquer que cette représentation montre les anneaux de glucose dans leur structure réelle en 3D, prenant en compte les angles de liaison entre les atomes C et O; de simples groupes H sur les anneaux sont omis par souci de clarté
- noir: C-atomes rouge: O-atomes
- blanc: H-atomes participant aux ponts H



Example: Des polymers de cellulose liés par des ponts H

Stockage des sucres sous forme des polysaccharides

- L'amidon et le glycogène sont des polysaccarides de stockage chez les plantes et les animaux, respectivement. Ce sont des polymères de glucose et ils servent à stocker l'énergie pour un usage ultérieur dans le métabolisme.
- L'amidon (amylose) est unisomère de cellulose, porte une liaison glycosidique α-1,4 et est produit par les cellules des plantes.
- Le glycogène (cellules animales)a une structure similaire, mais est plus ramifié (via liaisons(-1,6).Les ramifications facilitent une dégradation plus rapide.



– Centres chiraux: Formes D- vs. L-dépendantes de la position du groupe OH- à l'atome asymétrique C- avec le chiffre le plus élevé
– Un atome C asymétrique porte quatre différents ligands. Si ces ligands changent de place, on se retouve avec un atome C portant les mêmes ligands mais qui ne peut pas être surimposé à l'original.

3.b.3. Biosynthèse des différents types de protéines glycosylées

3.b.3.a. Protéines N- et O- glycoconjugées

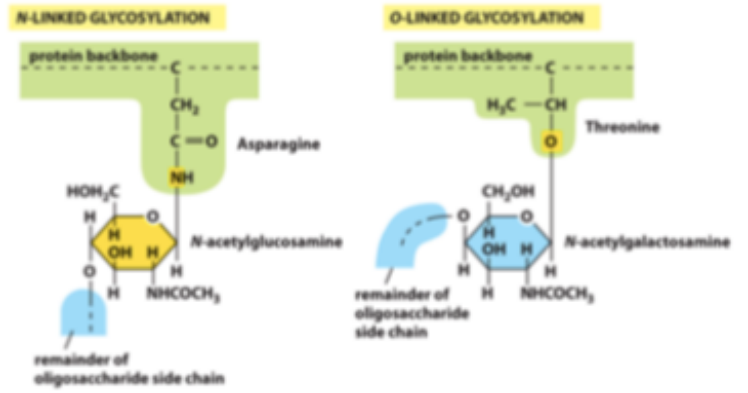
3.b.3.a.1. Glycosylation d'une protéine

- On distingue deux types de glycosylation:

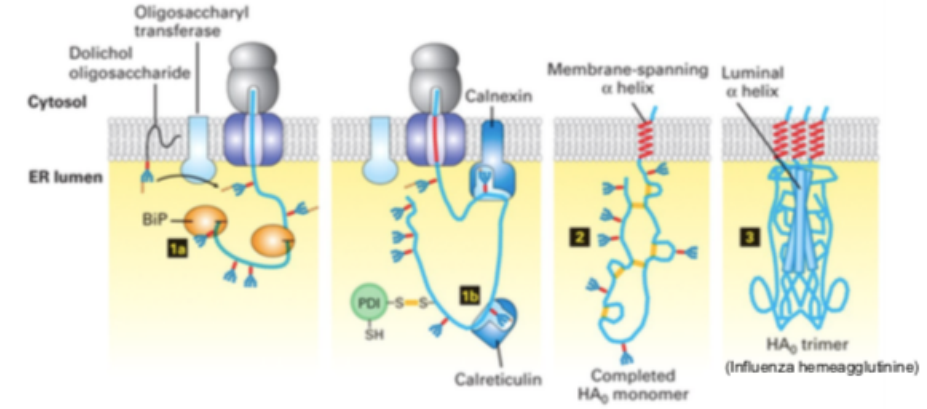
La N-glycosylation: attachement au nitrogène d'une asparagine d'une protéine; initiée dans le réticulum endoplasmique (RE); puis traitée dans le Golgi

La O-glycosylation: attachement à l'oxygène d'une sérine ou une thréonine d' une protéine: seulement dans le Golgi

– 90% de toutes les protéines glycosylées reçoivent la N-glycosylation; La O- glycosylation est bien moins fréquente et les voies pour la générer sont encore mal comprises. C'est pourquoi, nous prendrons la N-glycosylation comme exemple.



3.b.3.a.2. La N-glycosylation se produit dans le RE pendant la translocation

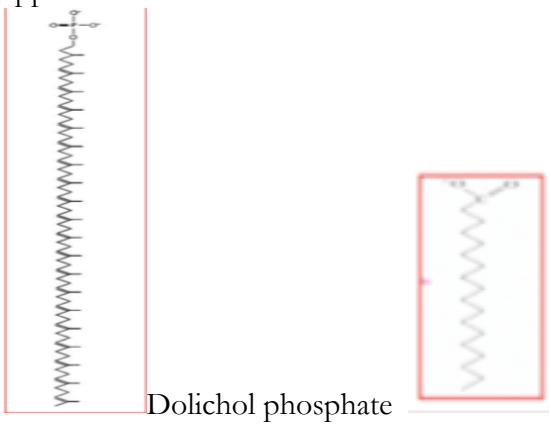


- La N-glycosylation se produit à la séquence de reconnaissance X-Asn-X-Ser/Thr
- Un oligosaccharide est transféré en une étape depuis le lipide donneur "dolichol phosphate" vers la préprotéine
- L' oligosaccharyltransférase responsable de cette réaction est associée physiquement avec la translocase
- La plupart des protéines sont importées de manière co-traductionnel. Cependant, la glycosylation se produit souvent avant que la translocation ne soit finie
- Par conséquent la glycosylation peut également affecter le re-pliage de la protéine précurseur
- Le site actif de l'oligosaccharyltransférase est dans la lumière du RE ==> cette modification n'affecte que les protéines solubles dans le RE ou des parties de protéines de la membrane faisant face à la lumière du RE

3.b.3.a.3. Les oligosaccharides pour l'oligosaccharyltransférase sont synthètisées des dans le RE sur l'isoprénoïde dolichol phosphate

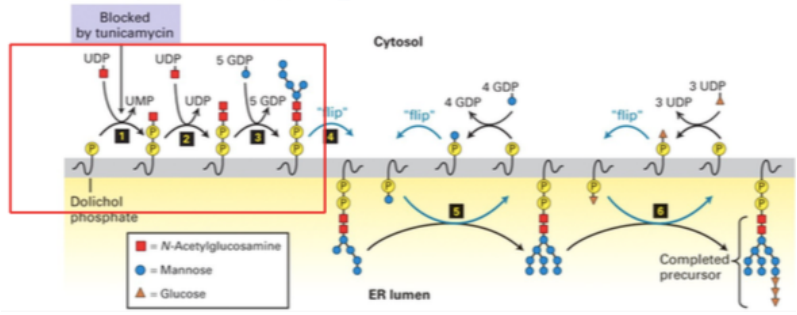
- Il contient 22 unités d'isoprène, c-à- d. 110 atomes de carbone (C_{100})
- Par comparaison: Les phospholipides "normaux" sont généralement C_{16} or C_{18}
- Par conséquent, un simple dolichol phosphate peut facilement s'étendre sur les deux feuillets d'une membrane au moins deux fois

Le stéarate, un acide gras présent chez de nombreux phospholipides, dessiné à approximativement la même échelle



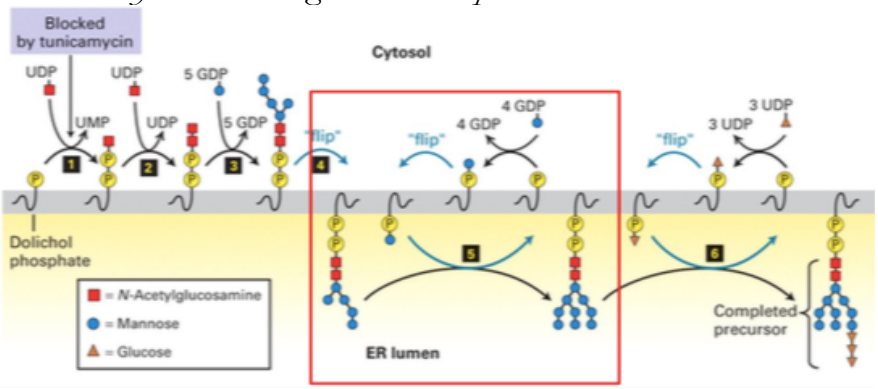
Dolichol phosphate

3.b.3.a.4. Synthèse des oligosaccharides précurseurs à la membrane du RE



✓ L'assemblage commence du côté cytoplasmique du RE
✓ L'oligosaccharide est assemblé sucre par sucre sur le lipide porteur **dolichol**
✓ Les sucres sont activés sur le côté cytoplasmique par la liaison covalente aux diphosphates du nucléotide
✓ L'hydrolyse des liaisons diphosphates du nucléotide entraîne leur attachement à la chaîne oligosaccaryl grandissante
✓ Les hydrates de carbone sont attachés au dolichol par un lien pyrophosphate "riche en énergie";
son hydrolyse conduit le transfert de la chaîne oligosaccharyl à la protéine

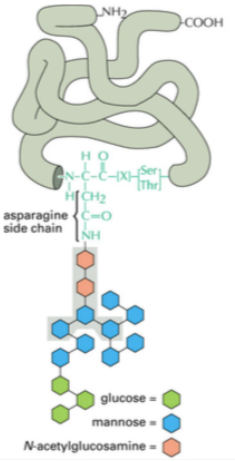
3.b.3.a.5. Synthèse des oligosaccharides précurseurs à la membrane du RE



- Après l'addition de 2x N-acetylglucosamine et 5x mannose, l'oligosaccharide lipidoconjugué est tourné vers la membrane et fait alors face à la lumière du RE
- La "flippase" est un "transporteur ABC " dirigé par l'hydrolyse de l'ATP Des nouveaux sucres sont ajoutés dans le RE
- Dans la lumière du RE, les formes monoglycosylées du dolichol jouent le rôle de donneurs de sucre
- Elles sont assemblées sur la face cytoplasmique et sont alors inversées vers la lumière

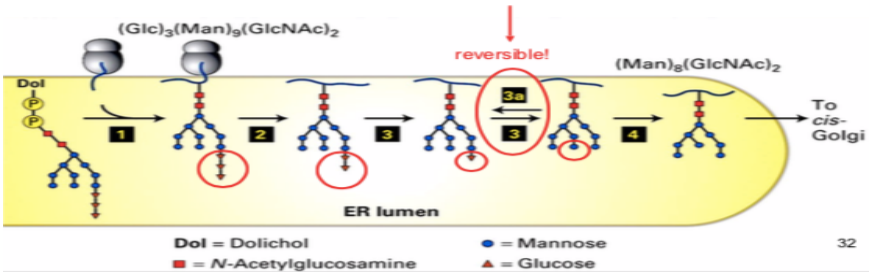
3.b.3.a.6. La N-glycosylation est ajouté à l'asparagine dans le RE

- La structure de la "core glycosylation" (les sucres marqué en gris) est la même pour toutes les protéines N- glycosylées
- L'entière diversité de la glycosylation observée est générée par une modification subséquente dans le RE et le Golgi



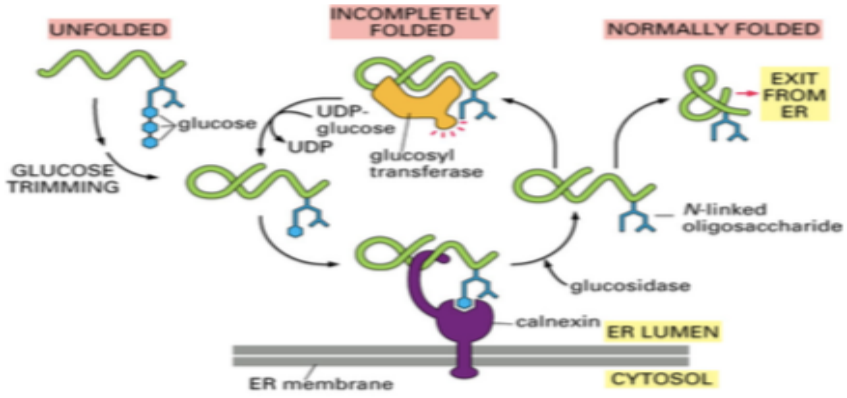
3.b.3.a.7. L'élimination (trimming) des oligosaccharides peut être un signal de repliement de la protéine

- ✓ Dans le RE, 3 glucoses et un mannose sont de nouveau rapidement éliminés. Ce processus est appelé oligosaccharide "trimming". Le premier résidu de glucose peut être ré-attaché par une glucosyltransférase.
- ✓ Les glycoprotéines qui ne sont pas correctement repliées dans le RE retiennent les glucoses
- ✓ Les résidus de glucose agissent comme signaux de rétention dans le RE



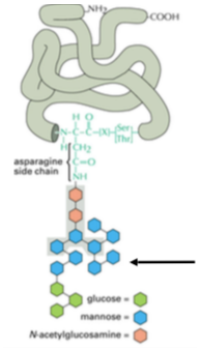
3.b.3.a.8. L'élimination (trimming) des oligosaccharides comme signal de repliement

- ✓Un résidu de glucose est maintenu par la competition entre une glucosyltransferase, qui agit préférentiellement sur des protéines mal pliés, et une glucosidase, qui domine en cas ou la protéine est correctement plié
- ✓ Le glucose terminal est reconnu par les protéines chaperonnes calnexine et calreticuline, qui déclenchent un autre cycle de repliement et retiennent la protéine dans le RE.



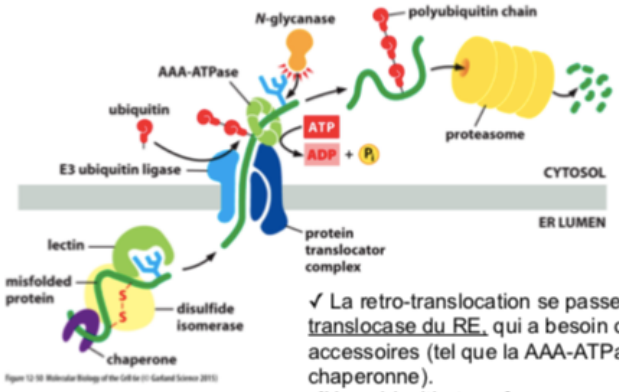
3.b.3.a.9. Si le repliement échoue, la dégradation de la protéine est induite

- ✓ Un résidu de glucose est maintenu si l'interaction avec les protéines chaperonnes calnexine et calreticuline persiste, ce qui retient la protéine dans le RE
- ✓ Si une protéine reste dans le cycle de repliement trop longtemps, indiquant des problèmes de repliement qui ne peuvent pas être résolus, elle devient un substrat pour une autre modification de sucre par mannosidase I dans RE.
- ✓ L'effacement d'une **mannose** (par mannosidase I dans RE) cible la protéine pour la dégradation associée au RE (**ERAD** = ER-associated degradation).



3.b.3.a.10. ERAD nécessite l'exportation de la protéine hors du RE dans le cytosol et une dégradation par la voie ubiquitine-protéasome

- La retro-translocation se passe aussi par la translocase du RE, qui a besoin de protéines accessoires (tel que la AAA-ATPase, une protéine chaperonne).
- Une ubiquitin-transferase associé avec la translocase va poly-ubiquityler la protéine pendant la retro-translocation
- Ceci conduit à sa dégradation par le protéasome

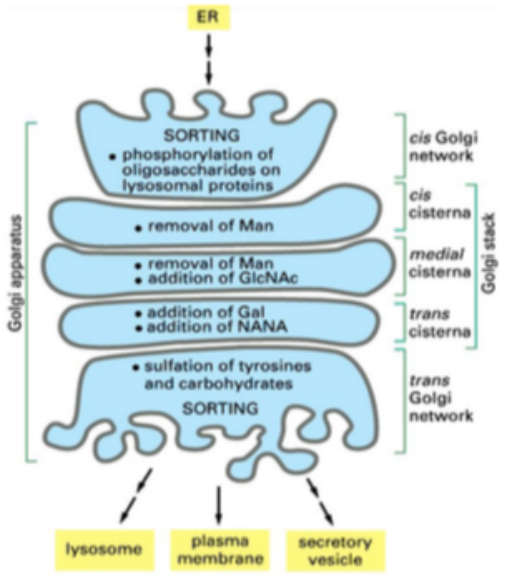


✓ La retro-translocation se passe aussi par la translocase du RE, qui a besoin de protéines accessoires (tel que la AAA-ATPase, une protéine chaperonne).
✓Une ubiquitin-transferase associé avec la translocase va poly-ubiquityler la protéine pendant la retro-translocation
✓Ceci conduit à sa dégradation par le protéasome

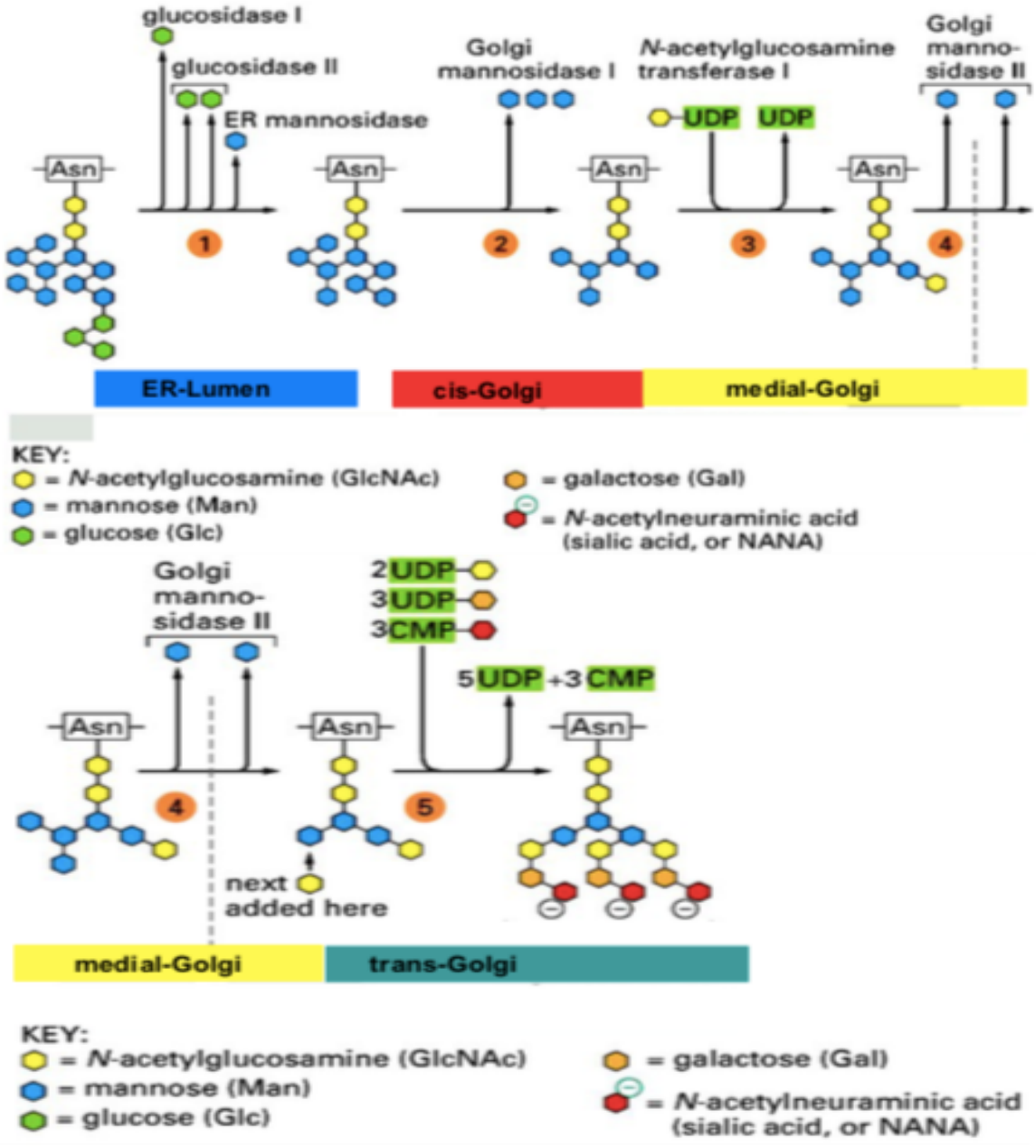
3.b.3.a.11. Modifications courantes des protéines dans le Golgi

✓ Les différents compartiments du Golgi contiennent des différents lots de protéines pour la modification covalente des protéines
✓ Certaines affectent les chaînes carbohydrates des protéines et des lipides en transit

Man: mannose
GlcNAc: N-acetylglucosamine
NANA: N-acetylneuramic acid



3.b.3.a.12. Changements successifs dans le schéma de glycosylation au cours de la migration de la protéine à travers le Golgi (I)



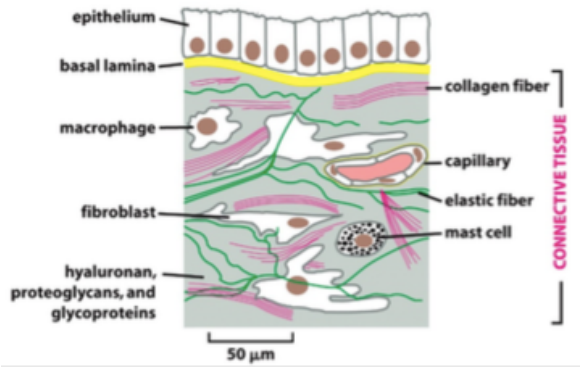
KEY:
= N-acetylglucosamine (GlcNAc)
= mannose (Man)
= glucose (Glc)
= galactose (Gal)
= N-acetylneuraminic acid (sialic acid, or NANA)

3.b.3.b. Protéoglycanes

3.b.3.b.1. *Les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes sont des composants majeurs de la matrice extracellulaire (ECM), qui relie les cellules entre elles*

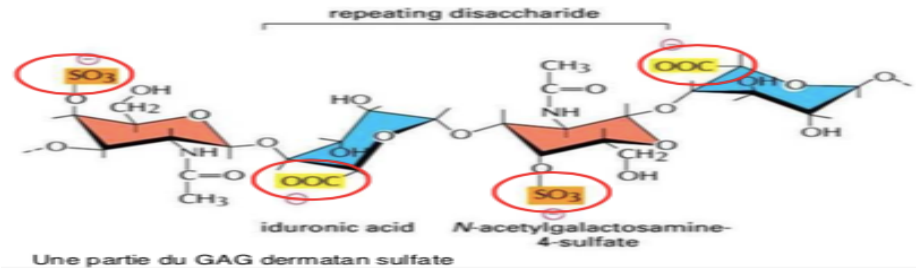
Les principaux éléments de l'ECM sont:

- ✓ Les protéines fibreuses (collagène, fibronectine, etc.)
- ✓ Les protéoglycanes
- ✓ Les glycosaminoglycanes



3.b.3.b.2. *Les glycosaminoglycanes (GAGs)*

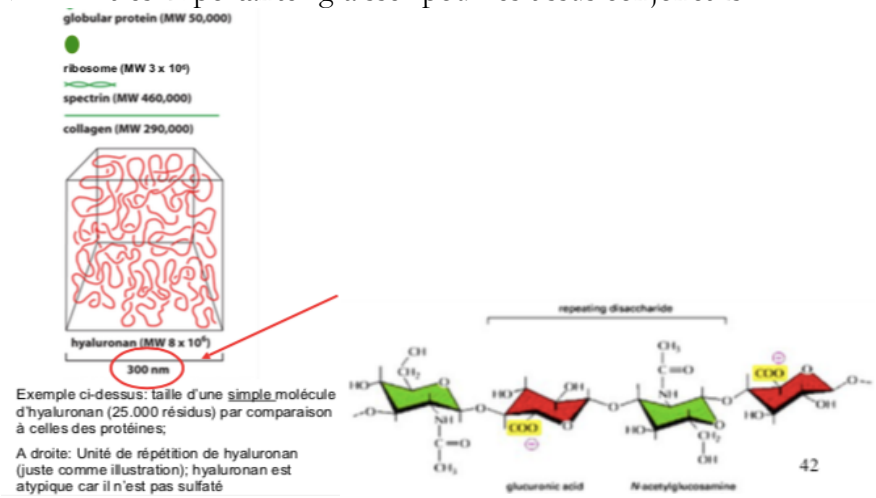
- Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des polysaccharides linéaires, composés de sucres acides (acides iduroniques ou glucuroniques, dérivés de l'hexosamine, par exemple la N-acetylgalactosamine) qui sont souvent sulfatés
- Ainsi, les GAGs portent beaucoup de charges négatives
- Typiquement 50-200 résidus (cependant, jusqu'à 25000 sont possibles, par exemple en hyaluronan)
- Synthétisé dans le Golgi



Une partie du GAG dermatan sulfate

3.b.3.b.3. *Les glycosaminoglycanes peuvent former des gels poreux*

✓ GAGs sont fortement hydratés; étendus (ne tombent pas dans des structures compactes comme les peptides le font pour minimiser les surfaces hydophobiques exposées)
✓ ==> Ils forment de la matière gélatineuse, qui est très visqueuse et élastique; leur très forte hydratation les rend comme des tamis moléculaires
✓ ==> très importante "graisse" pour les tissus conjonctifs



Exemple ci-dessus: taille d'une simple molécule d'hyaluronan (25.000 résidus) par comparaison à celles des protéines;

A droite: Unité de répétition de hyaluronan (juste comme illustration); hyaluronan est atypique car il n'est pas sulfaté

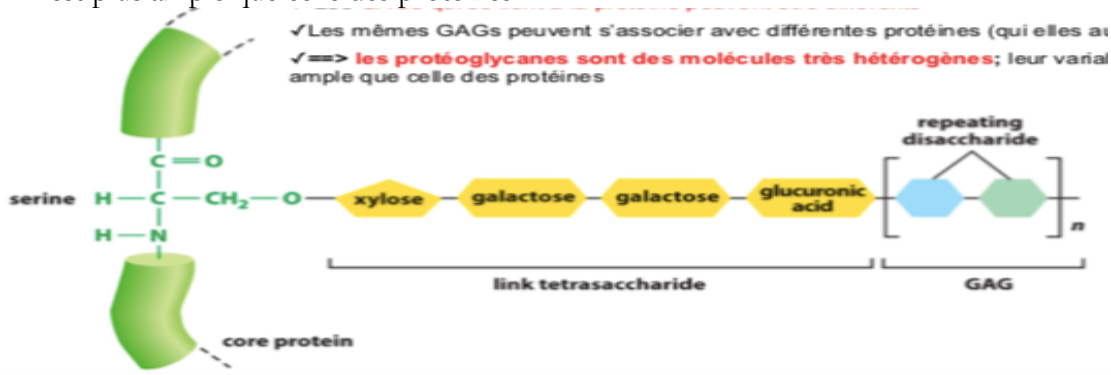
Comparaison de la taille d'une bactérie: approx. 1000 nm! 3 molécules d'hyaluronan pourraient remplir une bactérie *d'Escherichia coli*

3.b.3.b.4. *Les GAGs peuvent être subdivisés en 5 groupes différents selon leurs résidus de sucre, leur couplage, le nombre et l'endroit des résidus sulfatés*

Sous-groupes	Emplacements principaux dans le corps humain
Hyaluronanes	Fluide synovial Matrice extracellulaire du tissu conionctif lâche
Chondroitin sulfates	cartilage, os, valves du coeur
Heparan sulfates	Membranes basales
Dermatan sulfates	peau, vaisseaux sanguins, valves du coeur
Keratan sulfates	cornée, os, cartilage

3.b.3.b.5. *Les protéoglycanes sont des glycosaminoglycanes liés de manière covalente à une protéine*

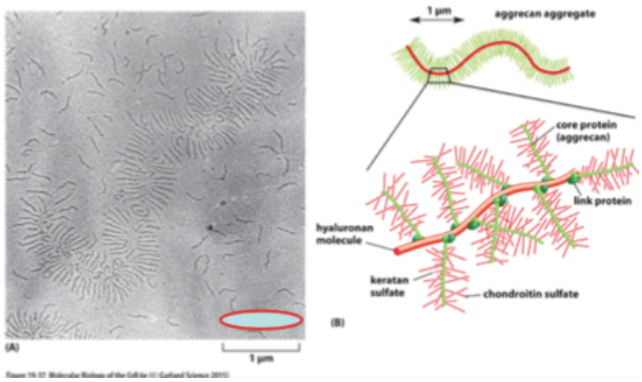
- ✓ La plupart des GAGs qui existent sont attachés aux polypeptides
- ✓Ils sont synthétisés sur ces polypeptides dans le Golgi
- ✓ Des sulfatations et d'autres modifications se produisent aussi dans le Golgi
- ✓ Plusieurs GAGs peuvent être trouvés sur une seule protéine
- ✓ Les GAGs qui se lient à la protéine peuvent être différents
- ✓Les mêmes GAGs peuvent s'associer avec différentes protéines (qui elles aussi sont divers)
- ✓**==> les protéoglycanes sont des molécules très hétérogènes;** leur variabilité est plus ample que celle des protéines



3.b.3.b.6. *Les protéoglycanes peuvent former des super-structures énormément grandes*

✓ Plusieurs protéoglycanes peuvent être aggrégées par les GAGs, conduisant à des molécules qui sont extrêmement larges

✓ Contrairement aux glycoprotéines, qui contiennent 1-60% d'hydrates de carbone, les protéoglycanes en contiennent >95%



L'illustration montre le protéoglycane aggrecan.
L'aggrecan est responsable de l'élasticité du cartilage
Dans l'arthrite rhumatoide l'aggrecan diminue
A gauche: Photo par microscopie électronique; encart en rouge: taille d'une bactérie
A droite: composition schématique de aggrecan

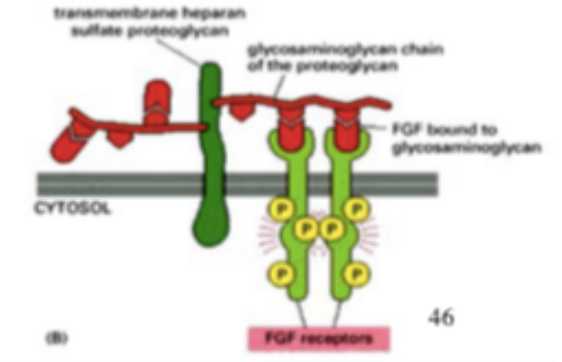
3.b.3.b.7. *Les protéoglycanes lient, immobilisent et parfois concentrent d'autres protéines*

✓ Etant donné leur structure hétérogène et aussi leur charge, ils peuvent lier de nombreuses protéines différentes
✓ En raison de leur taille; les protéoglycanes sont essentiellement immobiles. Cependant, ils peuvent lier et immobiliser des protéines secrétées proches d'une site de sécrétion.

Exemple 1: Vaisseaux sanguins endommagés

Au site d'une inflammation, l'endothélium des vaisseaux sanguins secrète des chimokines qui attirent les cellules du système immunitaire. Les sulfates d'héparane, qui sont liés à la surface endothéliale, fixent et présentent les chimokines secrétées au site d'inflammation. Cela permet de diriger la réponse immunitaire à l'endroit correct.

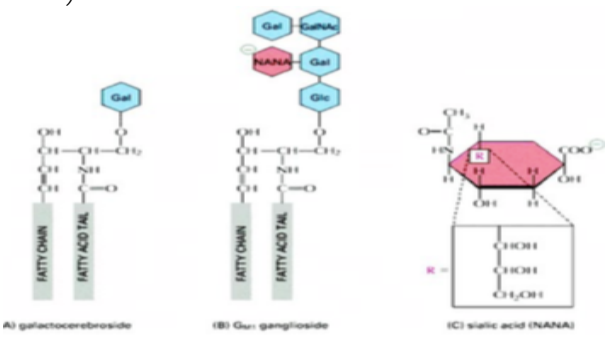
Exemple 2: Facteurs de croissance
Les protéoglycanes peuvent concentrer des facteurs de croissance solubles (comme fetal growth factor, FGF); cela favorise la dimérization des récepteurs du facteur de croissance dans la membrane plasmique, ce qui est indispensable pour leur activation



3.b.4. Lipides glycosylés, ancres GPI

3.b.4.a. Les glycolipides sont trouvés dans toutes membranes des voies secrétoires et endocytiques, et particulièrement sur la membrane plasmique

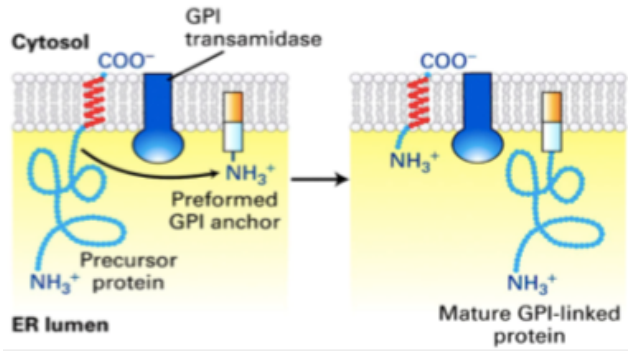
✓ seulement trouvés sur la face exoplasmique (=non-cytosolique) de la membrane
✓ formés dans le Golgi
✓ Constituent à peu près 5% des lipides dans la membrane plasmique
✓Quelques-uns sont impliqués dans les processus de reconnaissance des pathogènes. Exemple: la toxine du choléra, qui est produite par la bactérie Vibrio cholerae, se lie au ganglioside GM1 et l'utilise comme récepteur pour déclencher son incorporation dans la cellule; la toxine de choléra augmente le niveau de cAMP dans les cellules épithéliales des intestins (activant un efflux de Na^+)



Deux exemples pour les glycolipides
Gal: Galactose
GalNAc: N-acetylgalactosamine
Glc: Glucose
NANA: acid N-acétylneuramique

3.b.4.b. Les ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) attachent certaines protéines à la membrane plasmique

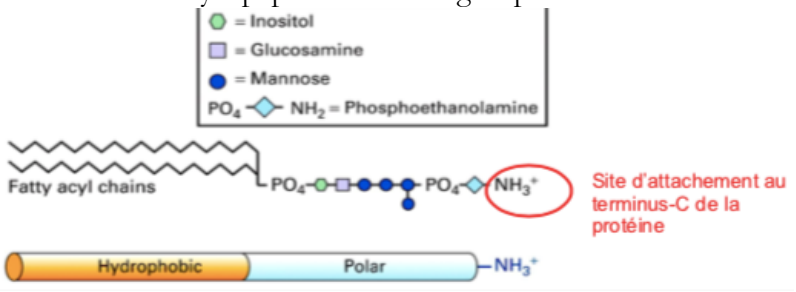
✓ Les protéines ancrées GPI sont d'abord transloquées et intégrées dans la membrane de RE via une hélice C-terminal.
✓ Cette ancre porte les signaux de reconnaissance pour une peptidase qui coupe l'ancre à la surface de RE.
✓ Le nouveau C-terminus du domaine hydrophile de la protéine est alors transféré à GPI



3.b.4.c. Structure d'une ancre GPI

✓ L'ancre GPI contient un tronc normal de phosphatidate

✓ La tête hydrophile est composée de 6 résidus de sucre et d'un éthanolamine terminal
✓ Le groupe carboxyl de la protéine se lie de manière covalente à cette éthanolamine en formant une liaison de style peptide avec son groupe aminé libre



3.b.5. Conséquences des défauts de glycosylation: maladies

Etapes défectueuses dans les différents désordres congénitaux de GLYCOSYLATION-I



3.b.5.a, Les désordres congénitaux de la glycosylation (CDGs) sont associés à des symptômes cliniques sérieux

Table 2 Clinical features seen in different types of CDG

Type	Features
Ia	Hypotonia, variable psychomotor retardation, seizures, peripheral neuropathy, stroke-like episodes, strabismus, cardiomyopathy
Ib	Normal development, hypoglycemia, coagulopathy, protein-losing enteropathy, hepatic fibrosis, cyclicvomiting
Ic	Hypotonia, psychomotor retardation, seizures, strabismus, feeding problem, coagulopathy
Id	Hypotonia, severe psychomotor retardation, seizures, microcephaly, optic atrophy
Ie	Hypotonia, severe psychomotor retardation, seizures, delayed myelination, Blindness
If	Hypotonia, severe psychomotor retardation, seizures, blindness, dry skin, low food intake, vomiting
Ig	Hypotonia, severe psychomotor retardation, seizures, feeding difficulties, facial dysmorphy, coagulopathy
IIa	Hypotonia, severe psychomotor retardation, frequent infections, widely spaced nipples
IIb	Hypotonia, generalized edema, hypoventilation, apnea, hepatomegaly, demyelinating polyneuropathy
IIc	Hypotonia, psychomotor retardation, elevated peripheral leukocytes, failure to thrives, short arms and legs
IId	Hypotonia, hydrocephalus, myopathy, coagulation abnormalities

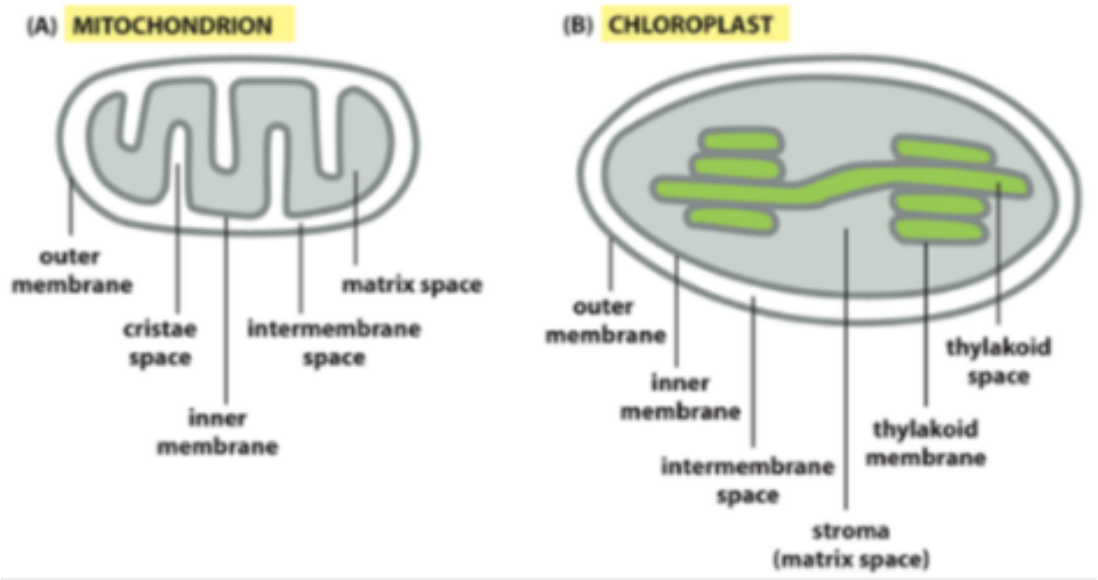
4. La biogenèse des mitochondries

Biogenèse et dynamique des mitochondries

- a. Organisation des mitochondries
- b. Fonctions
- c. Système génétique
- d. Assemblage

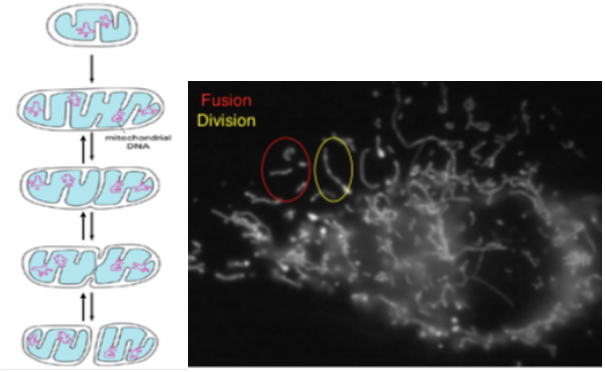
4.a. Organisation des mitochondries

4.a.1. Les mitochondries sont divisées en quatre sous-compartiments



- Mitochondrion
- Chloroplast

4.a.2.Les mitochondries peuvent se diviser et fusionner, selon le cycle cellulaire et les conditions environnementales

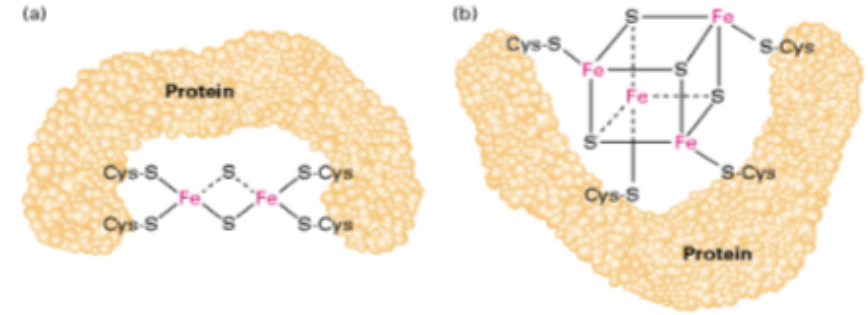


4. b. Fonctions

4.b.1. Fonctions mitochondriales dans les cellules mammifères

- Homéostasie du calcium et signalisation par calcium (les mitochondries stockent le Ca^{2+})
- Mort cellulaire active (apoptose)
- Les mutations de l'ADN mitochondriale sont en corrélation avec des maladies liées au vieillissement
- Centrale de la cellule; responsable de la phosphorylation oxidative (générant l'ATP)
- Synthèse de phospholipides (phosphatidyl-ethanolamine)
- Biogenèse des complexes fer-soufre (Fe-S)

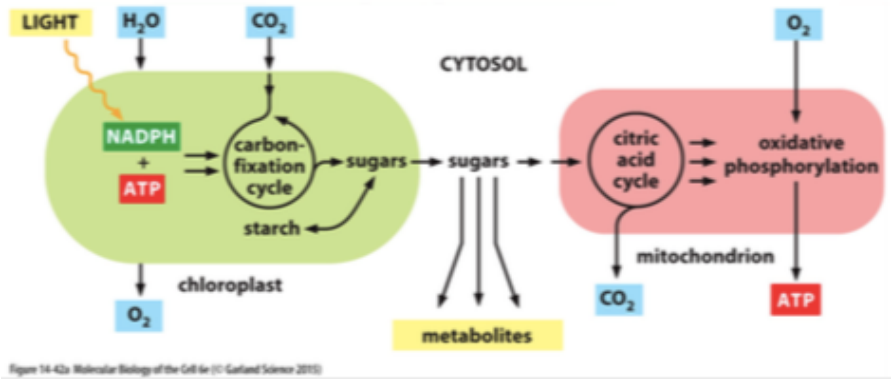
4.b.2. Des enzymes oxido-reductrices portent souvent des centres réactifs composés de fer et de sulfure; ces centres sont assemblés à l'intérieur des mitochondries



Exemples: Ferredoxin, NADH dehydrogenase, aconitase

4.b.3. Résultat finale des activités bioénergétiques des mitochondries: CO_2 et ATP

Les cellules mammifères oxydent des sucres (fournis par les plantes et leurs chloroplastes) en CO_2 et H_2O. Elles capturent une partie de l'énergie libérée sous forme d'ATP.



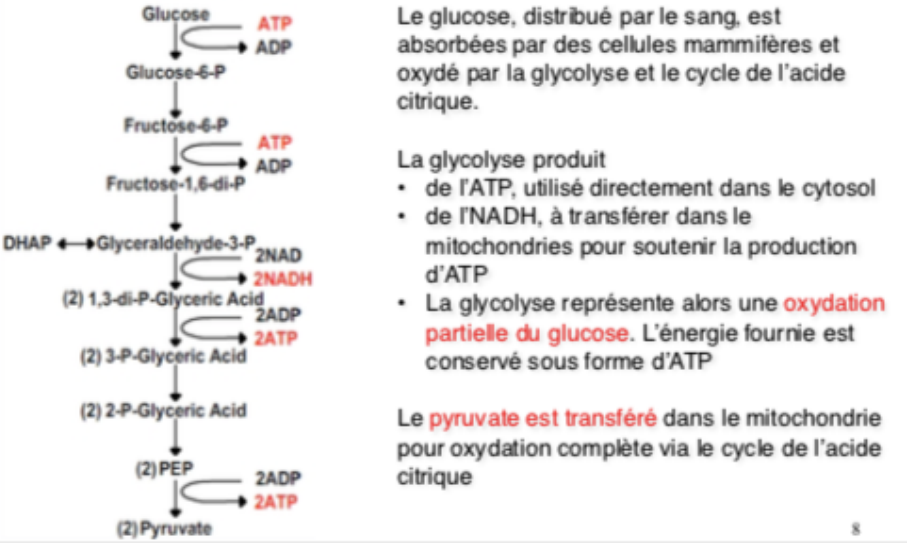
4.b.4. La glycolyse: Conversion du glucose en pyruvate dans le cytosol

Le glucose, distribué par le sang, est absorbées par des cellules mammifères et oxydé par la glycolyse et le cycle de l'acide citrique.

La glycolyse produit

- de l'ATP, utilisé directement dans le cytosol
- de l'NADH, à transférer dans le mitochondries pour soutenir la production d'ATP
- La glycolyse représente alors une oxydation

Le pyruvate est transféré dans le mitochondrie pour oxydation complète via le cycle de l'acide citrique



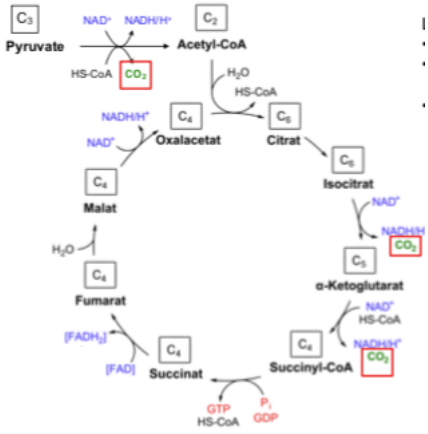
4.b.5. Le cycle d'acide citrique dans les mitochondries

Le cycle produit

-GTP

-CO_2 et H_2O, grâce è une oxydation complète du pyruvate

- Les électrons (et H transférés par NAD et FAD vers les complexes de la chaine respiratoire (= chaine de transport d'electrons) dans la membrane interne.



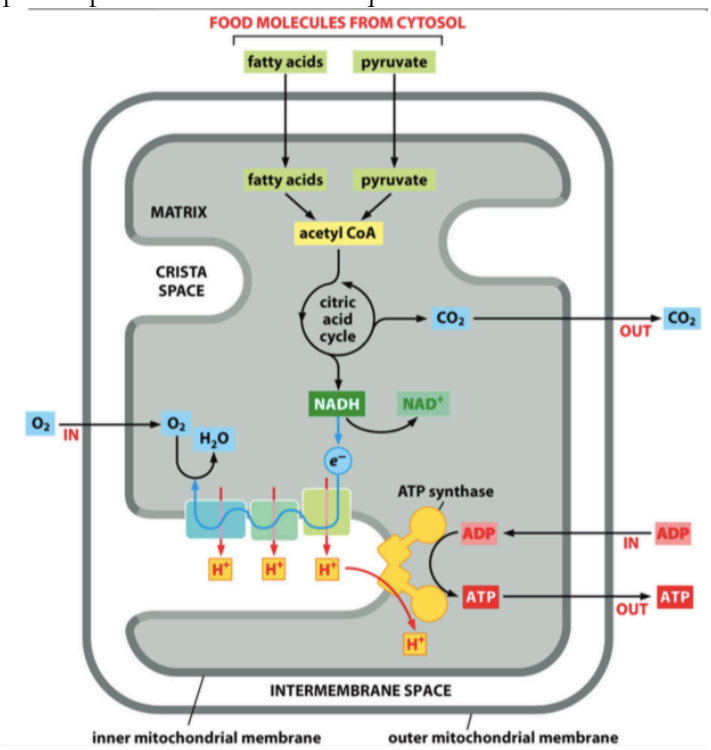
4.b.6. L'oxydation du pyruvate en CO_2 à l'intérieur des mitochondries dirige l'export de protons à partir de la matrice vers l'espace inter-membranaire

- Le cycle de l'acide citrique va oxyder le pyruvate en CO_2. Les électrons sont transférés par l'NADH sur une chaine de transport d'électron (la chaine respiratoire, composé de 3 complexes transmembranaire qui agissent comme pompes de protons. Le dernier complexe de ce chaine les transferts sur O_2 pour en générer de l'eau.

- L'exportation de protons conduit à un potentiel électrochimique (c-a-d., le gradient de concentration de H^+ et un potentiel électrique à travers la membrane)

- L'énergie libérée si H^+ reflue dans la matrice est utilisée pour alimenter la synthèse d'ATP sur la F-ATPase mitochondriale, l'enzyme qui fait presque tout l'ATP utilisés dans notre corps

- La membrane externe contient de grands canaux perméables aux ions appelés porines, qui laissent passer toutes les molécules inférieures à 5000 Da. Par conséquent, cette membrane n'a pas de potentiel électrochimique.

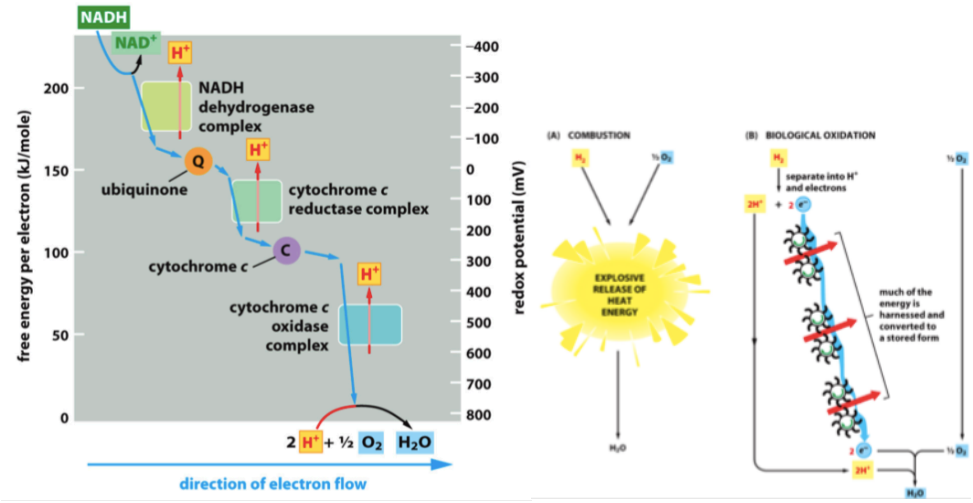


4.b.7. Conversion de l'énergie fournie par oxidation de NADH

- Les complexes de la chaine respiratoire transfèrent des électrons dans un ordre défini, selon leur potentiel redox croisant.

- L'énergie fournie par l'oxidation de NADH en H_2O est ainsi libérée par étape, permettant sa préservation efficace sous forme d'un gradient électrochimique.

-Cet oxidation graduelle distingue le processus d'une simple combustion, même si les produits finaux sont identique.



4.b.8. La F-ATPase est une turbine moléculaire entraîné par des protons

4. c. Système génétique

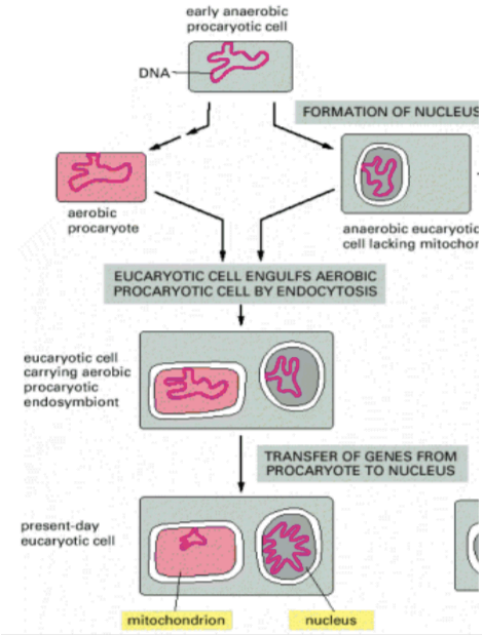
4.c.1.Les mitochondries contiennent leur propre génome, exprimée à l'intérieur de l'organelle

− La majorité d'ADN se trouve dans le noyau ✓Aussi les mitochondries et les chloroplastes contiennent de l'ADN

− Les mitochondries et les chloroplastes ont probablement évolué depuis les bactéries qui ont été endocytosées par les cellules ancestrales contenant un noyau eucaryote, formant les **endosymbiotes.**

−Pendant l'évolution, la plupart des gènes bactériennes furent transférées au noyau: Les mitochondries et les chloroplastes n'ont retenu que les pétits ADNs circulaires encodant quelques protéines de l'organelle. Ils sont exprimés par des polymérases mitochondriales d'ARN et des ribosomes au sein de l'organelle. Ce système d'expression de gènes est similaire à celui des bactéries.

−Par conséquent, les cellules eucaryotes ont des multiples systèmes génétiques: un système nucléaire prédominant et des systèmes secondaires avec leur propre ADN dans les mitochondries et les chloroplastes.



4.c.2.Les génomes mitochondriaux sont petits

- Les génomes mitochondriaux dans les cellules mammifères n'encodent que 16000-20000 de paires de base

- Chez les plantes et les champignons, ils peuvent atteindre 2,5 x 10^6 bp, mais sont encore 100x-1000x plus petits que les génomes nucléaires (10^8-10^9 bp)

Table 14-2. The Size of Organelle Genomes*

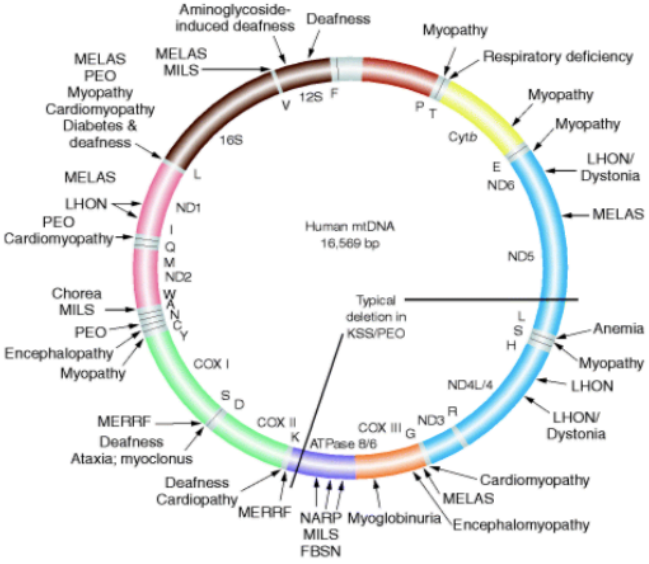
Type of DNA	Size (thousands of nucleotide pairs)
Chloroplast DNA	
Higher plants	120-200
Chlamydomonas(green alga)	180
Mitochondrial DNA	
Animals (including flatworms, insects, and mammals)	16-19
Higher plants	150-2500
Fungi	

4.c.3.Le code génétique des mitochondries diffère de celui du noyau, au moins pour quelques codons

Codon	"Universal" code	Mitochondrial codes			
		Mammals	Invertebrates	Yeasts	Plants
UGA	STOP	*Trp*	*Trp*	*Trp*	STOP
AUA	Ile	*Met*	*Met*	*Met*	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	*Thr*	Leu
AGA AGG	Arg	*STOP*	*Ser*	Arg	Arg

***Red* italics indicate that the code differs from the "Universal" code.**

4.c.4. Les mutations de l'ADN des mitochondries sont responsables de nombreuses maladies



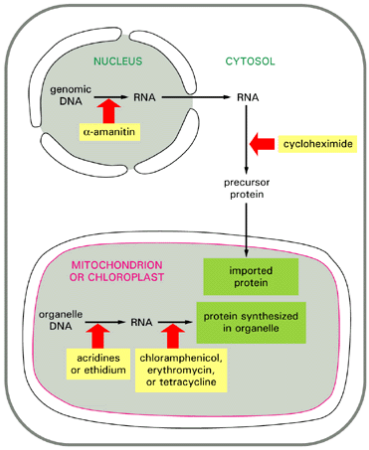
Diseases:

MERRF	Myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease
LHON	Leber hereditary optic neuropathy
NARP	Neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosum
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike symptoms
MMC	Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy
PEO	Progressive external opthalmoplegia
KSS	Kearns-Sayre syndrome
MILS	Maternally inherited Leigh syndrome

Ces mutations affectent surtout les tissus dans lesquels les mitochondries sont particulièrement abondantes, par ex. les cellules musculaires ou les neurones

4. d. Assemblage

4.d.1. Les mitochondries sont synthétisées à partir des protéines de deux différentes sources



- La majorité des protéines mitochondriales est encodée dans le noyau, traduite sur les ribosomes cytoplasmiques et importée post- traductionnellement dans l'organelle

-Peu de gènes (13 chez les mitochondries humaines, jusqu'à 97 chez les protozoaires) sont à l'intérieur des mitochondries et y sont exprimés. Pour comparaison: Une mitochondrie contient 500 protéines différentes.

-Pour ce faire, les mitochondries contiennent un appareil indépendant pour la transcription et la traduction qui ressemble à celui des bactéries

-Les contributions des deux génomes peuvent être facilement distinguées par des inhibiteurs sélectifs de l'expression des gènes nucléaires ou des gènes mitochondriaux. Le system d'expression des gènes mitochondrial ressemble a celui des bactéries et est sensible aux mêmes antibiotiques.

4.d.2.Import dans la matrice

−Les protéines sont généralement importées post-traductionellement

−L'Import se produit aux sites de contact entre les membranes interne et externe

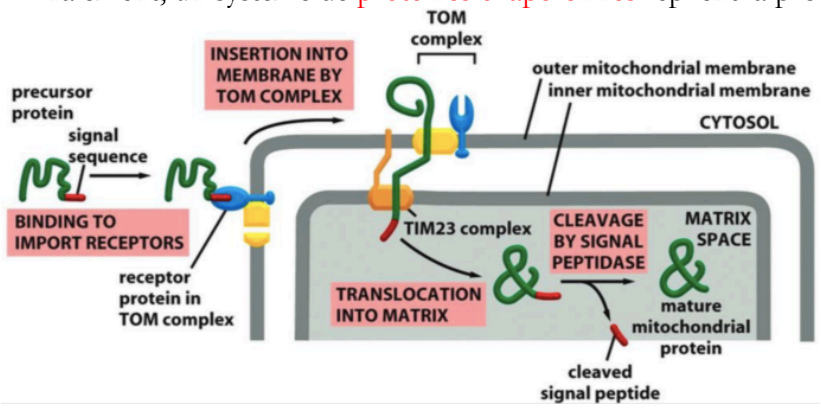
−Il y a une translocase pour la membrane externe et des translocases pour la membrane interne

−La translocation à travers les deux membranes est couplée

−La membrane externe possède des récepteurs de la séquence du signal

−Dans la matrice, une peptidase coupe le signal

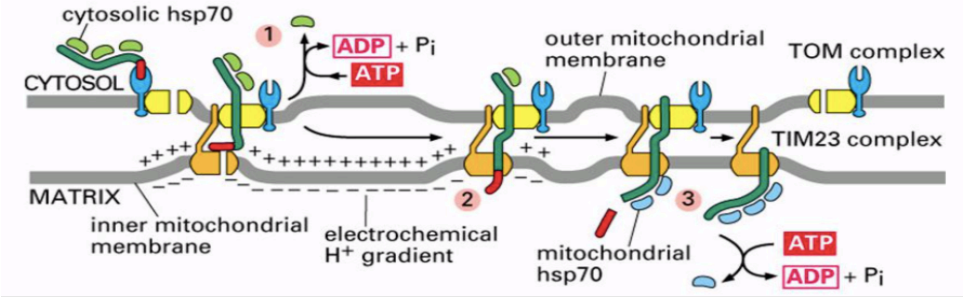
-Finalement, un système de protéines chaperonnes replient la protéine



4.d.3.Les forces conductrices de l'import des protéines mitochondriales: potentiel de membrane et ATP

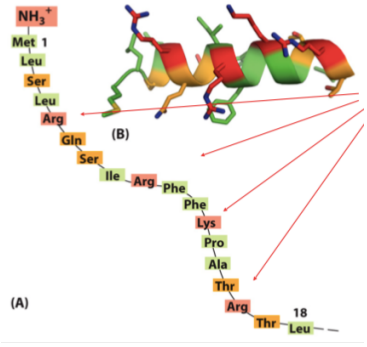
Trois étapes nécessitant de l'énergie sont requises pour importer des protéines dans la matrice:

- Relâchement de la protéine précurseur depuis les chaperones du cytoplasme (hsp70s, qui sont des ATPases)
- Translocation de la séquence signal positivement chargé à travers la membrane interne des mitochondries
- Capture de la chaine arrivant dans la matrice par le biais de chaperones ATP-dépendantes

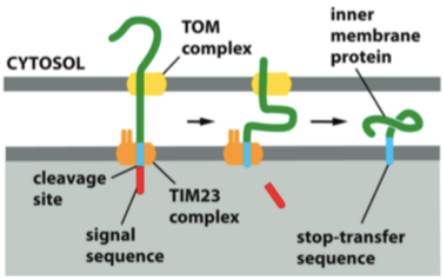


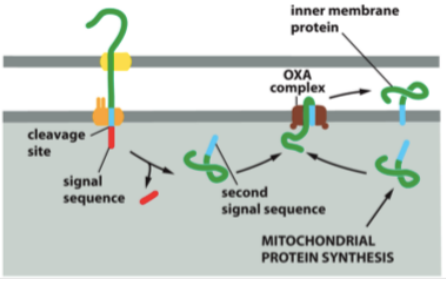
4.d.4.La séquence de signalisation ("présequence") pour import dans la matrice

- La séquence signal est composé de 20-30 acides aminés
- Elle contient de nombreux acides aminés positivement chargés, à chaque 3 ^{eme}- 4 ^{eme} position
- En formant une hélice-alpha, la séquences signal positionne ces charges du même coté
- Les charges positives de la séquence signal la rendent sensibles au potential électrique à travers la membrane interne et aident à sa translocation



4.d.5.Deux séquences signal sont nécessaires pour le tri à l'intérieur de la membrane interne





- Cette voie dirige vers l'import dans la matrice. Puis la protéine est intégrée dans la membrane interne depuis le côté matriciel. En termes d'evolution, c'est équivalent à l'export des bactéries
- La machinerie responsable de l'export (dont le complexe-Oxa est un élément) resemble aux translocases que les bactéries utilisent pour exporter des protéines dans l'espace périplasmique ou extra- cellulaire.
- Donc les pré-protéines destinées à la membrane interne ou à l'espace intermembranaire contiennent deux séquences de signalisation, l'une pour l'import, l'autre pour le ré-export ou pour l'arrêt de la translocation à travers la membrane interne ("stop- transfert")

Cellules - Membranes et trafic vésiculaire

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 14

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 15

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 16

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 16

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 18

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 19

Cellule et tissus - cellules - Membranes et trafic vesiculaire 20

Cellule et tissus - cellules - Membranes organelles et trafic vesiculaire 21
https://rumble.com/v7gynzk-cellule-et-tissus-cellules-membranes-organelles-et-trafic-vesiculaire-21.html

Cellule et tissus - cellules - Membranes organelles et trafic vesiculaire 22
https://rumble.com/v7gyo64-cellule-et-tissus-cellules-membranes-organelles-et-trafic-vesiculaire-22.html
Cellule et tissus - cellules - Membranes organelles et trafic vesiculaire 23