

Cours 2 : 10/02 :

Les éléments du cytosquelette

Microtubules : 24 nm.

Actine : 7 à 9 nm.

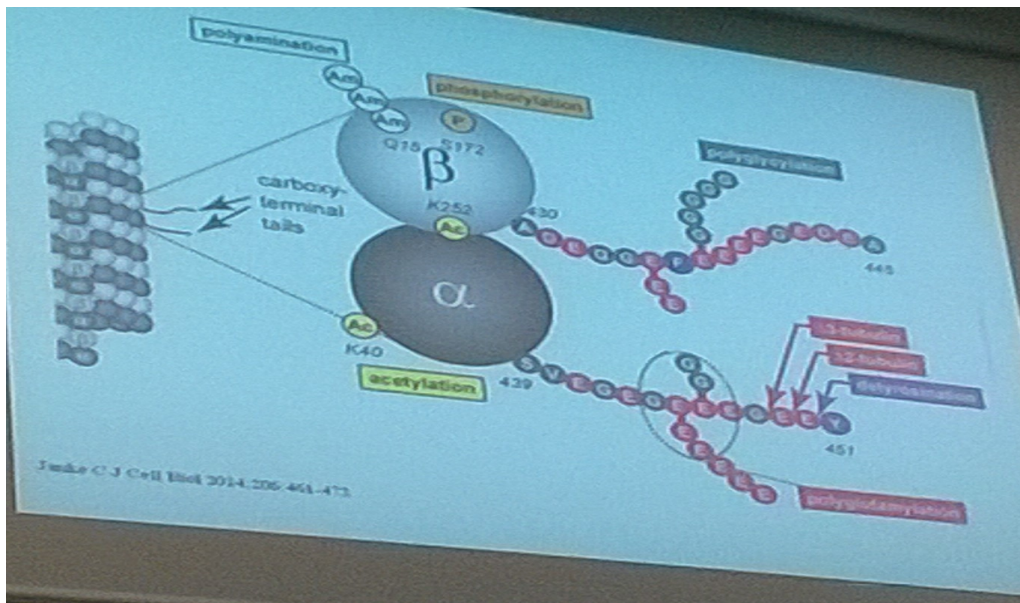
Filaments intermédiaires : 10 nm.

I – Microtubules

Dans les **microtubules**, on trouve une unité de base, la **tubuline**, c'est un hétérodimère alpha-bêta. Les tubulines alpha et bêta sont codées par plusieurs gènes. Sur le site **alpha**, on trouve sur le **site N** (non échangeable, non hydrolysable, à l'interface entre les deux dimères), de l'utilisation de GTP, et ainsi sur le **site E** (échangeable et hydrolysable) que l'on trouve sur le site **bêta**, donc le **GTP** est la source d'énergie pour la formation d'un filament de tubuline. La structure de ces tubulines est extrêmement conservée, forte pression de sélection. Les microtubules sont impliqués dans la division cellulaire. Ils sont essentiels pour le **maintien de cette structure**, la structure cellulaire. Les tubulines alpha et bêta sont deux **isoformes** (ce sont les différentes formes qu'une protéine prend lorsqu'elle est issue de gènes différents) hétérogénéité au niveau du **C-term**. La plupart des modifications post-traductionnelles agissent sur la tubuline phosphorylée. Ces modifications vont toucher soit l'**extrémité C-term** soit le **reste de la protéine**.

On peut observer des **phosphorylations**, des **acétylations** (Lysine en position 40 par exemple). Cela se passe à l'intérieur du microtubule. Ces modifications font intervenir des enzymes, par contre, elles ne modifient **pas** les **propriétés intrinsèques** des microtubules mais **modifient les propriétés des microtubules avec leur partenaire**. Sur les microtubules, on trouve une protéine motrice, qui s'appelle la **kinésine**. Elle peut se déplacer, en présence d'ATP sur les microtubules. La liaison avec la kinésine est facilitée grandement. (Je n'ai pas compris cette transition mais voilà... Désolée... En gros, il a parlé de la kinésine..)

On trouve aussi un acide aminé qui revient beaucoup sur l'extrémité C-term : les nombreux E qu'on observe sur la diapo, ce sont des **acides glutamiques**, entraînant une charge négative au niveau des extrémités C-term. Toute la zone largement chargée de manière négative → Beaucoup d'interaction avec des protéines positives.

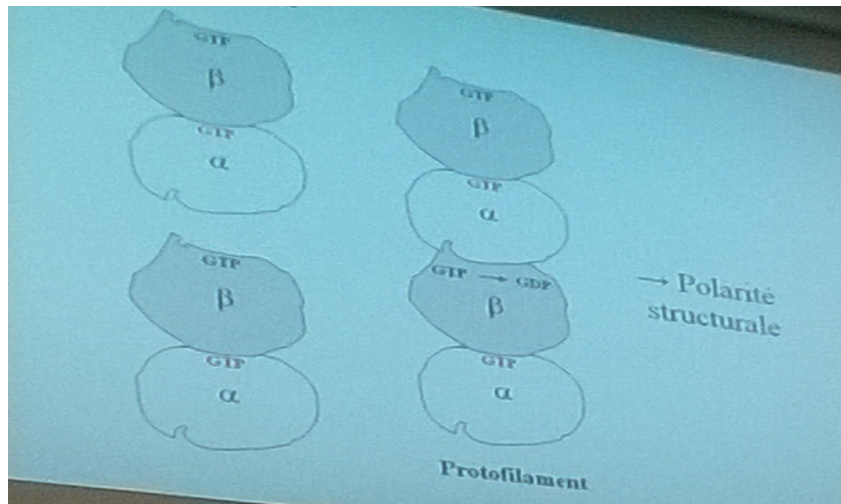


Il existe aussi d'autres isoformes de la tubuline, autre que la tubuline alpha et bêta :

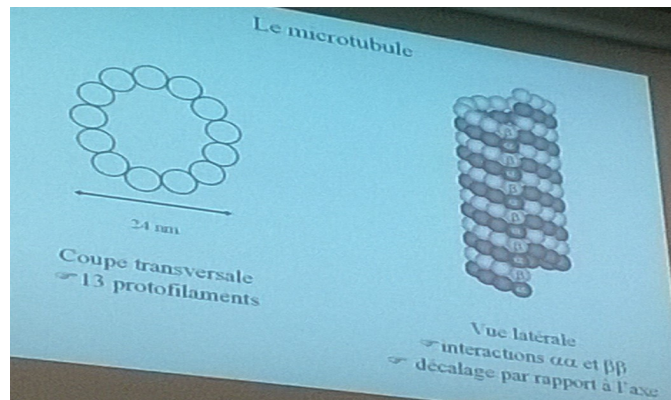
- **Gamma** → Biogenèse des microtubules.
- **Delta** → Corps basaux et Centrioles.
- **Êta** → Importance dans la duplication des corps basaux.
- Tubuline **È** et **Zeta**: Fonctions encore à explorer.

La **polymérisation** :

Lorsque l'on met des tubulines dans de bonnes conditions, T°, en présence de GTP, on va avoir une polymérisation des microtubules. Celle-ci se fait toujours dans le même sens, il s'agit d'un empilement de tubuline dans un sens précis. Cette empilement de tubuline donne naissance à un **protofilament** (colonne de tubulines). Si on fait la polymérisation toujours dans le même sens, cela va entraîner donc une polarité de la structure. Donc on trouve toujours, du haut vers le bas, une tubuline bêta, puis une tubuline alpha, puis une tubuline bêta, et ainsi de suite...

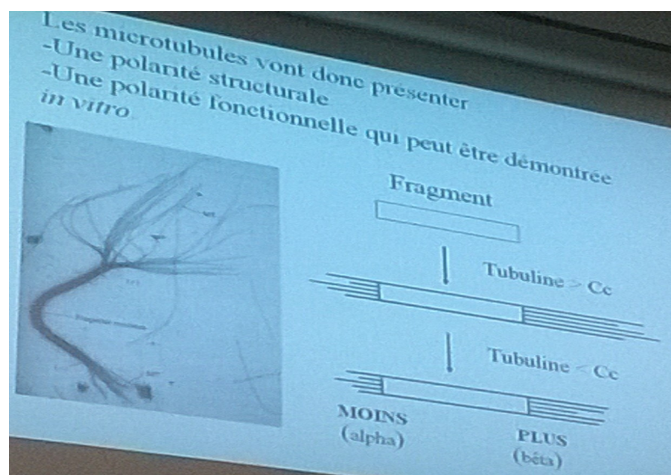


Si on effectue une coupe transversale : on observe un diamètre de **24 nm** et on trouve **13 protofilaments** formant un « cercle ». Au niveau de l'interaction entre les deux protofilaments qui vont fermer le microtubule, on trouve un décalage par rapport au plan du microtubules car il faut une interaction entre une **tubuline alpha** et une **tubuline bêta**, d'où l'existence de ce décalage.



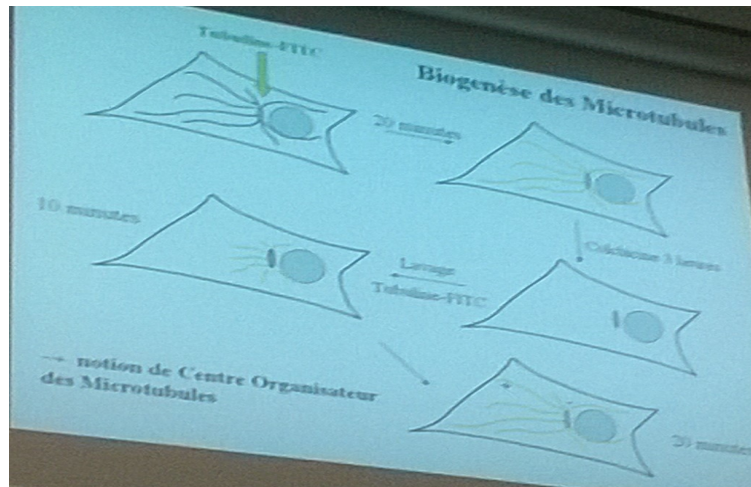
Les microtubules présentent donc :

- Polarité **structurale**.
- Polarité **fonctionnelle** qui peut être démontrée in vitro. On a pris un morceau de microtubule déjà constitué (flagelle), les scientifiques ont rajouté de la tubuline en concentration supérieur à la concentration critique. Ils ont observé que la polymérisation se fait aux deux extrémités. On va trouver une formation plus active de microtubules d'un côté que de l'autre. Ce côté a été baptisé le côté + par rapport au côté -. Le côté - correspond au côté alpha et le côté + au côté bêta.



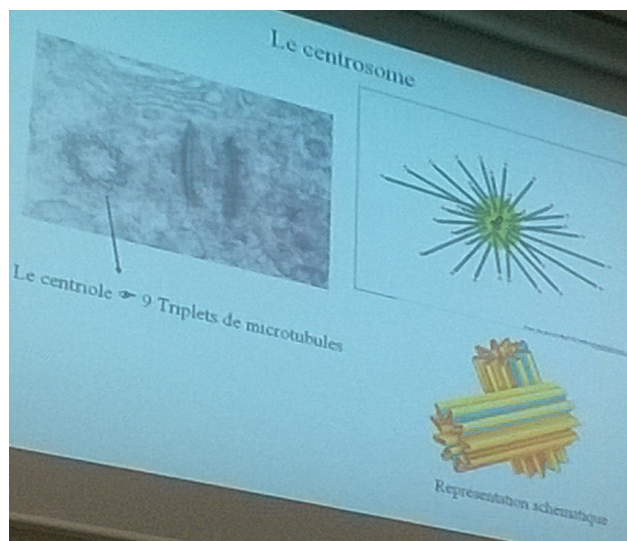
Biogenèse des microtubules :

°Pour observer la biogenèse des microtubules, on va incorporer un marqueur, appelé la **Tubuline FITC**. C'est un fluorescent que l'on excite dans le bleu et va se dévoiler dans le vert. Au bout de 20 min, on fixe les cellules et on observe la fluorescence. Si la tubuline s'est incorporé, on doit voir un marquage vert. Le travail consiste à trouver le marquage. On observe un réseau classique, réseau qui part du **centre organisateur des microtubules (COM)**, et qui s'étend vers la périphérie de la cellule. Cette expérience a permis de mettre en évidence la structure et le COM.



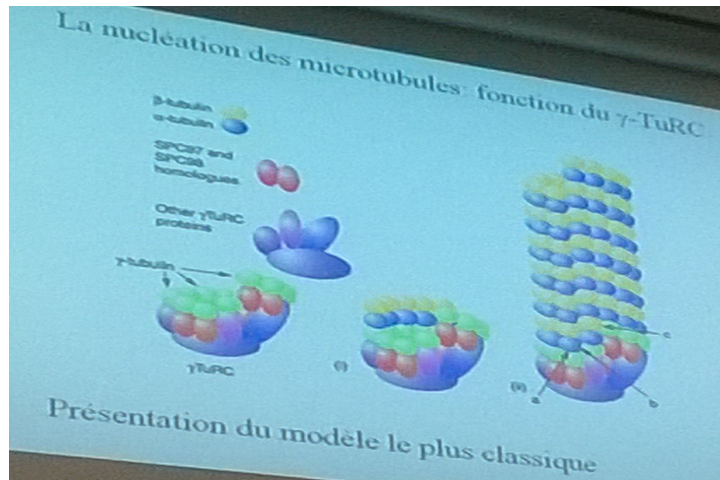
Les scientifiques ont traité la cellule par colchicine (outil permettant de travailler avec les microtubules, permettant la stabilisation ou la dépolymérisation des microtubules). Si on traite la cellule trois heures à la colchicine, on a complètement détruit et éliminé ce réseau. L'avantage de la colchicine : on peut laver et éliminer cette colchicine et on va pouvoir replacer en présence de tubuline la cellule, au lieu de fixer après 20 min, on fait cela au bout de 10 min, cette fois-ci. Après dix minutes, les microtubules semblent naître à partir du COM. Donc, la naissance des microtubules se fait à partir du COM. On a pu le mettre en évidence grâce à cette expérience.

Le **COM** c'est ce qu'on appelle aussi le **centrosome** (on réserve ce terme aux cellules de mammifères). La microscopie électronique, on trouve un peu à côté les **centrioles**. Les centrioles sont différents du centrosome. Ce sont des triplets de microtubules, on en trouve **9**. (Schéma masse verte) → On trouve les deux centrioles et autour, une masse pas très importantes, qu'on appelle la **masse périocentriolaire**. On trouve autour des deux centrioles, le **côté -** au niveau du COM, **ancré dans le centrosome** et le **côté +**, du côté des **microtubules**. La masse périocentriolaire comprend entre 200 et 250 protéines.



La nucléation des microtubules : la fonction du gamma-TuRC.

Si on se débarrasse de la gamma tubuline, on n'observe qu'il n'y a pas formation des microtubules. Donc le **gamma TuRC** (gamma tubuline read complex) sert de guide pour l'élaboration de l'**échafaudage de microtubules**. On les trouve beaucoup dans le cytoplasme. 80 % de ces structures dans cytoplasme. Elle permet d'acquérir une structure correcte.



Comportement dynamique des microtubules dans la cellule interphasique : On va introduire un certain nombre de protéines dans la cellule. Ce sont des expériences historiques ayant mis en évidence la dynamique des microtubules.

On fait l'injection de tubuline FITC à t=0.

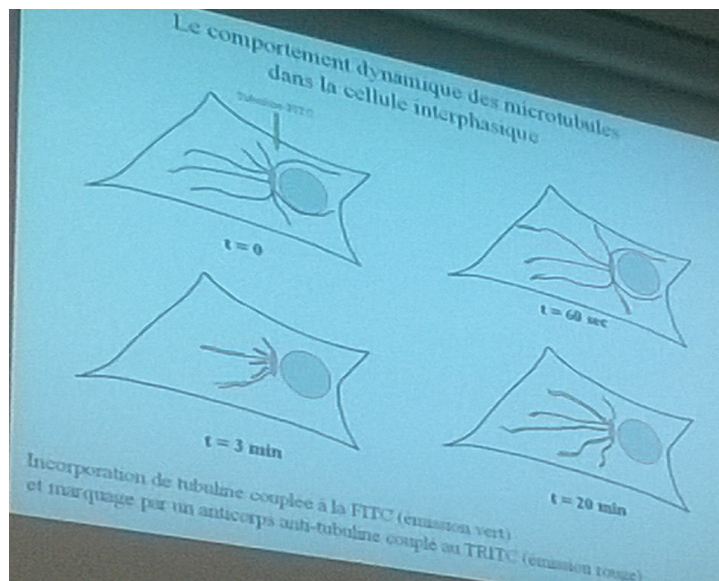
A 1min, ils vont fixer les cellules (traite à une formaldéhyde, toute la dynamique s'arrête ainsi). On arrête les cellules à des temps différents afin d'observer la fluorescence émise par la tubuline FITC pour voir la dynamique des microtubules. Au début, on ne trouve que quelques points verts. Ensuite ils ont marqué les cellules par des anticorps anti-tubuline → TRITC (excitation dans vert et émission dans rouge). Donc la tubuline incorporée va être reconnue par l'anticorps, donc cette tubuline va être verte et rouge (car fluorescence en vert mais on y a mis aussi du rouge par l'anticorps TRITC).

Au bout de 1 min, on voit que ce sont les extrémités qui sont marquées.

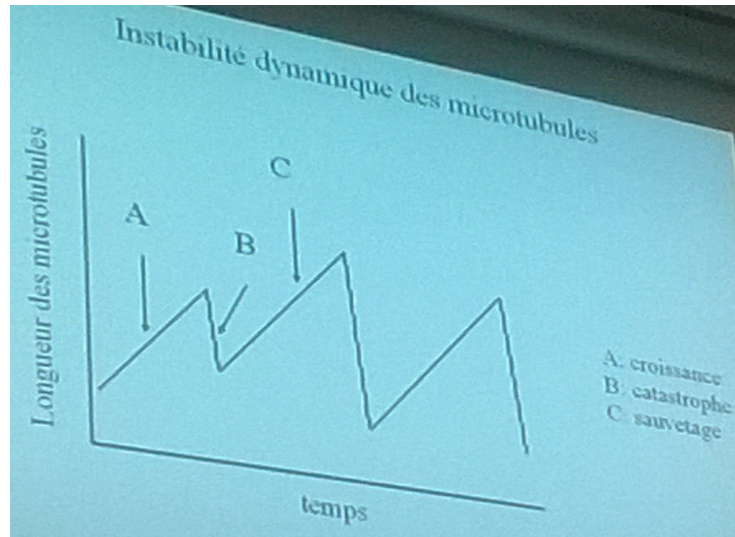
Au bout de 3 min, la tubulines FITC est presque partout.

Au bout de 20 min, tout le réseau est doublement marqué. On ne distingue plus la tubuline injectée, qui a été échangé au niveau de tout le réseau.

Cette expérience souligne le caractère dynamique extrêmement fort des microtubules, mais en travaillant à des temps beaucoup plus courts et par stratégie de double marquage, on a pu reconstituer le processus et le comportement dynamique des microtubules. On observe donc une **instabilité dynamique** des microtubules.



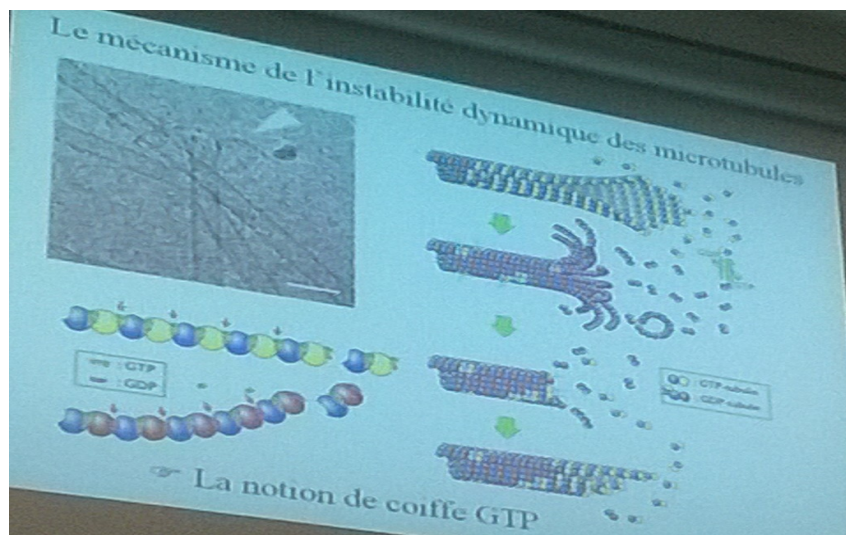
Ils ont postulé que les microtubules passaient par les phases suivantes (diapo), indépendamment les unes des autres. A ces phases de croissance vont succéder des **phases de dépolymérisation**. On parle phase de catastrophe. Le microtubule va s'écrouler jusqu'au centrosome. Il existe des mécanismes dans les cellules, qu'on appelle des **phases de sauvetage**. La dépolymérisation brutale (donc la **catastrophe**) peut être **totale**, suite à ce style de dépolymérisation, les microtubules s'effondrent jusqu'au centrosome, ou peut être **suivie par une phase de sauvetage**, c'est une caractéristique intrinsèque du microtubule mais dans la cellule, cela va être moduler par un ensemble d'interaction dans la cellule.



Le mécanisme de l'instabilité dynamique des microtubules :

C'est un mécanisme encore aujourd'hui controversé : Notion de **coiffe GTP**. Le dimère alpha bêta est capable de lier du GTP. Sur la tubuline bêta cela peut être **soit du GTP soit du GDP**.

- Quand on a une majorité de GTP au niveau bêta, dans la partie terminal du microtubule, alors celui-ci peut continuer à pousser. Au niveau du site bêta, on peut hydrolyser le site E. On va trouver très largement du GDP lorsqu'il y a hydrolystation mais dans la partie qui croît essentiellement du GTP. La présence de bêta GDP induit une **courbure**, ce qui explique la dépolymérisation du microtubule.



Régulation de ce mécanisme : (A partir de la, ça part en couilles, manque des parties, phrases pas entière etc... Désolée..)

Ce comportement est extrêmement régulé par un ensemble de partenaire. On va parler de protéines qui stabilisent les microtubules qui augmentent la croissance, s'opposent au catastrophe et on aura une autre partie de protéines capables de déstabiliser les microtubules.

On attaque avec les **protéines de stabilisation** : Les protéines **MAP**.

On trouve les MAP1A → 300 kDa, MAP1B → 255 kDa, MAP1S → Grosse protéines, chaînes lourdes que l'on trouve dans les neurones d'adultes. Les précurseurs sont polypeptidiques et vont subir un **clivage protéolytique** pour générer un **complexe avec une chaîne lourde et une chaîne légère**. Si ce sont des MAP, on doit pouvoir mettre des sites de liaison aux microtubules mais aussi des sites de liaison à l'actine. Il y a de nombreuses interaction entre les différents éléments du cytosquelette.

On trouve aussi les MAP de type II :

Beaucoup de protéines caractéristiques des dendrites et des axones :

- MAP 2A → 280 kDa.
- MAP4 → 210 kDa.
- Tau → 55-62 kDa.

On a une partie avec un site de liaison pour les microtubules et on a la partie qui fait saillie dans le cytoplasme. Certains scientifiques ont surexprimé **MAP 2** et on a vu des pontages plus important. On a forcé le système par **surexpression**. Donc MAP 2 induit les pontages.

La protéine **Tau** permet d'augmenter la croissance des microtubules, réduire les catastrophes. Cette protéine s'oppose à l'action de promoteurs de catastrophes ou de protéines de fragmentation. Elle aussi fait du pontage. Elle va s'opposer à l'action d'autres protéines, qui sont des promoteurs de catastrophes. On l'étudie pour lutter contre Alzheimer.

On a aussi les **MAP6** ou **STOP protein** (Stable Tubule Only Polypeptide) confèrent une grande stabilité aux microtubules (système nerveux).

Les MAPs sont contrôlés par la phosphorylation (MAP kinase, cdc2 kinase, MARKS...). La **phosphorylation** induit le **détachement** des microtubules. Donc on trouve un microtubule très déstabilisés. La protéine Tau est impliquée dans la neurodégénérescence. Dans ce genre de maladie, la protéine Tau est **hyperphosphorylée**, donc moins attachée aux microtubules, donc il y a une diminution de la stabilité des microtubules. C'est un cas d'étude fondamental, mais aussi un cas concret dans certaines pathologies, etc...

La régulation du comportement dynamique des microtubules se fait via des protéines de stabilisation : la famille des **protéines + TIPS**. Il s'agit d'une famille de protéines ne **pouvant aller qu'a la partie +**. Mais on y trouve aussi des protéines de déstabilisation, qui vont entraîner des catastrophes. Ce sont donc des protéines capable d'aller directement à l'**extrémité + des microtubules**.

On trouve de nombreuses interactions potentielles entre ces différentes protéines. Il y a beaucoup de mécanismes qui sont étudiés soit in vitro, soit in vivo. Donc on ne sait pas vraiment si ce que font ces protéines in vitro, c'est exactement la même action in vivo.

Les **TIPS** ont d'autres fonctions dans la cellule, *par exemple, la liaison entre les microtubules et le cortex cellulaire. On a aussi la liaison avec le réticulum endoplasmique, ou avec le filament d'actine ou encore connexion avec certaines vésicules.*

Donc les **TIPS** permettent un **trafic intracellulaire via les microtubules**. Il existe aussi des protéines à l'extrémité -.

On trouve la gamma tubuline dans les cellules classiques (**interphasique**), on trouve les microtubules ancrés au niveau du centrosome.

L'**extrémité -** est très stable. Les autres cellules dans lesquelles on trouve des **microtubules non ancrés** dans le centrosome.

Est ce que les extrémités sont stabilisées ou pas si les microtubules ne sont pas ancrés dans le centrosome ?

On trouve les **gamma tubuline** ou encore les **CAMSAPS** qui sont impliqués dans la stabilisation des extrémités - des microtubules en dehors du centrosome. *Par exemple dans les neurones ou encore dans certaines cellules polarisées.* Par contre, il s'agit encore de notions récentes, encore en recherche.

On trouve une protéine notable : **Nezha** → Protéine la plus étudiée.

La **déstabilisation des microtubules** fonctionnent avec des protéines qui, au lieu d'augmenter la croissance des microtubules et de diminuer la catastrophe, celles-ci vont faire augmenter l'instabilité des microtubules. On parle de **promoteurs de catastrophe**.

On trouve les **kinésines** (MAP motrice), ce sont des **ATPases** responsable de fonction dans la cellule. La **kinésine 13** est un **promoteur de catastrophe**. La kinésine est associée au centrosome du microtubule.

Mécanisme : Séquestration de la tubuline, indépendant de l'ATP, ce qui est curieux car il s'agit d'une protéine motrice, donc normalement, elle a besoin d'ATP mais dans le cas de la séquestration de la tubule, il n'y en a pas besoin. On réduit ainsi la concentration de tubuline au niveau des extrémités + jusqu'à passer en dessous de la concentration critique pour entraîner une **dépolymérisation des microtubules**. La déstabilisation de l'extrémité + se fait via la kinésine qui va directement à l'extrémité + et fait bouger les interactions latérales entre protofilament. La protéine **MCAK** est une TIPS +, elle porte un autre nom : **catastrophine**. Celle-ci interagit avec un dimère de protéine EB alors que EB stabilise les microtubules. Donc en gros, une protéine qui par elle-même favorise la croissance des microtubules, ici on observe le recrutement d'une protéine déstabilisant le microtubule. La protéine EB **in vitro**, on va voir un rôle positif sur la croissance, tandis qu'**in vivo**, la protéine EB en fonction du partenaire, stabilise ou déstabilise les microtubules. Il faut donc toujours faire attention au modèle dans lequel on travaille.

Autre famille importante : **Stathmines** → Complexe crystallisé, il s'agit de protéines de séquestration. Comme pour la kinésine, bien démontré, on met en évidence une partie de la protéine. On observe un **hélice alpha** qui est en interaction avec deux tubulines. L'action de la **stathmine**, qui est indirect, va séquestrer les dimères de la tubuline, qui ne sont **plus disponible pour la polymérisation** au niveau des extrémités + pour le microtubule, donc cela va entraîner une concentration critique et ainsi la dépolymérisation.

Par spectrophotométrie, on met les microtubules dépolymérisés, et quand on met des protéines déstabilisante, la mesure de DO va baisser. Donc on voit l'**action de catastrophe**. La **stathmine** a donc l'action de déstabilisation direct. Très intéressante, très étudié dans le cancer, car très exprimé et active dans les cellules prolifératives, très contrôlées par la phosphorylation.

Dans la cellule, on a besoin souvent de seconds messages pour contrôler l'**activité de ces kinases** et donc l'**activité de la stathmine**.

Pendant la **mitose**, la stathmine est inactive par contre, celle-ci est active pendant **interphase** dans les cellules à forte capacité de prolifération.

La protéine découpante ou severing proteins fait partie de la **superfamille des AAA** (ATPases Associées à des Activités cellulaires). On trouve la katanine, purifiée il y a une 20aine d'année, on met des microtubules et on y rajoute de la katanine. On voit la fragmentation des microtubules, **pas de protéolyse**. C'est une protéine **oligomérique**, c'est à dire que c'est un polymère constitué d'un nombre limité de sous-unité moléculaire. On observe une **sous unité p80**, qui a pour fonction l'adressage de la protéine dans deux grands modèles, au niveau du centrosome et du centromère (centromère, puisque microtubules intervient dans la mitose).

On prend une protéine X, on fait une protéine chimérique et on envoie protéine X au centrosome ou au centromère. Ceci est la démonstration que p80 organise le complexe (je crois que c'est pas complet xD). Sans la **sous unité p60** (2eme s-u), on ne trouve pas d'activité découpante : l'activité **ATPasique** est nécessaire pour fragmenter les microtubules.

Mécanisme : la collaboration avec moteur (C'est pas faux!), préférence pour certains isotypes beta, et préférence pour tubulines modifiées.

La libération des microtubules au niveau du centrosome se passe quand on passe en mitose, il faut défaire ce réseau pour pouvoir séparer les deux cellules filles. Au niveau du **centromère**, en **Anaphase** : montée des chromosomes, qui vont monter vers les pôles. Ce sont des mécanismes complexes donc la katanine aide le tout.

Regardons à présent quelques composés **affectant la structure** des microtubules :

- **Colchicine** : se lie à tubuline et inhibe polymérisation. Composé apparenté : la colcémide.
- **Vinblastine** : se lie à tubuline et inhibe polymérisation. Composé apparenté : vincristine.
- **Nocodazol** se lie à tubuline et inhibe polymérisation.
- Agent de stabilisation des microtubules : **Taxol**. Utilisé comme anti-mitotique, sous le nom paclitaxel. Utilisation pour traitement anticancéreux.

Quelques grandes fonctions des microtubules : Battement ciliaire et flagellaire.

- Implication dans les transports intracellulaires et le maintien de la compartimentation intracellulaire.
- Implication lors de la division cellulaire (mise en place du fuseau mitotique, séparation des K...)

Ces fonctions ont besoin de **moteurs moléculaires** (ATPase un site de liaison d'hydrolyse d'ATP, toujours un site de liaison aux microtubules, l'hydrolyse d'ATP couplée à un travail, qui peut être un battement ciliaire, des transports vésiculaires, etc...) **associés aux microtubules** ou **MAPS motrices** :

- **Dynéines**
- **Kinésines**

Les mouvements de cils et flagelles :

- Les **cils** engendrent un mouvement de liquide parallèle à leur surface d'implantation.
- Les **flagelles** provoquent un mouvement perpendiculaire à celle-ci, induisant le déplacement de cellule.

On trouve beaucoup de cils dans les épithéliums respiratoire, ou encore dans les trompes de Fallope. Dans la moule, on a des liaisons, des ancrages cytoplasmiques, permettant aux branchies de battre de manières coordonnées.

Exemple du cil de Paramecie : on trouve une structure microtubulaire très complexe. Au minimum **650 protéines** différentes construisant ce système la. On trouve le **corpuscule basale** : équivalent d'un centriole à la base du flagelle ou du cil. 9 triplets périphériques reliés à la gaine centrale par des ponts. Et quand on monte dans la structure : zone de transition où on peut casser cil ou flagelle et on a des doublets périphériques pour relier à la structure centrale. Et on a l'**axonème**, la partie distale correspondant aux extrémités + du microtubule, **9 doublets périphériques reliés au doublet centrale**.