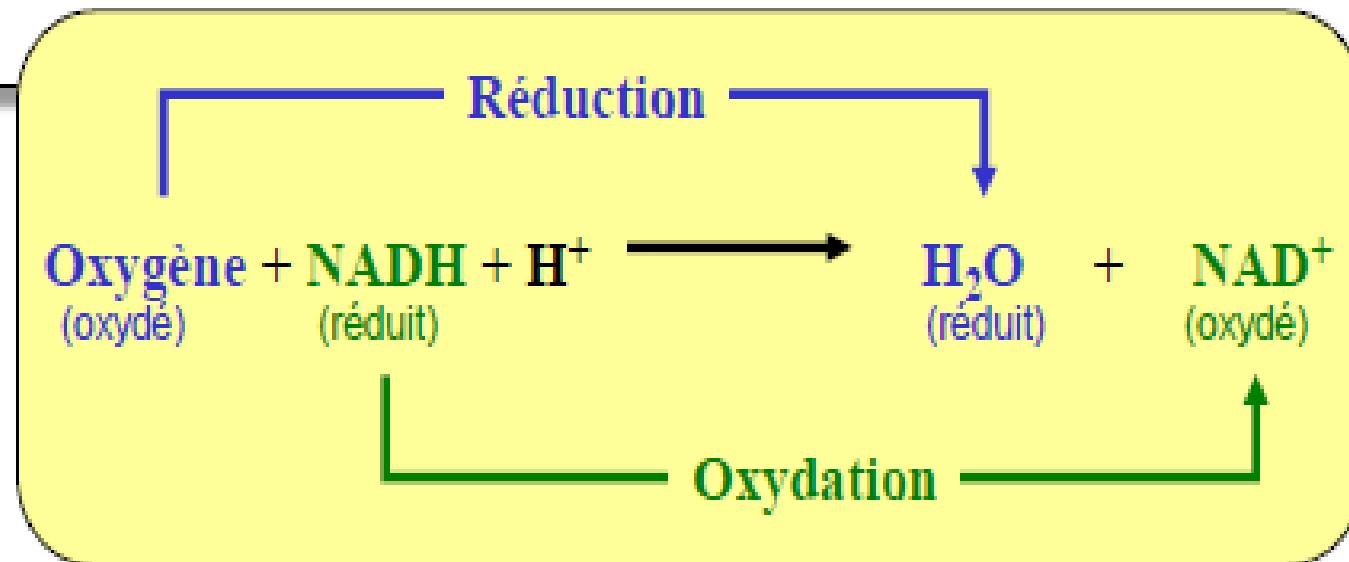
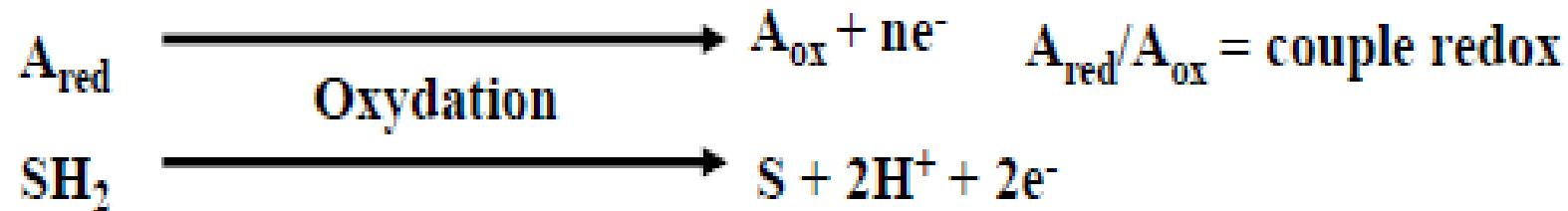


L'oxydation

Définition

L'oxydation est une réaction chimique **d'oxydo-réduction**, au cours de laquelle des électrons sont transférés d'une substance vers un élément oxydant.

Oxydation : réactions mettant en jeu des protons (H^+) et des électrons (e^-)



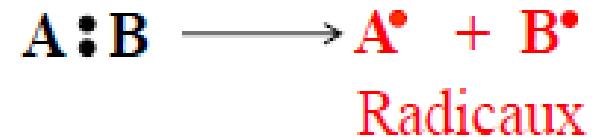
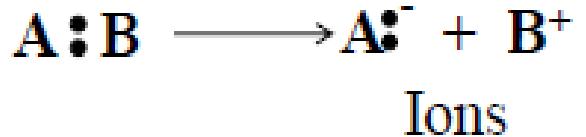
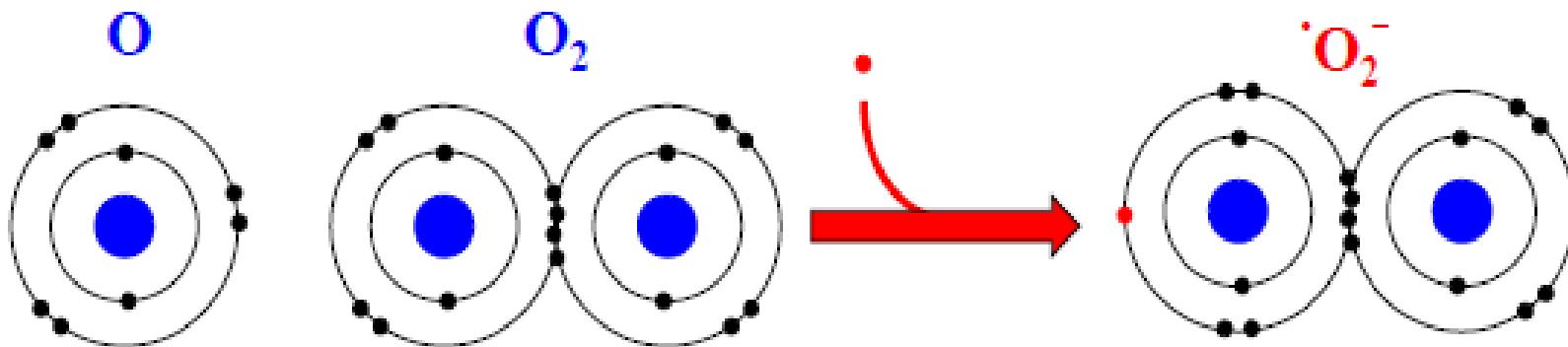
- ❖ Ce type de réaction peut produire **des radicaux libres**. Ces radicaux libres sont des agents chimiques (oxygène, monoxyde d'azote, ...) qui peuvent entraîner des **réactions en chaîne**, pouvant mener jusqu'à la mort des cellules.
- ❖ Ces éléments, vont attaquer les cellules, l'ADN, certaines molécules, **les protéines** ou les acides gras, pour les dégrader, les découper ou les détruire.

I. ROS & Stress Oxydant

Définitions

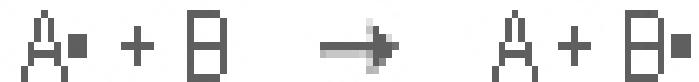
Stabilité chimique : Organisation de la couche électronique externe → électrons appariés 2 à 2

Radical libre : Au moins un électron non apparié sur la couche externe → très réactif.



- ❖ Les radicaux libres jouent le rôle d'oxydant car ils gagnent un ou plusieurs électron(s). Ces autres molécules jouent le rôle de réducteur, ils perdent un ou plusieurs électron(s) sur leur couche externe.
- ❖ Cependant, une fois que la réaction décrite ci-dessus a lieu, les molécules, à l'origine stables, se transforment à leur tour en radicaux libres. Ainsi pour redevenir stables, elles captent un électron présent dans leur entourage : c'est le début d'une réaction en chaîne.

Pour simplifier, voici l'équation de la réaction :



Remarques :

A \bullet : le radical libre

B : la molécule attaquée

A : le radical libre est devenu stable

B \bullet : la molécule attaquée est devenue un radical libre

• : signifie que la couche externe comporte un ou plusieurs électron(s) non appareillé(s)

Les formes réactives de l'oxygène : (ROS)

REACTIVE OXYGEN SPECIES

l'oxygène singulet $\bullet\text{O-O}\bullet$;

l'anion superoxyde $\text{O}_2\bullet^-$;

le radical hydroxyle $\text{HO}\bullet$;

le radical hydroperoxyde HO_2 ;

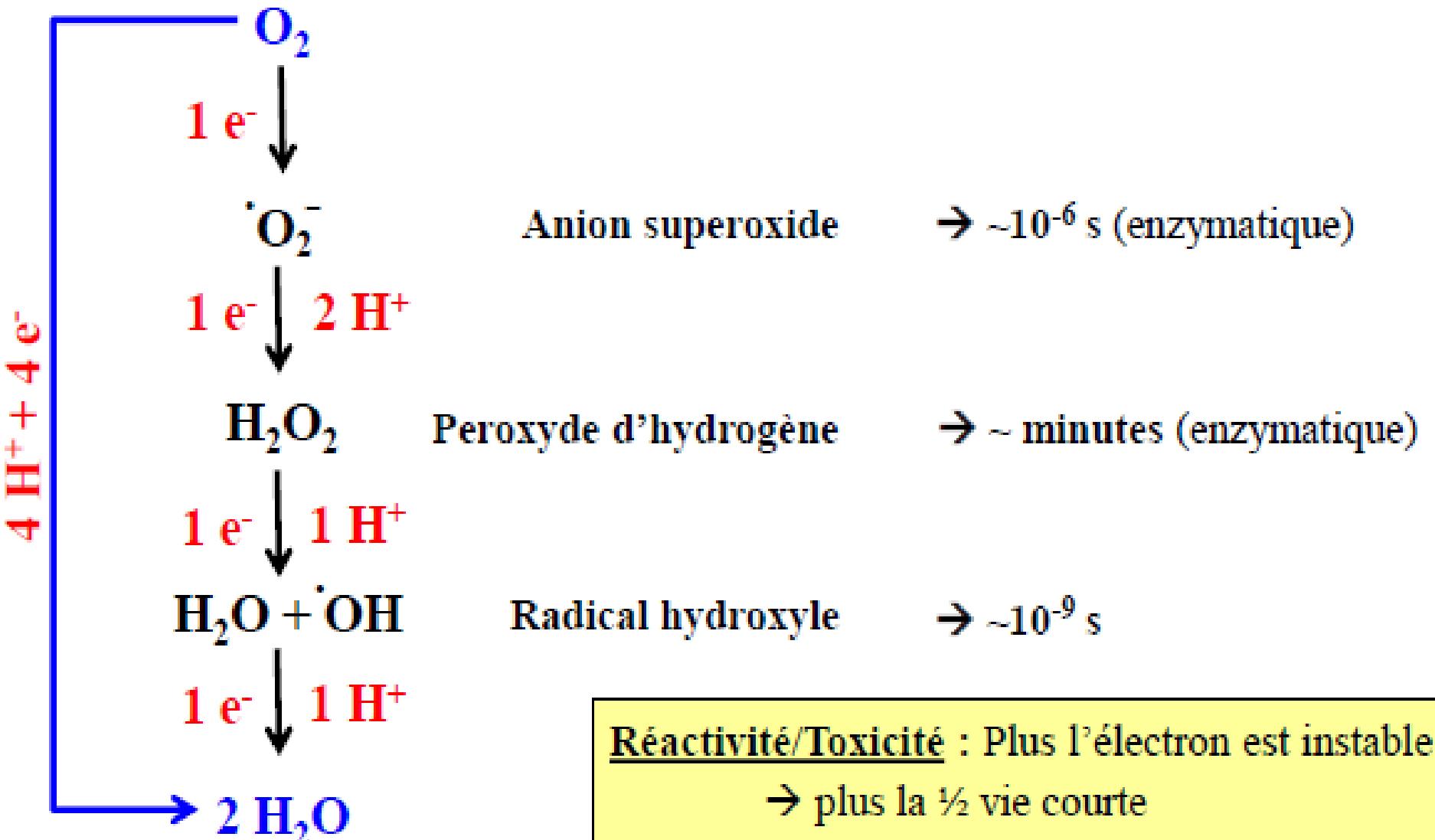
les radicaux peroxyde ($\text{ROO}\bullet$), radical alkoxyde
($\text{RO}\bullet$) où R est une chaîne carbonée.

Les radicaux dérivant d'un acide gras insaturé.

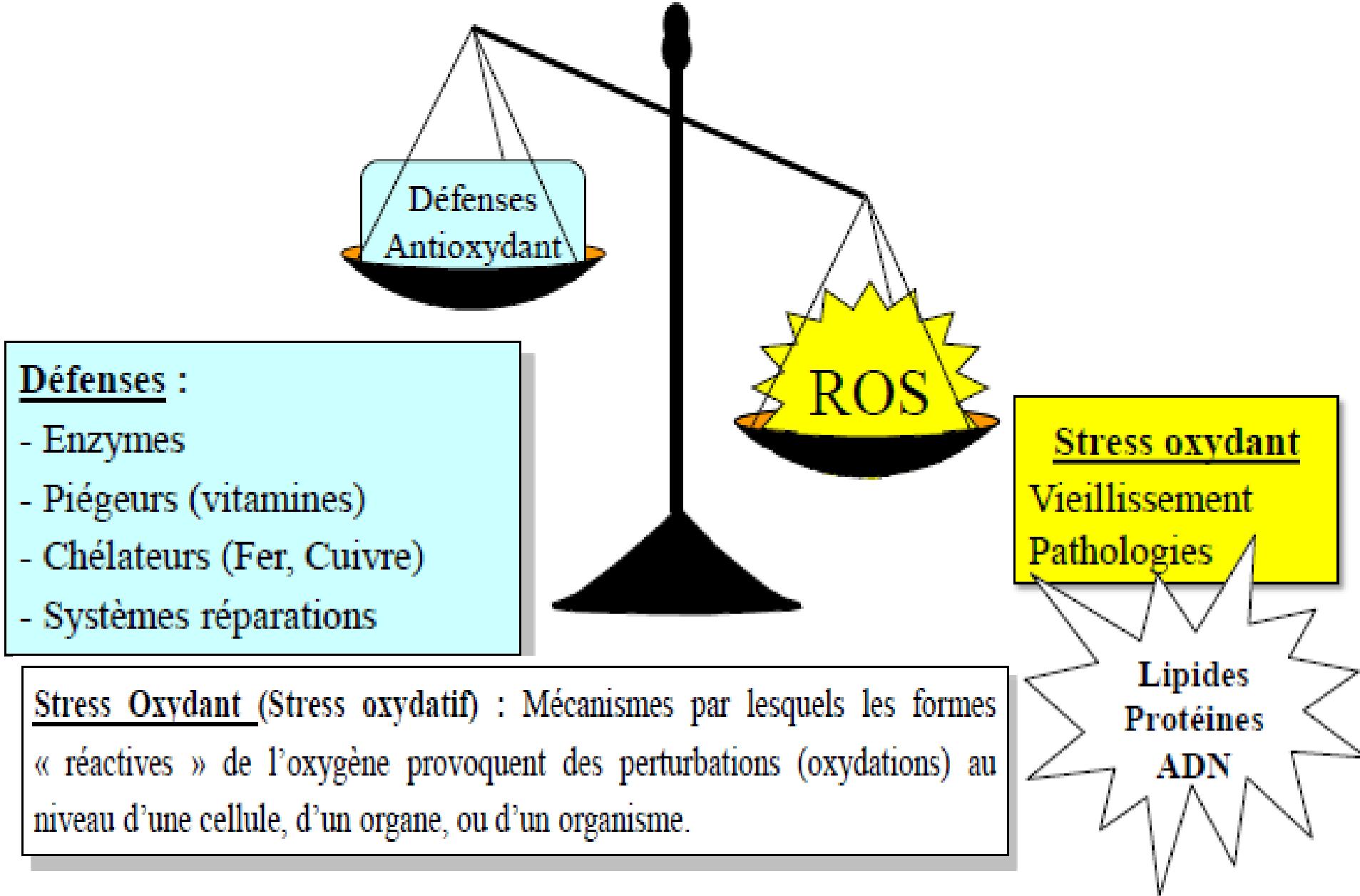
Le peroxynitrite $\text{ONOO}\bullet$.

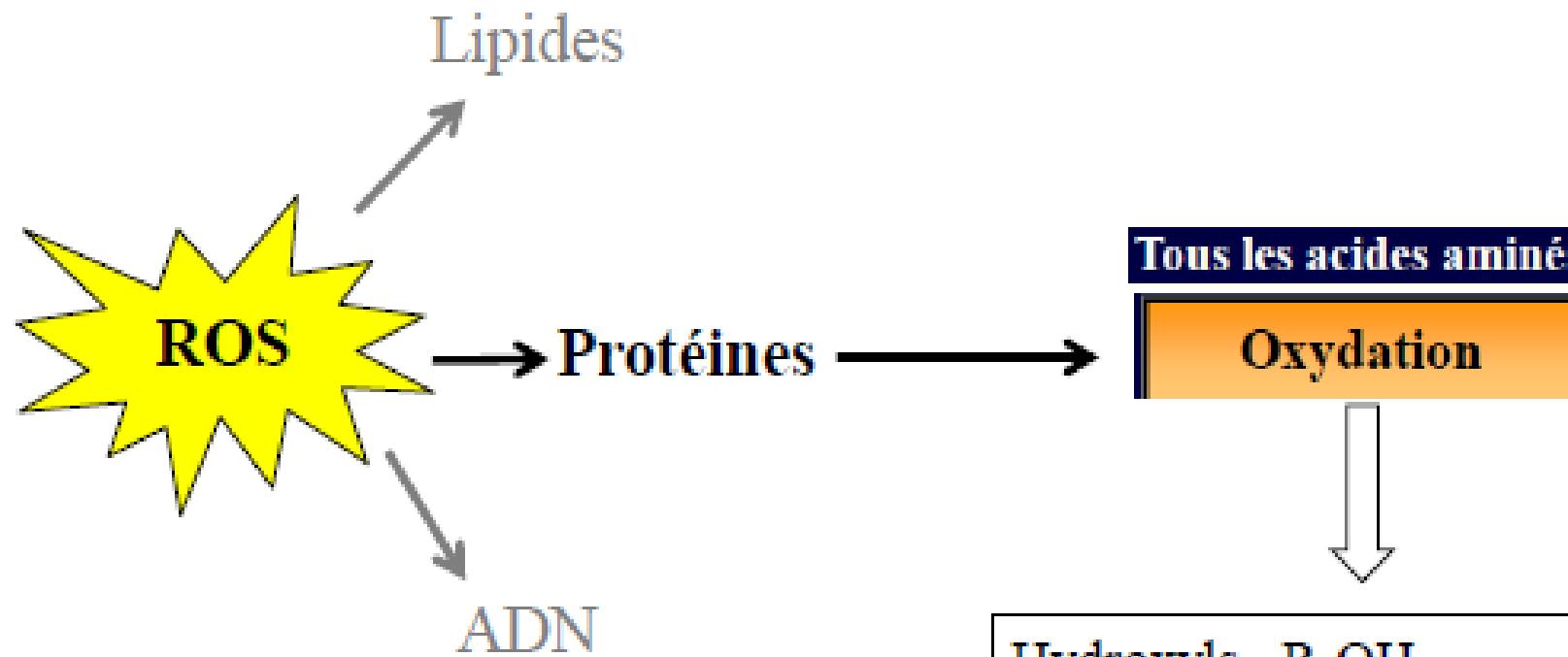
Le monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$.

« Reactive Oxygen Species »



Balance oxydative & Stress oxydant



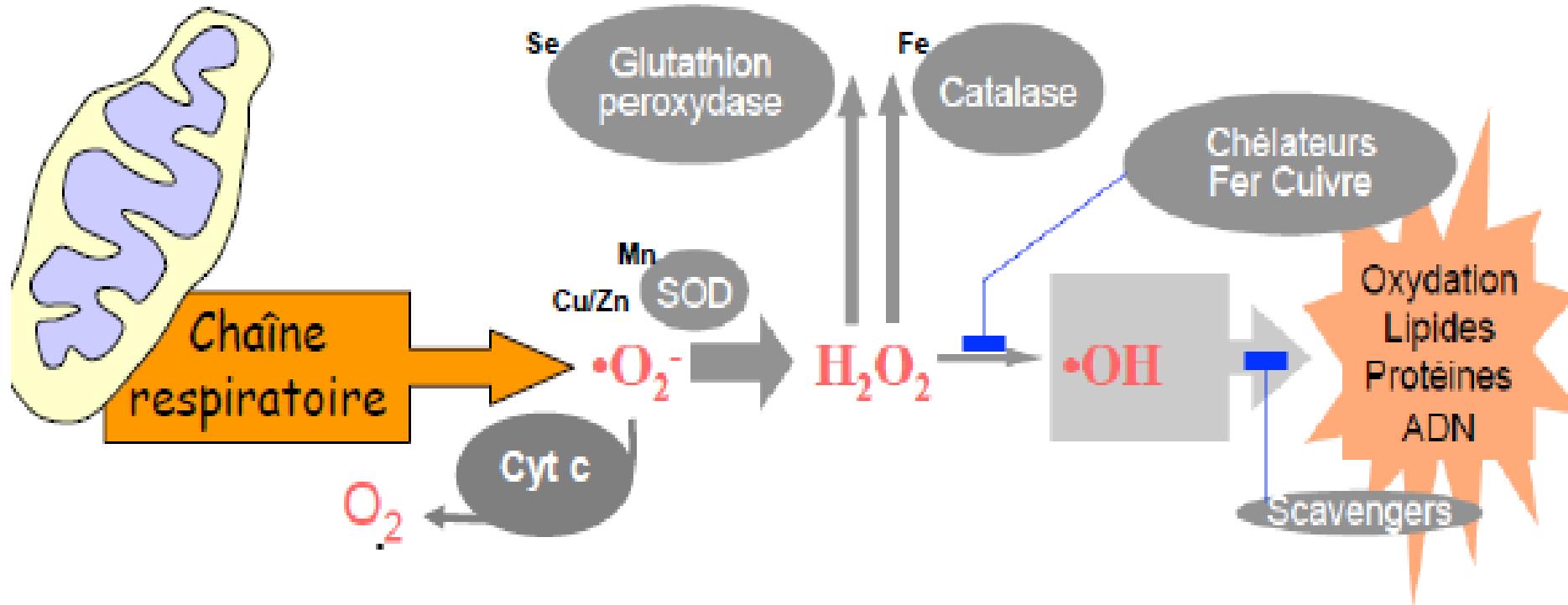


Hydroxyls	$R-OH$
Carbonyls	$R-C(=O)H$
Disulfide	cys-S-S-cys
Méthionine sulfoxide	Met=O

Anomalies fonctionnelles :

- Dégradation (protéasome)
- Inhibition d'activité enzymatique

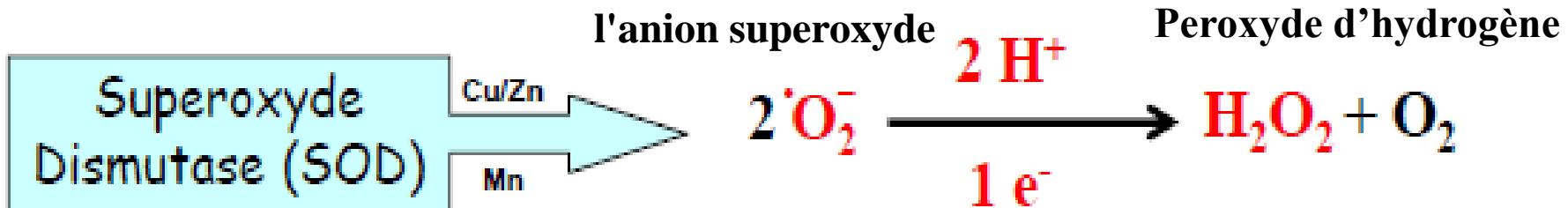
Défenses



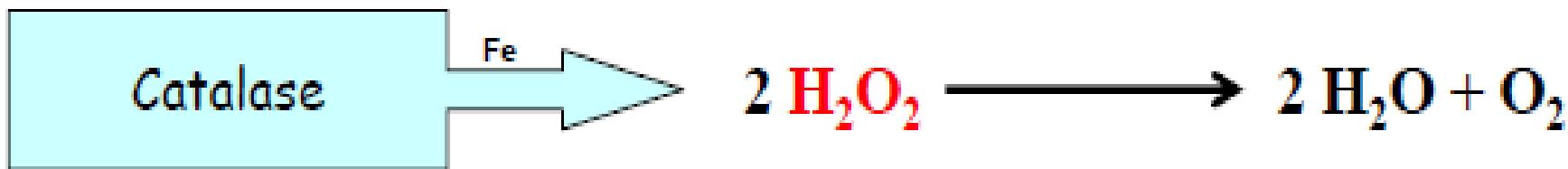
Défenses :

- Enzymes → Superoxyde dismutase – glutathion peroxydase - catalase
- Piégeurs → Vitamines E & C – Caroténoïdes – Cytochrome c
- Chélateurs des métaux → Fer - Cuivre

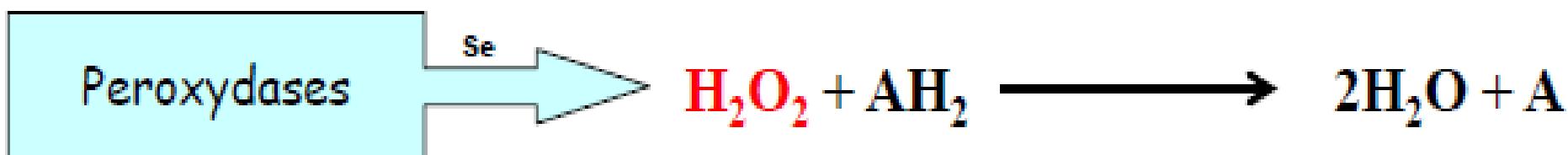
Défenses - Enzymatiques



Localisée dans la mitochondrie, le cytosol et extracellulaire

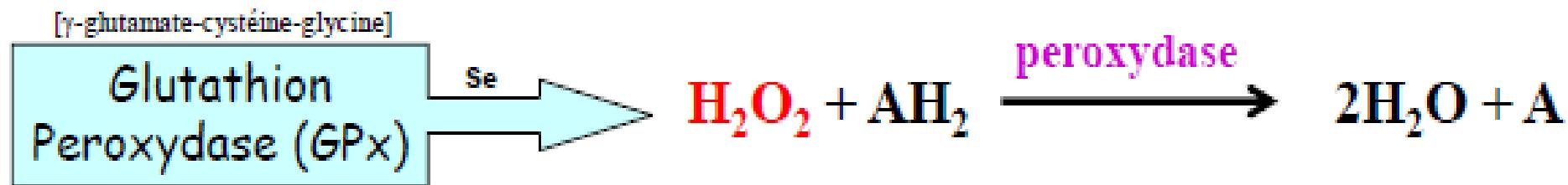


Principalement localisée dans le peroxysome

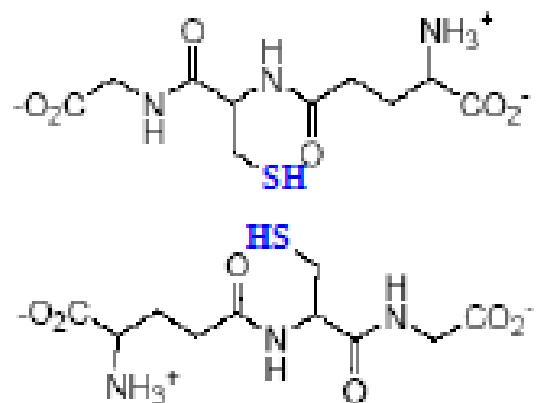


Localisée dans la mitochondrie, le cytosol et extracellulaire
(le glutathion et la thioredoxine → principaux donneurs d'électrons)

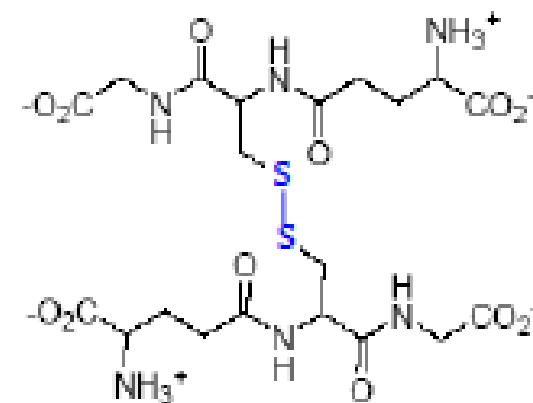
Défenses - Enzymatiques



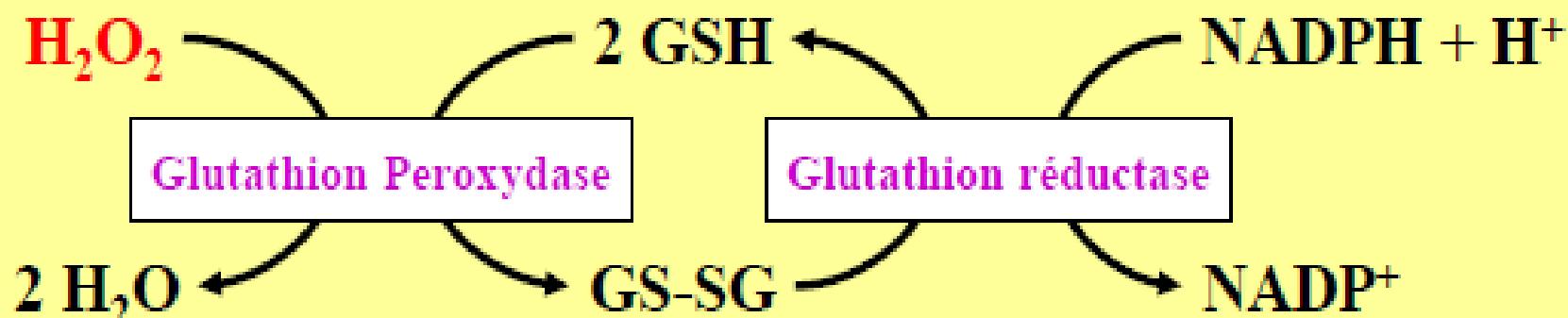
2 A-SH = Glutathion réduit



A = Glutathion oxydé



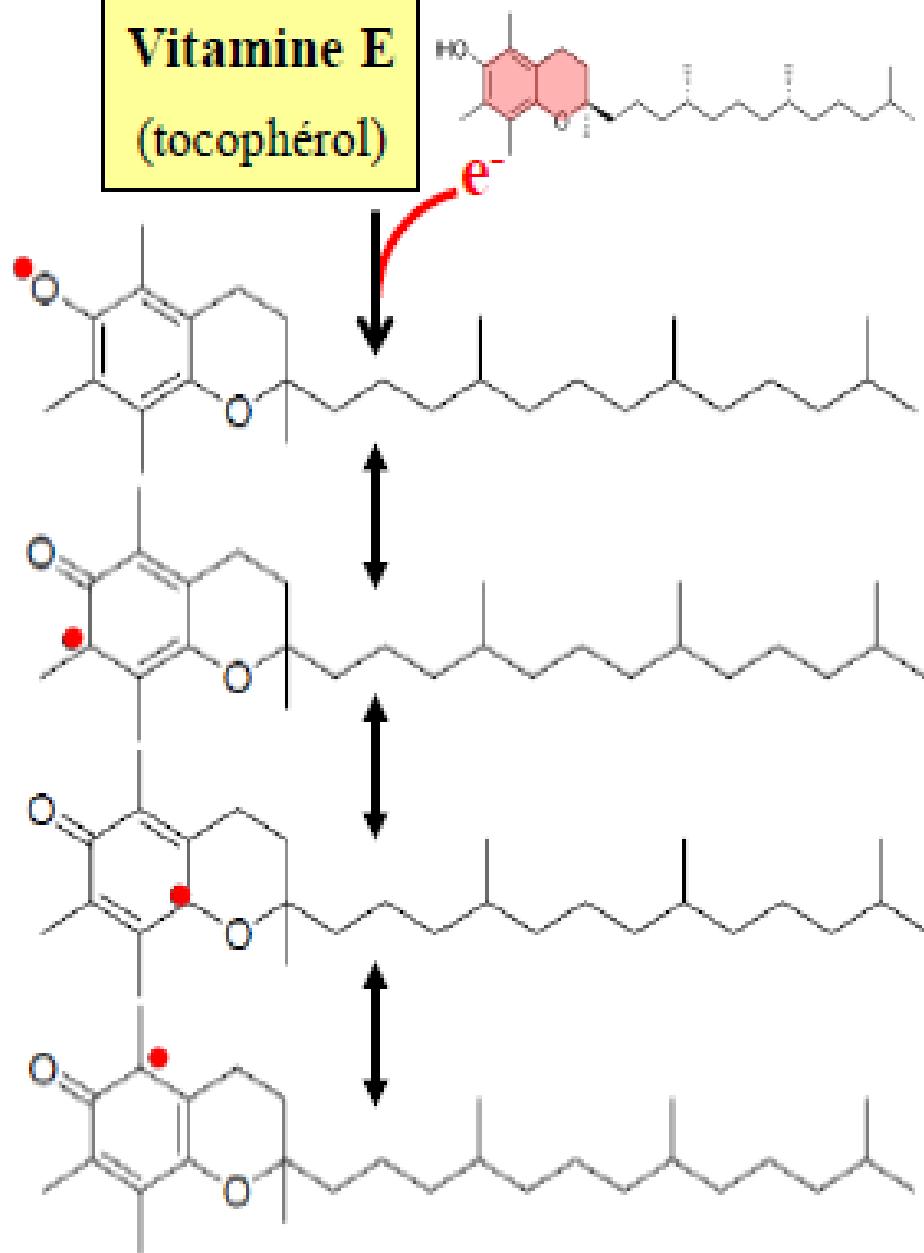
peroxydase
réductase



Défenses – Non-enzymatiques

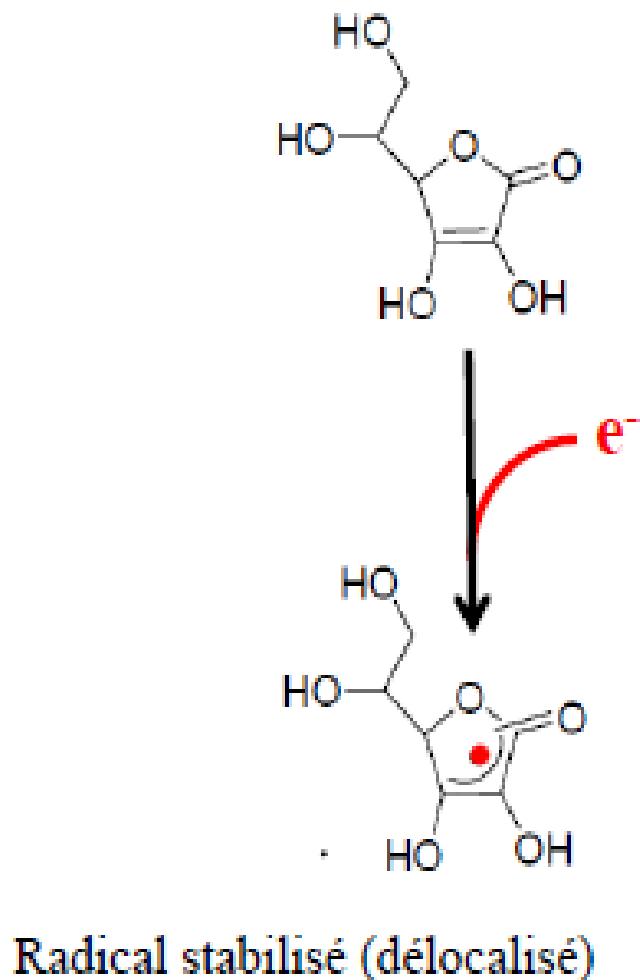
Liposoluble

Vitamine E
(tocophérol)



Hydrosoluble

Vitamine C
(acide ascorbique)



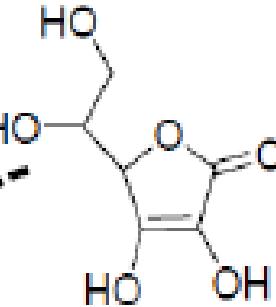
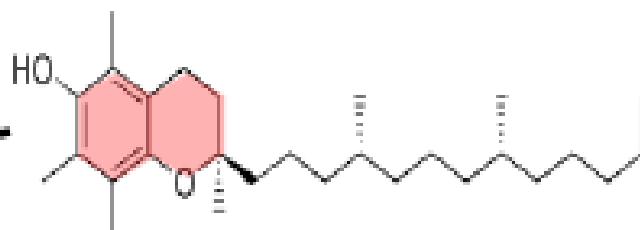
Radical stabilisé (délocalisé)

Vitamine E
(tocophérol)

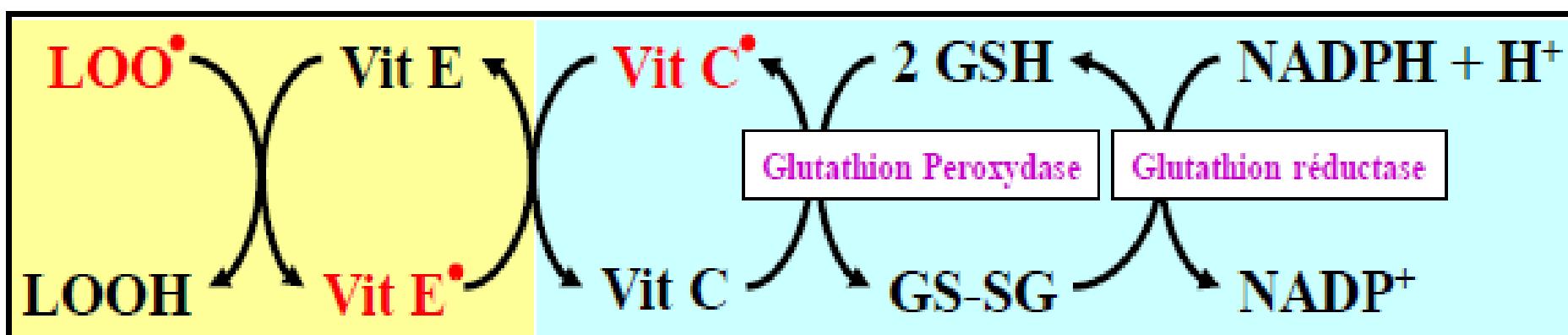
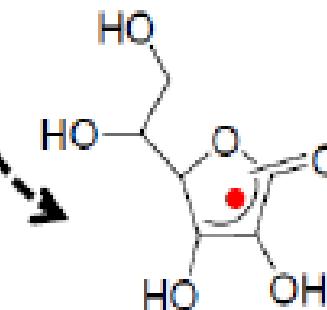
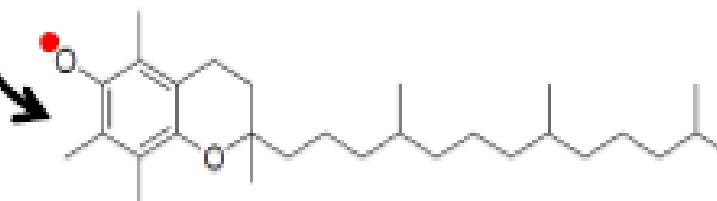
Défenses – Non-enzymatiques

Bloque la peroxydation lipidique

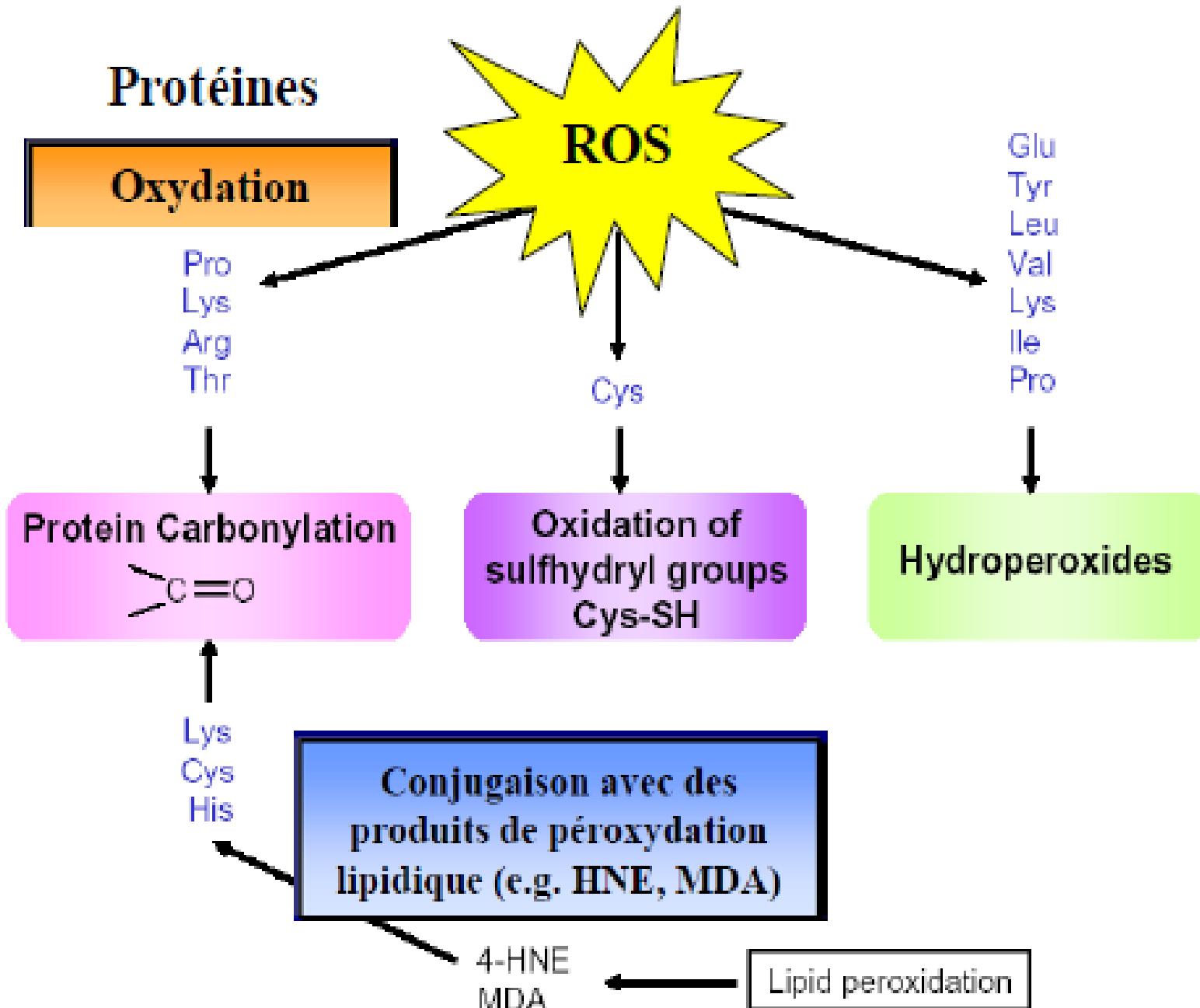
e^-



Vitamine C



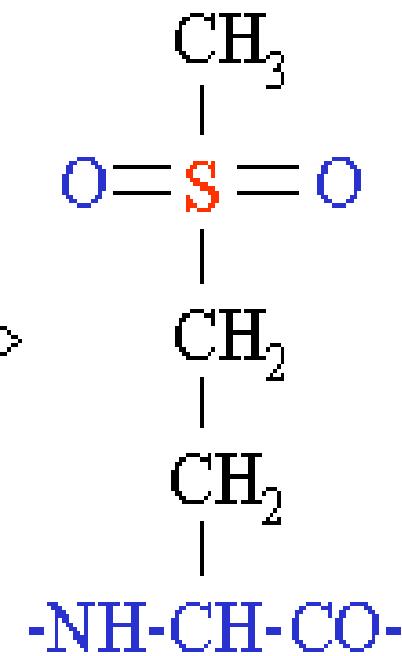
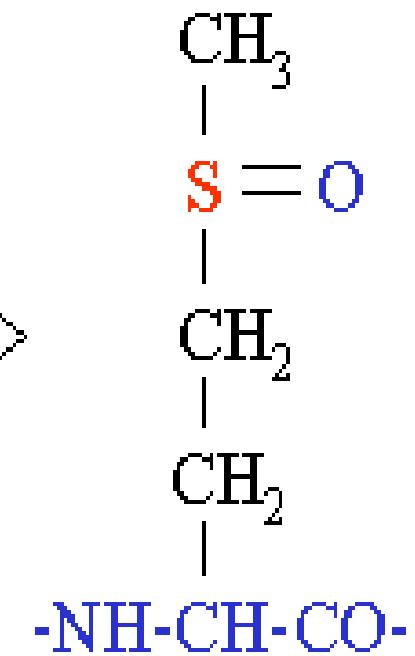
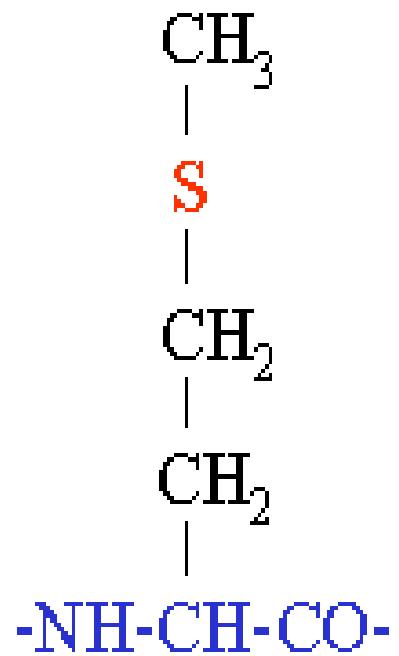
Dégâts - Protéines



❖ Les ROS peuvent attaquer les protéines notamment les **acides aminés soufrés** (cystéine et méthionine) et **aromatiques** (tyrosine et tryptophane) pour produire des groupements **carbonyles** et des aa modifiés incluant la méthionine sulfoxide, la **2-oxohistidine** et **les peroxydes protéiques**.

❖ La modification protéique est initiée par l'attaque du radical hydroxyle ($\text{OH}\bullet$) soit au niveau de la chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydation soit au niveau de la liaison peptidique **entrainant la fragmentation de la chaîne**.

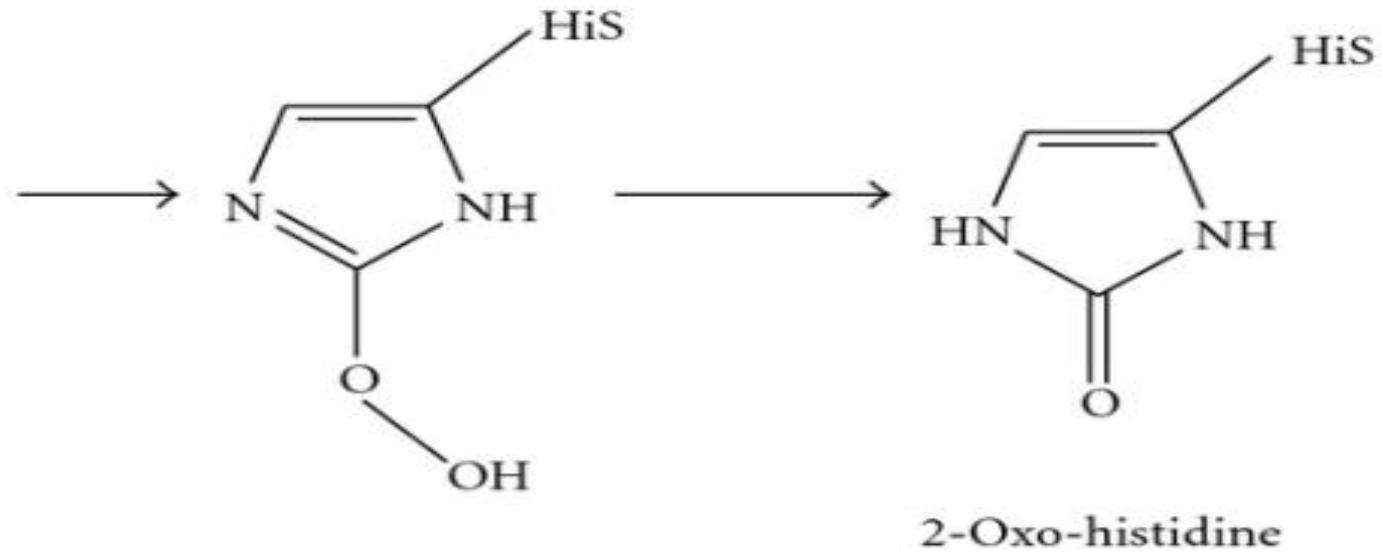
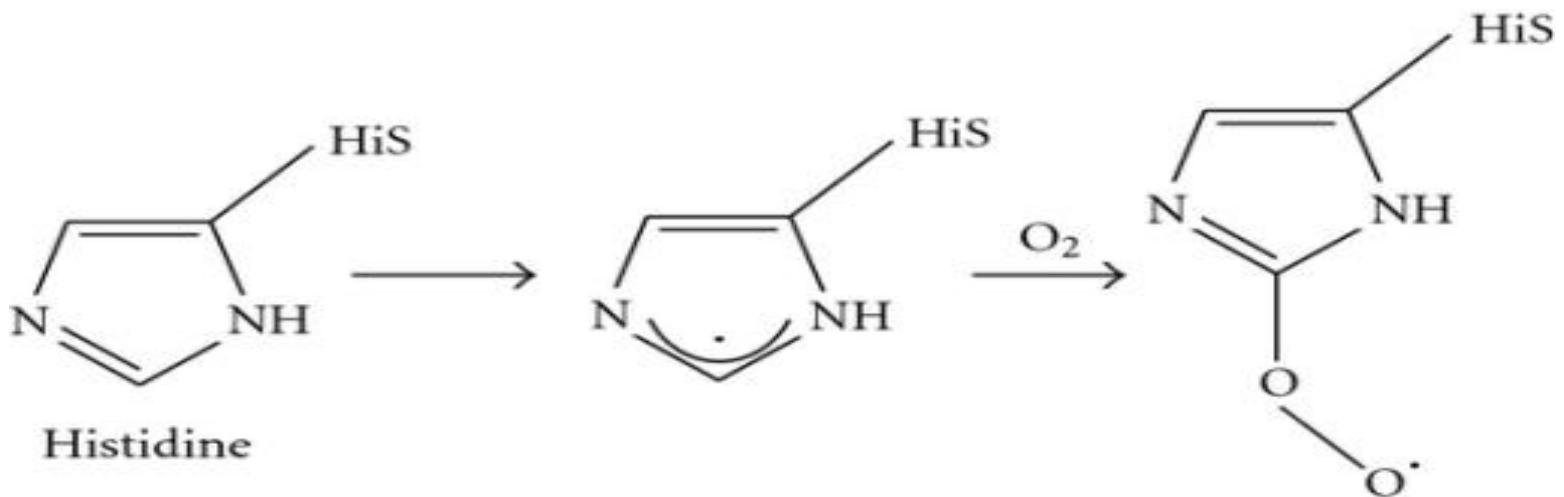
❖ Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec les protéines entraînant par conséquent son oxydation.



Methionine

Methionine
Sulfoxide

Methionine
Sulfone



- ❖ En présence d'oxygène, les radicaux **thiyl** $\text{RS}\cdot$ ainsi formés donnent des espèces **peroxy** $\text{RSOO}\cdot$.
- ❖ La dimérisation des radicaux thiyls peut mener à des pontages intra- ou inter-protéines:
 - ❖ $\text{RSH} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{RS}\cdot$
 - ❖ $\text{RS}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RSOO}\cdot$
 - ❖ $\text{RS}\cdot + \text{RS}'\cdot \rightarrow \text{RSSR}'$

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des **modifications structurales** (dimérisations par pontage intra- ou inter-protéines, agrégations, fragmentations, réarrangements, modification des acides aminés) et **fonctionnelles** (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse).

Acylation

L'acylation d'une protéine correspond à la formation co- ou post-traductionnelle d'une liaison covalente entre **un acide gras** activé en acyl-CoA et un résidu d'acide aminé de la protéine substrat. Les acides gras utilisés par la cellule pour acyler des protéines sont très majoritairement **saturés**.

- ❖ L'acylation concerne de très nombreuses protéines (enzymes, récepteurs, oncogènes, suppresseurs de tumeur, protéines impliquées dans la transduction des signaux, protéines de structure eucaryotes et même virales) et
- ❖ exerce une grande variété de fonctions dans les **régulations cellulaires**, puisque la liaison covalente d'un acide gras à une protéine change son hydrophobicité et permet de réguler l'ancrage de la protéine à la membrane, de modifier son adressage subcellulaire ou encore d'induire des interactions entre sous-unités protéiques.

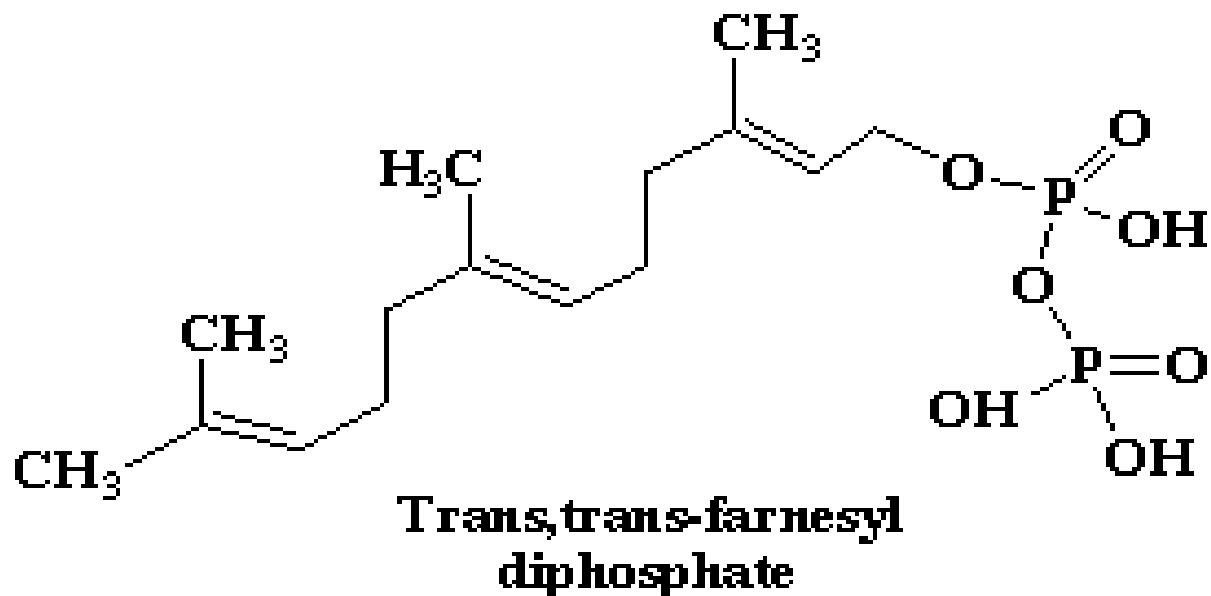
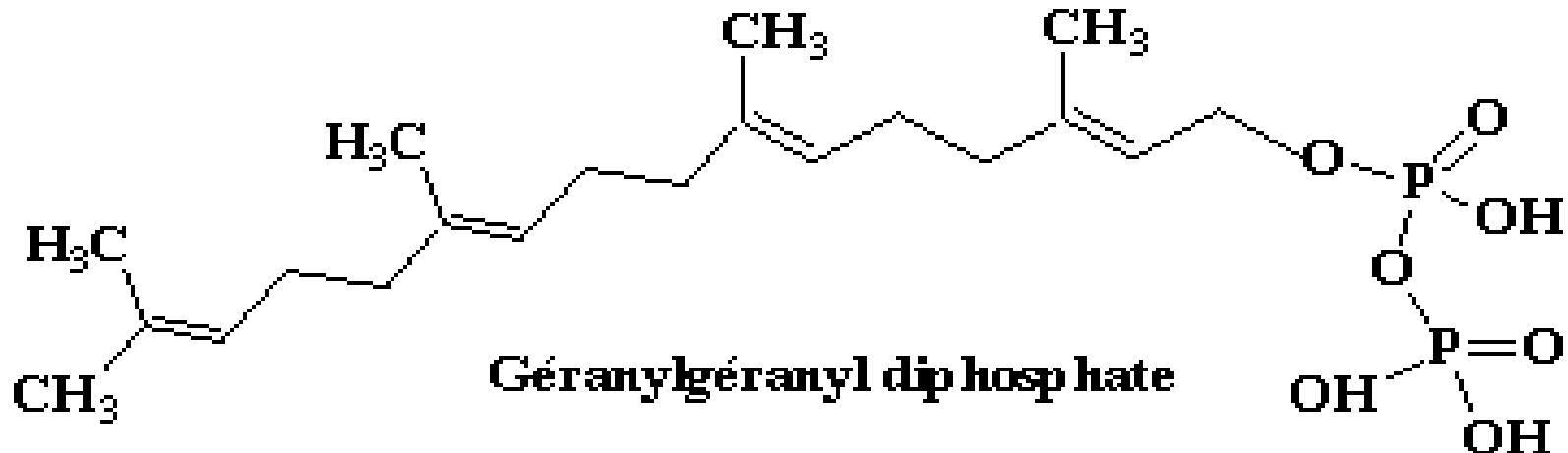
Les modifications les plus courantes de protéines par des lipides sont :

- ❖ Isoprénylation ou prénylation
- ❖ N-myristoylation
- ❖ palmitoylation (*S*-acylation)
- ❖ Glypiation, ou ajout de GPI (*GLYcosyl Phosphatidyl Inositol*)

L'isoprénylation

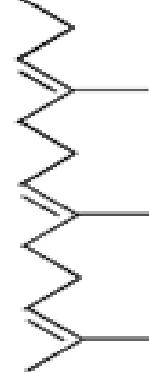
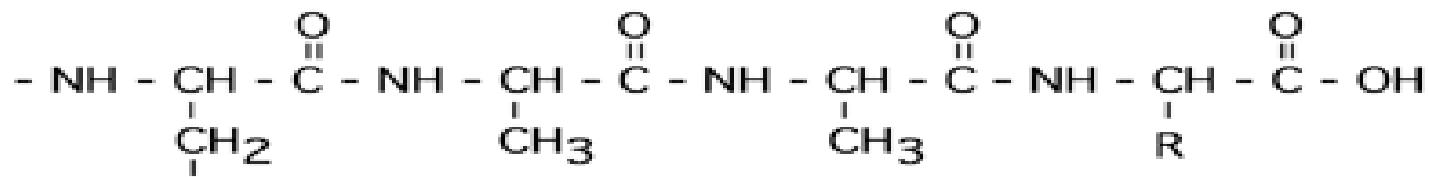
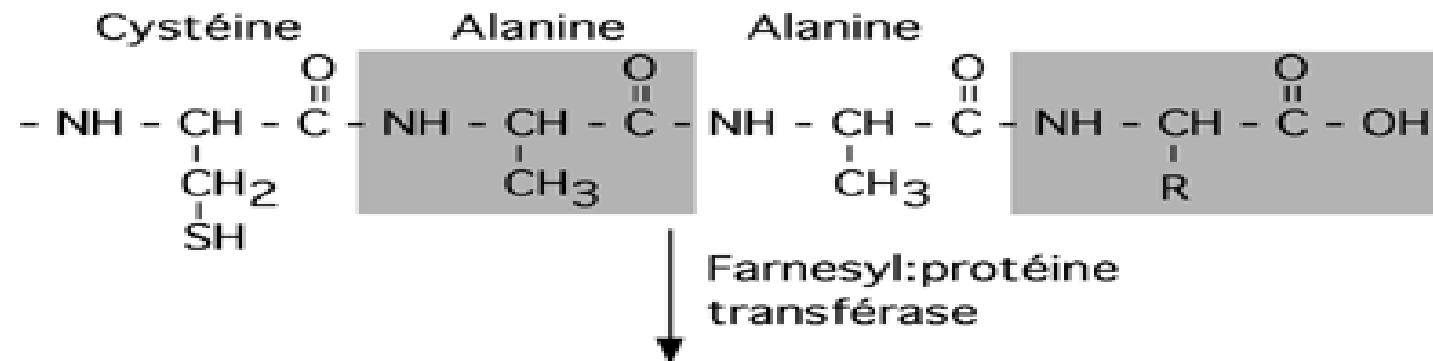
L'isoprénylation (ou **prénylation**) est la modification qui ajoute un lipide isoprénoïde **farnesyl** ou **géranylgeranyl**, via une liaison **thioéther**, sur une **cystéine** en position C-terminale ou proche de cette extrémité.

La protéine est ensuite clivée juste après la cystéine modifiée et un groupement méthyle y est ajouté en position C-terminale.

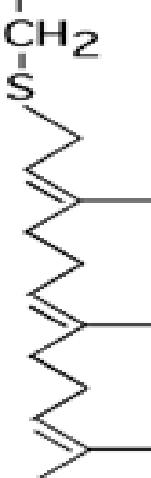


Jaspard (2005)

Les groupements farnesyl (15 carbones) et géranylgeranyl (20 carbones) sont des poly-isoprènes insaturés. Ils dérivent du **mévalonate**.



Peptidase et
Methyltransferase



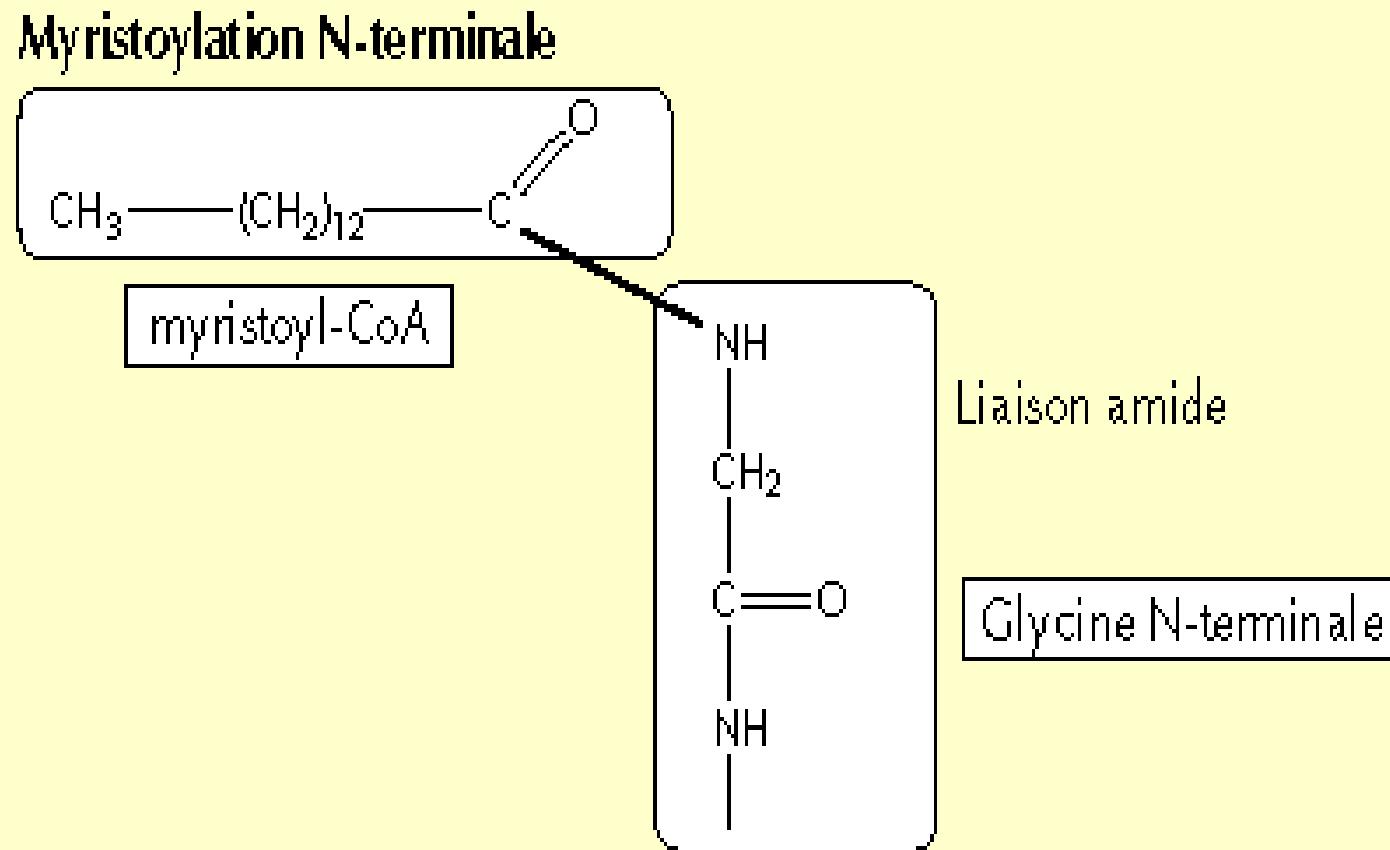
- ❖ L'ajout d'un groupement isoprénoïde à une protéine se fait sur une séquence cible **CAAX**, où
 - ❖ C est une **cystéine**,
 - ❖ A représente **un acide aminé aliphatique** et
 - ❖ X est **Ser, Met, Ala ou Glu.**
- ❖ (On retrouve aussi parfois des cibles Cys-Cys ou Cys-X-Cys, selon la farnesyl transférase impliquée dans la réaction).

- ❖ Chez l'homme il existe 3 protéines prényltransférases : la farnesyl-transférase (FT) et les géranylgeranyl-transférase 1 et 2 (GGT1 et GGT2).
- ❖ La réaction catalysée par la GGT2 met en jeu 2 molécules de géranylgeranyl diphosphate, au lieu de 1 pour FT et GGT1.
- ❖ Chacune de ces protéines contient une sous-unité α et une sous-unité β . Les sous-unités α de FT et de GGT1 sont codées par le même gène (FNTA).

L'isoprénylation permet à des protéines de se fixer dans une membrane. C'est le cas **des protéines G** impliquées dans la transduction du signal. **Les membres de la famille Ras** s'accrochent aussi à la membrane plasmique par une ancre farnésylée. (c'est pourquoi plusieurs drogues anticancéreuses en voie de développement sont des inhibiteurs de farnesyltransférase, qui empêchent Ras de se retrouver à la membrane et de véhiculer les signaux extracellulaires pro-mitotiques).

La myristylation

- ❖ La N-myristylation est la modification qui ajoute un **acide myristique** (activé sous forme de **myristoyl-CoA**) sur **une glycine en position N-terminale**.



- ❖ La méthionine N-terminale issu du codon d'initiation de la traduction est au préalable clivée.
- ❖ L'acide myristique (C14:0) est présent en faible quantité dans les tissus animaux. Il ne représente que 0,6 % des acides gras totaux du foie de souris.

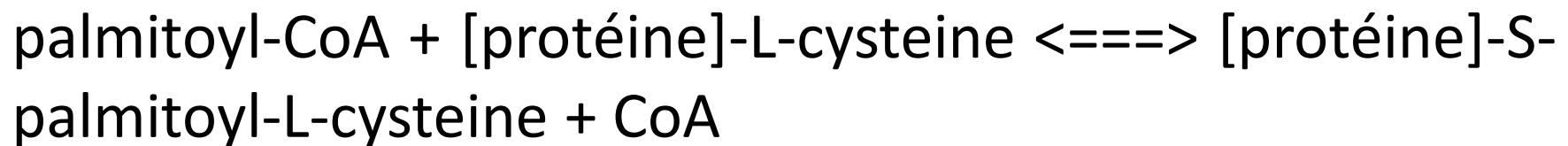
- ❖ cette modification peut être co-traductionnelle ou post-traductionnelle.
- ❖ La myristoylation N-terminale est irréversible.
- ❖ C'est une modification courante des protéines membranaires virales. **La protéine gag de VIH** est ainsi myristoylée; sans cette modification, le virus ne peut pas produire de particules infectieuses.

Les protéine myristoylées

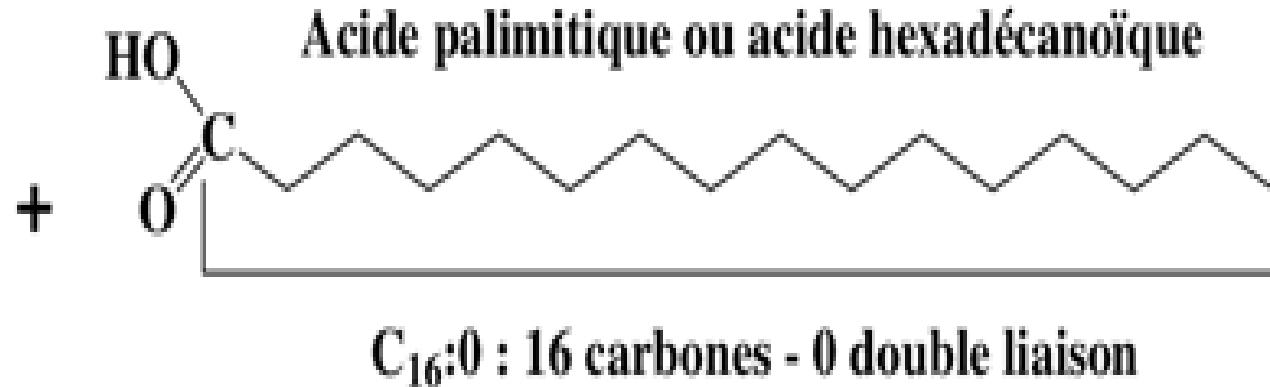
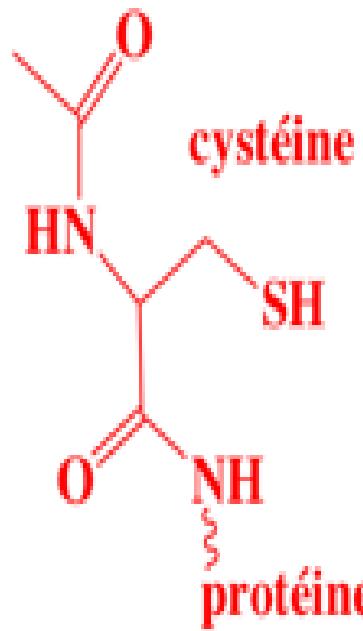
Protein	Physiological Role	Myristylation Function
Actin	Cytoskeleton structural protein	Post-translational myristylation during apoptosis ^[7]
Bid	Apoptosis promoting protein	Post-translational myristylation after caspase cleavage targets protein to mitochondrial membrane ^[7]
MARCKS	actin cross-linking when phosphorylated by protein kinase C	Co-translational myristylation aids in plasma membrane association
G-Protein	Signaling GTPase	Co-translational myristylation aids in plasma membrane association ^[10]
Gelsolin	Actin filament-severing protein	Post-translational myristylation up-regulates anti-apoptotic properties ^[7]
PAK2	Serine/threonine kinase cell growth, mobility, survival stimulator	Post-translational myristylation up-regulates apoptotic properties and induces plasma membrane localization ^[7]
Arf	vesicular trafficking and actin remodeling regulation	N-terminus myristylation aids in membrane association
Hippocalcin	Neuronal calcium sensor	Contains a Ca ²⁺ /myristoyl switch

La S-palmitoylation

La S-palmitoylation (ou S-acylation) est une modification post-traductionnelle qui ajoute, dans la grande majorité des cas, **un acide palmitique** (acide gras saturé en C16) sur **1 à 4 cystéine(s)** d'une protéine membranaire, via une liaison **thioester**.



L'acide palmitique est au préalable activé sous forme d'un acyl-CoA : le palmitoyl - CoA.



protéine acyl-transférase

palmitoyl-protéine thioestérase

protéine palmitoylée

E. Jaspard (2013)

Acyl-CoA



La sérine et la thréonine peuvent aussi, mais plus rarement, être palmitoylées.

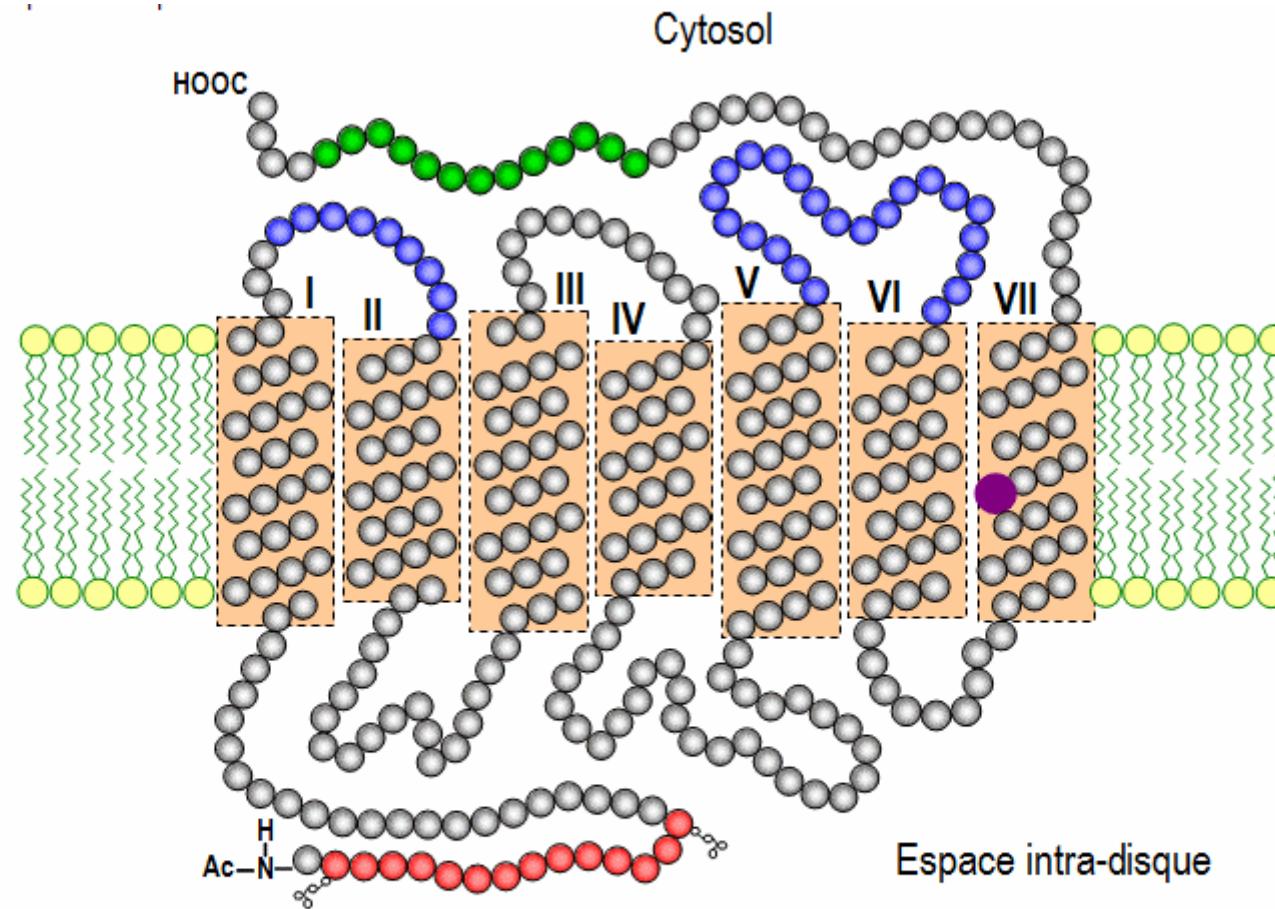
La S-palmitoylation est catalysée par les **palmitoyl S-acyltransférases** qui ont fixées à la membrane.

A l'inverse de la prénylation et de la myristoylation, la palmitoylation est en général réversible du fait de la nature chimique de la liaison thioester établie entre l'acide gras et l'acide aminé. La dé-palmitoylation est catalysée par les **palmitoyl-protéines thioesterases** (EC 3.1.2.22).

- ❖ Les protéines sont souvent modifiées de manière séquentielle par des lipides différents :
 - ❖ la modification co-traductionnelle par N-myristoylation s'effectue sur un résidu Gly N-terminal après que cette Gly apparaisse suite à l'hydrolyse de la méthionine N-terminale (liée au codon d'initiation de la traduction).
 - ❖ cette modification est suivie par la palmitoylation post-traductionnelle des résidus Cys adjacents ou proches d'un résidu Gly N-myristoylé.

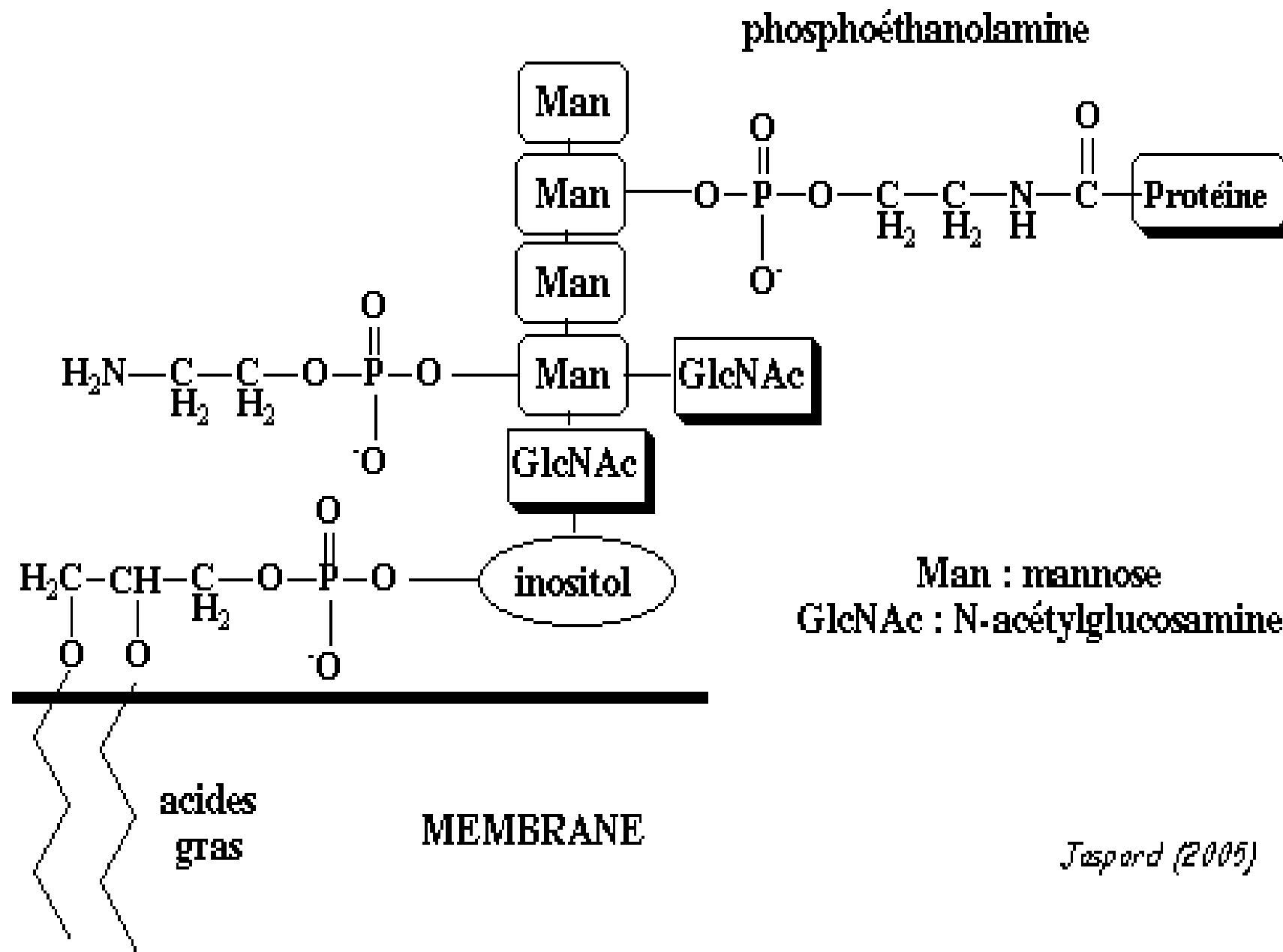
- La palmitoylation augmente l'**hydrophobicité** de la protéine et donc son aptitude à s'associer aux membranes.
- La palmitoylation est essentielle pour les protéines membranaires impliquées dans la signalisation et le trafic intracellulaires comme **les kinases de la famille Src**, **les GTPases de la famille Ras**, **les protéines G** et les récepteurs couplés aux protéines G .
- La palmitoylation est aussi impliquée dans le métabolisme des **lipoprotéines**, **l'apoptose** et d'autres processus cellulaires.

❖ Même des protéines possédant des domaines transmembranaires peuvent utiliser une ancre hydrophobique pour arrimer une partie hydrophile de leur structure à la membrane: c'est le cas de la **rhodopsine**, qui même si elle possède sept domaines transmembranaires utilise quand même **une ancre S-palmitoylée** pour attacher son extrémité C-terminale (cytoplasmique et hydrophile) à la membrane plasmique.



La glypiation

- ❖ La glypiation est la modification qui ajoute un groupement **glycosyl-phosphatidylinositol ou GPI** ou ancre GPI sur un acide aminé en position C-terminale de protéines fixées à la membrane du réticulum endoplasmique (par **une transamidase**).
- ❖ Il s'agit d'une modification rare en général, mais qui se retrouve dans plusieurs protéines ancrée dans la membrane par un acide gras couplé à leur extrémité C-terminale.



L'ancre GPI est pré-assemblée dans la membrane.

Elle est composée :

- d'un groupement phosphatidylinositol
- fixé à un glycane (résidus mannose et N-acétylglucosamine)
- lui-même lié au groupement phosphoryle de la phosphoéthanolamine

Les modifications post-traductionnelles du P53 et leur interférence avec celles des histones

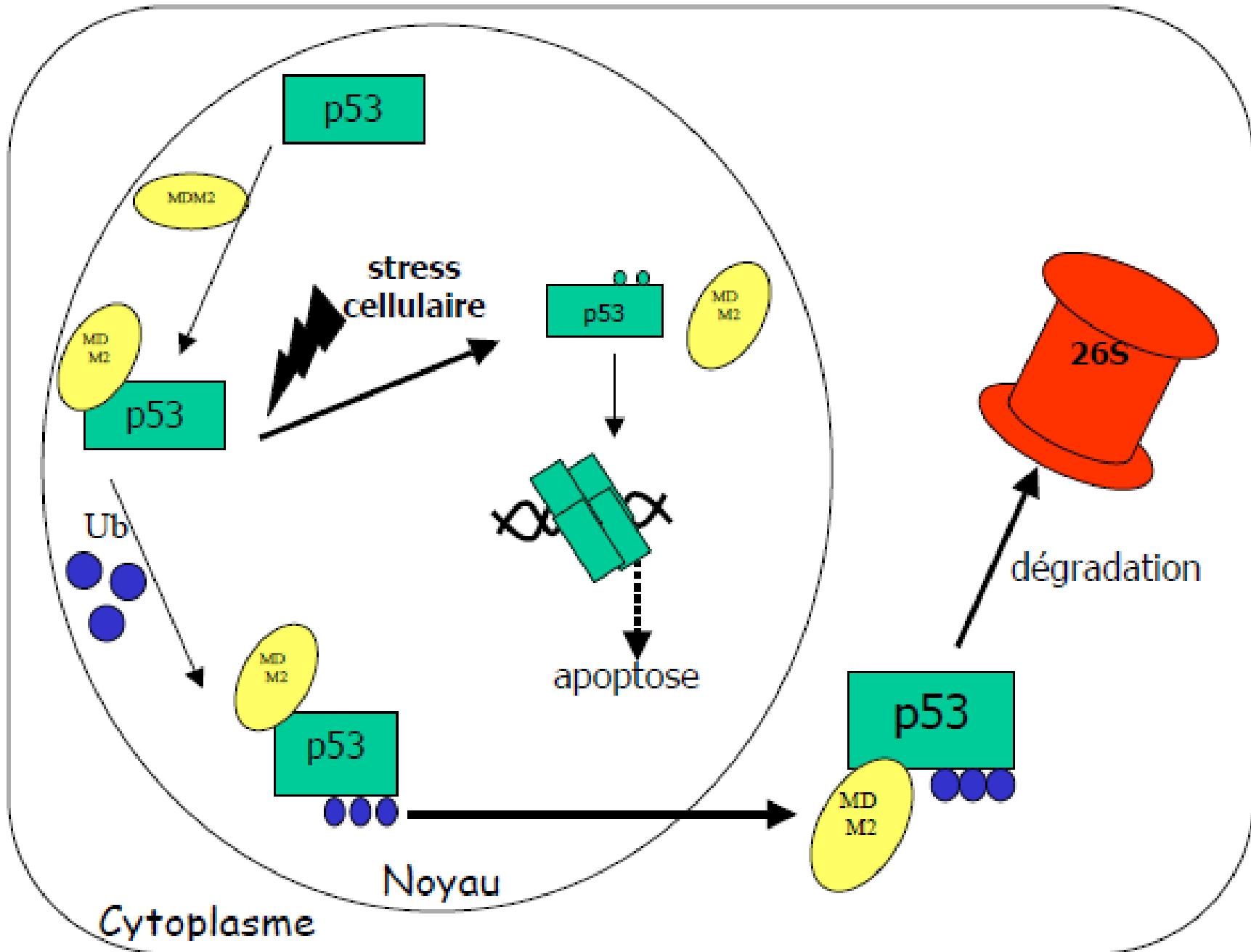


Figure 3: Schématisation du rôle de MDM2 dans la voie de p53

- ❖ La protéine humaine p53 (393 acides aminés) est un facteur de transcription. Dans les cellules **non stressées**, p53 est **inactive** ; elle est maintenue à un faible niveau par son association avec l'oncoprotéine MDM2, qui provoque son transport du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie dépendante de l'ubiquitine.
- ❖ Des stress génotoxiques tels que les radiations UV ou les radiations ionisantes déclenchent des voies de signalisation qui aboutissent à la stabilisation de la protéine p53, causant son accumulation dans le noyau et son activation comme facteur de transcription.
- ❖ Cette activation conduit à l'arrêt de croissance ou à l'induction de l'apoptose.

❖ Les mécanismes moléculaires qui activent p53 impliquent des modifications post-traductionnelles des régions amino- et carboxy-terminales, de types **acétylation**, **phosphorylation** et **sumoylation**, essentielles à la fonction de p53.

Structure de p53

Le gène TP53 qui code la protéine p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Ce gène est particulièrement conservé au cours de l'évolution. Il s'agit d'une phosphoprotéine nucléaire de 53kDa et de 393 acides aminés répartis en 5 domaines (fig1).

Les principaux domaines sont :

- le N ter, domaine transactivateur
- le domaine de fixation à l'ADN au centre
- le C ter (COOH), région de la régulation de l'activité de la protéine

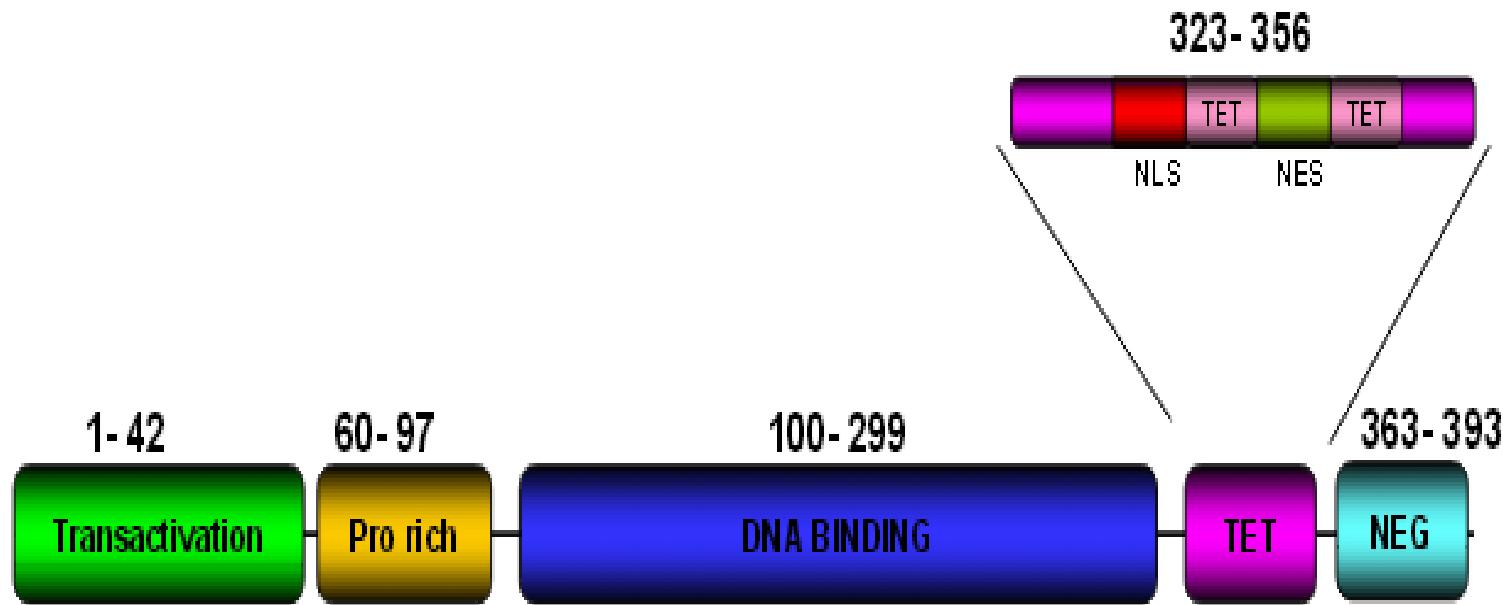


Fig1 : Schématisation de l'organisation de p53 :

Transactivation, domaine d'interaction avec l'appareil de la transcription. Proline rich, domaine riche en proline intervenant dans la voie apoptose et interaction protéine/protéine. DNA binding, domaine de fixation à l'ADN. TET, domaine de tétramérisation de p53 contenant aussi les domaines de translocation nucléaire NLS nuclear localisation signal et NES nuclear exportation signal. NEG, domaine principal de régulation de p53.

p53 et les modifications post-traductionnelles

- ❖ L'activité de P53 est finement contrôlée par des modifications post-traductionnelles sur ses domaines principaux. **Le domaine N-terminal présente différents sites de phosphorylation alors que sa partie C-terminal est acétylée et sumoylée.**
- ❖ De nombreuses études montrent que les modifications post traductionnelles sur p53 modulent son activité.
- ❖ Chaque modification est réalisée par des enzymes spécifiques

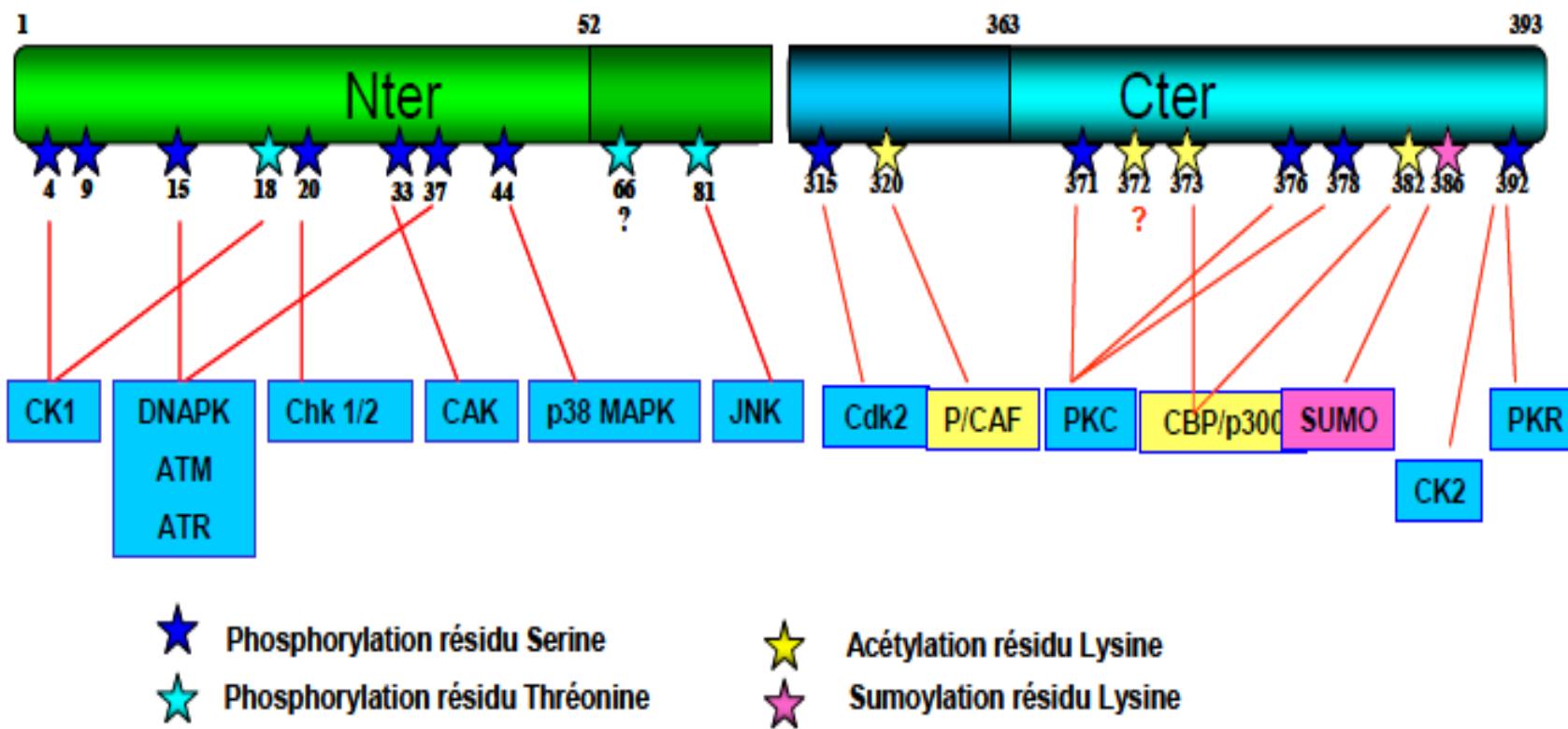


fig3: Modifications post-traductionnelles des domaines de Transactivation et de Régulation de p53.

CK1 (casein kinase 1). ATM & ATR (Ataxia-telangiectasia-mutated & Ataxia-telangiectasia Rad 53 related). DNAPK (DNA-dependent protein kinase). Chk ½ (Check 1 & 2). CAK (Cdk Activating Kinase). p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase 38). JNK (Jun Nter kinase). Cdk2 (Cyclin dependent kinase 2). P/CAF (P300/CBP Associated Factor). PKC (Proteine kinase C). CBP/p300 (CREB-binding protein and p300). SUMO (Small ubiquitin-like modifier). CK2 (casein kinase 2). PKR (Protein kinase RNA activated).

Phosphorylations de la région amino-terminale et rôle dans l'activation de p53

La phosphorylation sur la sérine 15 stimule l'interaction de p53 avec ses co-activateurs transcriptionnels, **les histones acétyltransférases p300 et CBP (*CREB binding protein*)**.

En outre, la sérine 20 est phosphorylée *in vitro* par Chk1 et Chk2 (*check point kinases*), qui sont activées par ATM et ATR après un dommage de l'ADN.

En outre, comme pour le résidu 15, la phosphorylation du résidu 20 peut activer p53 en inhibant son interaction avec MDM2 (**Mouse double minute 2**), et en participant à la stabilisation du complexe p53/p300.

L'action de MDM2 sur le P53

- ❖ La protéine MDM2 est un proto-oncogène à activité ubiquitine-ligase E3. cette protéine est capable d'adresser p53 au protéasome.
- ❖ L'adressage au protéasome de p53 par MDM2 se fait par le mécanisme suivant:
 - ❖ L'ubiquitine ligase MDM2 se fixe sur le domaine N-terminal de p53 (domaine transactivateur) et induit une ubiquitylation du domaine C-terminal (domaine régulateur), ce qui conduit à la translocation de p53 du noyau vers le cytoplasme et à sa dégradation par le protéasome.

Acétylation

- ❖ L'acétylation de la lysine 320 par PCAF et/ou les lysines 373 et 382 par **p300/CBP** contribue également à l'activation de p53.
- ❖ L'acétylation a été initialement supposée favoriser la fixation de p53 à l'ADN. Cependant, de nombreux résultats ont amené à rejeter cette hypothèse.

- ❖ En outre, des analyses *in vitro* de la fixation de p53 à la chromatine ont confirmé que l'acétylation en C-terminal de p53 n'est pas requise pour que p53 se fixe à l'élément de réponse ER, bien que l'activité de **p300/CBP histone acétylase** soit nécessaire à la **transactivation** induite par p53.
- ❖ En outre, p300/CBP lié à p53 pourrait acétyler des histones dans les éléments de réponse de p53, conduisant à des modifications de la chromatine nécessaires à la transactivation de p53.