

Structure primaire

CODE À UNE LETTRE :

A = alanine
E = glutamique
R = arginine
T = thréonine
Y = tyrosine
I = isoleucine
P = proline
Q = glutamine
S = sérine
D = aspartique

F = phénylalanine
G = glycine
H = histidine
K = lysine
L = leucine
M = méthionine
W = tryptophane
C = cystéine
V = valine
N = asparagine

Structure primaire : séquence en acide aminés

Structure secondaire : repliement local de la chaîne principale

Structure tertiaire : structure tridimensionnelle

Structure quaternaire : association de plusieurs chaînes polypeptidiques

CHAÎNE LATÉRALE NON POLAIRE

	pK _C	pK _N	pK _R	pH _I		pK _C	pK _N	pK _R	pH _I
$\text{H}-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ glycine (75) Gly (G)	2.3	9.6		6.0	CH_2 $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$	2.0	10.6		6.3
$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ alanine (89) Ala (A)	2.3	9.7		6.0	proline (115) Pro (P)				
CH_3 $\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ valine (117) Val (V)	2.3	9.6		6.0	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ phénylalanine (165) Phe (F)	1.8	9.1		5.5
CH_3 $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ leucine (131) Leu (L)	2.4	9.6		6.0	$\text{CH}_3-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ méthionine (149) Met (M)	2.3	9.2		5.8
CH_3-CH_2 $\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ isoleucine (131) Ile (I)	2.4	9.7		6.1	$\text{C}_8\text{H}_7\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ tryptophane (204) Trp (W)	2.4	9.4		5.9

CHAÎNE LATÉRALE AVEC UNE FONCTION ACIDE-BASE ANIONIQUE A pH 7

	pK _C	pK _N	pK _R	pH _I		pK _C	pK _N	pK _R	pH _I
$\text{COO}^--\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ acide aspartique ou aspartate (132) Asp (D)	2.1	9.8	3.9	3.0	$\text{COO}^--(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ acide glutamique ou glutamate (147) Glu (E)	2.2	9.7	4.1	3.2

CHAÎNE LATÉRALE AVEC UNE FONCTION ACIDE-BASE NEUTRE A pH 7

	pK _C	pK _N	pK _R	pH _I		pK _C	pK _N	pK _R	pH _I
$\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ cystéine (121) Cys (C)	1.7	10.8	8.3	5.0	$\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \diagdown \end{array}$ NH_3^+ histidine (155) His (H)	1.8	9.2	6.0	7.6
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ tyrosine (181) Tyr (Y)	2.2	9.1	10.1	5.7	$\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \diagdown \end{array}$ est la fonction de pK 6; conjuguée : $\text{H}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \diagdown \end{array}$ n'est pas une fonction acide-base				

CHAÎNE LATÉRALE POLAIRE SANS FONCTION ACIDE-BASE

	pK _C	pK _N	pK _R	pH _I		pK _C	pK _N	pK _R	pH _I
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ sérine (105) Ser (S)	2.2	9.2		5.7	$\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ asparagine (132) Asn (N)	2.0	8.8		5.4
$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^-$ HO NH_3^+ thréonine (119) Thr (T)	2.6	10.4		6.5	$\text{NH}_2-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ glutamine (146) Gln (Q)	2.2	9.1		5.7

CHAÎNE LATÉRALE AVEC UNE FONCTION ACIDE-BASE CATIONIQUE A pH 7

	pK _C	pK _N	pK _R	pH _I		pK _C	pK _N	pK _R	pH _I
$\text{NH}_3^+-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-\text{COO}^-$ NH_3^+ lysine (147) Lys (K)	2.2	9.0	10.5	9.8	$\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{C} \begin{array}{c} \diagup \text{NH}_2 \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$ NH_3^+ arginine (175) Arg (R)	2.2	9.0	12.5	10.8
					la fonction guanidine a un seul pK (12.5)				

Si l'ordre d'enchaînement est inconnu, on les place entre parenthèses : V(S, T, Y) G R

Si une identification précises est impossible :

- **B** pour aspartique D ou asparagine N
- **Z** pour glutamique E ou glutamine Q

Hydrolyse acide : 24h ou 72h, HCl 6mol.L⁻¹, 110°C

Séparation du mélange d'acides aminés, **destruction des tryptophanes W**, désamination de N en D et Q en E => **détermination de B et Z**

Il faut au préalable séparer les sous unités, réduire les ponts disulfures inter et intra et alkyler les cystéines.

Marquage des extrémités :

- **DNFB (dinitrofluorobenzene) ou réactif de Sanger** : libération du DNP acide aminé de couleur jaune (acide aminé en N-terminale)
- **Hydrazinolyse** : tous les acides aminés sont marqués sauf l'acide aminé en C-terminal

Séquençage N-terminal par dégradation d'Edman : identification récurrente de l'acide aminé N-terminal, on obtient un PTH acide aminé via l'intermédiaire d'un PTC polypeptide. C'est une méthode automatisée, récurrente et avec un rendement inférieur à 100%.

Séquençage récurrente de l'acide aminé C-terminal par des **exocarboxypeptidases** (le tableau sera donné si besoin)

Nom	Source	Spécificité
Carboxypeptidase A	Pancréas de boeuf	Non spécifique (sauf R, K, et P en position n ou n-1)
Carboxypeptidase B	Pancréas de porc	R, K (sauf P en n-1)
Carboxypeptidase C	Feuilles de citronnier	Non spécifique
Carboxypeptidase Y	Levure	Non spécifique

Le bromure de cyanogène permet un clivage chimique du coté C-terminal des **méthionines** : V P M / S T R

La trypsine permet un clivage **après R et K** sauf P en n+1 et la chymotrypsine **après F, Y et W** sauf P en n+1.

Séparation des fragments de protéolyse

- **électrophorèse** : charge nette
séparation de molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique selon la charge nette globale au pH donné ; révélation par coloration : **ninhydrine** (pourpre) et fluorescamine
- **chromatographie sur couche mince** : hydrophobie
chromatographie de partage avec une phase stationnaire polaire/hydrophile fixée sur un support inerte et une phase mobile liquide apolaire/hydrophobe : rétention des acides aminés polaires et déplacement rapide des acides aminés apolaires
- **finger-print** : charge nette + hydrophobie
séparation en deux dimensions en combinant les techniques : électrophorèse (charge nette) et chromatographie sur couche mince (hydrophobie) ; révélation par ninhydrine
- **chromatographie échangeuses d'ions** : charge
- **phase inverse en système HPLC** : hydrophobie
chromatographie d'adsorption phase stationnaire solide non polaire et une phase mobile liquide polaire : rétention des peptides non polaires et élution avec une phase mobile de plus en plus hydrophobe ; utilisation d'une chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : forte pression, analyse plus rapide.

Enzymologie

I. Introduction

Les organismes vivants ont un très grand nombre de réactions qui sont rendues possibles par des macromolécules biologiques, les enzymes. L'enzymologie est l'étude des propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes. Les enzymes sont les protéines les plus spécialisées, ils catalysent toutes les réactions biologiques et sont **actives en très faible quantité**.

Elles ont la caractéristique première d'accélérer les réactions en augmentant la vitesse sans modifier l'équilibre thermodynamique. La réaction est **10^7 plus rapide**. Les enzymes ont un **haut degré de spécificité**, elles sont très sélective sur le type de réaction catalysée et le substrat utilisé. Enfin, elles se déroulent en solution aqueuse. Leur conformation native doit être préservée afin de conserver l'activité catalytique.

Les enzymes :

- **holoprotéine** : entièrement protéique
- **hétéroprotéines** : formée de 2 constituants : l'**apoenzyme** (partie protéique et spécifique) et le cofacteur ou **coenzyme** (non protéique, non spécifique et catalyse de la réaction)

La classification des enzymes :

	Classe	Action	$S \rightarrow P$
1	Oxydo-réductases	Transfert d'électrons	$A^- + B \rightleftharpoons A + B^-$
2	Transférases	Transfert de groupes chimiques	$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$
3	Hydrolases	Réaction d'hydrolyse : transfert de groupes fonctionnels à l'eau	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$
4	Lyases	Addition de groupes sur double liaison ou formation de double liaison par soustraction de groupe	$\begin{array}{c} X \quad Y \\ \quad \\ A-B \rightleftharpoons A=B + X-Y \end{array}$
5	Isomérases	Transfert de groupes à l'intérieur d'une molécule pour former un isomère	$\begin{array}{ccc} X & Y & \\ & & \\ A-B & \rightleftharpoons & Y-X \\ & & \\ A & B & \end{array}$
6	Ligases	Formation de liaison C-C, C-S, C-O ou C-N par réaction de condensation. Nécessite la fourniture d'énergie (ATP).	$A + B \rightleftharpoons A_5-B$

II. La catalyse enzymatique

1. GÉNÉRALITÉS

Un catalyseur est une molécule avec une action physicochimique permettant **d'accélérer la vitesse d'une réaction** sans intervenir directement sur celle-ci : pas de modification de l'équilibre avec une **baisse de la barrière énergétique**. Une enzyme est **un catalyseur spécifique**.

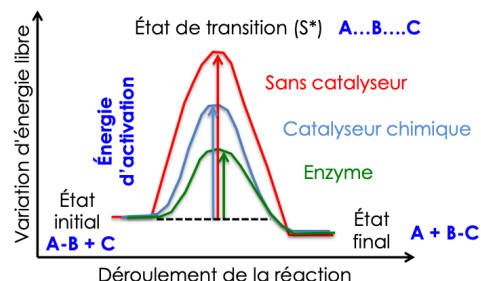
Une enzyme abaisse l'énergie d'activation, ne modifie pas l'équilibre mais augmente la vitesse de la réaction.

Réaction de transformation d'un substrat S en produit P :



avec la constante d'équilibre $K'_{eq} = [P]/[S]$

Accélération des réactions aller et retour



2. CINÉTIQUE CHIMIQUE

Ordre d'une réaction :

• **Ordre 0** : $S \rightarrow P$

$$V = -d[S] / dt = d[P] / dt = k_0 \text{ (k en mol.L}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$$

La vitesse de la réaction est indépendante de $[S]$.

• **Ordre 1** : $S \rightarrow P$

$$V = -d[S] / dt = d[P] / dt = k \cdot [S] \text{ (k en s}^{-1}\text{)}$$

La vitesse de la réaction est proportionnelle à $[S]$.

• **Ordre 2** : $A + B \rightarrow P$

$$V = -d[A] / dt = -d[B] / dt = d[P] / dt = k \cdot [A] \cdot [B] \text{ (k en mol}^{-1}\text{L.s}^{-1}\text{)}$$

2 substrats sont nécessaires à la réaction, donc 2 molécules influent sur la vitesse !

La vitesse de la réaction est proportionnelle à $[A]$ et $[B]$.

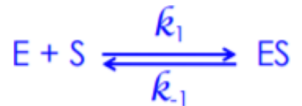
• **Pseudo-ordre 1** :

- si $[B] \gg [A] \Rightarrow [B]$ est constante alors : $V = k \cdot [A] \cdot [B] = k' \cdot [A]$, pseudo ordre 1 par rapport à A

- si $[A] \gg [B] \Rightarrow [A]$ est constante alors $V = k \cdot [A] \cdot [B] = k'' \cdot [B]$, pseudo ordre 1 par rapport à B

Intéraction protéines ligand :

La liaison peut se faire hormone ou neurotransmetteur / récepteur ; antigène / anticorps ; molécules transportées / transporteur ; substrat / enzyme ...



3. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

La cinétique enzymatique est la variation de la concentration du produit (ou du substrat) de la réaction en fonction du temps.

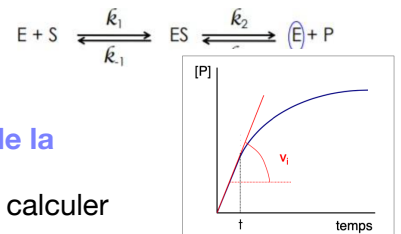
Il y a **deux étapes dans la réaction catalysée**.

Afin de déterminer la vitesse initiale V_i de la réaction, il faut calculer la

tangente à l'origine de la pente. A conditions que la cinétique soit une droite et que le produit soit inférieur à 10% du substrat initial.

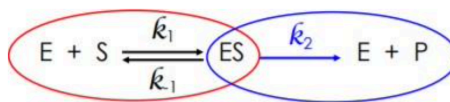
Ensuite V diminue car $[S]$ diminue. Puis **$V = 0$, car on atteint l'équilibre de la réaction**.

Dans le cas d'une cinétique avec plusieurs concentrations initiales, il faut calculer chaque V_i pour chaque substrat.

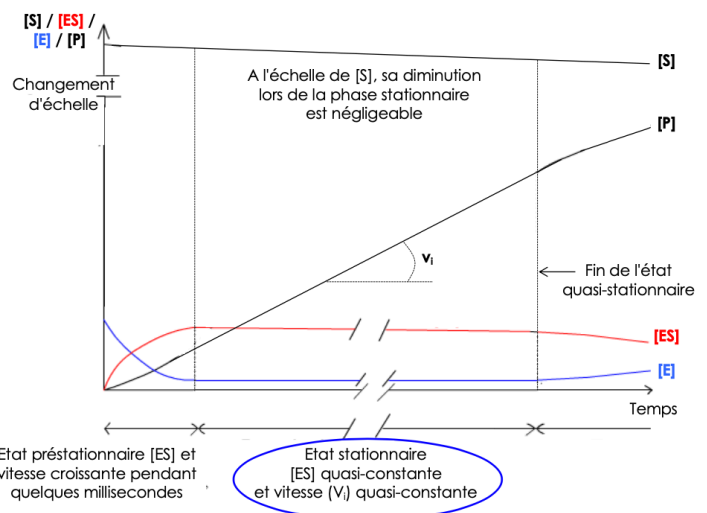


La **courbe de Michaelis et Menten** correspond à la courbe de saturation **$V_i = f([S]_0)$** .

La vitesse maximale de la réaction n'est jamais atteinte, ATTENTION !!!



La formation du complexe ES est une **étape rapide et réversible**. La libération de E et de P est une **étape limitante**. La vitesse est proportionnelle à $[ES]$ en conditions de $V_i \Rightarrow v_i = d[P] / dt = k_2 \cdot [ES]$



A l'état stationnaire : **[ES] constant** : vitesse de formation de ES = vitesse de disparition de ES

Pour démontrer l'équation de Michaelis-Menten :

- définir les conditions initiales : $[S]_0 \gg [E]_0$, $[P]$ négligeable
- définir l'état stationnaire : $[ES]$ constante d'où : $\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_M$
- **écrire l'équation de conservation** $[E] = [E]_0 - [ES]$ et exprimer $[ES]$ en fonction du K_M
- écrire l'équation de **V_i** et l'exprimer en fonction de la **V_{max}**

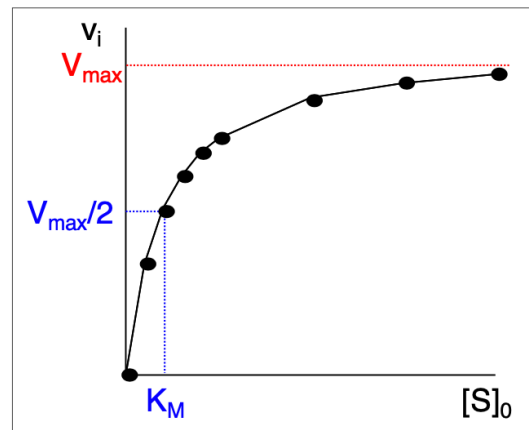
Ce qui nous donne la courbe de Michaelis et Menten :

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_M}$$

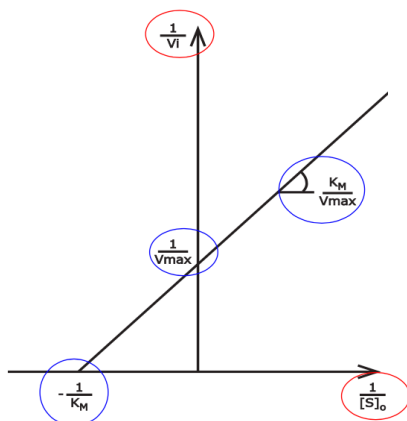
$V_i = V_{max}$ si $[S]_0 \geq 20K_M$

et si **$[S]_0 = K_M$ alors $V_i = V_{max}/2$**

Avec la courbe de Michaelis et Menten, nous pouvons donc faire une approximation de la V_{max} et de K_M .



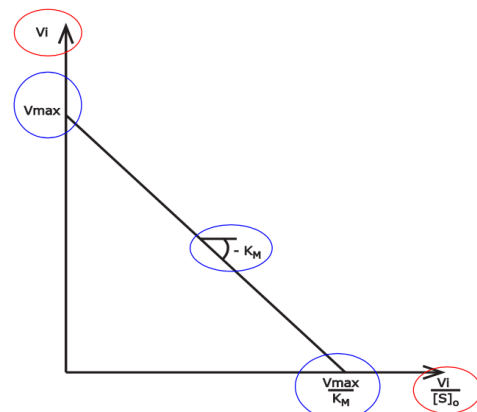
Représentation de Lineweaver et Burk ou double inverse : linéarisation de la courbe de Michaelis-Menten :



$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

y = a x + b

Représentation d'Eadie-Hofstee



$$V_i = V_{max} - K_M \cdot \frac{V_i}{[S]_0}$$

y = b + a x

La signification de $K_m : [S]$ telle que $V_i = V_{max}/2$

K_m est une grandeur expérimentale qui peut **varier avec la structure de S, le pH, la température, la force ionique**. Chaque enzyme a un K_m caractéristique pour un substrat donné : **plus le K_m est élevé, plus l'affinité diminue**.

• Si $k_2 \ll k_{-1}$: $\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_2}$ alors $K_M = K_D$

- k_2 : constante de vitesse d'ordre 1 exprimée en $s^{-1} \Rightarrow$ inverse d'un temps : fréquence
- k_2 : fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique, constante catalytique ou k_{cat}
- Valeur de k_{cat} = **nombre de molécules S converties en P par une molécule d'enzyme en une seconde**
- bonne fixation du substrat = faible K_m
catalyse très lente = faible K_{cat}
- mauvaise fixation du substrat = K_m élevée
catalyse très rapide = K_{cat} élevée

III. Les inhibitions

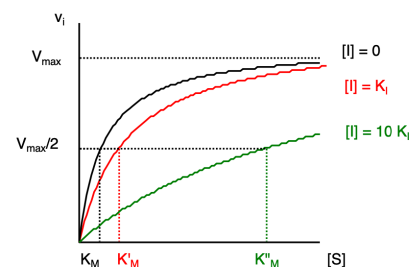
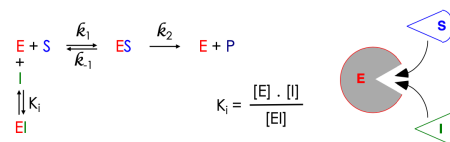
Les inhibiteurs **diminuent l'activité enzymatique**. Ils peuvent être de nature métaboliques, antibiotiques, toxines, drogues... L'association inhibiteurs/enzyme-cible peut être réversible ou irréversible.

1. L'INHIBITION COMPÉTITIVE

La fixation de l'inhibiteur empêche celle du substrat et réciproquement : fixation mutuellement exclusive : EI non productif

- **K_m augmenté**
- V_{max} non modifiée

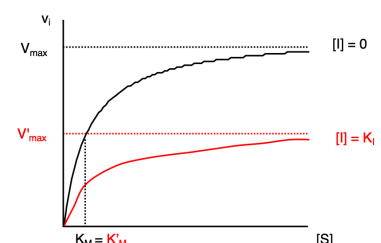
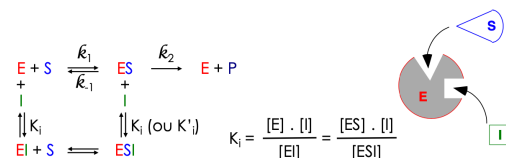
$$V'_i = \frac{V_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K'_M}$$



2. L'INHIBITION NON COMPÉTITIVE

La fixation de l'inhibiteur n'a aucune influence sur celle du substrat et réciproquement : sites de fixation distincts; EI ne modifie pas la fixation de S mais empêche les ajustements conformationnels au site actif : ESI inactif $\Rightarrow K_m$ inchangée ; **V_{max} diminuée**

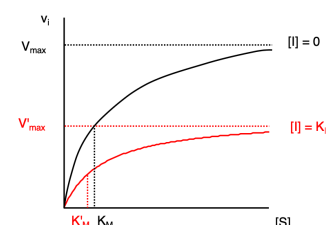
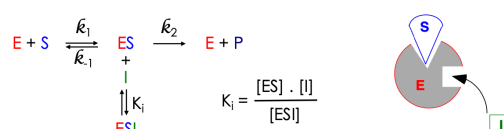
$$V'_i = \frac{V'_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_M}$$



3. L'INHIBITION INCOMPÉTITIVE

La fixation de l'inhibiteur n'a lieu que sur le complexe ES mais en un site distinct de celui de S : inhibition rencontrée dans des réactions à plusieurs substrats menant à un complexe ternaire ESI inactif $\Rightarrow V_{max}$ diminuée ; **K_m diminuée**

$$V'_i = \frac{V'_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K'_M}$$



	K'_M	V'_{max}	Forme d'E
Inhibition compétitive		Inchangée	E
Inhibition non compétitive	Inchangée		E et ES
Inhibition incompétitive			ES

4. L'INHIBITION IRRÉVERSIBLE

C'est l'établissement d'une liaison covalente entre la molécule d'enzyme et celle d'inhibiteur :
enzyme totalement inactive

IV. Les mécanismes catalytiques

L'enzyme a pour rôle de **diminuer l'énergie d'activation de la réaction**. Le substrat se fixe au niveau du site actif, une poche où se déroule la catalyse.

Les caractéristiques du site actif :

- petite région de l'enzyme liant le(s) substrat(s) voire un coenzyme
- présence de **résidus catalytiques** participant directement à la catalyse de la réaction
- rôle du reste de la protéine : stabilisation de la conformation du site actif, régulation de l'activité catalytique, interaction avec d'autres molécules ...
- **entité tridimensionnelle** impliquant des résidus même éloignés dans la structure primaire => catalyse plus efficace que s'ils étaient voisins dans la séquence
- forme : **poche, crevasse ou fente**
- globalement non polaire : absence d'H₂O sauf si elle intervient comme réactant
- présence possible de résidus polaires
- formation du complexe ES : **interactions faibles et spécificité de reconnaissance**
- **complémentarité non rigide** : la fixation du substrat peut entraîner un changement de conformation du site actif
- poche obstruées par les chaînes latérales de V et T : **n'accueille que les petites chaînes latérales hydrophobes** (A, V...)

Les effets du pH :

L'enzyme a une activité optimale dans une zone de pH donné : état d'ionisation des groupes ionisables participant à la catalyse acide-base. La zone de pH optimum dépend de l'environnement cellulaire : pepsine pH 1,8 dans l'estomac et glucose 6-phosphatase pH 7.

En conclusion, le pH agit sur la conformation de l'enzyme, l'association ES et l'action catalytique de l'enzyme.

Conclusion :

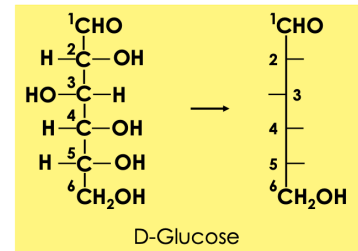
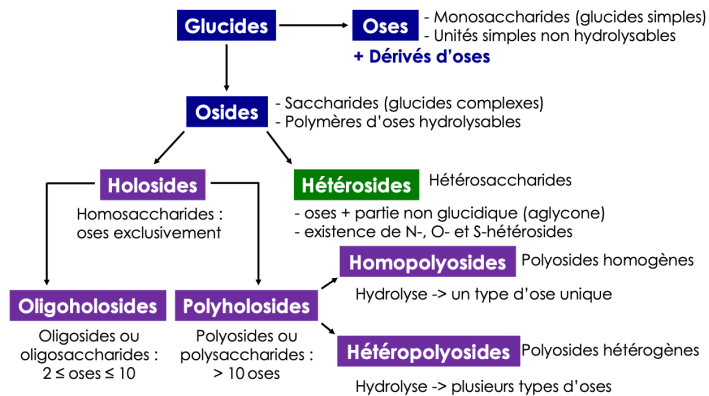
Dans les cellules, les voies métaboliques sont constituées de suites de réactions catalysées par différentes enzymes. C'est un ensemble de voies métaboliques soumis à des régulations dépendant de l'état métabolique de la cellule et de l'organisme.

Les glucides

I. Introduction

Les glucides sont des aldéhydes ou des cétones polyhydroxylés. Ils sont présents dans les végétaux et les cyanobactéries (80% du poids sec) avec la **photosynthèse** mais également chez les animaux (5%) avec la **néoglucogénèse**.

Les glucides ont un rôle structural, énergétique, dans la reconnaissance et la communication cellulaire mais aussi dans la composition des macromolécules.



Représentation Fisher simplifiée :

II. Les oses (monosaccharides ou glucides simples)

Formule brute des glucides : $(C.H_2O)_n$

Ils ont soit une **fonction aldéhyde** soit une **fonction cétone**.

Nomenclature : triose, tétrorse, pentose, hexose, heptose... => aldotérose, cétopentose

Deux isomères optiques (énantiomères) ont une configuration opposée. Ils sont image et non superposables. Ils ont une activité optique opposée.

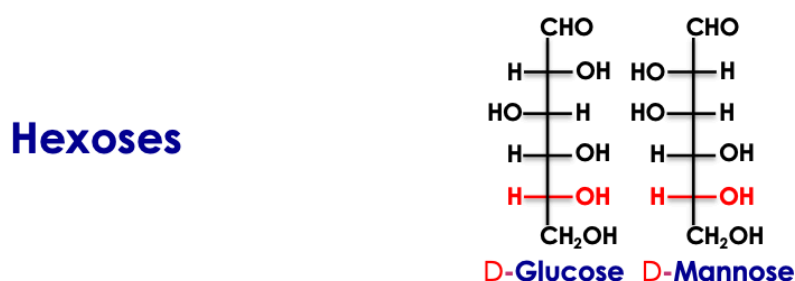
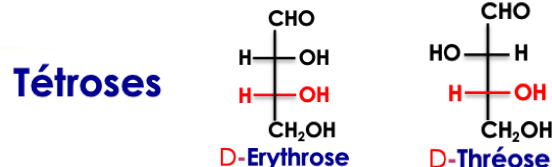
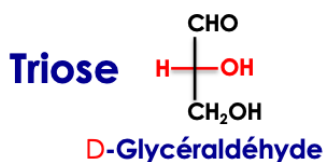
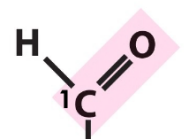
L'attribution dextrogyre et levogyre est complètement arbitraire => dextrogyre pour la configuration D et levogyre pour la configuration L. Cette attribution a été confirmée par cristallographie.

Les oses naturels sont majoritairement **de configuration D**.

LES ALDÉHYDES

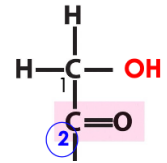
Aldose : **2(n-2)** stéréoisomères car C1 et Cn ne sont pas asymétriques.

Les aldoses à connaître :

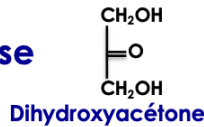


LES CÉTONES :

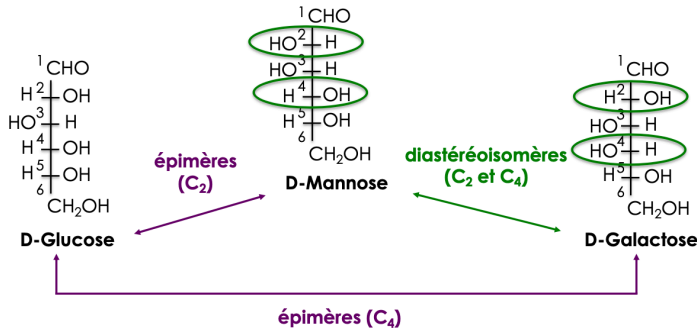
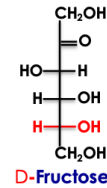
Cétose : **2(n-3)** stéréoisomères car C1, C2 et Cn ne sont pas asymétriques.
Les cétones à connaître :



Triose



Hexoses



Les stéréoisomères non énantiomères sont des diastéréoisomères => 1 ou plusieurs C asymétriques de configuration différentes.
Les stéréoisomères qui diffèrent que par la configuration d'un seul carbone asymétrique sont des épimères.

III. Structure cyclique des oses

La structure linéaire des oses avec plus de 4 carbones n'explique pas leur propriétés.

Il y a 2 objections à la structure linéaire :

- **réactivité différentes des vrais aldéhydes et cétones** : l'aldéhyde se transforme en acétal par l'intermédiaire d'un hémiacétal : la fonction réductrice de l'ose a déjà établi une première liaison avec une fonction alcool : elle est moins réductrice
- **mutarotation** : modification du pouvoir rotatoire d'une solution de glucide au cours du temps : existence d'un carbone asymétrique supplémentaire au niveau du carbonyle entraînant l'apparition de 2 stéréoisomères appelés anomères α et β

Cyclisation possible grâce à la flexibilité du squelette carboné et l'hémiacétalisation intramoléculaire (formation d'un pont oxydique)

Aldose (hémiacétal) => **fonction pseudoaldéhyde**

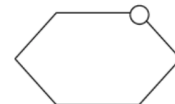
Cétose (hémiacétal) => **fonction pseudocétone**

Il existe 2 cycles les plus répandus dans la nature car les plus stables :

- les furanose
- les pyranose

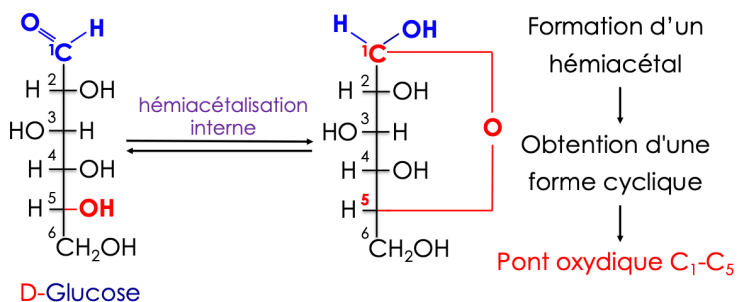


Furanose



Pyranose

CYCLISATION - REPRÉSENTATION DE TOLLENS :



Aldose	Pont oxydique
Pyranose	C ₁ -C ₅
Furanose	C ₁ -C ₄

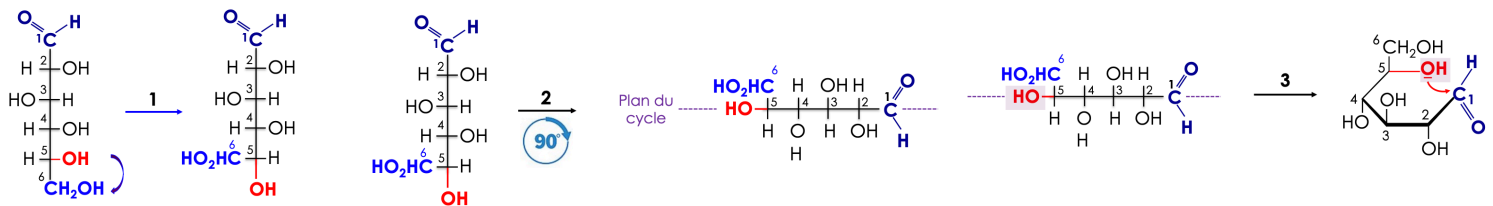
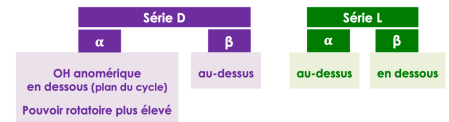
Cétose	Pont oxydique
Furanose	C ₂ -C ₅
Pyranose	C ₂ -C ₆

CYCLISATION - REPRÉSENTATION DE HAWORTH :

Par convention, **les OH situés à droite en projection de Fischer apparaîtront en-dessous du plan du cycle et ceux situés à gauche apparaîtront au-dessus du plan du cycle.**

Etape de la cyclisation :

- 1) le OH impliqué dans le pont oxydique est placé dans l'axe du squelette carboné
- 2) Rotation de la chaîne carbonée de 90° vers la droite
- 3) Attaque nucléophile du doublet libre de l'oxygène d'un côté ou de l'autre du carbone du carbonyle
- 4) Formation d'un pont oxydique C1-C5, deux stéréoisomères possibles



IV. Propriétés chimiques des glucides

Les aldoses sont des réducteurs dont la fonction réductrice est la fonction pseudoaldéhyde.

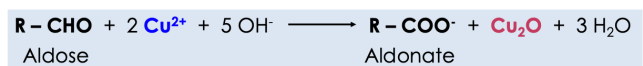
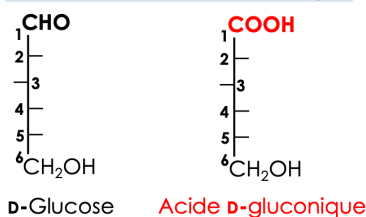
OXYDATION DES ALDOSES :

Le résultat va dépendre des conditions de la réaction : oxydation d'une seule fonction de l'ose :

- **I2 ou Br2 en milieu alcalin** : formation d'acides aldoniques

Nomenclature : **acide X-onique**

- **action de sels de métaux lourds** : mise en évidence d'aldoses réducteurs : précipité d'oxyde cuivreux de couleur rouge brique

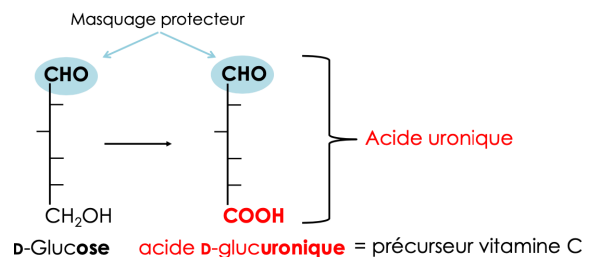


- **Oxydation avec masquage protecteur du C1**

Nomenclature : **acide X-uronique**

=> Constituants essentiels des GAG

=> Détoxyfication hépatique



RÉDUCTION DES OSES :

Aldéhyde ou cétone en fonction alcool par action d'un borohydrure ou par voie enzymatique

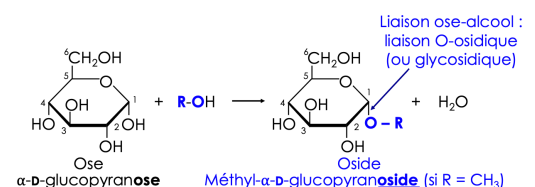
Aldoses : obtention d'un polyalcool => **suffixe -itol** => **sur le C1 -CHO ==> -CH2OH**

Cétooses : obtention de deux polyalcools épimères => **sur le C2 =O ==> -OH**

CONDENSATION DES OSES :

=> fonction hémiacétalique avec une fonction alcool, réaction particulièrement importante, obtention d'osides : holosides si R-OH est un ose ou O-hétéosides si R-OH n'est pas un glucide

=> fonction hémiacétalique avec une fonction amine :



- perte du pouvoir réducteur
- blocage dans la configuration α ou β

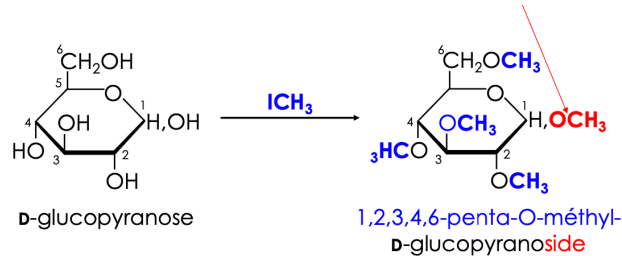
N-hétérosides avec liaison N-osidique

MÉTHYLATION DES OSES :

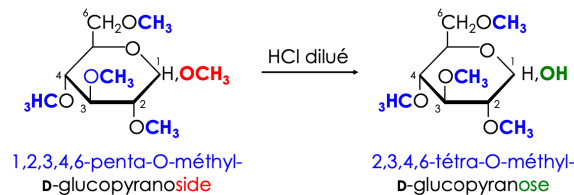
Réaction de perméthylation des groupements OH : substitution de l'hydrogène des OH libres par un CH₃, formation d'un groupement éther ou acétal

La méthylation est une méthode importante qui permet la détermination de la structure des cycles et la détermination de l'enchaînement des oses.

- si l'OH hémiacétalique est libre : formation d'un dérivé O-méthylé



- liaison osidique moins stable que la liaison éther : hydrolyse acide facile



V. Quelques oses et dérivés

LE GLUCOSE

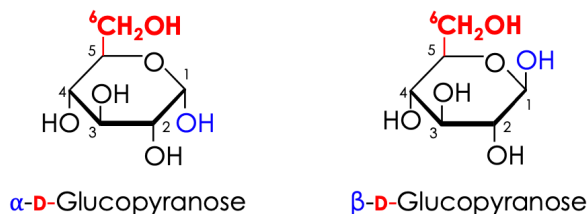
Aldohéxose adoptant un cycle pyranose

Dextrogyre

Libre ou combiné avec d'autres oses

Combustible de la cellule

Glycémie : 0,7 à 1,1 g.L⁻¹



LE GALACTOSE ET MANNOSE

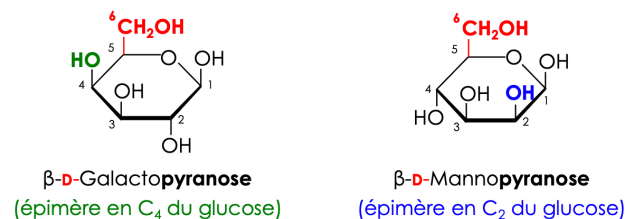
Aldohéxose adoptant un cycle pyranose

Dextrogyre

Moins abondant que le glucose

Galactose : lait et cérebrogalactosides

Mannose : ose abondant chez les végétaux

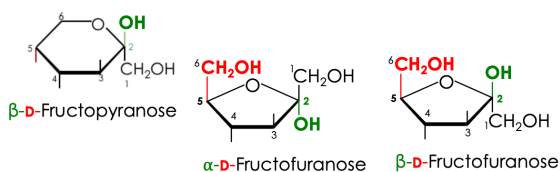


LE FRUCTOSE

Majoritairement pyranose

Forme linéaire élevée

Dans les fruits et le miel, lévogyre

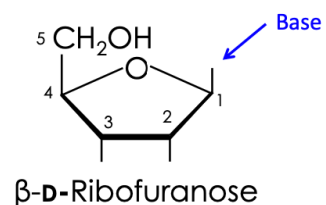


LE RIBOSE

Aldopentose : cycle furanose dans un oside

Lié aux bases par une liaison N-osidique

Dans la structure des coenzymes

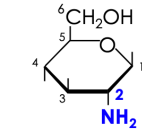


LES DÉSOXYOSES OU DÉOSES :

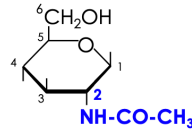
Substitution d'un groupement OH par un H (exemple : B-D-désoxyribose : constituant de l'ADN)

LES OSES AMINÉS OU OSAMINES :

Substitution d'un ou de plusieurs OH par un groupement amine souvent acétylé



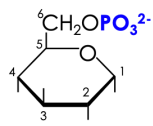
β -D-Glucosamine
(2-amino-2-désoxy-
 β -D-Glucopyranose)



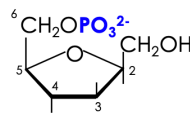
β -D-N-Acetyl glucosamine

LES OSES PHOSPHATES :

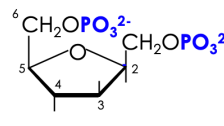
Transfert du groupe phosphate terminal de l'ATP sur un ose, nombreuses voies métaboliques



Glucose-6-
phosphate



Fructose-6-
phosphate



Fructose-1,6-
bisphosphate

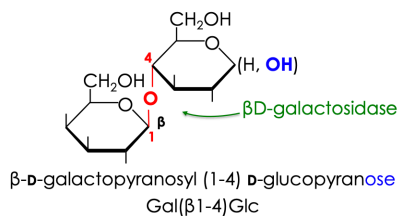
VI. Quelques diholosides

Mode de liaison des oses : condensation du OH hémiacétalique d'un premier ose avec la fonction OH d'un deuxième ose

- condensation de 2 OH hémiacétalique => liaison osido-oside : OH hémiacétalique bloqué dans sa configuration, **oside non réducteur (saccharose)**
- condensation OH hémiacétalique avec OH => liaison osido-ose : OH hémiacétalique libre, **oside réducteur (lactose)**

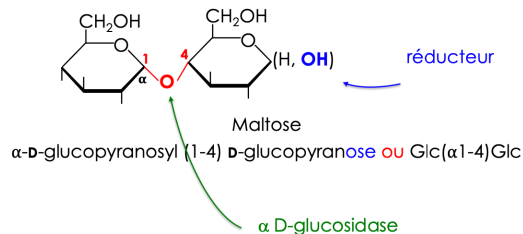
LE LACTOSE

Uniquement dans le lait, origine animale
Seul diholoside naturel **réducteur**
Galactose - Glucose



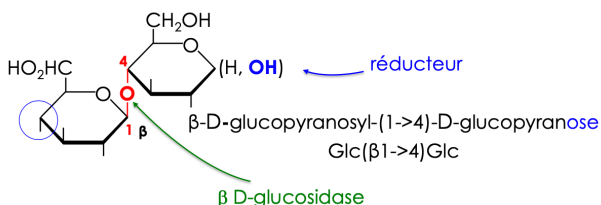
LE MALTOSE

Libéré par hydrolyse de l'amylose
Structure courbée
Glucose - Glucose



LE CELLOBIOSE

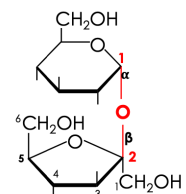
Libéré par hydrolyse de la cellulose
Épimère du lactose au niveau du C4 du premier résidu glucose
Structure linéaire



LE SACCHAROSE

Très présent dans le règne animal
Seul diholoside naturel **non réducteur**

α -D-glucopyranosyl (1-2) β -D-fructofuranoside
ou Glc(α1-β2)Fru
 β -D-fructofuranosyl (2-1) α -D-glucopyranoside
ou Fru(β2-α1)Glc



La réplication

I. Le modèle de la réplication

Réplication semi conservative :

- 1ère réplication : à partir d'une molécule d'ADN parentale, on obtient deux brins d'ADN (un parentale et un synthétisée).
- 2ème réplication : un double brin néosynthétisé et un double brin hybride

Réplication conservative :

- 1ère réplication : un double brin parentale et 1 double brin néosynthétisé
- 2ème réplication : 3 double brin néosynthétisé et un double brin parentale

Réplication dispersive : mélange dans les deux brins

=> La réplication est semi conservative : un brin parental et un brin néosynthétisé.

II. Fonctions et propriétés de l'ADN polymérase d'E.Coli

Les polymérases sont beaucoup plus simples car les génomes sont beaucoup plus petits que ceux de l'Homme.

Les ADN polymérases catalysent la formation d'une liaison phosphoester **entre le 3'OH du nucléotide n et le phosphate a sur le carbone 5' du nucléotide n+1.**

Le précurseur est un désoxynucléoside triphosphate (a, B et y).

Il faut un appariement des oligonucléotides pour former de courtes séquences double brin. Une fois l'appariement, la polymérase synthétise de 5' en 3' mais elle lit dans le sens 3' - 5'. Des molécules de pyrophosphates sont libérés, **la réaction est exergonique.**

Les polymérases ont besoin d'une matrice ADN et d'une amorce.

Il existe aussi une activité exonucléase 3'-5' et 5'-3', en plus de l'activité de polymérisation.

Activité exonucléasique 3'-5' : que se passe-t-il sans précurseurs dNTP ?

A l'issue de l'expérience, on remarque que sans précurseurs, l'ADN est hydrolysé par la polymérase (sens inverse de la polymérisation) => **libération de dNMP désoxyribonucleotide monophosphate.** Cette action sert à corriger les erreurs.

A la suite d'une erreur d'incorporation, il y a une distorsion de la molécule d'ADN car il ne forme pas le même nombre de liaisons avec le nucléotide complémentaire. L'activité polymérase s'arrête et l'activité exonucléase 3'-5' commence. Certaines mutations persistent et cela permet l'évolution du vivant. => **PROOFREADING**

La fidélité dépend du taux d'erreurs lors de la synthèse et de l'efficacité de relecture par l'activité exonucléasique.

- **1 base mal incorporé / 10 000**
- **1 mésappariement non réparé / 1 000**
- Taux d'erreur : 1 base toutes les 10

Activité exonucléasique 5'-3' :

Dans le même sens que la polymérisation, uniquement quand la polymérase rencontre une base devant elle, elle l'hydrolyse, libère un nucléotide monophosphate et insère un nouveau nucléotide.

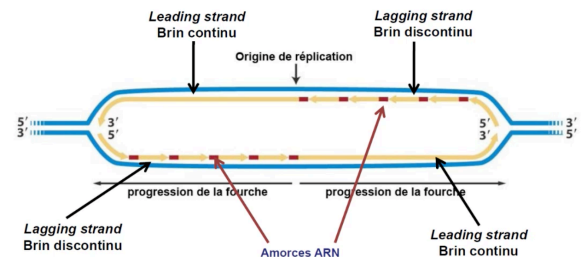
III. La primase

Pour la polymérisation, il faut une amorce et c'est le rôle de la primase de l'ajouter. Dans la cellule, ces fragments apparaissent comme **des amorces d'ARN.** Elle sont capable de synthétiser des petites amorces d'environ 11 nucléotides. Le 3' OH d'ARN ne pose pas de problème pour intégrer un ADN à la suite. On obtient **une molécule hybride** avec au début de l'ARN et à la suite de l'ADN synthétisé par la polymérase.

IV. Fonctionnement de la réplication dans les cellules

Réplication d'un chromosome circulaire : duplication du génome par les **boucles de réplication**. On cherche à savoir s'il y a un sens de réplication ou si la réplication va dans les deux sens. Pour cela, on a marqué radioactivement les dNTP afin de suivre leur évolution. On obtient un résultat qui nous démontre la présence de **deux fourches de réplication** qui vont progresser chacune de leur côté. **Les deux brins sont antiparallèles et sont répliqués en même temps.**

Les fragments d'Okazaki : la polymérase ne peut allonger le brin que de 5' vers 3'. On obtient un brin continu et un brin discontinu avec plusieurs fragments synthétisés par des amorces. Dans le brin continu, on a qu'une amorce alors que **dans le brin discontinu il y a plusieurs amorces**. Cela permet d'expliquer comment les deux brins peuvent être synthétisés en même temps.



L'élimination des amorces :

Chaque fragment est composé d'amorces d'ARN, cette situation n'est pas viable donc il faut les remplacer par de l'ADN.

L'ADN polymérase III n'a pas l'activité exonucléasique 5'-3'.

L'RNase H va éliminer les ARN des amorces et l'ADN polymérase va remplacer l'ARN par de l'ADN. Le seul problème est de réparer les brèches entre l'ADN et l'ancienne amorce d'ARN.

Les ADN ligases sont des enzymes capables de reconstituer la liaison phosphoester entre le carbone 3'OH et le phosphate 5' de deux nucléotides voisins sur un brin d'ADN. En revanche les nucléotides sont déjà monophosphate donc faut trouver l'énergie pour former cette liaison. L'ADN ligase n'ajoute pas de nucléotides.

Cette énergie est fournie soit :

- par l'hydrolyse de NAD^+
- par l'hydrolyse d'ATP.

L'hélicase catalyse le déroulement et la séparation des deux brins parentaux. Elle agit contre les liaisons hydrogènes entre les bases qui sont appariées. **Grâce à l'hydrolyse de l'ATP**, elle va pouvoir avancer. C'est un hexamère, avec un trou au milieu où un des deux brins d'ADN passe à travers.

Les protéines SSb permettent de maintenir l'ADN sous une forme simple brin pour la réplication. Elle se fixe à l'ADN polymérase et démêle le simple brin pour que l'ADN polymérase puisse fonctionner correctement (fixation faible).

Les topoisomérases :

La fourche de réplication est bloquée. Elles sont connues pour 2 caractéristiques :

- elles sont capables d'hydrolyser et de reformer une liaison phosphoester de l'ADN par l'intermédiaire de **2 réactions de transestérification**.
- La coupure transitoire permet le passage d'un segment d'ADN simple brin ou double brin

=> Topoisomérases de type 1 : **hydrolyse d'un des deux brins de l'ADN**

Après la coupure, il y a liaison covalente entre l'extrémité 5' P de la brèche (ADN) et l'OH de la tyrosine. Il y a ensuite rotation d'un brin au-dessus de l'autre puis réassociation. Et enfin, il y a dissociation de la topo iso 1.

=> Topoisomérases de type 2 (ATP dépendante) ou **gyrase** : **hydrolyse des deux brins de l'ADN**, enzyme dimérique

À la fin de la réplication d'un ADN circulaire, il faut séparer les deux doubles brins d'ADN circulaire. L'enzyme va se lier de façon covalente sur les deux extrémités du brin coupé. La barrière créée par la topoisomérase s'ouvre et se ferme pour laisser passer la seconde hélice d'ADN. La réversibilité de la liaison covalente de la topoisomérase rétablit une double hélice intacte.

=> séparation des 2 doubles hélices d'ADN circulaire

Les étapes de la réplication :

- L'hélicase se lie à l'origine de réplication, elle a besoin d'ATP
- L'ADN gyrase ou topoisomérase 2 : crée des supertours négatifs pour compenser l'apparition des supertours positifs due au déroulement de l'ADN.
- Les protéines SSB se lient à l'ADN et débloquent les endroits emmêlés
- La primase synthétise des amorces d'ARN de 4-10 bases : une sur le brin continu et plusieurs sur le brin discontinu
- L'ADN polymérase III reconnaît l'extrémité 3'OH des amorces et poursuit la synthèse d'ADN
- L'ADN polymérase I hydrolyse les amorces d'ARN (activité exonucléasique que l'ADN polymérase III n'a pas) et poursuit la synthèse d'ADN pour remplacer l'ARN
- L'ADN ligase permet de lier les fragments d'ADN entre eux, elle consomme de l'ATP

V. Les plasmides

Molécules d'ADN doubles brins circulaires existant naturellement dans la bactérie.

Molécules indépendantes du chromosome bactérien

Réplication autonome dans la bactérie : propre origine de réplication, nombres de copies variable en fonction du type de plasmides

Porteur d'au moins **un gène non essentiel à la bactérie** hôte mais lui conférant **une propriété particulière (résistance à un antibiotique) : environ 250 copies**

Exemple : plasmide pBR322 : deux gènes de résistance à l'**ampicilline** et à la **tétracycline** (Tetr et Bla), plusieurs sites de restriction uniques.

Structure tertiaire des plasmides :

Plus il est superenroulé, plus il va migrer dans un gel.

Les différentes formes d'un plasmide : superenroulé, relâché, relâché avec brèche ou linéaire.

Celui qui migre le plus à celui qui migre le moins : **plasmide natif > plasmide linéarisé > plasmide relâché.**

Les endonucléases de restriction :

Reconnaissance d'une séquence définie de l'ADN et hydrolyse des deux brins dans ou à proximité de cette séquence => **système de défense des bactéries**, phénomène de restriction de l'infectivité des bactéries par certains bactériophages

Pour se défendre, elle va produire une enzyme qui va détruire l'ADN étranger sans détruire le sien. Il faut qu'elle reconnaisse une suite de nucléotide présente chez le phage et pas chez elle.

=> **Type II** : utilisé pour la cartographie et le clonage avec un **site de reconnaissance symétrique et palindromique** (même séquence sur chaque brin en lisant de 5'-3')

le site d'EcoRI : GAATTC

L'hydrolyse par une enzyme de restriction génère une extrémité 5'P et une extrémité 3'OH.

Transcription

I. Notion de régulation transcriptionnelle

Réplication : mécanisme permettant la duplication de l'ADN nécessaire à la transmission de l'information génétique d'une cellule mère à deux cellules filles

ADN : séquence nucléotidique contenant toute l'information génétique

Protéines : Séquence d'acides aminés conférant des caractères biologiques

ARN : séquence nucléotidique utilisée comme intermédiaire dans la synthèse des protéines, transcription à partir de l'ADN

A partir du glucose, la bactérie **Escherichia coli** effectue la glycolyse/fermentation/respiration afin de produire de l'**ATP**, du **CO₂** et de l'**H₂O**.

A partir du lactose, la bactérie *Escherichia coli* produit du glucose grâce à la **B-galactosidase**. À partir d'un lactose, la B-galactosidase produit **1 galactose et 1 glucose**. Le lactose induit la synthèse de B-galactosidase.

A quel niveau se fait la régulation ?

L'acide désoxyribonucléique (ADN), à deux brins, est transcrit en acide ribonucléique (ARN) à un seul brin. L'ARN est traduit ensuite en protéines par des ribosomes, des ARNt et de l'énergie. Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines. Il y a environ **10⁶ copies d'une protéine par cellule**.

Tous ces mécanismes permettent l'**amplification**, le **contrôle des niveaux d'expressions** et la **protection de l'information génétique**.

II. L'ARN polymérase procaryote

L'ARN polymérase bactérienne a une vitesse d'élongation de **100 nucléotides/seconde**.

Le brin d'ADN transcrit est complémentaire du brin d'ARN.

L'ADN a deux brins :

- le **brin non transcrit ou brin codant (5' => 3')**
- le **brin transcrit ou brin matriciel (3' => 5')**

Rappels des 4 bases azotées : cytosine, thymine, uracile, guanine, adénine

Le nucléotide d'ARN est composé d'un ribose, d'un ou plusieurs phosphates et d'une base azotée. Il y a 2 liaisons **anhydride d'acide** (riche en énergie) et 1 liaison **phosphoester**. Le ribose est lié à la base azotée par une liaison **N-glycosidique**.

Lors d'une réaction d'élongation, il y a **libération d'un PPi**. Elle utilise des **ribonucléosides triphosphate comme précurseurs**. L'élongation se fait du 5' P vers 3' OH. **L'ARN polymérase a besoin d'une matrice d'ADN pour transcrire** et permet la synthèse d'ARN de novo. Les ARN polymérases sont moins fiables que les ADN polymérases.

III. Le démarrage de la transcription chez les procaryotes

Il y a 3 étapes : démarrage, élongation et terminaison

Chez les procaryotes, c'est le **facteur sigma** qui cible l'ARN polymérase sur le promoteur et permet de l'ancrer sur le brin d'ADN. Le facteur sigma est **spécifique de l'étape de démarrage**. Le niveau de transcription varie d'un promoteur à l'autre. On retrouve les promoteurs faibles et les promoteurs forts.

Promoteur fort : très bon recrutement de la polymérase par sigma, proche du consensus => **beaucoup de copies**

Promoteur faible : fiable recrutement de la polymérase par sigma, éloigné du consensus => **pas beaucoup de copies**

Le niveau de transcription d'un promoteur reflète la fréquence de démarrage de l'ARN polymérase et le niveau de transcription d'un promoteur est défini par **la qualité de l'interaction du promoteur avec un facteur sigma**.

Reprogrammation de l'ARN polymérase en fonction de la température :

A 30°C, le facteur sigma 70 se fixe sur des **promoteurs standards**, boîte cat et tata. En revanche, à 42°C, le facteur sigma 32 se fixe sur des **promoteurs des gènes de choc thermique** avec les mêmes régions mais des séquences différentes des boîtes normales.

IV. L'élongation et la terminaison de la transcription chez les procaryotes

L'élongation forme un **canal à ribonucléosides triphosphates** afin d'allonger et de rajouter des bases toujours dans le sens 5' vers 3'. Du côté du 5'P, il y a un système de **supertours négatifs** en revanche du côté du 3'OH ce sont des **supertours positifs**.

Un événement de transcription transcrit un seul brin, c'est pour cela que deux unités de transcription se forme chacun allant à l'opposé de l'autre. De plus, il y a formation d'une **bulle de transcription**.

À la fin, l'ARN polymérase détecte un **terminateur qui signale la fin de la transcription**. La transcription se met en pause et il y a **isomérisation puis décrochage de l'ARN polymérase**. L'ARN polymérase détecte la **région palindromique** constitué d'une partie riche en G/C et d'une région riche en A. Les deux régions sont transcrites et il y a formation d'une **structure tige-boucle puis déstabilisation des liaisons A-U**. Enfin, il y a séparation du brin d'ARN et du brin matrice, ça marque la **fin de la transcription**.

La terminaison est Rho dépendante, fixation de Rho sur Rut, puis translocation de Rho sur le brin d'ARN et enfin dissociation de l'ARN polymérase, de Rho et du brin d'ARN.

Exemple d'antibiotique ciblant l'ARN polymérase procaryote : **la rifampicine**.

V. L'organisation du génome procaryote

L'unité de transcription est définie par :

- Le **site où débute la transcription** : nucléotide +1
- Le **sens de transcription** (choix du brin transcrit)
- Le **site où s'arrête la transcription** : terminateur

Les définitions de gène et d'unité de transcription sont chevauchantes mais pas équivalentes.

Chez les procaryotes, **une unité de transcription peut contenir un ou plusieurs gènes**. Un gène peut coder **une protéine, un ARNt, un ARNr, ou un ARN régulateur**. Les ARNr et les ARNt ont un rôle dans la traduction des ARNm en protéines. Et les ARN régulateur ont un rôle dans la **régulation de l'expression génétique**.

ARNr et ARNt : stables et abondants

ARNm et ARN régulateurs : instables et minoritaires

Chez les procaryotes, les ARN messagers sont souvent polycistoniques. La synthèse de plusieurs protéines d'un même ARN peut se faire **coordonnées**.

L'opéron lactose est une unité de transcription procaryote.

VI. L'opéron lactose

La **présence de lactose induit la transcription de l'opéron lactose** qui va permettre la synthèse de la B-galactosidase, d'une perméase et d'une trans-acétylase.

Le **glucose est préférentiellement métabolisé**. Dans un milieu en présence de glucose et de lactose, on va pouvoir observer une première étape de métabolisation du glucose (opéron lactose)

non transcrit), suivie d'une phase de métabolisation du lactose (opéron lactose transcrit). Et ce, quelque soit la proportion entre les deux sucres dans le milieu.

En revanche, après **ajout de glucose** d'un milieu en présence d'inducteur, **la synthèse d'ARN lac chute fortement**.

La présence de lactose (en absence de glucose) induit très rapidement d'un **facteur 1000 la synthèse des ARNm codant la protéine B-galactosidase** donc des gènes de l'opéron lactose.

VII. L'induction de l'opéron lactose par le lactose est sous contrôle négatif

Résultats des expériences :

La protéine LacI, une fois fixé sur l'ADN inhibe la transcription.

En absence d'inducteur : la protéine LacI réprime la transcription de l'opéron lac => **répresseur transcriptionnel**

En présence d'inducteur : la protéine LacI ne réprime plus la transcription de l'opéron lac => le **complexe inducteur-répresseur ne peut pas se fixer** sur l'opérateur

En présence de lactose, il y a un changement de conformation sur le répresseur LacI => **le répresseur devient inactif** et ne peut plus inhiber la transcription de l'opéron lac.

LacI exerce un contrôle négatif sur l'opéron lac ; l'activation de la transcription de cet opérons résulte de la levée d'une répression en présence de l'inducteur (lactose). En absence, de lactose, l'opéron lactose n'est pas totalement réprimé (niveau basal de transcription)

VIII. Répression de l'opéron lactose par le glucose sous contrôle positif

On a vu que le glucose est préférentiellement métabolisé. Il y a une **répression de l'opéron lac, uniquement en présence du glucose** en complément du lactose.

Le démarrage de la transcription de l'opéron lac **nécessite la présence d'activateurs telle que la protéine CRP** en amont du promoteur. La protéine CRP-AMPc permet le recrutement direct de l'ARN polymérase et déforme la double hélice => exerce un **contrôle positif sur la transcription**

Faible quantité de glucose => AMPc élevé => **transcription**

Forte quantité de glucose => AMPc faible => **taux de transcription faible**

CRP ne peut se fixer à l'ADN et donc activer la transcription que quand elle est liée à l'AMPc.

Conclusion :

- + glucose +lactose : opéron exprimé au niveau basal
- + glucose -lactose : opéron inactivé
- - glucose - lactose : opéron inactivé
- - glucose + lactose : opéron activé

IX. Régulation transcriptionnelle chez les procaryotes

Le niveau de transcription en absence de toute régulation est déterminé par le promoteur.

La **reprogrammation de l'ARN** polymérase par différents facteurs sigma influencent le niveau de transcription ainsi que la **présence d'activateurs ou de répresseurs**.

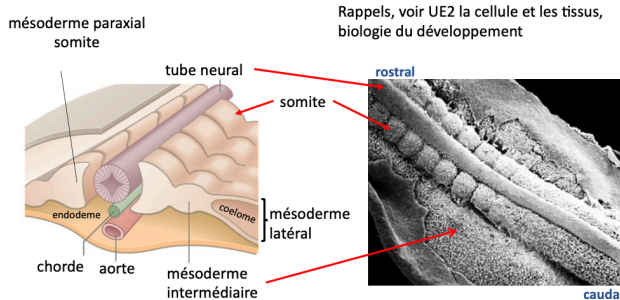
- Contrôle positif : activateurs : augmentation du niveau de transcription
- Contrôle négatif : répresseur : diminution du niveau de transcription

Les protéines se lient aux séquences d'ADN grâce à des **combinaisons particulières de liaisons hydrogènes vers l'extérieur de la double hélice**. L'information accessible par le grand sillon est plus riche.

Données anatomiques de l'organogénèse du rein

Le **mésoderme intermédiaire** est situé entre le mésoderme paraxial et latéral. Il se forme dans la région cervicale et thoracique supérieure des amas cellulaires segmentés de façon métamérique, **les néphrotomes (les pièces intermédiaires)**.

Le mésoderme intermédiaire se différencie de la région crâniale à la région caudale. Chez les vertébrés, trois structures se mettent en place séquentiellement : **les néphrotomes cervicaux (pronéphros), le mésonéphros, le métanéphros ou rein définitif**.



Pendant longtemps par analogie avec la souris, le pronéphros a été décrit chez l'humain.

En 2019, une analyse histologique a permis à Bakker et coll. de démontrer qu'**il n'y a pas de pronéphros chez l'humain**.

Dans les régions plus caudales, le mésoderme intermédiaire non segmenté forme une crête longitudinale dorsale, qui évoluera pour donner **la crête uro-génitale**. Elle sera à

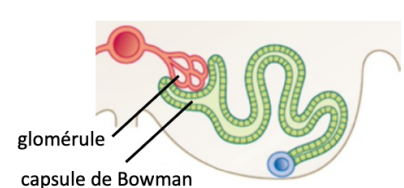
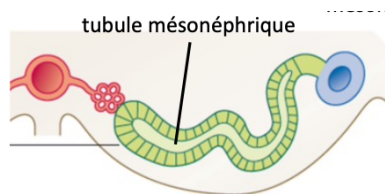
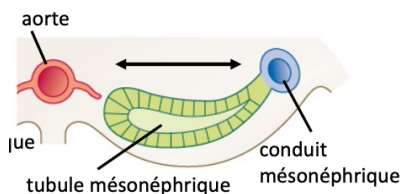
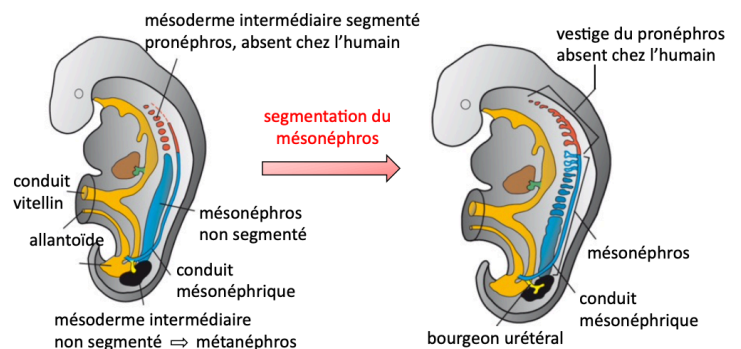
l'origine du mésonéphros et des gonades. Dans la région caudale, le mésoderme intermédiaire non segmenté forme un mésenchyme qui évoluera pour donner **le métanéphros, le rein définitif**.

Entre les jours 24-25, le mésonéphros se segmente séquentiellement de la région rostrale vers la région caudale. Dans le même temps un conduit se ségrège. Ainsi apparaissent les deux structures du mésonéphros: **les néphrotomes, les conduits mésonéphriques**.

Les deux conduits mésonéphriques sont des cordons cellulaires solides issus de la condensation du mésoderme intermédiaire. Les cordons s'étendent en direction caudale par prolifération et migration des cellules. **Ils fusionnent avec le cloaque au jour 26**.

Puis ils se creusent d'une lumière de la région crâniale vers la région caudale. Les cordons cellulaires deviennent donc des conduits : les conduits mésonéphriques ou **canaux de Wolff**. Les néphrotomes apparaissent de chaque côté de la colonne vertébrale, depuis la région thoracique jusqu'au niveau de **L3**.

A la fin de la 5^e semaine, les paires de néphrotomes régressent massivement dans la région crâniale. Il restera une **vingtaine de paires de néphrotomes dans la région lombaire**. Chaque néphrotome se creuse d'une lumière et s'allonge, donnant un tubule, le **tubule mésonéphrique**.



Les tubules mésonéphriques prolifèrent et rejoignent le conduit mésonéphrique. Ils prolifèrent également en direction de l'aorte. L'épithélium se déprime, s'aplatit et forme une cupule à double feuillet : **la capsule de Bowman**. Elle enveloppe une pelote de capillaires : **le**

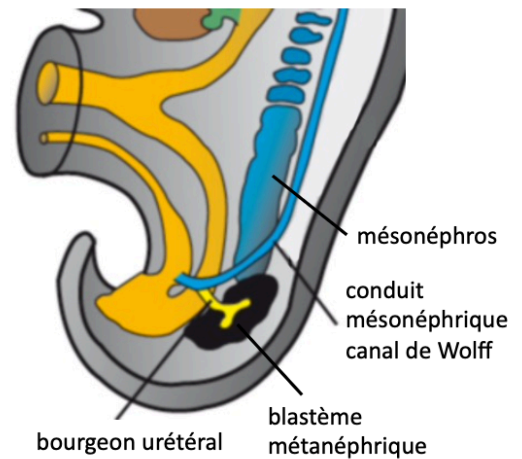
glomérule. L'ensemble forme des structures mésonéphriques fonctionnelles entre les semaines 6 à 10 qui produisent de l'urine. Ces unités excrétrices ressemblent aux néphrons du rein de l'adulte. Elles régressent après la 10^e semaine.

Les reins définitifs ou métanéphros commencent à se former dans la région caudale **vers le 28^e jour**. Un bourgeon urétéral émerge à partir de chaque conduit mésonéphrique.

Vers le jour 32, chaque bourgeon pénètre dans le mésoderme intermédiaire sous-jacent appelé **blastème métanéphrique**.

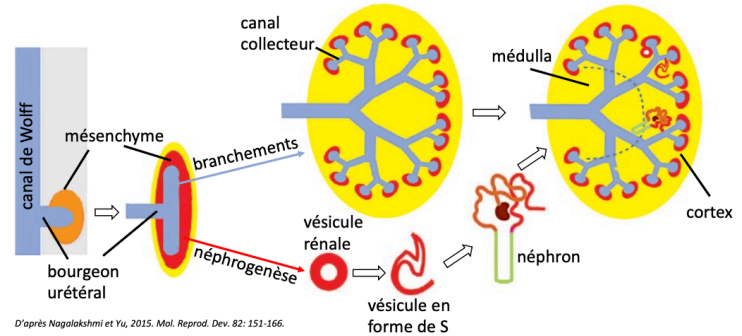
Le blastème formera la totalité des néphrons.
Le bourgeon urétéral donnera le système excréteur des reins : l'uretère, le bassin, le grand et petit calices et à un nombre variant entre 1 et 3 millions de tubules rénaux.

Entre les bourgeons et les blastèmes, une série d'inductions réciproques va générer les reins définitifs de l'embryon. Ils auront **leur architecture définitive vers la 10^e semaine**.

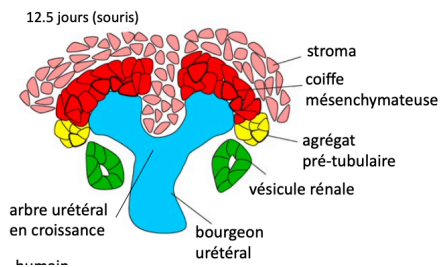


Formation et structuration du système tubulaire du néphron

Le développement rénal commence quand un bourgeon urétéral, excroissance du canal de Wolff, envahit le mésenchyme métanéphrique. Le bourgeon urétéral subit des cycles répétés de ramifications pour former **le système des canaux collecteurs**. L'épithélium du bourgeon urétéral induit **la néphrogenèse** dans le mésenchyme. Les progéniteurs des néphrons dans le mésenchyme s'épithélialisent pour former la vésicule rénale, qui se développe ensuite en vésicule en forme de S avant de **se différencier complètement en néphron**. Les reins sont divisés en cortex et médulla chacun enrichi de différents segments des néphrons et des conduits collecteurs.



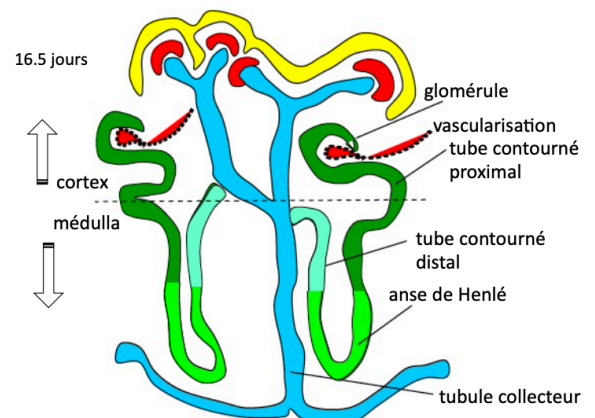
A 11.5 jours, à l'apex des branchements (arbre urétéral), le mésenchyme se ségrège **en stroma** (mésenchyme lâche) et en **coiffe mésenchymateuse**, mésenchyme condensé. Sous les extrémités de l'arbre urétéral en croissance, la différenciation de la coiffe mésenchymateuse s'initie avec l'apparition d'un agrégat de cellules mésenchymateuse, **l'agrégat pré-tubulaire**.



Le bourgeon urétéral génère le système tubulaire collecteur, excréteur.

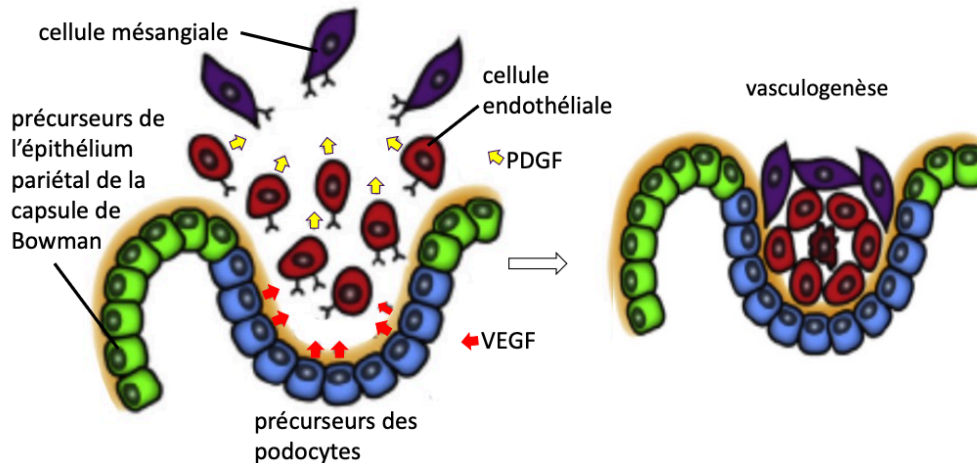
La coiffe mésenchymateuse génère le néphron : capsule de Bowman, glomérule et tubules. A **12.5 jours**, l'agrégat pré-tubulaire se différencie pour former **la vésicule rénale**. Elle est formée de cellules épithéliales polarisées et d'une cavité. La vésicule rénale prolifère et se différencie en vésicule en forme de virgule, puis en forme de S. La vésicule en forme de S prolifère et fusionne avec l'épithélium d'un tubule collecteur.

Une seconde phase se produit après J 16.5. Il y a une croissance et une structuration accrues des segments de néphron associés à l'expansion du cortex rénal et la structuration de la région médullaire du rein adulte. Chez l'humain, les premiers néphrons vont apparaître **entre la 5e et la 8e semaine**. Ils ne seront pas fonctionnels. Les premiers néphrons fonctionnels apparaissent après **la 9e semaine**.

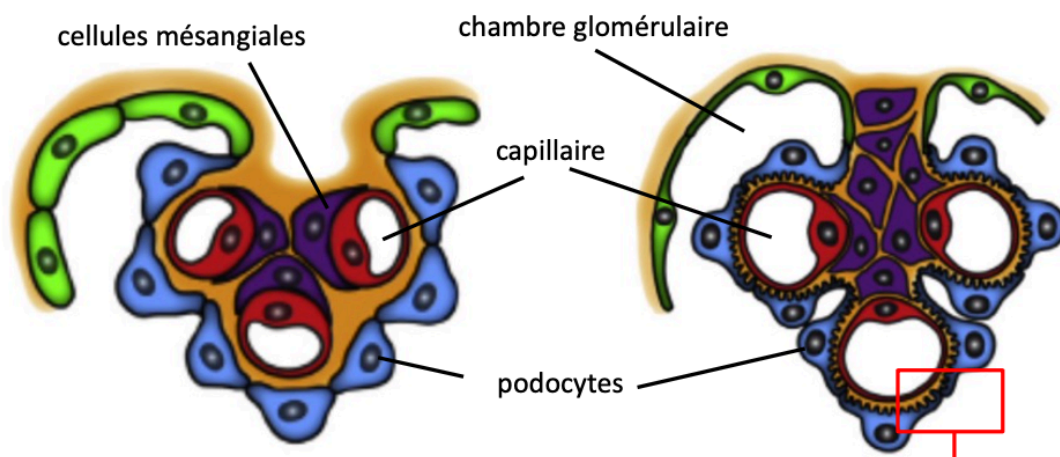


Formation et structuration du glomérule

Au stade de la vésicule en forme de S, les cellules progénitrices des podocytes produisent un facteur de croissance (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, **VEGF**). Il attire **les cellules endothéliales** qui possèdent le récepteur au VEGF. A leur tour, elles produisent un facteur de croissance (facteur de croissance dérivé des plaquettes, **PDGF**) qui attire **les cellules progénitrices mésangiales**. Les cellules endothéliales s'agrègent. Les agrégats se creusent d'une lumière par apoptose pour former un capillaire.



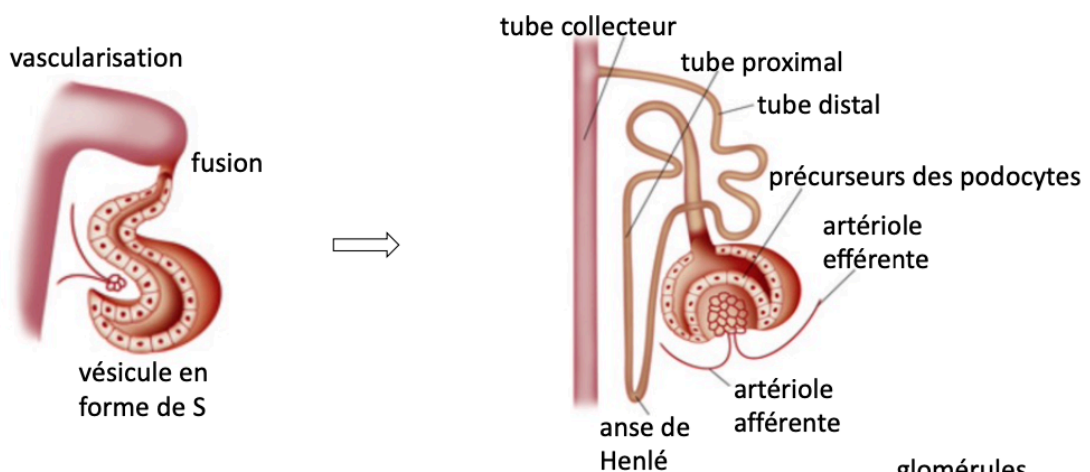
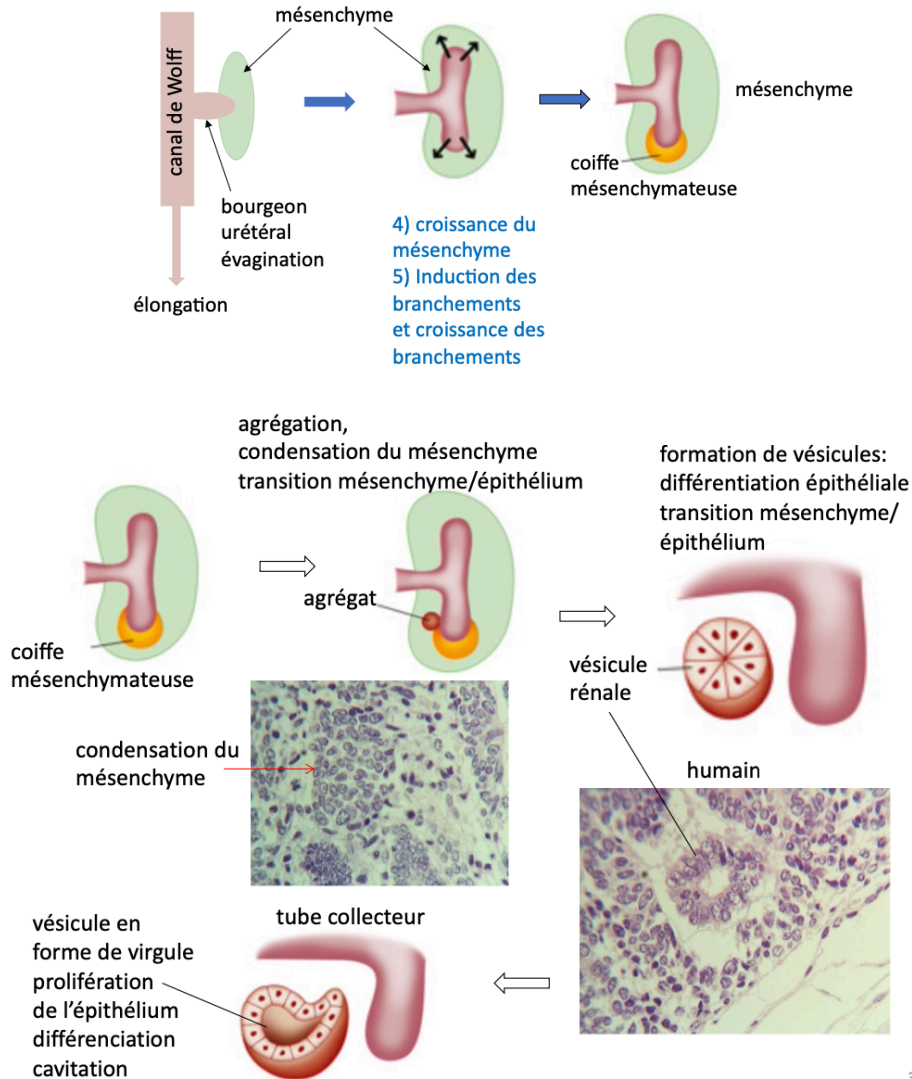
Les cellules mésangiales se fixent aux cellules endothéliales du capillaire initial et génèrent des contraintes mécaniques qui provoquent des courbures puis boucles des capillaires. Les cellules épithéliales viscérales, précurseurs des podocytes, entrent en contact avec les cellules endothéliales et commencent à se différencier. Elles **contribuent également à la forme globale des capillaires**. La membrane basale est située à l'interface entre les podocytes et les cellules endothéliales. **Ces 2 types cellulaires sécrètent les composants de cette membrane.**



Les événements morphogénétiques

- 1) Elongation du canal de Wolff
- 2) spécification du mésenchyme
- 3) évagination d'un bourgeon

- 6) induction et condensation du mésenchyme à l'apex des bourgeonnements
- 7) transition mésenchyme/épithélium



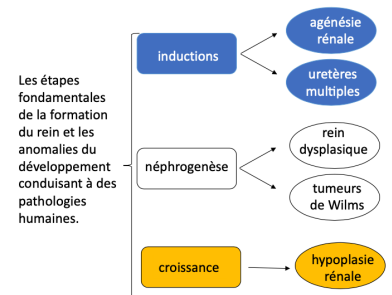
glomérules

Les maladies et les malformations congénitales

Les anomalies congénitales des reins et des voies urinaires (CAKUT) surviennent chez **~1 / 500**

naissances vivantes et sont une des principales causes d'insuffisance rénale pédiatrique. Les CAKUT sont dues à des mutations dans un grand nombre de gènes et présentent un large spectre de phénotypes.

Avec un temps d'attente moyen de **3 à 5 ans pour une transplantation rénale**, le besoin est grand de comprendre où, quand et comment apparaissent ces malformations.



Agénésie rénale unilatérale ou bilatérale : absence complète par absence de l'ébauche embryonnaire



Dysplasie : organisation anormale d'un organe



Rein polykystique : kystes volumineux qui recouvrent la majorité du rein (le rein dysplasique multikystique MCDK ; le polykystose rénale autosomique dominante ADPKD)



Tumeurs : sclérose tubuleuse, tumeur de Wilms



Hypoplasie : insuffisance de développement de l'ébauche du rein



Rein en fer à cheval : les deux reins sont fusionnés



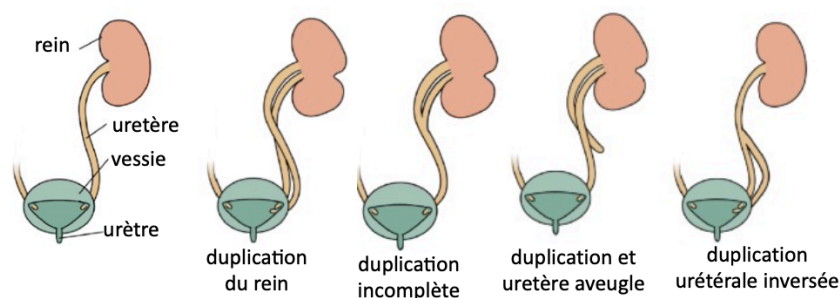
Néphronophthisie : destruction symétrique progressive des reins impliquant à la fois les tubules et les glomérules.



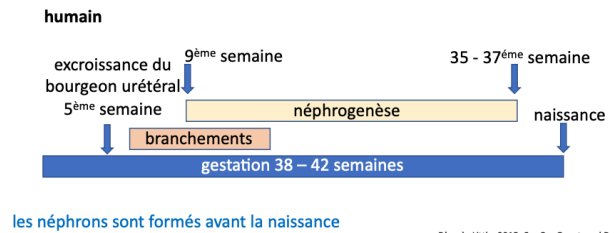
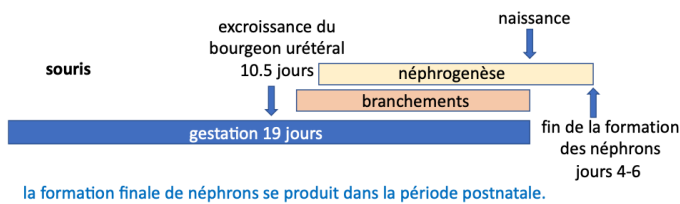
Malformations de l'uretère (blocage) entraînant des reflux d'urine dans les reins

Les **duplications rénales**, une forme relativement fréquente de CAKUT qui sont souvent asymptomatiques mais prédisposent au reflux vésico-urétéral et à l'hydronéphrose.

L'hydronéphrose touche environ 11 naissances sur 10 000. Elle représente environ 50 % des malformations congénitales qui peuvent toucher un ou les deux reins.



La souris, modèle d'étude



Diwan et al. 2012. Eur J Cell Dev Biol 142

Il existe des différences dans la chronologie de développement entre la souris et l'humain. Chez la souris, la formation finale de néphrons se produit **dans la période postnatale**. En revanche, chez l'humain, les néphrons sont formés **avant la naissance**. Le rein embryonnaire humain se compose de 8 à 15 lobes, avec un arbre urétéral ramifié avec environ 1 million de néphron. Le rein de souris est unipapillé avec environ 14 000 néphrons.

Il faut garder à l'esprit que, malgré un degré élevé de conservation, les souris et les humains présentent des **différences significatives au niveau génétique, cellulaire et moléculaire**. Les résultats chez les souris sont donc uniquement indicatifs et ne doivent pas être directement extrapolés aux pathologies humaines.

LES PREMIÈRES ÉTUDES

Les recherches sur les aspects cellulaires et moléculaires du développement du rein ont commencé avec les travaux pionniers de **Clifford Grobstein publiés en 1956**.

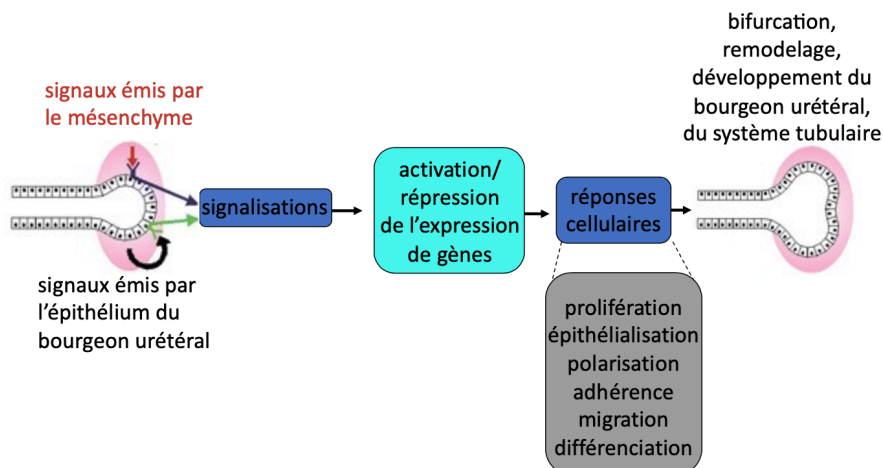
Après avoir fait des microdissections et avoir dissocié le bourgeon urétéral du mésenchyme, il obtient la **mort cellulaire des deux tissus**. On peut donc se demander s'il y a une interaction cellulaire entre le bourgeon urétéral et le mésenchyme.

La deuxième expérience consiste à placer d'un côté les deux tissus séparés par un obstacle et de l'autre séparés par un filtre. La seule situation qui aboutit à la **formation de vésicules est en présence du filtre**. On en conclut que la formation de vésicules rénale à l'origine des néphrons nécessite une **interaction entre le bourgeon et le mésenchyme**.

La troisième expérience consiste à apposer une partie du toit du tube neural ou de la chorde avec le mésenchyme séparés par un filtre. On aboutit à la ségrégation des cellules du mésenchyme donc **formation des vésicules**. Le **tube neural ou la chorde sont inducteurs** ; 18h de contact sont nécessaires.

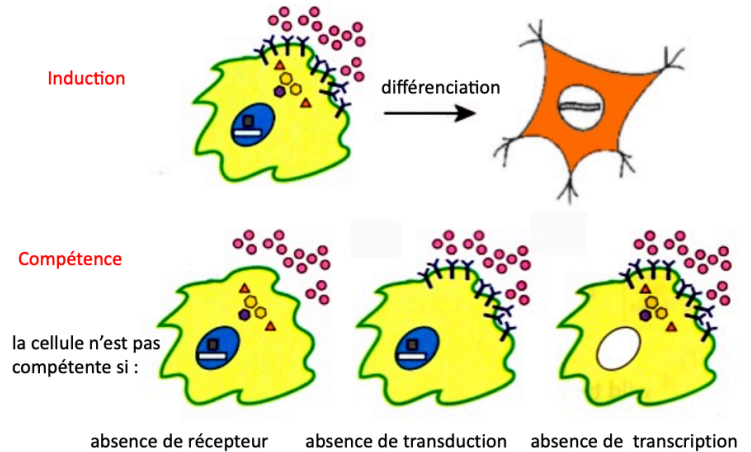
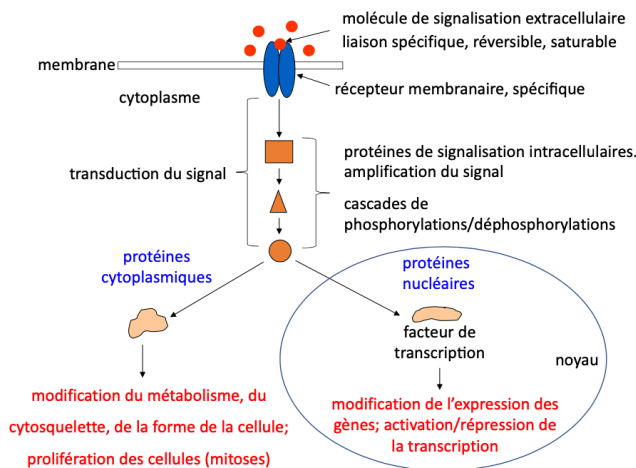
Il y a également une spécification du mésenchyme. Les branchements ne se font qu'en présence d'un **bourgeon spécifique**.

Ces données nous suggèrent : **interactions réciproques, inductions**.



RAPPELS SUR L'INDUCTION :

L'induction c'est la propriété qu'a une cellule, un groupe de cellules, un tissu d'**influencer le développement d'une autre cellule**, tissu généralement situé à proximité. L'induction engage la, les cellules, le tissu dans une voie de différenciation. Elle **provoque la détermination**. Ce concept d'induction est indissociable de celui de **compétence**.



MÉTHODES D'ÉTUDES :

- **cultures organotypiques** : culture d'ébauches ou de fragments d'ébauches d'organes embryonnaires, permet l'analyse de la différenciation de l'organe et des rapports mutuels existant entre les tissus qui le constituent
- **cultures transfiltres** : voir les expériences précédentes C. Grobstein (1950).
- **organoïdes** : structures multicellulaires tridimensionnelles qui reproduisent *in vitro* le développement, la différenciation et l'anatomie d'un organe. Formés à partir de cellules souches, ou de cellules progénitrices, qui s'auto-organisent dans un environnement 3D adapté (hydrogel, environnement matriciel poreux). Des facteurs de croissance et de différenciation, dont la nature, la quantité et la fenêtre d'exposition guide la différenciation de l'organoïde.
- **mutations murines ou humaines**
- **invalidation de gènes**

INVALIDATION D'UN GÈNE

Chez la souris, pour connaître la fonction d'une protéine codée par un gène, la méthode la plus efficace consiste à faire **surexprimer ou supprimer celui-ci dans un tissu**, un organe et à observer les conséquences de ce manque sur le développement ou le fonctionnement de ce tissu ou organe. Gain ou perte de fonction. C'est à dire générer des animaux transgéniques

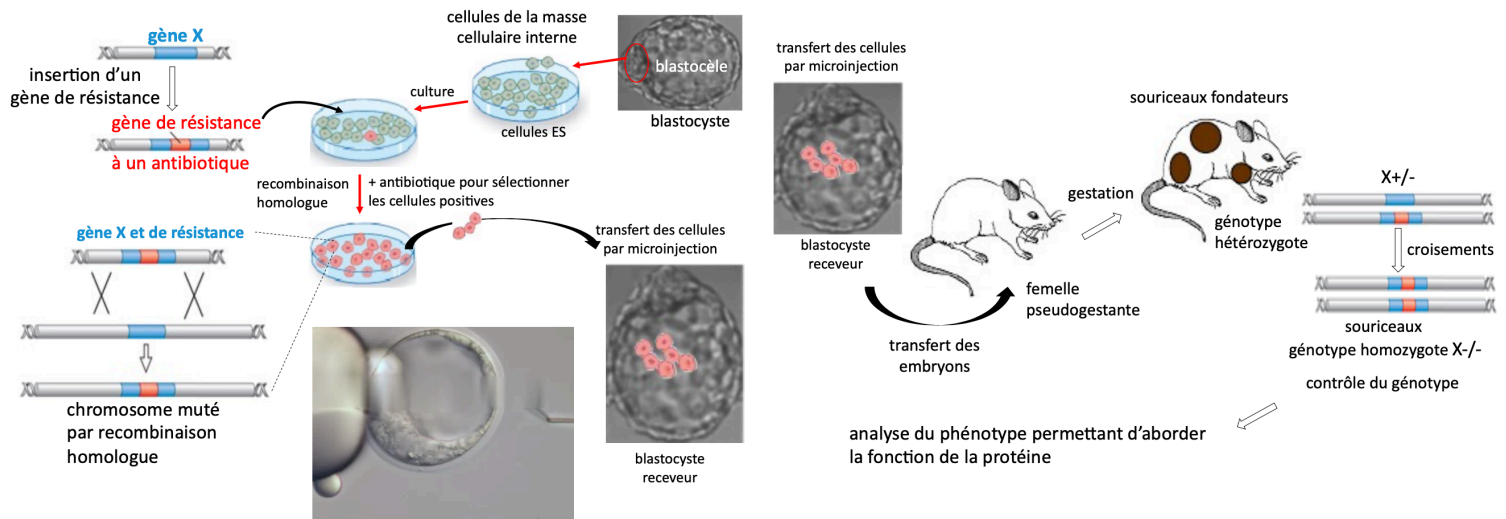
La transgénèse consiste:

- soit à ajouter une information génétique étrangère
- soit à remplacer très précisément un gène endogène par un gène étranger

Trois méthodes pour modifier le génome :

- **Micro-injection d'ADN** : Transgénèse additionnelle, insertion aléatoire d'un transgène dans le génome de la souris => souris transgéniques
- **Infection virale** : transgénèse additionnelle, insertion aléatoire d'un transgène dans le génome de la souris
- **Grefe de cellule** : invalidation d'un gène par recombinaison homologue, délétion ciblée d'une séquence génomique, transgénèse ciblée => souris KO

EXPÉRIENCE CHEZ LA SOURIS D'UN GÈNE DE RÉSISTANCE À UN ANTIBIOTIQUE :



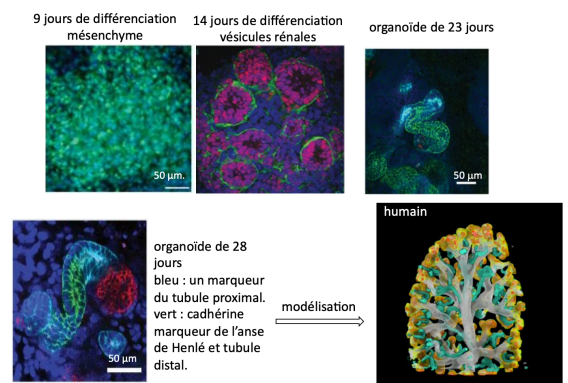
Les applications potentielles des cellules embryonnaires :

- génération d'animaux transgéniques pouvant servir de modèles : pour étudier la fonction de la protéine codée par le transgène, le gène d'intérêt ;
- pour analyser l'étiologie, l'apparition de la progression des maladies rénales humaines ;
- pour la recherche fondamentale
- les cellules souches embryonnaires peuvent être différenciées *in vitro* en différents types de cellules : neurales, sanguines, cellules musculaires, cellules rénales.

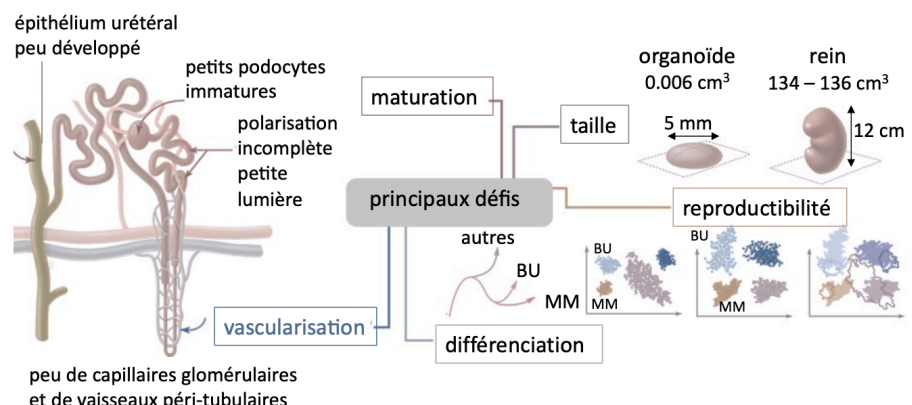
LES ORGANOÏDES

Les **corps embryoïdes** sont des **agrégats cellulaires générés *in vitro*** par culture en suspension de cellules souches pluripotentes, cellules de la masse cellulaire interne. Au cours des 3 premiers jours de culture, le développement des corps embryoïdes récapitule le développement de l'embryon avec apparition des trois feuillets embryonnaires : **endoderme, mésoderme et ectoderme**. Les progrès récents des techniques de culture permettent la génération d'organoïdes. En fonction des conditions de culture, ils **miment la différenciation des cellules et l'organisation structurale de l'organe d'intérêt**. Pour le rein, la difficulté aujourd'hui c'est d'**obtenir la formation d'un système vasculaire**.

Des limitations doivent être résolues avant que les organoïdes rénaux, à partir de cellules souches humaines, puissent être appliqués avec succès en tant que thérapie de remplacement pour les patients atteints de maladies rénales.



Les défis pour l'avenir :



Le mésenchyme initie le développement du bourgeon urétéral

GENE WT1

Le gène **WT1** (*Wilms tumor 1*) : code pour un facteur de transcription à doigt de zinc, bras court du **chromosome 11**, 50kb et comprend **10 exons**.

Souris : ARNm présents dès le 9^{ème} jour, au niveau de la crête urogénitale, puis toute la vie dans les gonades, au niveau **des cellules de Sertoli du testicule et de la granulosa de l'ovaire**.

Le gène WT1 est présents dans les cellules du **mésenchyme**, mais **pas dans le bourgeon urétéral**.

Lors d'une inactivation du gène WT1, les souris homozygotes **-/-** n'ont pas de rein. Cela devient létale à partir du 12^{ème} jour. Il n'y pas de branchements du bourgeon urétéral mais persiste une expansion du mésenchyme et les canaux de Wolff.

1^{ère} expérience : expériences **transfiltres** : mésenchyme **WT1^{-/-}** de souris ne répond pas aux inducteurs

2^{ème} expérience : cultures **organotypiques** après recombinaisons de tissus, souris :

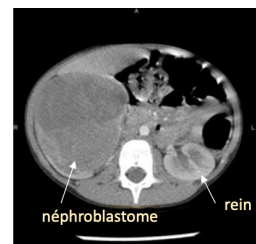
- mésenchyme WT1 **+/+** et bourgeon WT1 **+/+** : le bourgeon urétéral progresse dans le mésenchyme, formation du tube, branchements
- mésenchyme WT1 **-/-** et bourgeon WT1 **+/+** : pas de progression du bourgeon urétéral, pas de branchements, pas de formation de tube, mésenchyme dégénère
- mésenchyme WT1 **+/+** et bourgeon WT1 **-/-** : plusieurs BU, branchements, tube

=> **Le facteur de transcription WT1 est requis dans le mésenchyme (et pas dans l'épithélium du bourgeon urétéral)** pour assurer le développement du bourgeon urétéral, du système tubulaire du rein.

LES SYNDROMES CHEZ L'HUMAIN

Le **syndrome de Denys-Drash** qui touche des enfants en bas âge, des deux sexes, insuffisance rénale aiguë **un néphroblastome** (tumeur de Wilms, 1/10 000 enfant), 100-120 nouveaux cas/an en France. Elle survient le plus souvent chez des enfants âgés de **6 mois à 5 ans**. C'est la tumeur maligne rénale **la plus fréquente de l'enfant**.

Résulte de la prolifération incontrôlée du blastème métanéphrogène, souvent associé à **une aniridie et retard mental**. Chez individus XY, **une dysgénésie gonadique** (malformation d'un organe ou d'un tissu survenant pendant le développement) avec ambiguïté génitale. Guérison dans 90% des cas à condition que le diagnostic soit fait tôt. Elle touche parfois les 2 reins (5% des cas). **80 mutations du gène WT1 portés par le chromosome 11 ont été identifiées**.



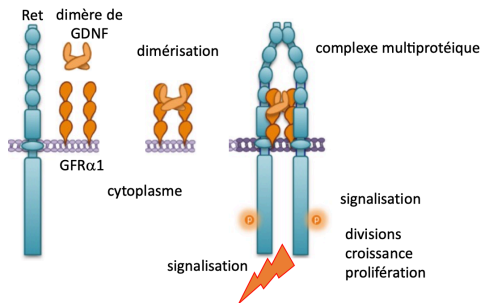
Le **syndrome de Frasier** est une affection définie par l'association d'une **dysgénésie gonadique complète** et d'une **néphropathie glomérulaire**. 150 cas ont été rapportés à ce jour. La prévalence de cette affection est inconnue. Les sujets atteints ont des **organes génitaux externes de type féminin**, un caryotype 46 XY. La néphropathie apparaît dans l'enfance et **évolue vers l'insuffisance rénale terminale à l'adolescence ou à l'âge adulte**. Des mutations hétérozygotes du gène **WT1** ont été retrouvées chez des patientes atteintes de syndrome de Frasier. Les 7 mutations responsables du syndrome de Frasier sont situées dans l'intron 9, site d'épissage alternatif, et conduisent à l'absence ou l'haplo-insuffisance du facteur de transcription. (un seul allèle actif. Protéine synthétisée en quantité insuffisante).

LE GDNF ET SON RÉCEPTEUR RET

Le GDNF et son récepteur Ret pourraient être un système inducteur :

GDNF : membre éloigné de **la famille des TGFb**, facteur neurotrophique dérivé d'une lignée de cellules gliales, sécrétée, retrouvée dans le cerveau exprimé par les cellules du mésenchyme

La signalisation GDNF/Ret :



avant son invasion par le bourgeon urétéral exprimé par les agrégats de cellules mésenchymateuses à l'origine des vésicules rénales.

Chromosome 5

Récepteur au GDNF : **protéine Ret** : localisation : bourgeon et apex des ramifications, **chromosome 10**

Ces observations : **GDNF dans le mésenchyme, son récepteur (Ret) à la surface des cellules du bourgeon et à l'apex des branchements suggère une signalisation, une induction.**

Cette signalisation pourrait induire la prolifération des cellules épithéliales en activant l'activité kinase du récepteur Ret.

Analyses expérimentales :

1. **Incubation du GDNF marqué en présence de coupes histologiques** : marquage à l'apex du bourgeon et aux extrémités des branchements

=> montre une **interaction ligand - récepteur**

=> suggère bien la présence d'un récepteur et d'une signalisation

2. **Incubation de canaux de Wolff en absence de mésenchyme et en présence de billes préalablement incubées dans du GDNF**

=> apparition de bourgeonnements croissance et duplication des bourgeons

La croissance se fait vers les billes : chimioattraction ??

Invalidation du gène codant le GDNF : pas de rein en homozygote, pourquoi ???

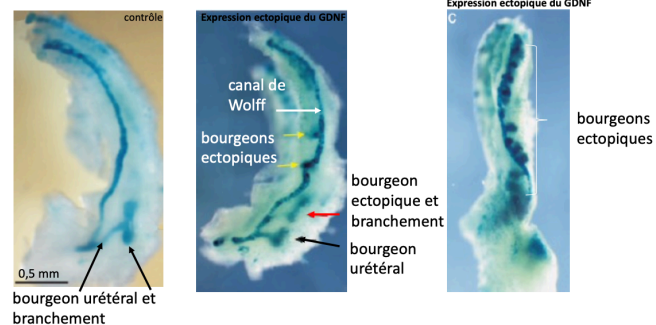
Sur des coupes histologiques, on observe qu'il n'y a pas de bourgeon urétéral, entrée en apoptose et disparition des cellules du mésenchyme et présence des canaux de Wolff.

Après ajout de bille de GDNF avec l'homozygote GDNF -/- : formation des bourgeons, croissance et branchements => **restauration de la déficience en GDNF.**

Invalidation du gène codant le GDNF : pas de rein en homozygote, pourquoi ???

Analyse expérimentale : expression du GDNF dans le canal de Wolff, dans ce cas le GDNF est sécrété et diffuse dans l'environnement du canal.

Toutes ces expériences vont dans le même sens. **La signalisation GDNF/Ret initie le développement du bourgeon puis sa croissance en induisant la mobilisation et la prolifération des cellules épithéliales via l'activité kinase du récepteur Ret.**



LA PROTÉINE EMX2

La **protéine Emx2** est un facteur de transcription codé par un gène contenant une homéoboîte, **le gène Emx2**. Une **boîte homéotique ou homéoboîte** est une séquence d'ADN retrouvée dans les gènes essentiels au développement embryonnaire (morphogénèse) des animaux et chez l'humain. Un gène contenant une boîte homéotique code un homéodomaine qui grâce à sa conformation se lie à l'ADN et permet d'activer/réprimer en cascade l'expression d'autres gènes. La protéine EMX2 est **présente dans le canal de Wolff au moment du bourgeonnement et dans l'épithélium du bourgeon en croissance. En revanche, il est absent du mésenchyme.**

Après invalidation du gène, les mutants manquent complètement de reins, d'uretères, de gonades et de voies génitales, tandis que **les glandes surrénales et la vessie se développent normalement**. Le phénotype mutant est le même pour les deux sexes. Dans la région du rein, on observe le développement d'un bourgeon à partir du canal de Wolff. Il prolifère dans le mésenchyme puis la croissance s'arrête, les agrégats de mésenchyme et les vésicules ne se forment pas. Le bourgeon urétéral dégénère par apoptose.

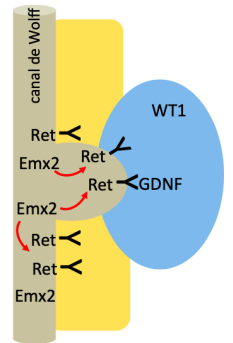
L'inactivation du gène Emx2 n'affecte pas l'expression du gène WT1 dans le mésenchyme.
L'inactivation du gène Emx2 n'affecte pas l'expression du gène GDNF dans le mésenchyme.
 Puisque les ARNm WT1, GDNF sont présents en absence d'Emx2, alors **Emx2 intervient en aval des protéines WT1, GDNF.**

Il y a donc un modèle possible :

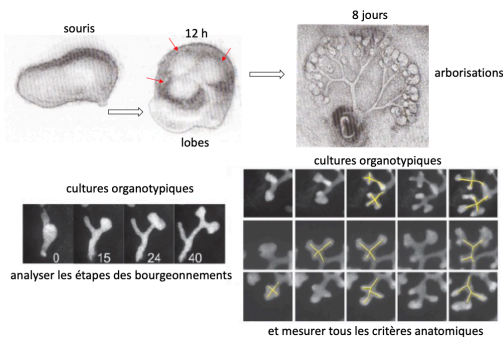
Le développement du bourgeon urétéral est sous l'influence de signaux inducteurs en provenance du mésenchyme. Il dépend de facteurs de croissance d'origine mésenchymateuse, le GDNF dont le récepteur de type tyrosine kinase (Ret) et son co-récepteur sont présents au niveau du canal de Wolff et du bourgeon urétéral. **La signalisation générée assure l'initiation de la croissance du bourgeon.**

Après la pénétration du bourgeon urétéral dans le mésenchyme, l'expression de la protéine Ret est dépendante du facteur de transcription Emx2.

Donc le facteur de transcription Emx2 permet d'activer l'expression du gène *Ret* donc de maintenir l'expression de la protéine Ret dans le bourgeon et le canal de Wolff.



La croissance, l'élongation du bourgeon urétéral

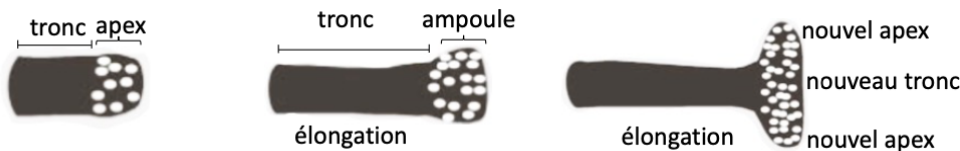


MICRODISSECTIONS DU BOURGEON URÉTÉRAL ASSOCIÉ AU MÉSENCHYME, PUIS CULTURES ORGANOTYPIQUES

Cela permet une analyse par vidéocinématographie des critères anatomiques : croissance, élongation du bourgeon urétéral et des bourgeonnements

Chez la souris, il y a 7-8 générations de divisions chez l'humain, on estime qu'il y a **15 générations de divisions dichotomiques**.

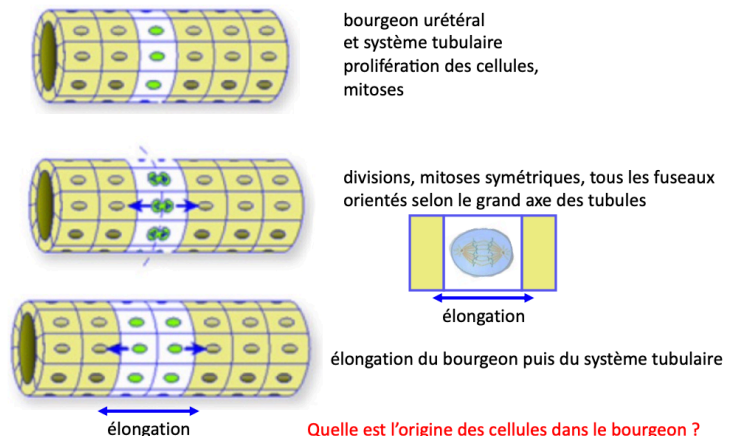
Cela permet de proposer un modèle d'élongation et de branchement du bourgeon urétéral.



ORIGINE DES CELLULES DANS LE BOURGEON, MÉTHODE D'ÉTUDE

La protéine fluorescente verte (GFP) issue d'une méduse peut être utilisée comme marqueur des cellules. Le gène codant la protéine GFP est incorporé dans le génome des cellules par transgénèse. Dans les cellules où le gène s'exprimera, **les cellules deviendront fluorescentes sous la lumière du microscope à épifluorescence**.

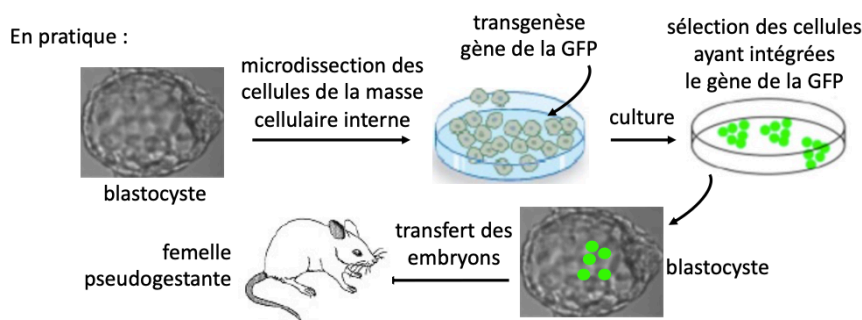
Avantages : protéine inerte, non métabolisable, diffuse dans le cytoplasme, marqueur pour suivre in vivo les cellules marquées.



Quelle est l'origine des cellules dans le bourgeon ?

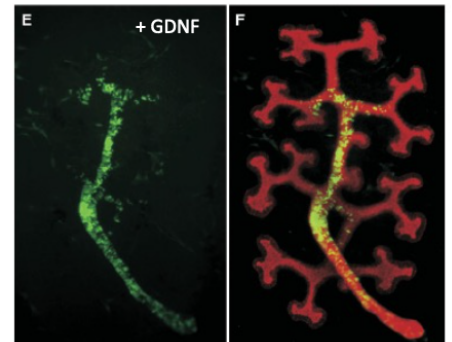
Les cellules mutantes sont identifiées par l'expression de la GFP (vert), et toutes les cellules de l'épithélium y compris les cellules de type sauvage, sont visualisées par immunofluorescence indirecte **avec des anticorps anti-cytokératine** (rouge).

Les cellules Ret-/- contribuent sans restriction au canal de Wolff et au tronc du bourgeon, mais sont exclues de l'apex du bourgeon. Après le premier branchement, les cellules mutantes entrent dans les deux nouvelles branches, mais ne s'intègrent pas à tout le branchement.



Lors de la croissance des branchements et la formation des ampoules, **les cellules mutantes ne contribuent pas à la formation des ampoules**. Les cellules témoins contribuent sans restriction à tous les branchements tout au long de l'arbre urétéral. Après 3 jours, les cellules mutantes ont contribué aux ramifications les plus proximales et sont absentes des ramifications distales et de leur l'apex. **Les cellules mutées participent au canal de Wolff et au tronc du bourgeon urétéral. Les cellules mutées Ret^{-/-} ne participent pas aux branches distales et aux extrémités du bourgeon urétéral.**

Conclusion : **Incapacité des cellules Ret^{-/-} à contribuer aux extrémités des branchements et aux branchements du bourgeons urétéral dans les reins des souris chimériques.**

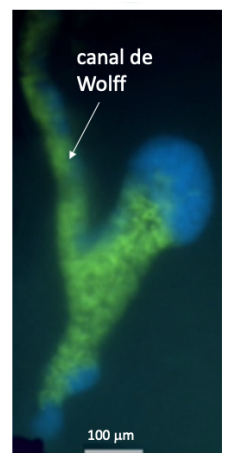


CANAL DE WOLFF CHIMÉRIQUE AVANT LE DÉBUT DE LA FORMATION DU BOURGEON URÉTÉRAL

Les cellules mutées Ret^{-/-} GFP (vertes) et les cellules Ret^{+/+} bleues sont distribuées au hasard. La région du canal de Wolff où le bourgeon urétéral émergera, s'enrichit fortement en cellules bleues donc en cellules qui expriment la protéine Ret. Lorsque le bourgeon s'allonge, les cellules qui expriment la protéine Ret génèrent l'apex du bourgeon, tandis que les cellules mutantes contribuent au tronc du bourgeon. Au fur et à mesure que le bourgeon émerge, il se compose entièrement de cellules bleues, donc de cellules qui expriment la protéine Ret.

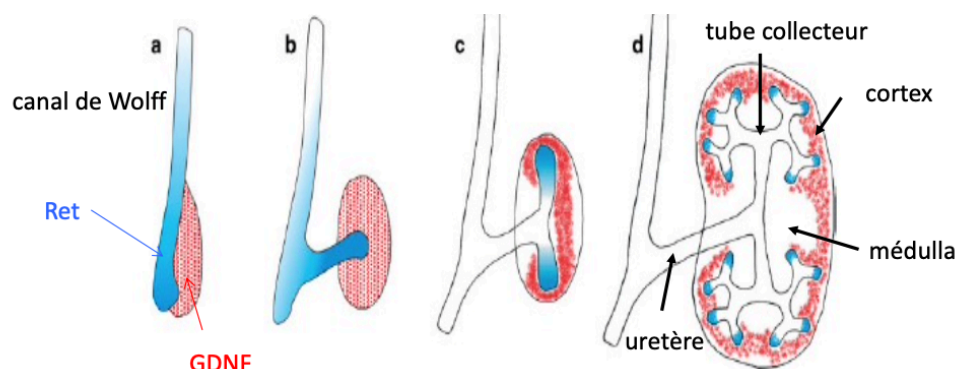
Pendant le premier événement de branchement du bourgeon, les cellules mutantes contribuent aux branches, alors que **seules les cellules qui expriment Ret forment l'apex des branchements**. Progressivement ségrégation entre cellules vertes et bleues, enrichissement de l'apex du bourgeon en cellules bleues.

Au niveau des branchements, les cellules mutantes contribuent à la région proximale du branchement.



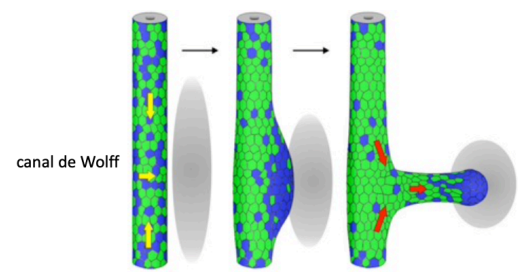
Ces expériences sur les souris chimères montrent que les cellules exprimant la protéine Ret se déplacent vers la pointe du bourgeon urétéral ce qui n'est pas le cas des cellules qui n'expriment pas la protéine Ret. **C'est un mécanisme de tri cellulaire** qui dans les circonstances normales, aboutit à la croissance d'un seul bourgeon urétérique. **La signalisation Ret induit la prolifération et également la motilité cellulaire.**

LE GDNF ET SON RÉCEPTEUR RET : UN SYSTÈME INDUCTEUR :



- a) Avant l'excroissance du bourgeon urétéral, Ret est exprimé dans le canal de Wolff et le GDNF dans le mésenchyme adjacent
- b) c) d) : quand le bourgeon urétéral se développe dans le blastème métanéphrique, Ret disparaît progressivement du canal de Wolff et l'expression de Ret se restreint aux extrémités distales du bourgeon;

Avec la croissance du bourgeon, **l'expression du GDNF se limite au mésenchyme indifférencié à la périphérie de l'apex de chaque branchement.**



Réarrangement des cellules Ret "positive" (bleu) et des cellules Ret "négatives" (en vert).

Les ovales gris représentent le mésenchyme métanéphrique.

Les cellules initialement Ret «positives» sont dispersés le long du canal de Wolff et commencent à se déplacer (flèches jaunes) pour former le premier bourgeon de l'uretère. Des cellules «chefs de files» vont former l'extrémité distale, tandis que les cellules Ret "négatives" suivent, entraînées par la prolifération des cellules épithéliales du bourgeon urétéral (flèches rouges).

QU'EST-CE QUI LIMITE L'INDUCTION ET LA CROISSANCE DU BOURGEON URÉTÉRAL À UN SEUL SITE ? POURQUOI Y A-T-IL QU'UN SEUL BOURGEON INDUIT ?

Les protéines BMP, protéines ostéogéniques :

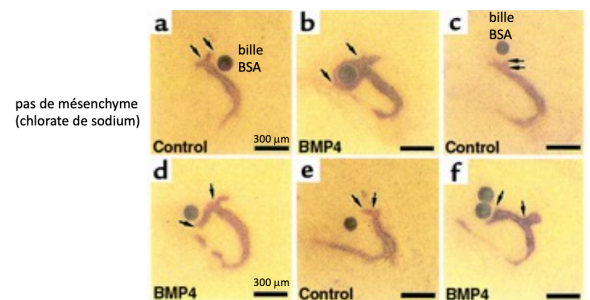
- cytokines de la **superfamille des TGF- β** ,
- glycoprotéines excrétées physiologiquement par les **cellules de moelle osseuse, les plaquettes, les ostéoclastes et les cellules musculaires.**
- Stockées dans la matrice osseuse **libérées par hypoxie et acidose qui surviennent lors d'une fracture**

ANALYSE IN VITRO

Le bourgeon urétéral au moment du premier branchement. Culture de 72 h en absence de mésenchyme.

En absence de mésenchyme, le branchement s'allonge du côté de la bille.

En absence de mésenchyme, BMP favorise l'élargissement.



A 11.5 jours, le bourgeon urétéral et le mésenchyme sont mis en culture en présence de BMP4

En présence de mésenchyme, **BMP exogène favorise**

l'expansion du mésenchyme. BMP4 favorise la croissance et l'élargissement du bourgeon de l'uretère, et élargit la population de cellules stromales du mésenchyme métanéphrique.

Le bourgeon et le mésenchyme sont prélevés et cultivés jusqu'au moment du premier branchement. Puis les billes de BMP sont ajoutées là où devra apparaître le second branchement. L'ensemble est cultivé pendant 48 ou 72 h. Les branchements s'estompent dans la région de la bille, flèche rouge. **En présence de mésenchyme, BMP inhibe les branchements.**

Expression du GDNF dans les explants traités avec des billes BMP4 pendant 0, 8 et 16 heures ou des billes témoins pendant 16 heures. L'expression du GDNF est identique entre les zones entourant les billes imbibées de BSA ou de BMP. **BMP n'affecte pas l'expression de GDNF.**

Expérience d'inactivation du gène BMP4

Dans le cas d'une inactivation homozygote, les souris sauvages meurt. En revanche, dans le cas d'une souris hétérozygote, il y a différents phénotypes : 47% de rein anormaux uniquement à droite, 15% de reins anormaux uniquement à gauche et 38% d'anomalies bilatérales. Parmi les 38%, il y a trois phénotypes : taille réduite du rein, calice hypertrophié et parenchyme réduit. Un autre phénotype observé à la naissance d'une souris hétérozygote : les 2 uretères du rein s'unissent caudalement pour former un seul uretère qui se draine dans la vessie avec 1 orifice urétéral. Ce phénotype mime l'une des malformations congénitales de duplication rénale. Les premiers branchements et le tronc principal de l'uretère sont plus courts chez le mutant. La taille de l'apex des branchements est également plus petite chez les mutants. Bourgeonnement ectopique de l'uretère chez le mutant.

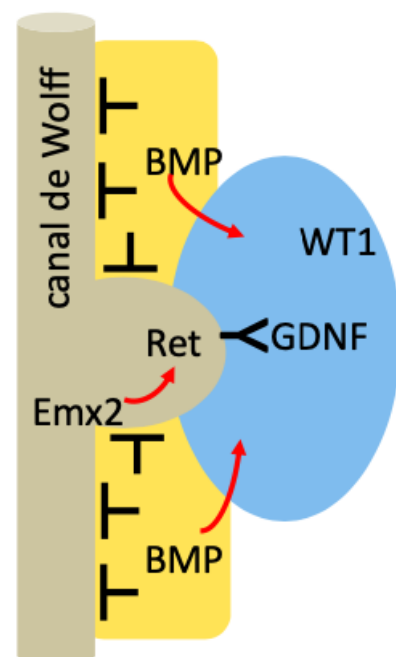
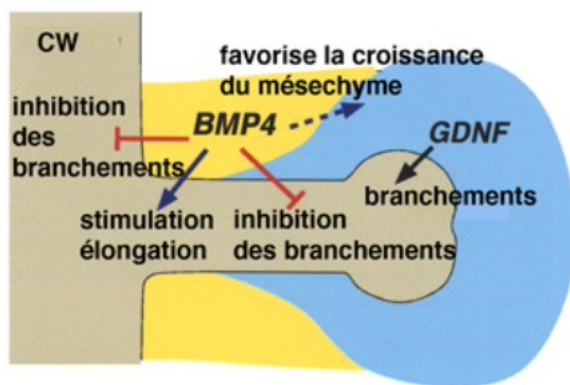
La réduction de l'expression de BMP n'affecte pas l'expression de Ret. Génère un bourgeon surnuméraire.

BILAN :

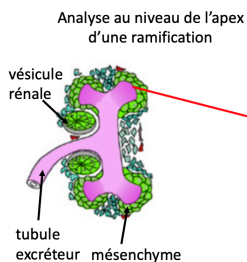
L'émergence du bourgeon urétéral implique des interactions réciproques entre l'épithélium urétéral (marron) et le mésenchyme métanéphrique (bleu).

Le site du bourgeonnement urétéral est régulé négativement par BMP, qui est exprimé dans un manchon des cellules mésenchymateuses adjacentes à l'épithélium urétéral et au canal de Wolff. De plus, BMP peut favoriser la croissance du mésenchyme métanéphrique en régulant la prolifération et/ou l'apoptose de ces cellules, qui produit un ou plusieurs facteurs pour stimuler la formation des bourgeons.

Le GDNF sécrété par les cellules du mésenchyme se lie à son complexe récepteur Ret/GFR1a présent à la surface des cellules épithéliales du bourgeon urétéral. Une signalisation provoque la prolifération des cellules épithéliales du bourgeon. Le maintien de l'expression du gène Ret dans le bourgeon dépend du facteur de transcription Emx2.



Les branchements, ramifications, implication de la matrice extracellulaire



Les analyses par immunofluorescence indirecte montrent la présence de **collagène et laminine**.

Les collagènes représentent **30 à 35% des protéines totales de notre organisme** que l'on retrouve dans la peau, les tendons, le cartilage, les ligaments, les tissus conjonctifs. Il assure la cohésion et l'élasticité de tous ces tissus.

Les laminines sont les constituants protéiques majeurs de **la lame basale**, adhésion, migration, stabilité des épithélia.

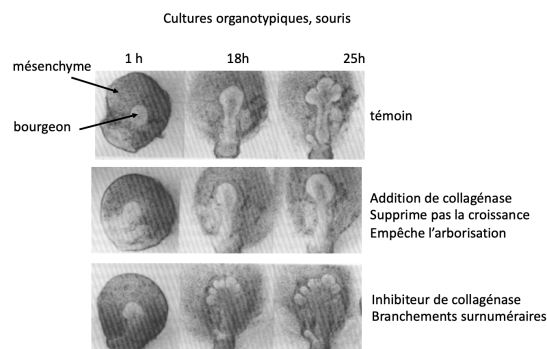
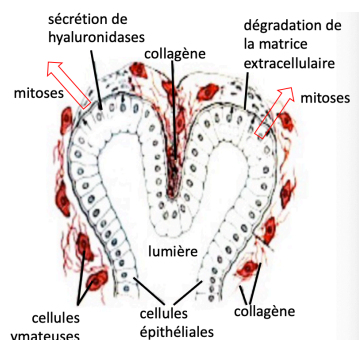
L'adjonction de collagénase exogène bloque les ramifications. L'inhibiteur de collagénase supprime l'activité de la collagénase endogène.

Un sillon se forme à l'apex du bourgeon (ramification), par l'accumulation de collagène qui forme un faisceau de fibres étirées par les cellules du mésenchyme.

=> contrainte, formation d'une fissure

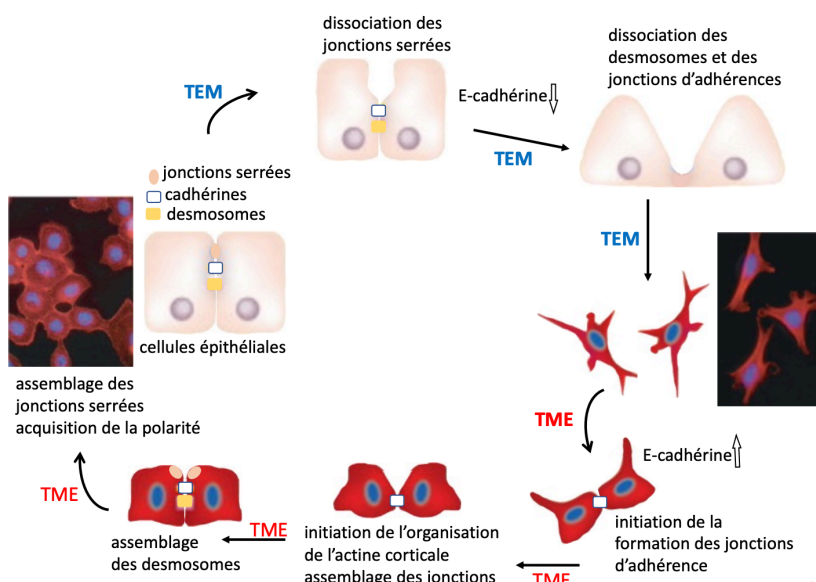
Les cellules à l'apex **sécrètent des GAG, de la hyaluronidase qui dégrade des molécules de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes.**

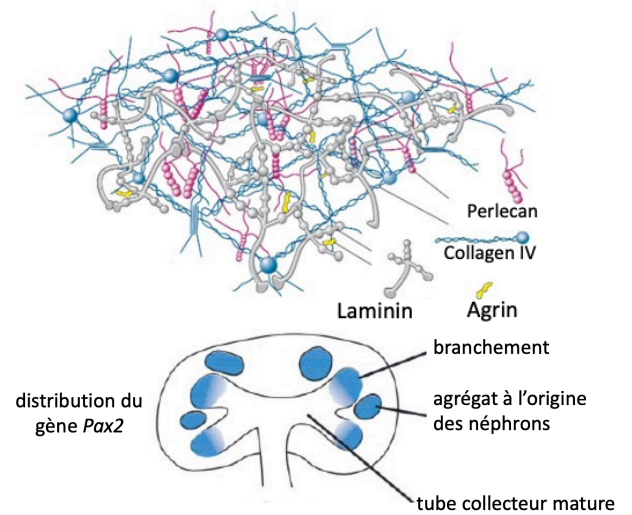
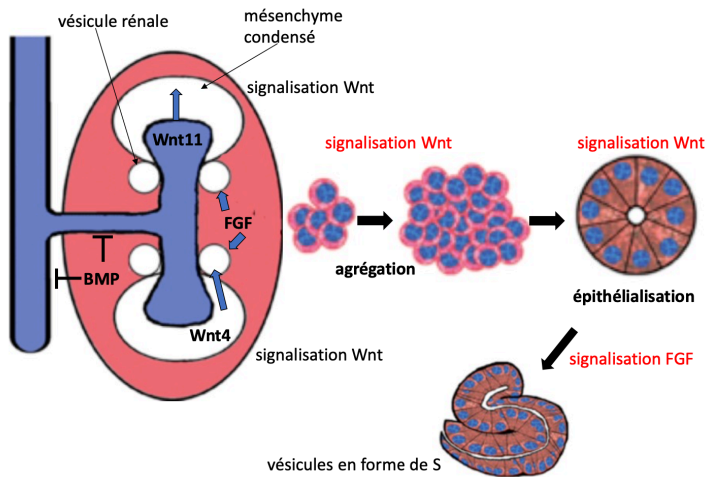
En synergie avec la division des cellules cela provoque une **poussée conduisant à la ramification.**



LA FORMATION DES VÉSICULES RÉNALES

La transition épithélium-mésenchyme





La laminine est un **constituant des matrices extracellulaires et des lames basales**.

C'est un complexe protéique flexible constitué de **trois chaînes polypeptidiques**. Douze formes différentes de laminine ont été caractérisées composant ainsi des protéines différentes.

Les trois chaînes forment **une croix asymétrique possédant plusieurs sites d'interaction** avec les cellules et avec les autres composants de la matrice extracellulaire (collagène).

La laminine se met en place autour des agrégats, puis entoure les vésicules rénales. Elle est impliquée dans la polarisation des agrégats nécessaire à l'épithélialisation et génère une signalisation via les intégrines permettant, **l'augmentation de l'expression des cadhérines, des constituants des jonctions serrées, des desmosomes conduisant à l'épithélialisation des agrégats puis à la formation des vésicules**.

Dans le cas d'une analyse in vitro, d'une culture organotypiques, après ajout d'anticorps anti-laminine, il y a condensation du mésenchyme, formation d'agrégats mais **pas d'épithélialisation**.

LES SIGNALISATIONS FGF ET WNT

Les facteur de croissance des fibroblastes (FGF), 18 protéines identifiées à ce jour chez l'humain connues : pour **activer la migration et la multiplication de cellules cibles**.

Les protéines Wnt : une famille de glycoprotéines sécrétées dans le milieu extracellulaire.

La signalisation **inhibe la phosphorylation de la β -caténine** qui ne sera pas dégradée par le protéasome, entrera dans le noyau de la cellule-cible pour activer l'expression de gènes spécifiques.

LA SIGNALISATION WNT

Les ARNm Wnt11 sont présents dans les cellules à l'apex du bourgeon urétéral ramifié.

Pendant les ramifications ultérieures, **Wnt11 est maintenu à l'extrémité des branchements de l'arbre urétéral**. Wnt 4 est exprimée dans les cellules des agrégats pré-tubulaires. Le facteur **Wnt4 est important pour la transition mésenchyme épithélium**, en son absence le bourgeon urétéral se forme et le blastème métanéphrogène se condense normalement, mais il n'y a pas de transition mésenchyme/épithélium.

L'élimination de la β -caténine dans les cellules progénitrices des vésicules rénales entraîne une réduction de la formation des vésicules en forme de S donc des néphrons.

LA SIGNALISATION FGF

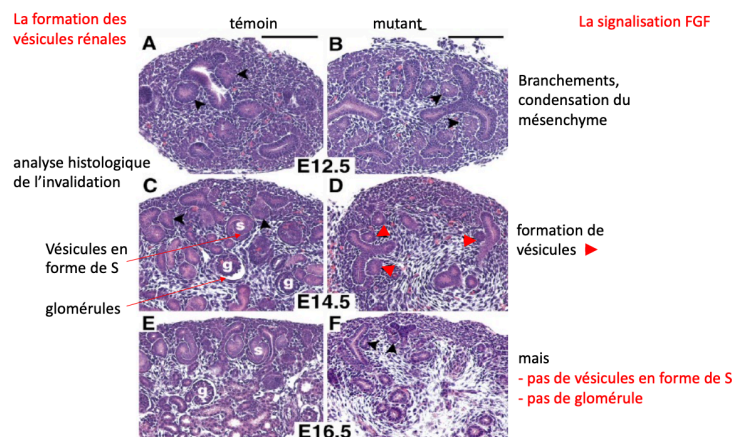
Les ARNm sont présents en périphérie et sous le bourgeon et les branchements. **En cas d'inactivation conditionnelle de FGF, il y a une hypoplasie rénale**. Il y a donc un rôle très important des ARNm FGF. Elle joue un **rôle dans la différenciation des vésicules rénales en vésicule en forme de S**.

Le gène PAX 2 a une forte expression dans le cortex, pas d'expression dans le glomérule et dans le mésenchyme. Il s'exprime dans les agrégats épithéliaux aux extrémités d'un branchement.

Corrélations possibles entre le degré d'expression de Pax2 et les malformations congénitales

=> **un rein hypoplasique avec un uretère mal formé, associé à une expression trop faible du gène Pax2 ;**

=> **une tumeur ou un rein dysplasique multikystique dans lequel les épithélia surexpriment le gène Pax2.**



LES GÈNES HOMÉOTIQUES PARALOGUES HOX 10, 11 SONT ESSENTIELS

Les gènes Hox sont des gènes du développement, des gènes homéotiques. Les gènes codent des facteurs de transcription à homéodomaine. Les gènes ont en commun : une **séquence de 180 nucléotides** : l'homéoboîte qui code un domaine protéique de **60 acides aminés** : l'**homéodomaine**. L'homéodomaine contient un motif responsable de la liaison à l'ADN au niveau de sites spécifiques (--ATTA--)

L'homéodomaine est si hautement conservé entre les espèces que les homéodomaines humains et de souris peuvent fonctionner chez la mouche et sauver des mouches mutantes.

Chez les Mammifères, on trouve **4 complexes de gènes homéotiques**. Les gènes *Hox* s'expriment selon **une règle de colinéarité spatio-temporelle**. Il y a une relation entre le temps et la dispersion selon l'axe antéro-postérieur des espèces.

Ceux situés en 3' s'expriment dans les régions antérieures, et les premiers à s'exprimer.

Ceux situés en 5' s'expriment dans les régions postérieures et les derniers à s'exprimer.

Chez l'humain :

> 39 gènes homéotiques : gènes Hox

> 13 familles de gènes paralogues dans ces complexes : ordonnées sur le chromosome et s'expriment dans le même ordre le long de l'axe crânio-caudale du tronc de l'embryon

LES PARALOGUES HOX 11

Hox 11 est exprimée dans les cellules mésenchymateuses autour des branchements.

Grace à des expériences de pertes de fonctions, on peut déterminer la fonction du gène Hox 11. En cas de triple mutants, on ne retrouve ni de reins, ni d'uretère, ni de cortex, ni de vésicules en forme de S. Cela aboutira à une apoptose et à une disparition des structures. La sévérité des phénotypes augmente avec le nombre de gènes mutés. Pour le double mutant, le rein est très peu développé.

Dans un cas contrôle, il n'y a que très peu de cellules apoptotiques. En revanche, dans le triple mutant il y a plus de cellules en apoptose que de cellules normales. En revanche, **le canal de Wolff n'est pas impacté par cette apoptose massive.**

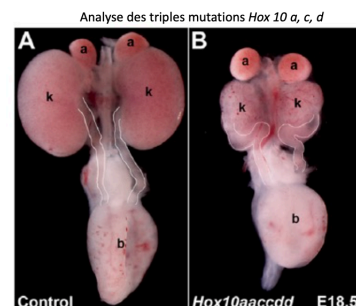
Lorsque l'on étudie l'expression de WT1, il n'y pas de différence entre le contrôle et le triple mutant. Cependant, **les facteurs de transcription Hox11 sont importants pour promouvoir et maintenir l'expression de GDNF dans le mésenchyme.**

LES PARALOGUES HOX 10

Les transcrits Hox10 sont présents dans les bourgeons urétéraux, dans le mésenchyme et dans le cortex, au même titre que Hox 11.

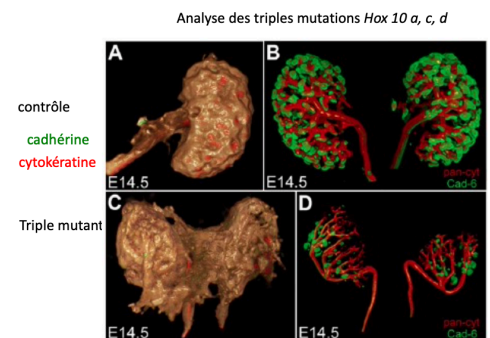
Si on analyse le phénotype des triples mutants de Hox 10, les reins sont beaucoup plus petits que le contrôle. Le routage des uretères (contour blanc) est anormal. **Ils entrent dans le rein à partir de la face latérale, au lieu de la région médiane pour les contrôles.**

L'embryon triple mutant présente une néphrogénèse réduite dans le cortex externe, un cortex interne élargi et une région médullaire très réduite. On observe également une hydronéphrose, c'est-à-dire une augmentation du volume du bassin, des calices, secondaire à



une occlusion ou obstruction des voies urinaire. L'organisation des reins est complètement différentes avec la mutations des paralogues de Hox10. Les canaux collecteurs ne se développent pas correctement et les tubules proximaux sont délocalisés. Les reins Hox10 mutants présentent des branchements aberrants par rapport aux témoins. Les mutants Hox10 ont, en moyenne, une réduction de 50% du nombre de branches par rapport aux témoins. **Il y a une formation anarchique des branchements par rapport au contrôle.**

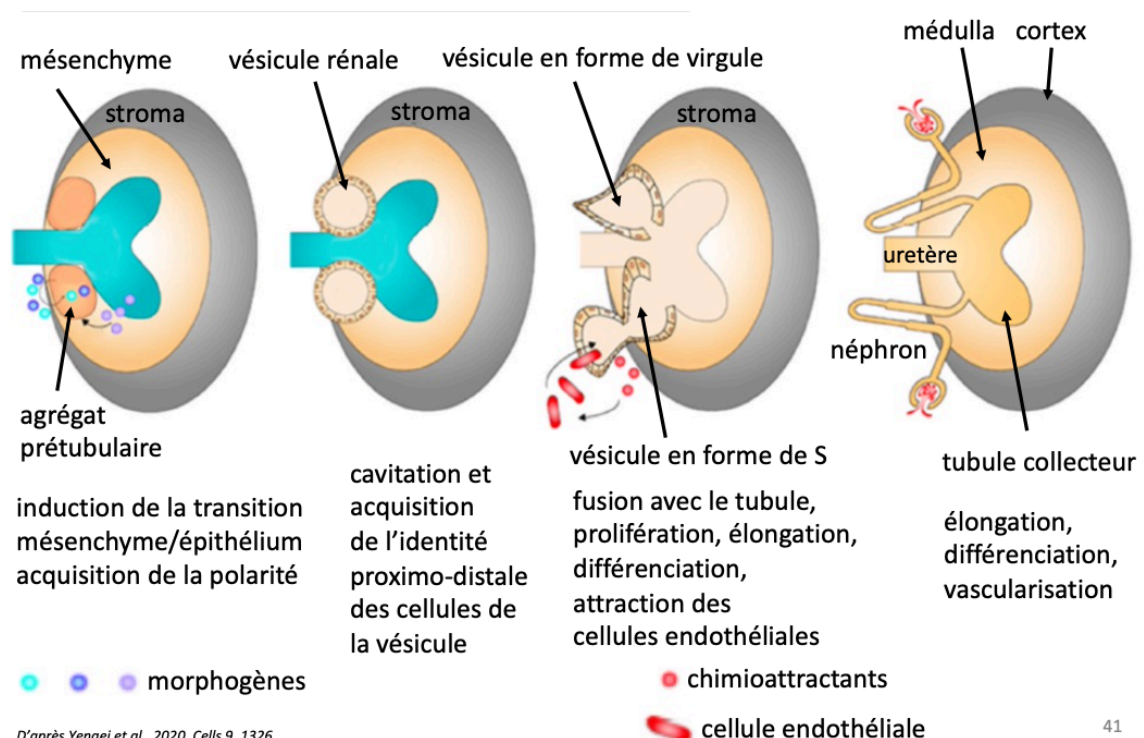
A 14,5j de développement, la ramification de l'uretère chez les mutants est réduite. Les branches sont anormalement allongées par rapport au contrôle. La superposition de la fluorescence permet de délimiter la surface de l'organe (marron). Cela montre que le rein mutant Hox10 ne se ségrège pas de la paroi corporelle. Les mutants Hox10 présentent des défauts de branchement.



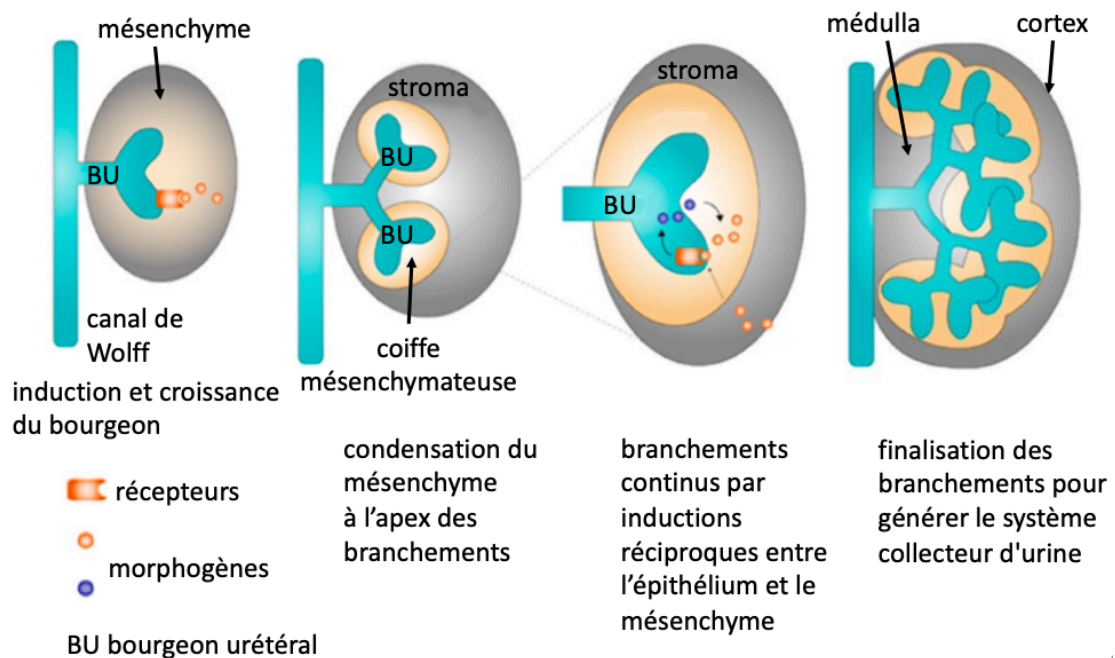
Dans les deux mutants, on observe pas de différence sur l'expression de WT1. On en conclut que WT1 est en amont des Hox10 et 11.

BILAN :

inductions, condensation, prolifération, maintien et élongation des ramifications, mise en place de l'arbre urétérale



transition du mésenchyme en structures épithéliales, élongation, acquisition d'une identité, différenciation, vascularisation pour générer les néphrons.



des interactions cellule-cellules sont requises pour le développement du rein

