

Journées Francophones de Nutrition, Reims, 7-9 décembre 2011

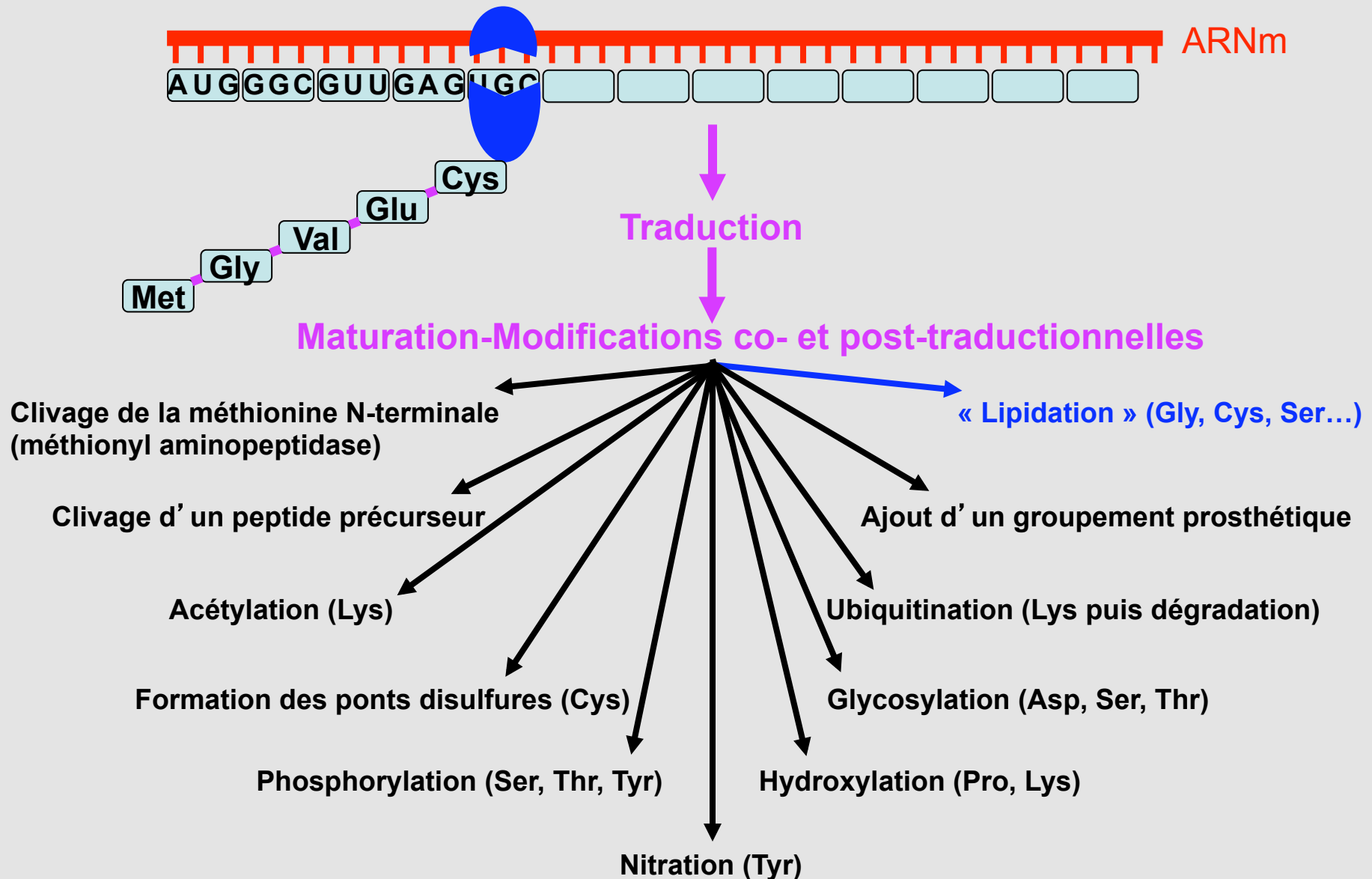
Myristoylation des protéines par l'acide myristique: nouvelles fonctions de régulation et de signalisation



Vincent Rioux
Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine
Université Européenne de Bretagne
AGROCAMPUS OUEST, INRA USC 2012



Principales modifications co- et post-traductionnelles des protéines chez les eucaryotes



PLAN

- 1. Les modifications covalentes de protéines par des lipides**
- 2. Les enzymes, les mécanismes et les effets de l'acylation**
- 3. Exemples de régulation de la fonction des protéines myristoylées**
- 4. L'origine des acides gras qui acylent des protéines**

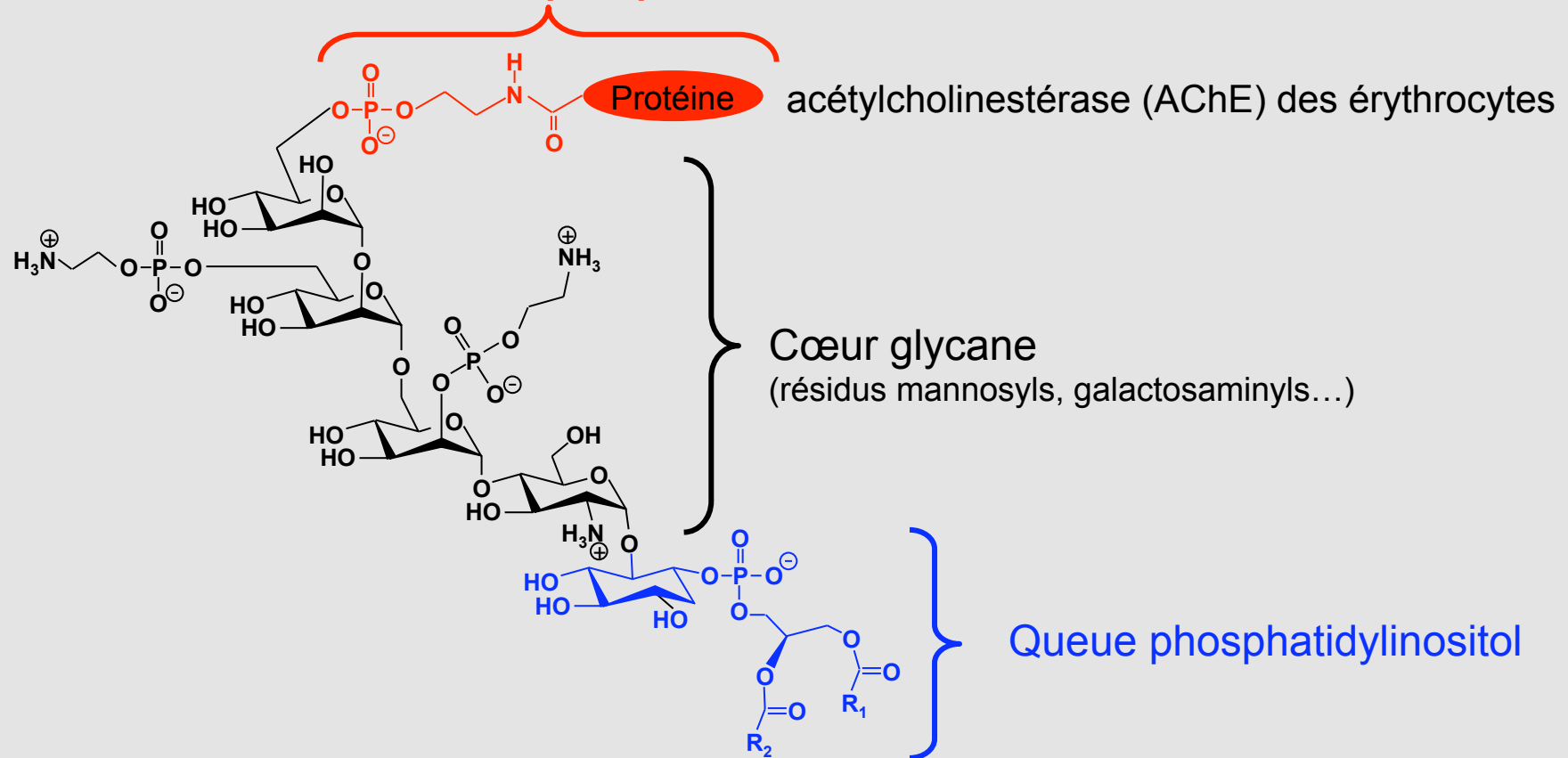
PLAN

- 1. Les modifications covalentes de protéines par des lipides**
- 2. Les enzymes, les mécanismes et les effets de l'acylation**
- 3. Exemples de régulation de la fonction des protéines myristoylées**
- 4. L'origine des acides gras qui acylent des protéines**

Les modifications covalentes de protéines par des lipides

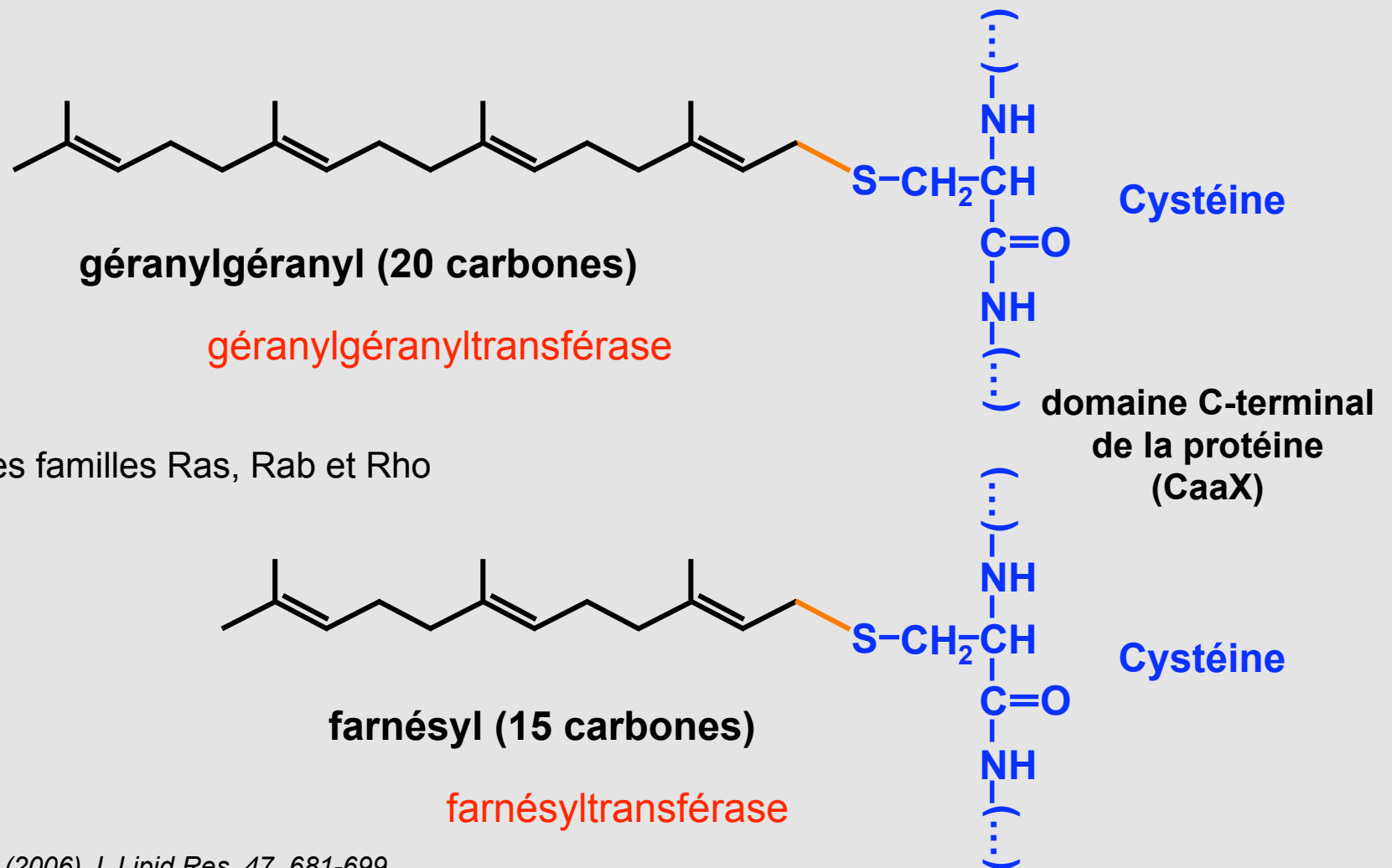
Glypiation: liaison post-traductionnelle amide de l'acide aminé C-terminal (Asp, Asn, Gly, Cys, Ser, Ala) de la protéine à la phosphoéthanolamine d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (ancree GPI)

Liaison amide avec la phosphoéthanolamine



Les modifications covalentes de protéines par des lipides

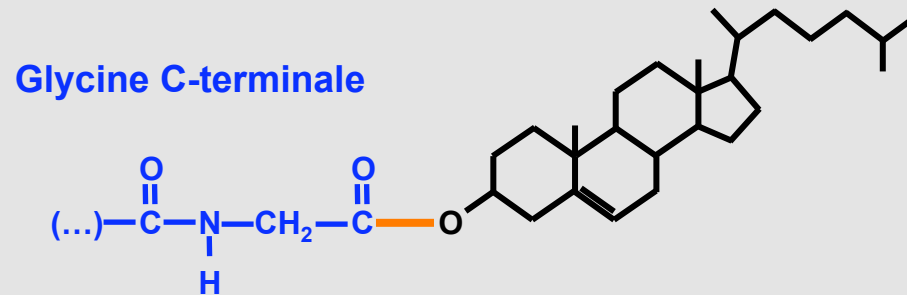
Isoprénylation: liaison post-traductionnelle thioéther entre un résidu Cys du domaine C-terminal de la protéine et un isoprène



Protéines des familles Ras, Rab et Rho

Les modifications covalentes de protéines par des lipides

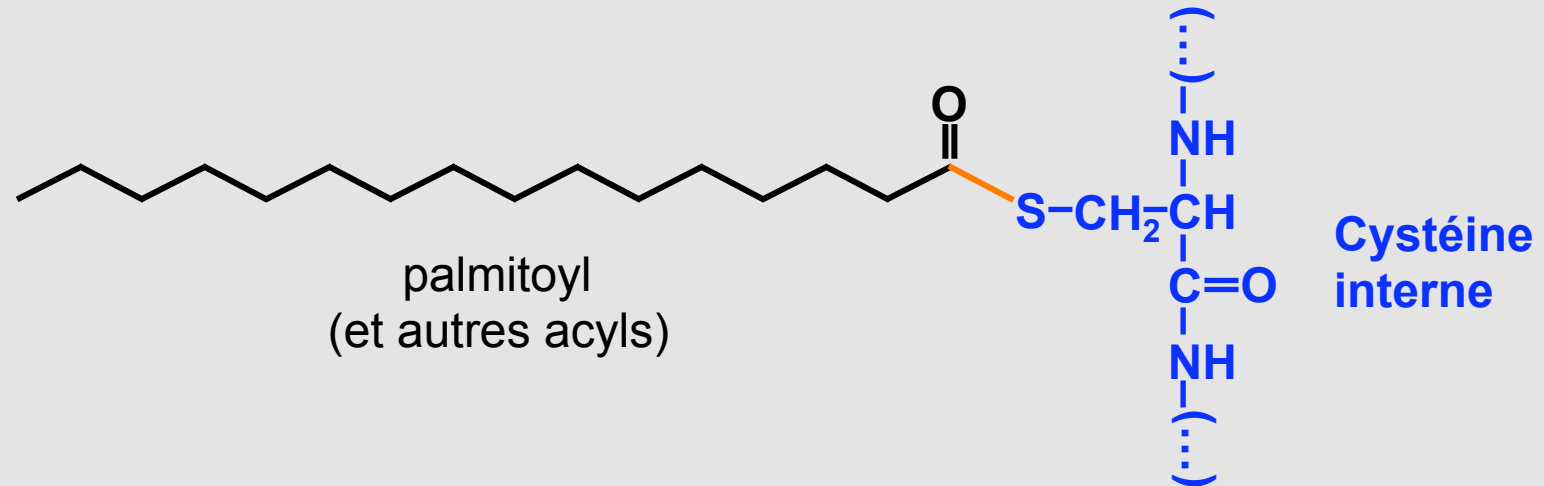
Cholestéroylation: Liaison ester entre une Gly C-terminale et le cholestérol (protéines de la famille hedgehog et Wnt)



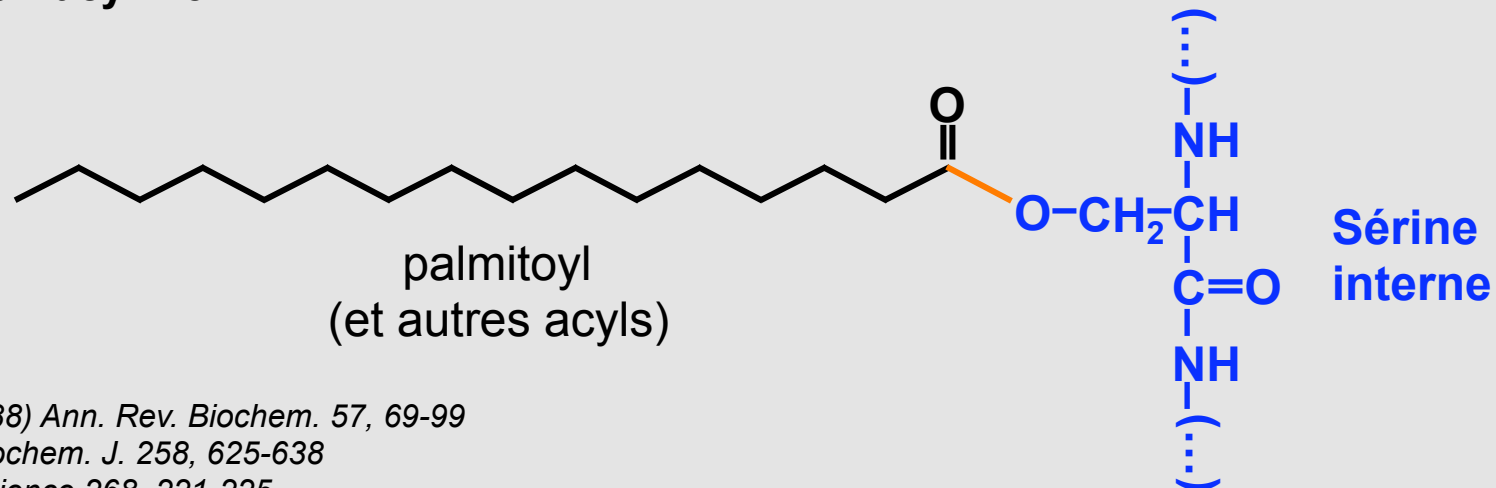
Enzyme impliquée ou mécanisme autocatalytique?

Les modifications covalentes de protéines par des lipides

Palmitoylation (=S-acylation): liaison post-traductionnelle thioester entre la chaîne latérale d'un résidu Cys de la protéine et un acyl-CoA (majoritairement le palmitoyl-CoA)

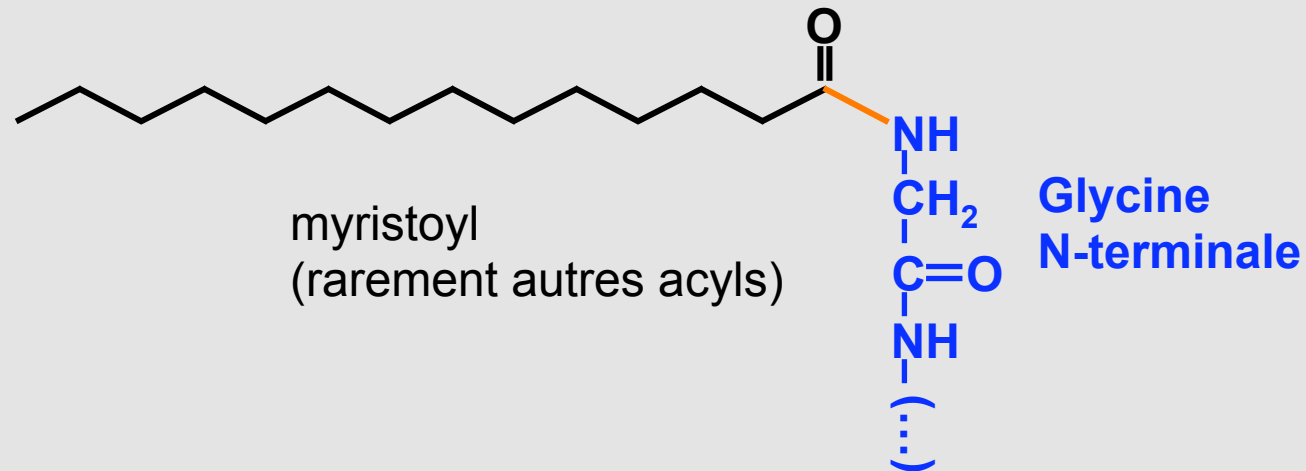


O-acylation: liaison post-traductionnelle ester entre la chaîne latérale d'un résidu Ser de la protéine et un acyl-CoA



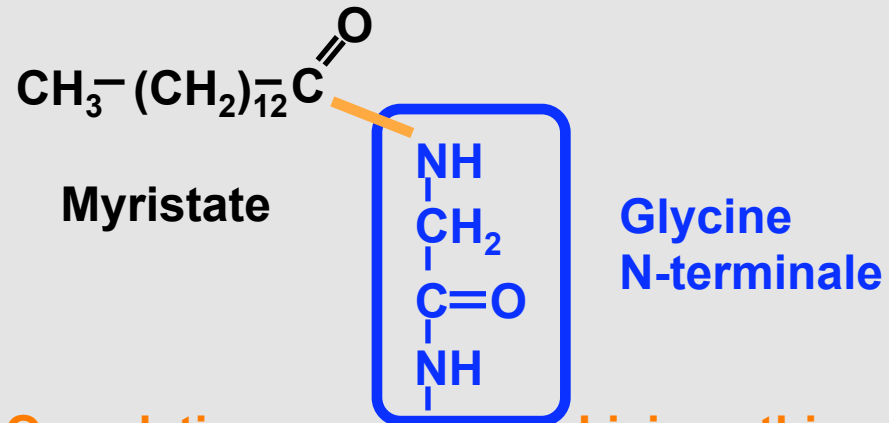
Les modifications covalentes de protéines par des lipides

Myristoylation N-terminale: liaison co- ou post-traductionnelle amide irréversible entre le résidu Gly N-terminale de la protéine et le myristoyl-CoA

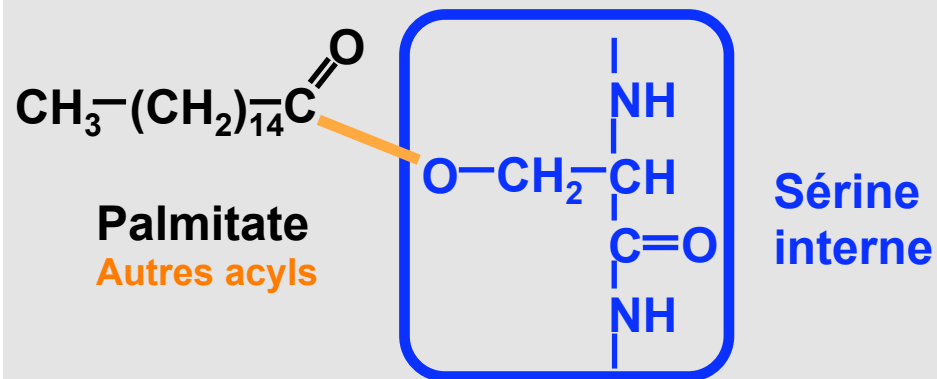


Acylation des protéines par des acides gras

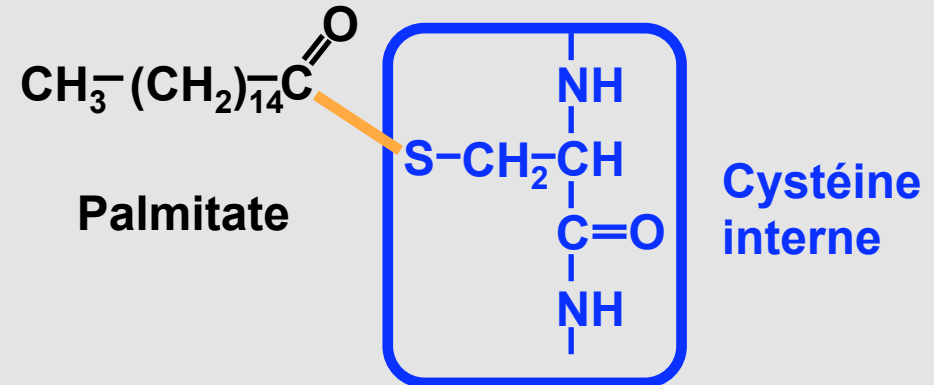
Liaison amide : N-myristoylation



Liaison ester: O-acylation



Liaison thioester: S-acylation



Phénomènes ubiquitaires

- levures
- végétaux
- animaux

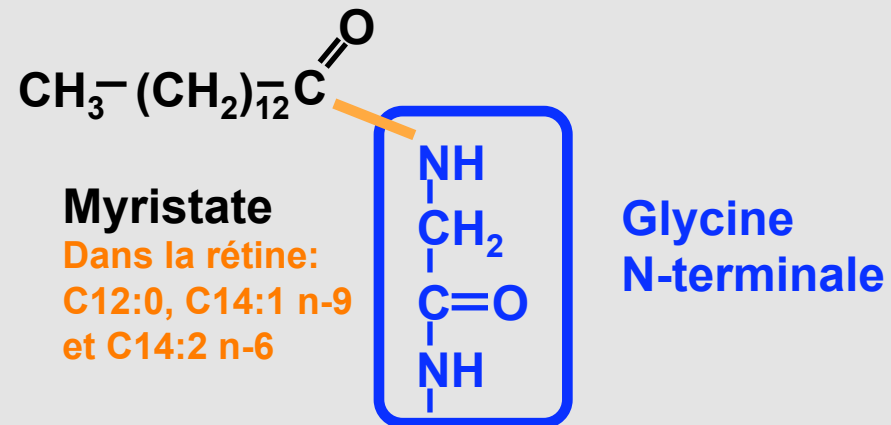
De nombreuses protéines virales de structure sont également acylées.

PLAN

1. Les modifications covalentes de protéines par des lipides
2. Les enzymes, les mécanismes et les effets de l'acylation
 - Les myristoyl-CoA : protéine N-myristoyltransférases (NMT)
 - Les palmitoylacyltransférases (PAT)
 - La ghréline O-acyltransférase (GOAT)
3. Exemples de régulation de la fonction des protéines myristoylées
4. L'origine des acides gras qui acylent des protéines

Myristoylation N-terminale

Liaison amide : N-myristoylation



myristoyl-CoA : protéine N-myristoyltransférases (NMT)

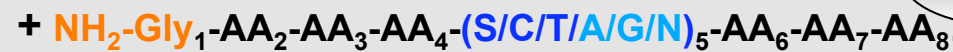
Myristoylation et myristoyl-CoA: protéine N-myristoyltransférase (NMT)

Myristoyl-CoA



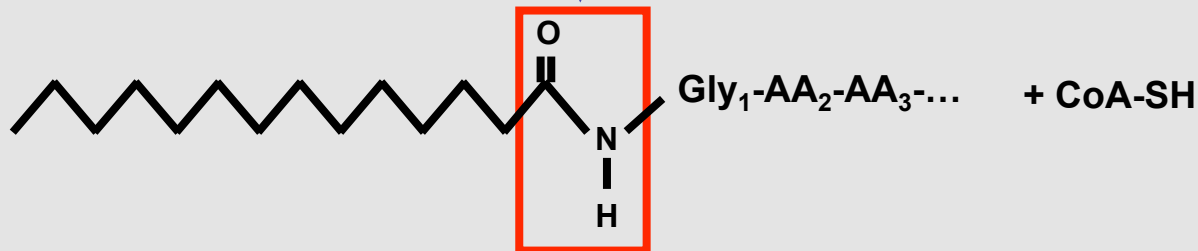
Protéine:

- en cours de traduction
- avec 1 glycine N-terminale (méthionine initiatrice clivée par méthionyl aminopeptidase)
- avec une séquence consensus N-terminale qui reste mystérieuse



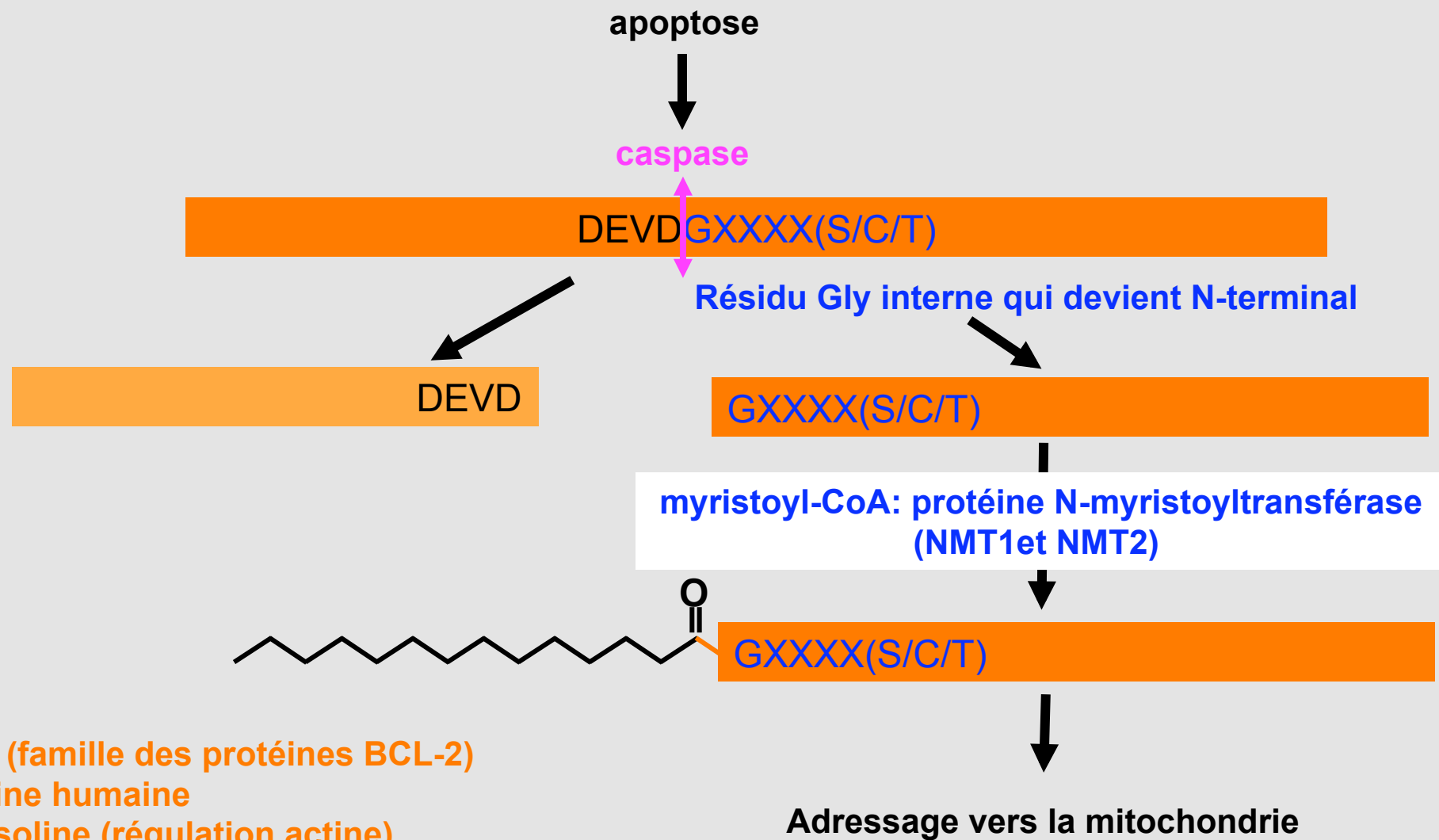
ribosome

myristoyl-CoA: protéine N-myristoyltransférase (NMT1 et NMT2)



Protéine myristoylée

Myristoylation post-traductionnelle



BID (famille des protéines BCL-2)

Actine humaine

Gelsoline (régulation actine)

PAK2 (protéine kinase 2)

D' autres protéines candidates en cours de découverte

Gènes et protéines NMT

1 seul gène chez la levure, une protéine de 455 acides aminés, activité cytosolique

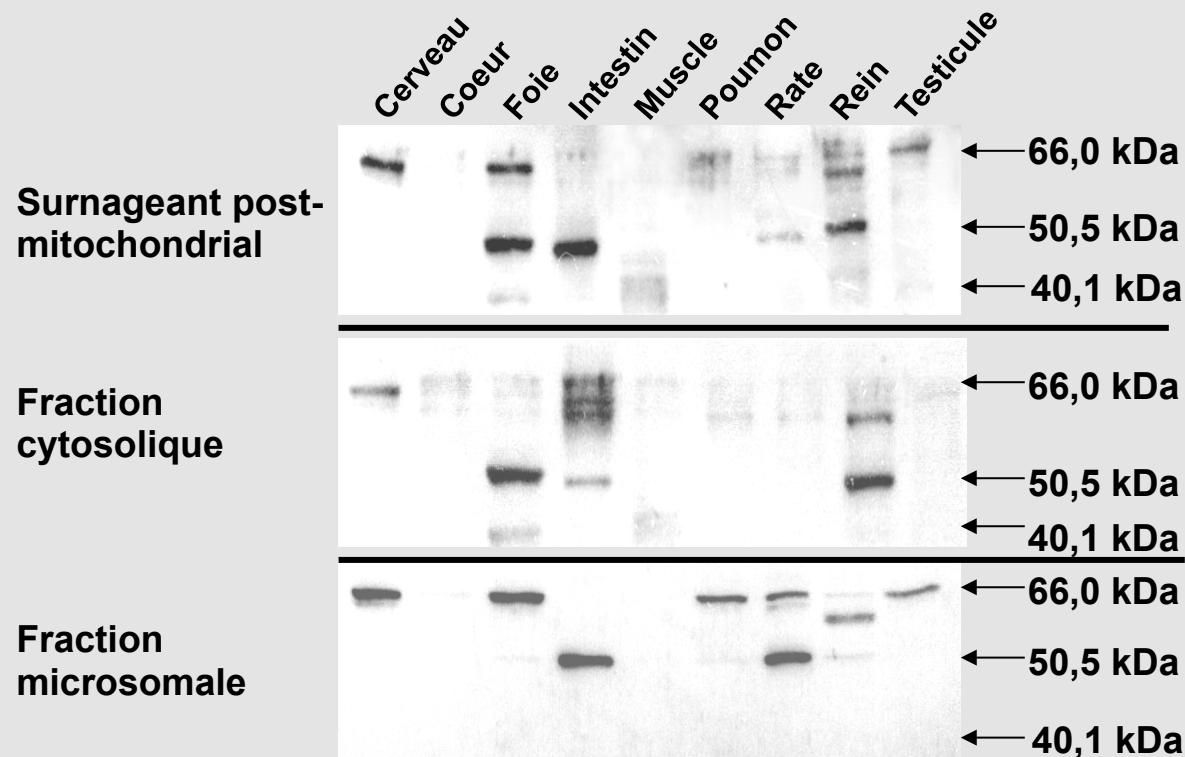
Duronio et al. (1989) *Science* 243, 796-800; Towler et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2708-2712

2 gènes Nmt1 et Nmt2 chez les mammifères (souris, rat et homme)

Des isoformes protéiques multiples (épissage alternatif?)

Activité cytosolique et/ou membranaire (en fonction du tissu)

Giang and Cravatt (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 6595-6598; Rioux et al. (2006) *Mol. Cell. Biochem.* 286, 161-170



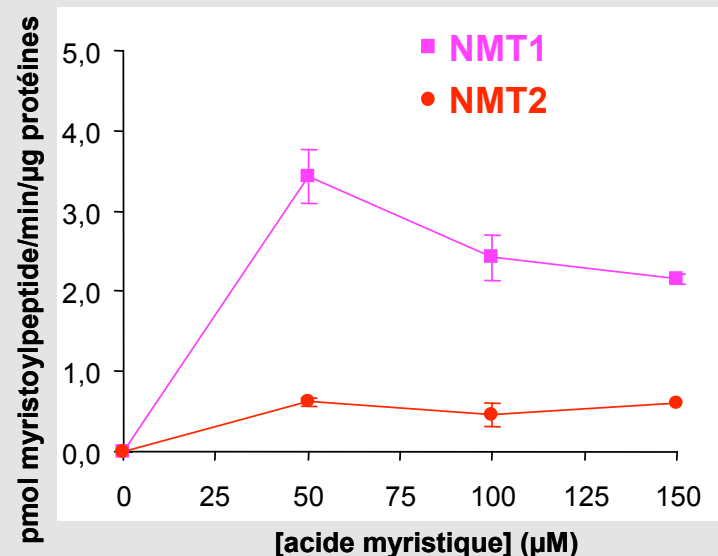
Importance de la myristoylation

Chez la levure, la délétion du gène codant pour la NMT est létale *Duronio et al. (1989) Science 243, 796-800*

Chez la drosophile, la délétion du gène codant pour la NMT affecte profondément le développement *Ntwasa et al. (2001) Exp. Cell Res. 262, 134-144*

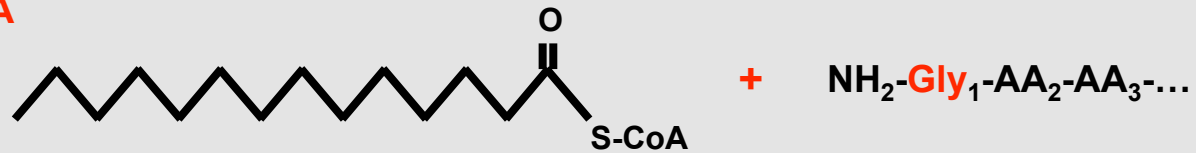
Les souris Knock-out Nmt1 ne sont pas viables: la présence de NMT2 seule n'est pas suffisante pour dépasser le stade embryonnaire *Yang et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:18990-18995*

NMT1 est l'enzyme la plus active comparée à NMT2 *Giang and Cravatt (1998) J. Biol. Chem. 273, 6595-6598; Rioux et al. (2006) Mol. Cell. Biochem. 286, 161-170*



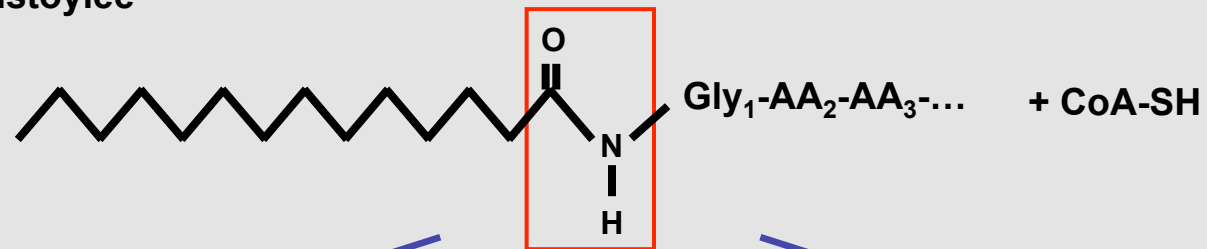
Les effets généraux de la myristoylation

Myristoyl-CoA



myristoyl-CoA: protéine N-myristoyltransférase (NMT)

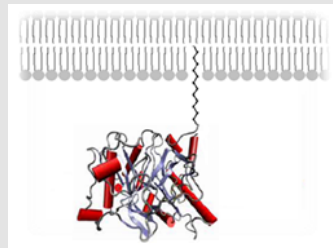
Protéine myristoylée



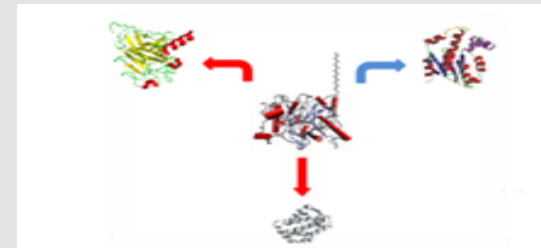
Localisation subcellulaire



Association à la membrane

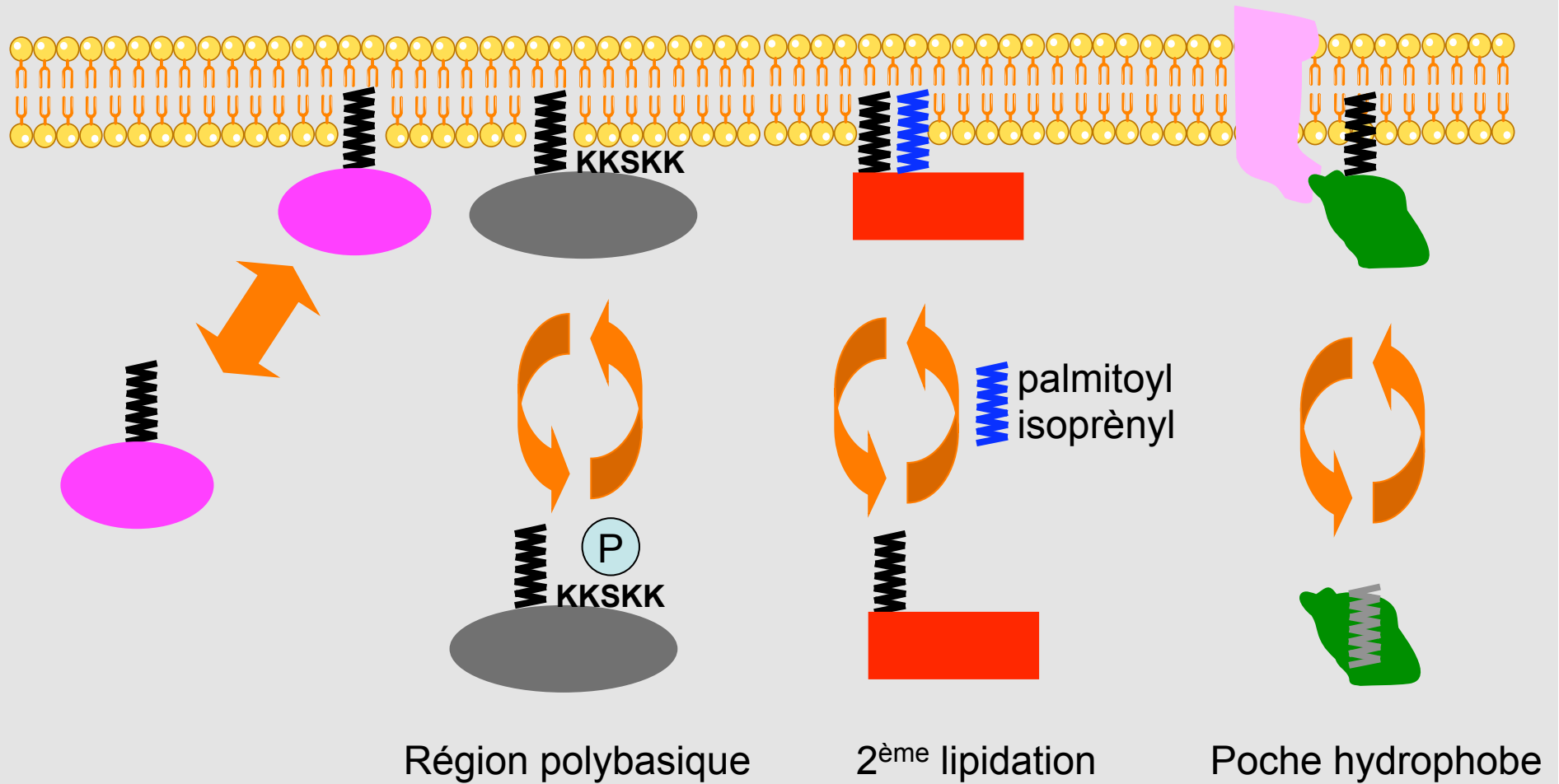


Interaction protéine-protéine



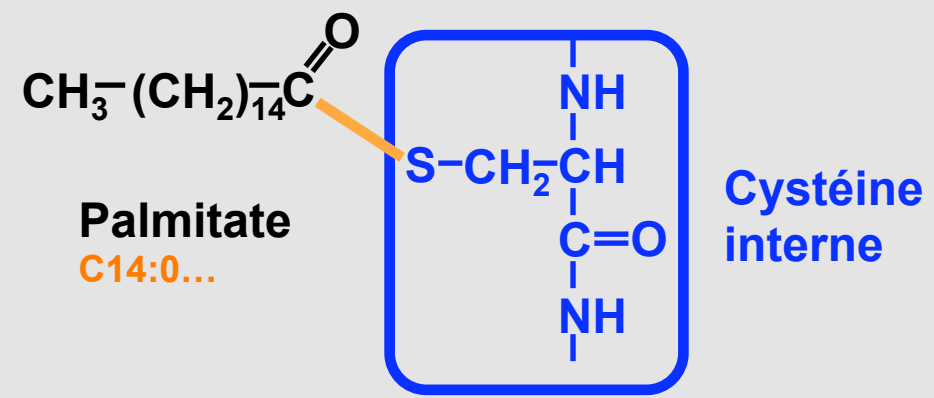
Les effets de la myristoylation

Un 2nd signal est nécessaire pour l'ancrage à la membrane



Palmitoylation (=S-acylation)

Liaison thioester: S-acylation



Palmitoylacyltransférases (PAT)

Les données actuelles sur les palmitoylacyltransférases (PAT) impliquées dans la S-acylation: la famille des protéines « DHHC »

1^{ère} description de la palmitoylation dans les années 1980 Schlesinger et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255,10021-10024

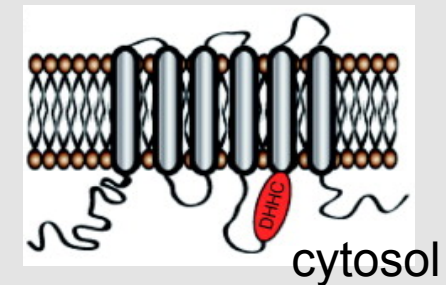
Découvertes des PAT chez la levure entre 1999 et 2002 Bartels et al. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 6775-6787; Roth et al (2002) *J. Cell. Biol.* 159, 23-28; Lobo et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 49352-49359.

23-25 protéines « DHHC » chez les mammifères Greaves and Chamberlain (2011) *Trends Biochem. Sci.* 36, 245-253

Protéines membranaires (4 à 6 domaines transmembranaires): ER, Golgi, membrane plasmatique

(b)

	1	10	20	30	40	50	51	
Consensus	LKYCPXCQLIK	PPRAH	HCSV	CDRCVXXE	DHHC	PWVNNCVGER	NYRYHLLFL	
DHHC1	DLHCNLC	DVDV	SARSK	HCSAC	NKCVCGE	DHHC	KWLNNCVGER	
DHHC2	IRYCDRCQLIK	PPDRCH	HCSV	CDKILKM	DHHC	PWVNNCVGFS	NYKFHLLFL	
DHHC3	VYKCPKCCS	IKPDR	RAH	HCSV	KRCIRKM	DHHC	PWVNNCVGEN	
DHHC4	NSRCP	CDLRLK	PARSK	HCSRL	CDRCVHR	DHHC	PWVNNCIGAW	
DHHC5	MKWCATCR	FYRPP	RCS	HCSV	CDNCVEE	DHHC	PWVNNCIGRR	
DHHC6	LQYCKVCQA	YKAPR	SH	HCRK	CNRCV	MKM	DHHC	PWINNC
DHHC7	IYKCPKCC	IKP	ERAH	HCS	ICKRC	IRKM	DHHC	PWVNNCVGE
DHHC8	MKWCAT	CHF	YRPP	RCS	HCSV	CDNCVEE	DHHC	PWVNNCIGRR
DHHC9	LKYCYTCK	I	FRPP	RAS	HCS	ICDNC	VER	
DHHC11	NQYCHL	CEVT	ASKKAK	HCSAC	NKCVSG	E	DHHC	KWLNNCVGR
DHHC12	LRRCR	HLV	LQPL	RAR	HCRD	CRRCV	RRY	
DHHC13	RTFCT	SCL	IRKPL	RSL	HCHV	CNSCV	ARE	
DHHC14	LKYCFTCK	I	FRPP	RAS	HCSL	CDNCVE	EQ	
DHHC15	VRFC	DRCH	L	IKPDR	CH	HCSV	CAMCVL	
DHHC16	VSIFCK	KCI	YPK	PAR	TH	HCS	ICNRCV	
DHHC17	SIFC	STCL	IRK	PVRS	KH	GV	CNRC	
DHHC18	LKYCFTCK	MFR	PP	PTS	HCSV	CDNCVE	ER	
DHHC19	LEWC	PKCL	FHR	PP	RTY	HCP	WCNICV	
DHHC20	IRYCEK	CQLIK	PPDR	RAH	HCSAC	DRCVL	KM	
DHHC21	WELCNK	CNLMR	PKR	SH	HCSR	CGHCV	RRM	
DHHC22	MSQR	PQCP	PP	STH	FCR	VC	SRVTL	
DHHC23	EDWC	AKC	QLV	R	PAR	A	HCSR	
DHHC24	WAYCYQ	CQS	QV	PP	RS	GH	ACRVC	
DHHC25	VSYC	TD	CH	SA	I	RTAC	HCTVC	



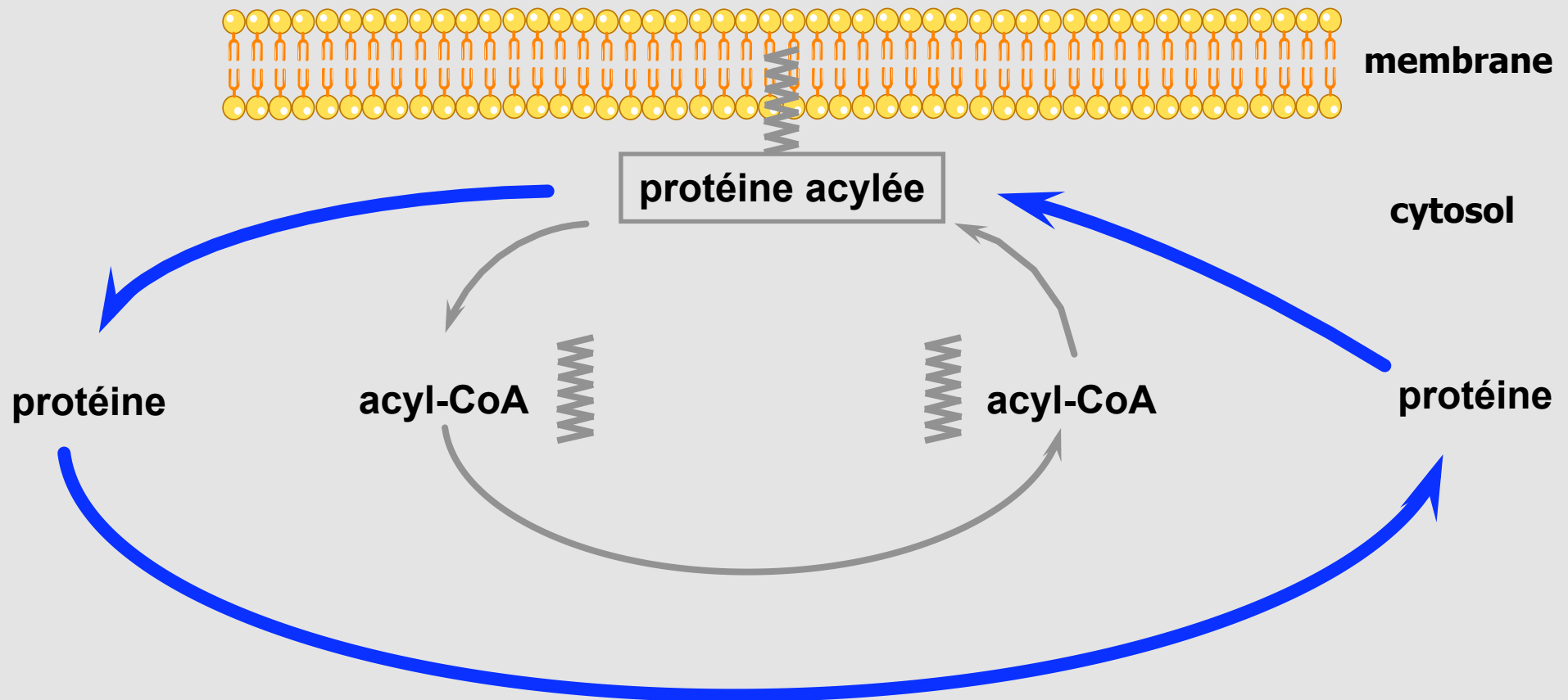
Les données actuelles sur les palmitoylacyltransférases (PAT) impliquées dans la S-acylation: la famille des protéines « DHHC »

Certaines protéines DHHC palmitoylent une large gamme de substrats protéiques, d'autres sont très spécifiques *Greaves and Chamberlain (2011) Trends Biochem. Sci. 36, 245-253*

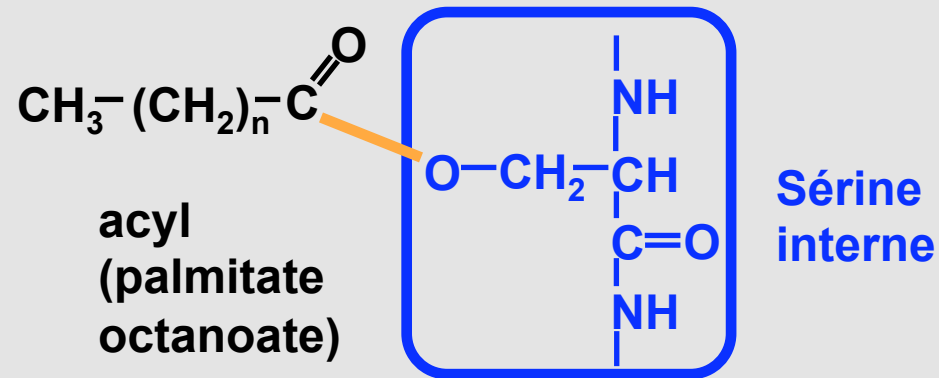
protéines DHHC	Substrats protéiques connus
DHHC2	PSD95, SNAP25, SNAP23, eNOS, Fyn, NDE1, NDEL1, CD151, CKAP4, ABCA1
DHHC3	PSD95, SNAP25, SNAP23, G _{as} , G _{αq} , G _{αi2} , CSP, GABA _A γ2, eNOS, GluR1/2, GAD65, STREX, Fyn, BACE1, NDE1, NDEL1, NCAM140, CaMKIγ, NR2A/B
DHHC4	BACE1
DHHC5	STREX
DHHC7	PSD95, GAP43, SNAP25, SNAP23, G _{as} , G _{αq} , G _{αi2} , CSP, GABA _A γ2, eNOS, STREX, Fyn, BACE1, NDE1, NDEL1, NCAM140, sortillin, PDE10A2
DHHC8	eNOS, SNAP25, paralemmin-1, GAD65, PSD95, PSD93
DHHC9	STREX
DHHC12	ABCA1
DHHC13	huntingtin, GAD65
DHHC15	PSD95, GAP43, SNAP25b, CSP, GABA _A γ2, Fyn, BACE1, CD151, CI-MPR, sortillin
DHHC17	Lck, SNAP25, SNAP23, CSP, huntingtin, GluR1/2, GAD65, STREX
DHHC18	Lck, H-Ras
DHHC19	R-Ras, PDE10A2
DHHC20	Fyn, BACE1, ABCA1
DHHC21	eNOS, Fyn, Lck, ABCA1

Les effets de la S-acylation latérale

Labilité et réversibilité de la liaison thioester
⇒ cycle d'acylation-déacylation possible



O-acylation et O-acyltransférases



**Mécanisme non-enzymatique?
Autocatalytique?**

Bano et al. (1998) Biochem. J. 330, 723-730

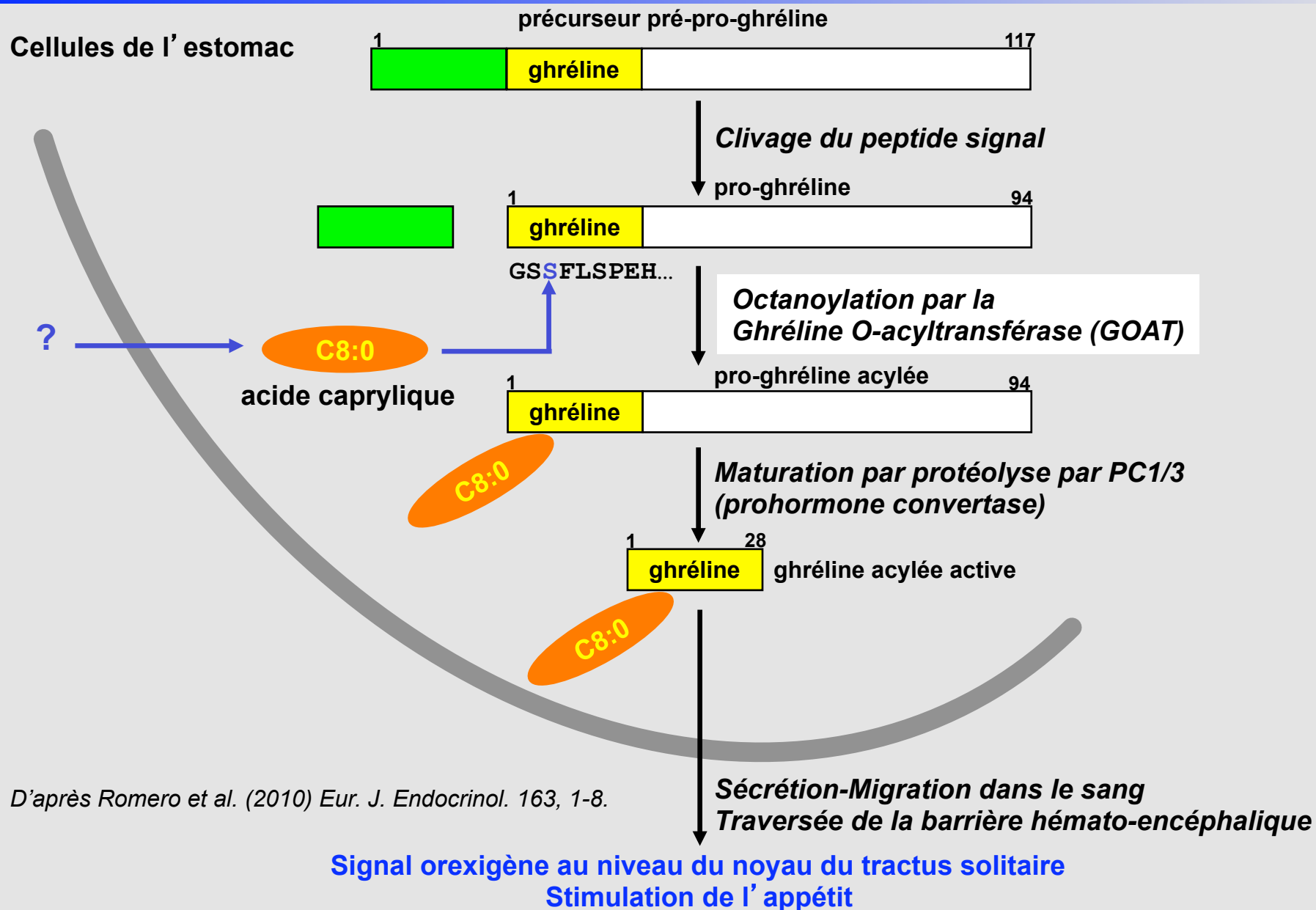
**Membrane-bound O-acyltransferase
(MBOAT)?**

Seule enzyme bien caractérisée: la GOAT
(Ghrelin O-acyltransférase)=MBOAT4

Yang et al, 2008, Cell 132,387-396

Octanoylation post-traductionnelle de la ghréline, peptide orexigène

(seul exemple actuellement connu d'une acylation latérale par un acide gras saturé court...)

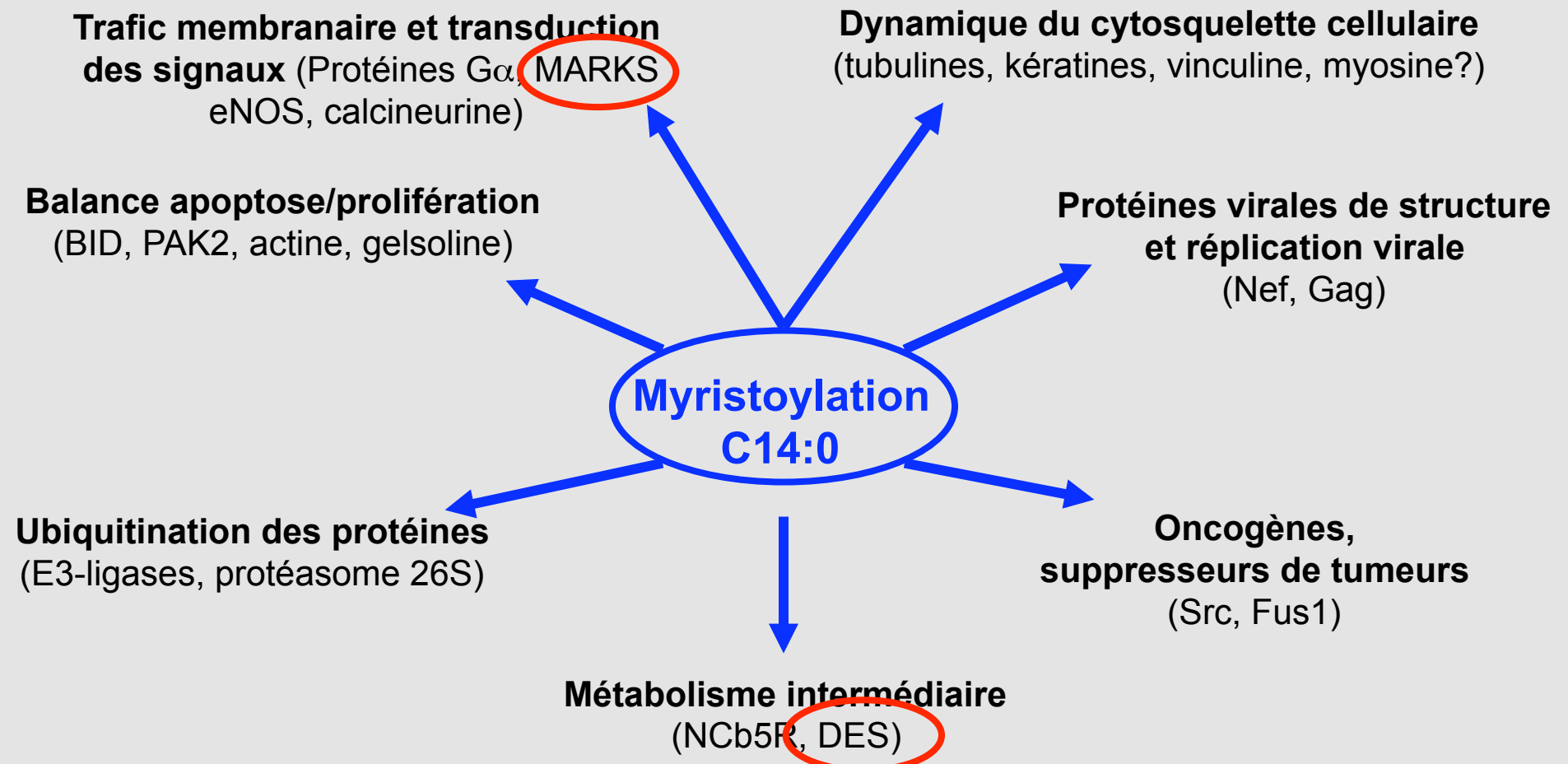


PLAN

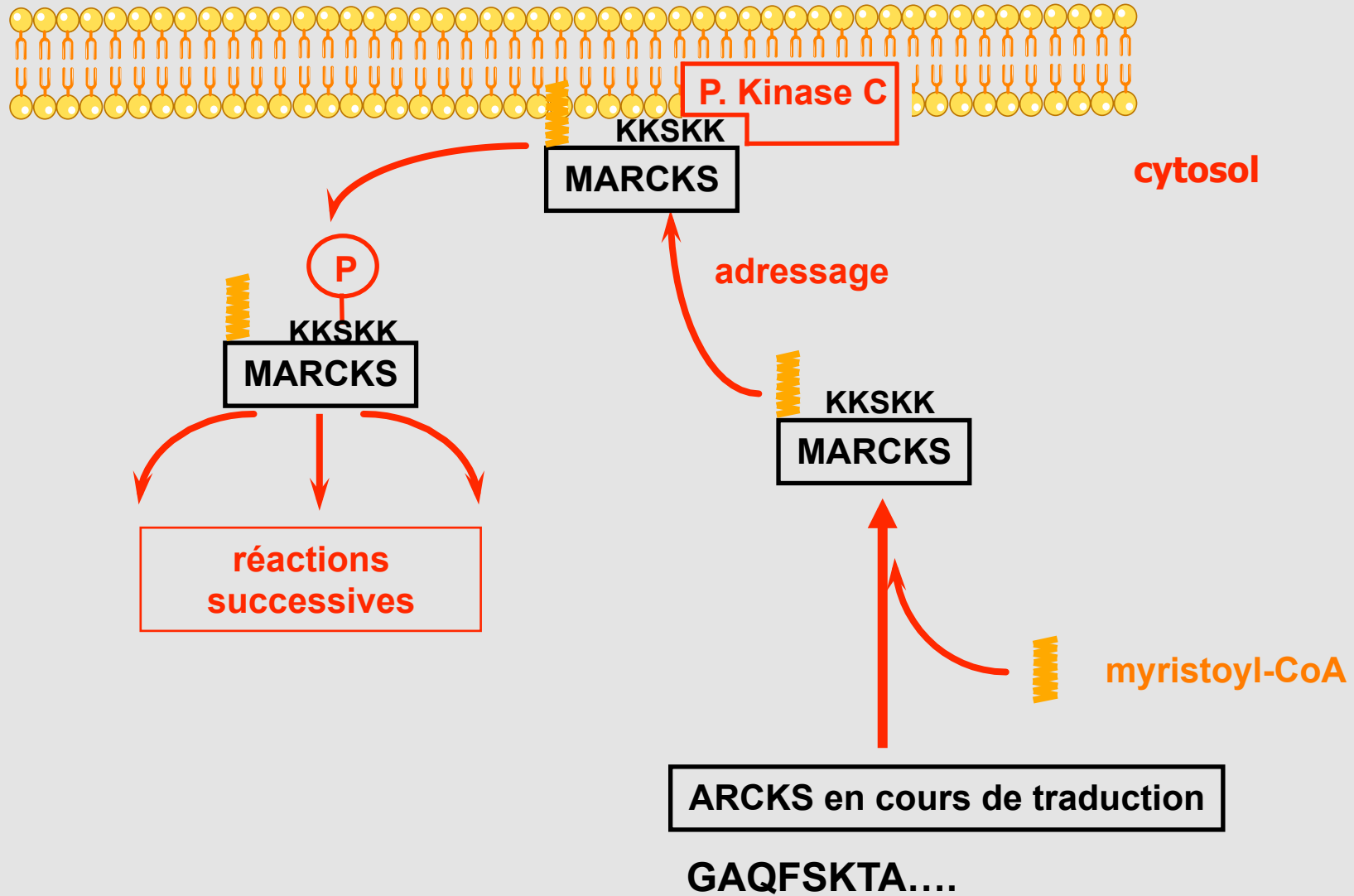
- 1. Les modifications covalentes de protéines par des lipides**
- 2. Les enzymes, les mécanismes et les effets de l'acylation**
- 3. Exemples de régulation de la fonction des protéines myristoylées**
- 4. L'origine des acides gras qui acylent des protéines**

Myristoylation, Régulation, Signalisation

60-70 protéines myristoylées connues et bien décrites, 200 à 300 protéines potentielles selon les prédictions bioinformatiques *Maurer-Stroh et al. (2000) J. Mol. Biol. 317, 541-557*

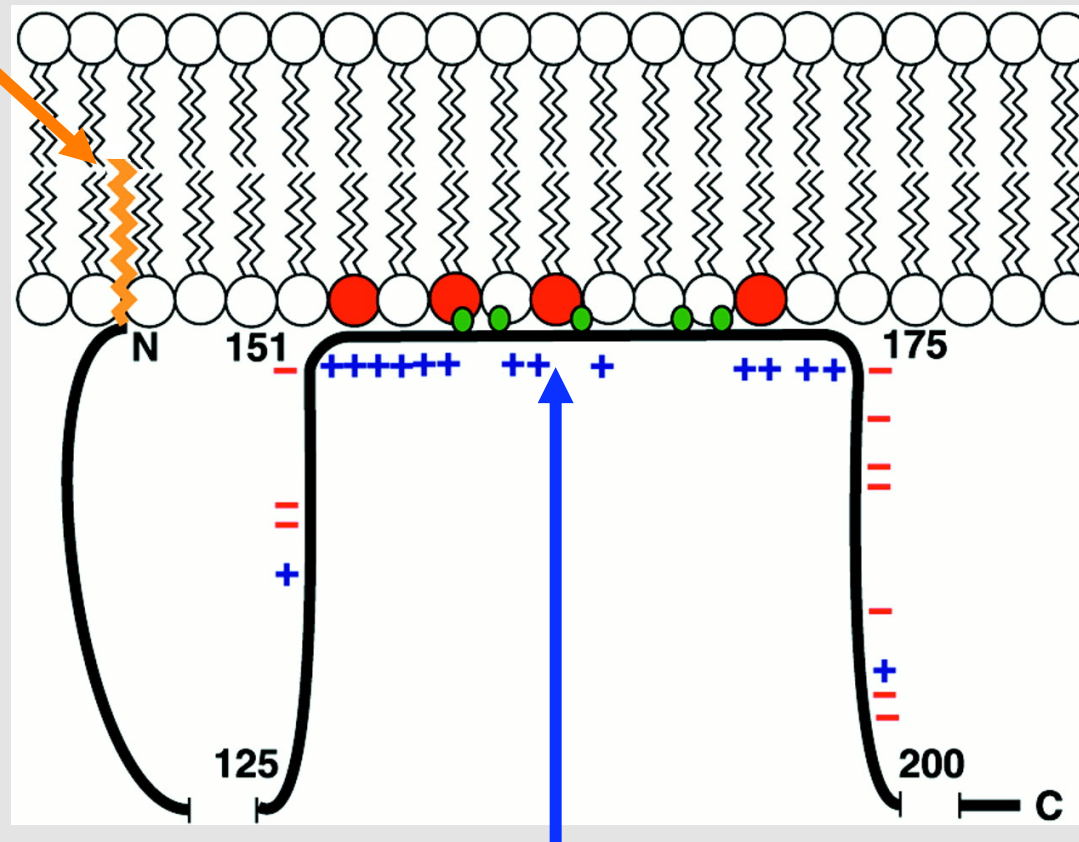


Myristoylation de MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate)



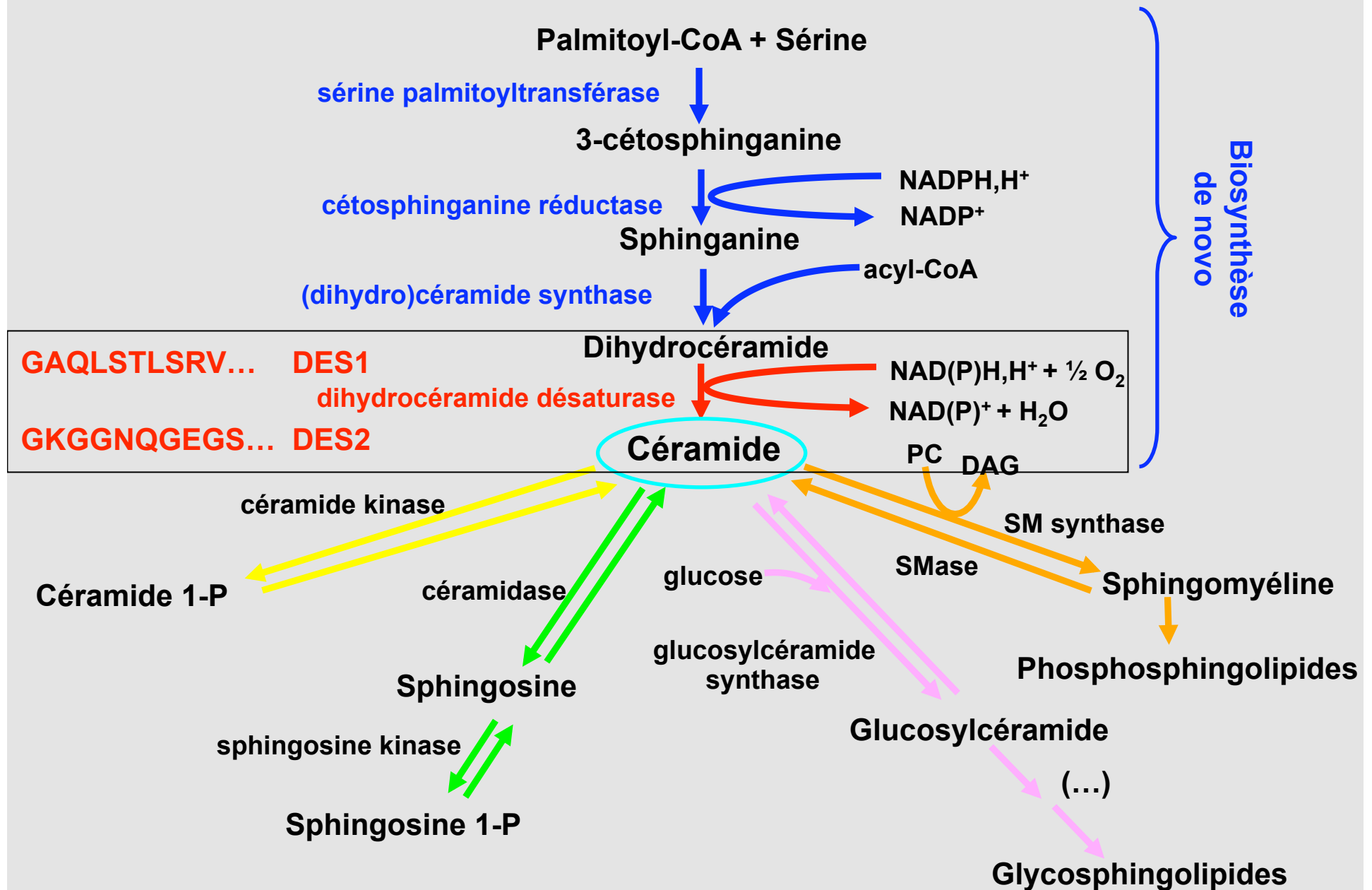
Interactions de MARCKS avec la membrane plasmique

Le C14:0 s'insère dans la bicouche

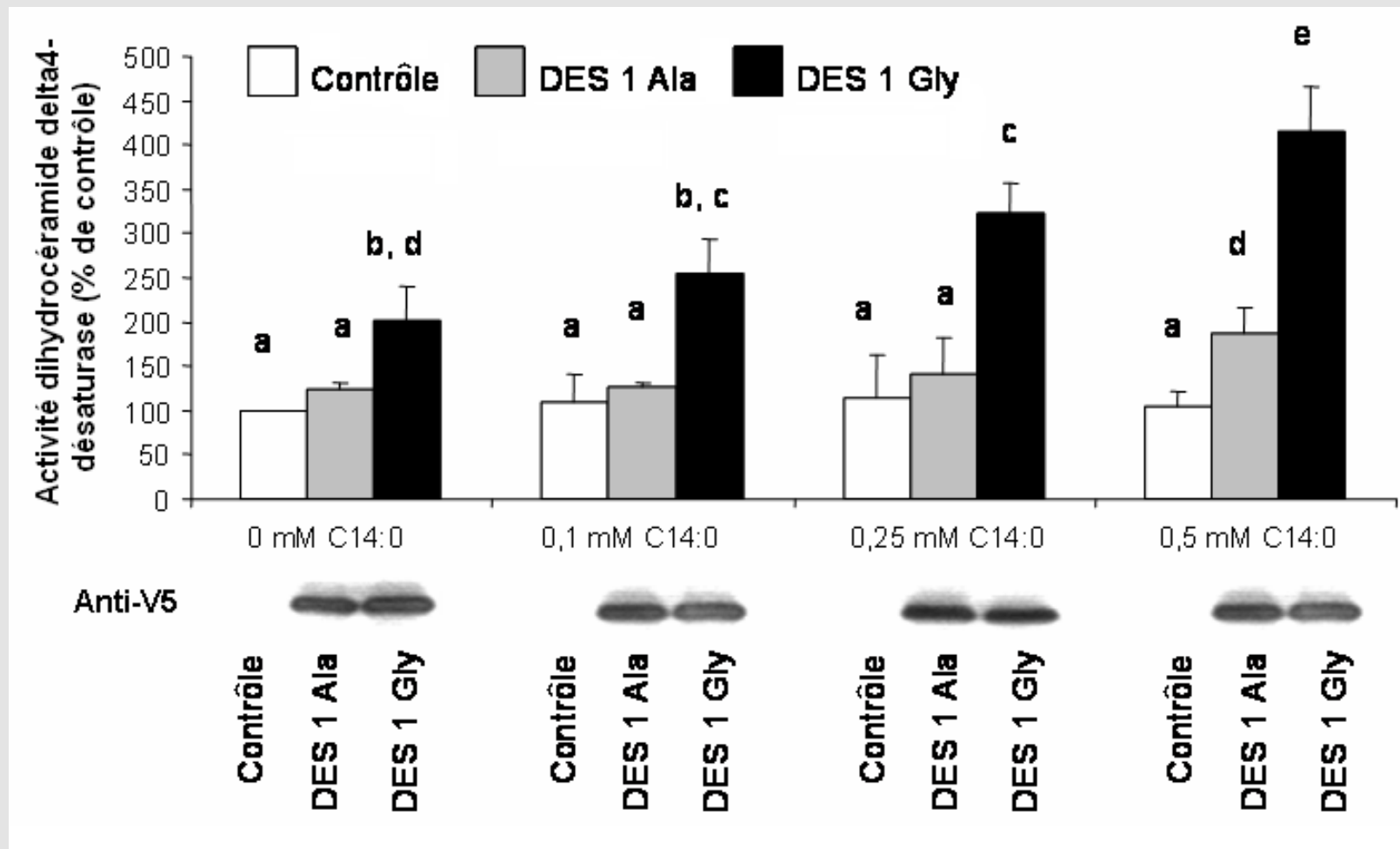


Les résidus basiques interagissent avec les lipides acides (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PIP₂)

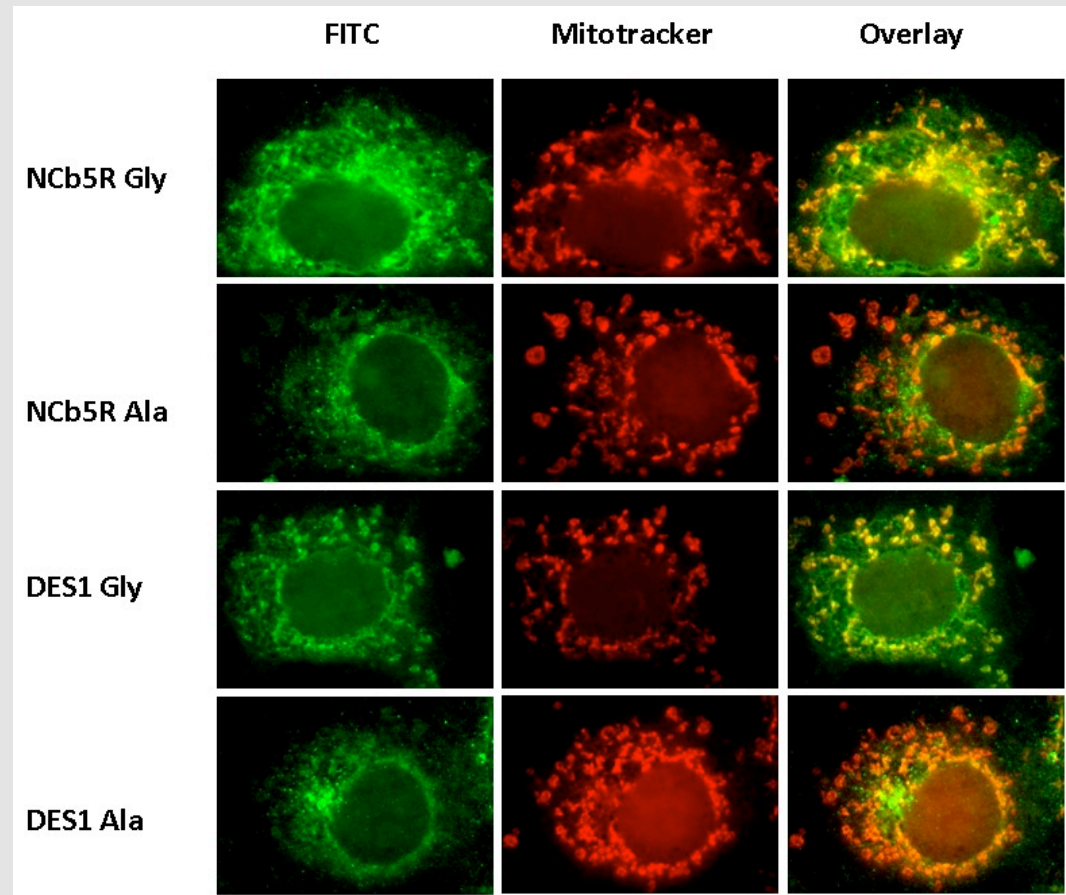
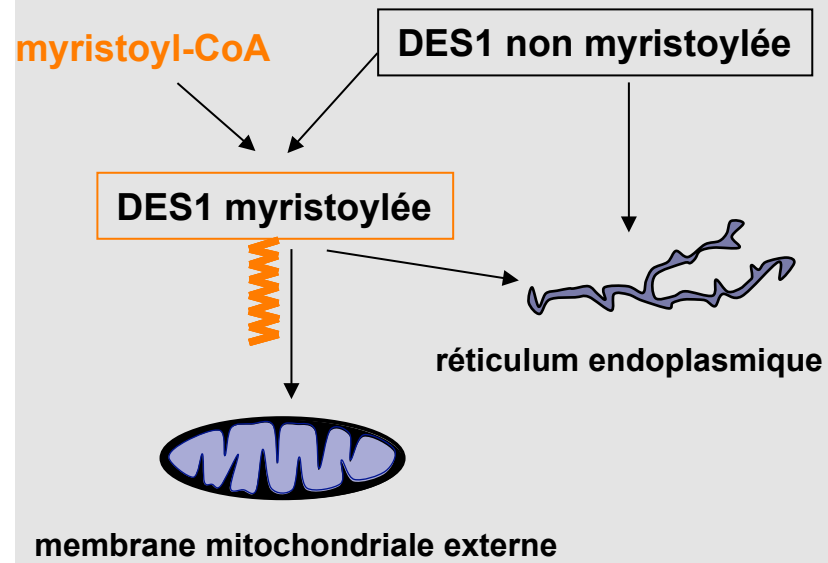
Myristoylation de la dihydrocéramide Δ^4 -désaturase (DES)



Effet activateur de la myristoylation sur l'activité de DES1

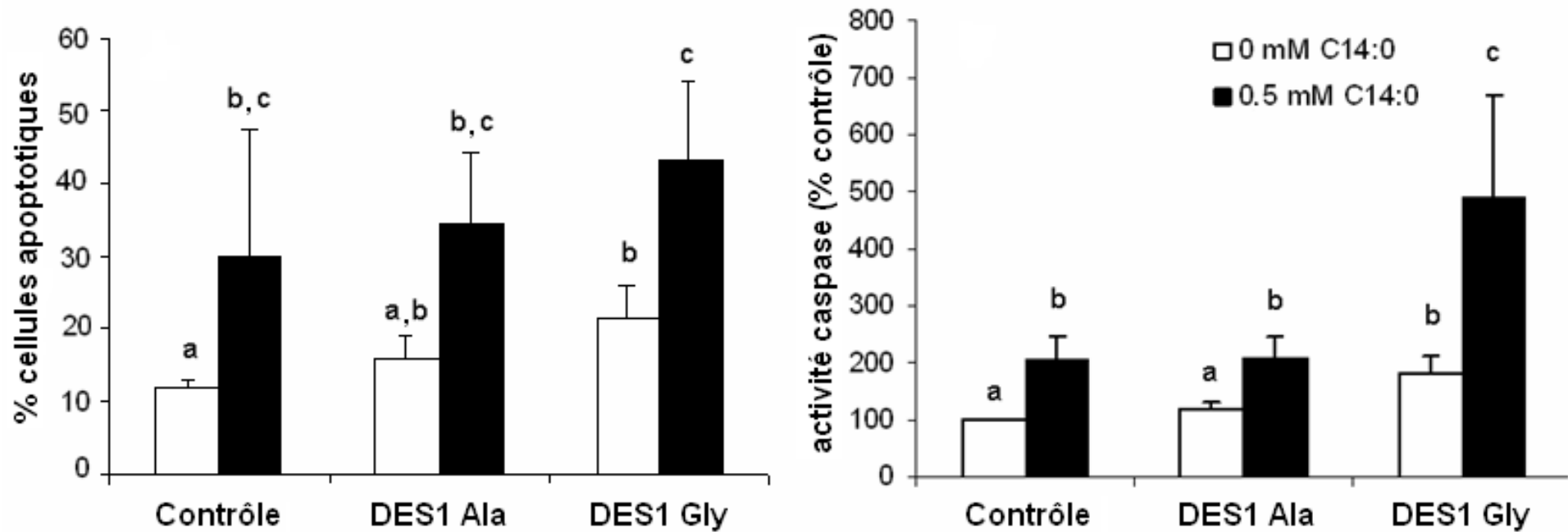


Adressage subcellulaire vers la mitochondrie de DES1 myristoylée



Effet proapoptotique du C14:0 via la myristoylation de DES1

Régulation de la production de céramide et de sa localisation: effet sur l'apoptose



PLAN

- 1. Les modifications covalentes de protéines par des lipides**
- 2. Les enzymes, les mécanismes et les effets de l'acylation**
- 3. Myristoylation et régulation de la fonction des protéines concernées**
- 4. L'origine des acides gras qui acylent des protéines**

Spécificité de la NMT pour le myristoyl-CoA

Chez la levure, l'homme, le rat: les myristoyltransférases sont hautement spécifiques de l'acide myristique activé en myristoyl-CoA *Bhatnagar et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 11045-11053; Kishore et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 8835-8855; Devadas et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 7224-7239; Rudnick et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10507-10511; Rioux et al. (2006) Mol. Cell. Biochem. 286, 161-170*

Km_{app} C14:0	95 μ M
Km_{app} C12:0	160 μ M
Km_{app} C18:1 n-9	203 μ M
Km_{app} C16:0	583 μ M

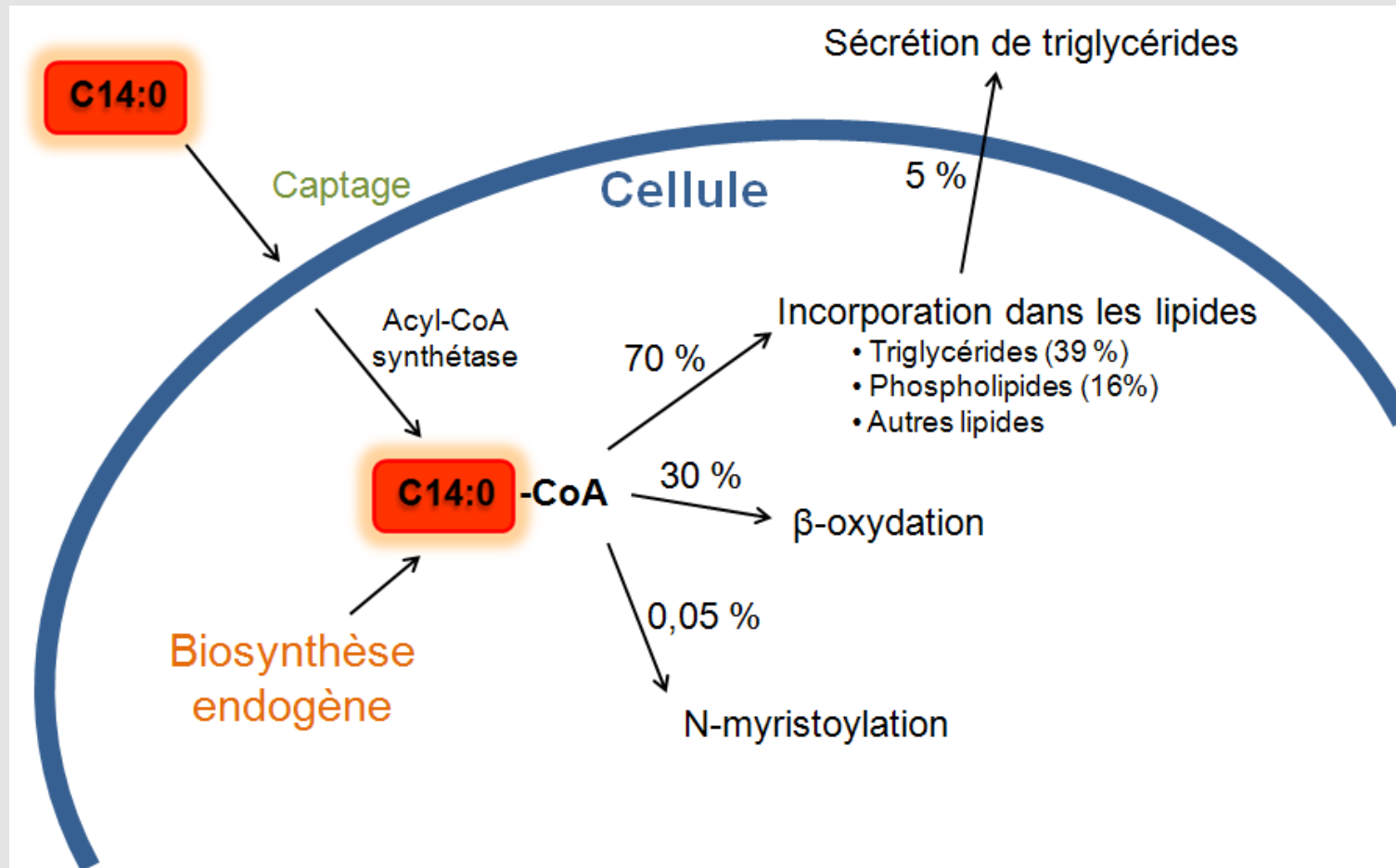
Seule exception : hétéroacylation découverte dans la rétine des mammifères
L'acide myristique C14:0 peut être remplacé par:

- ☞ l'acide laurique C12:0
- ☞ l'acide cis-5 tétradécanoïque C14:1 n-9
- ☞ l'acide cis-5, cis-8 tétradécadiénoïque C14:2 n-6

Neubert et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 18274-18277

Kokame et al. (1992) Nature 359, 749-752

Origine de l'acide myristique qui myristoyle les protéines?



En modèle cellulaire: l'acide myristique exogène et l'acide myristique endogène sont utilisés pour la myristoylation

Origine des acides gras saturés qui acylent les protéines *in vivo*?

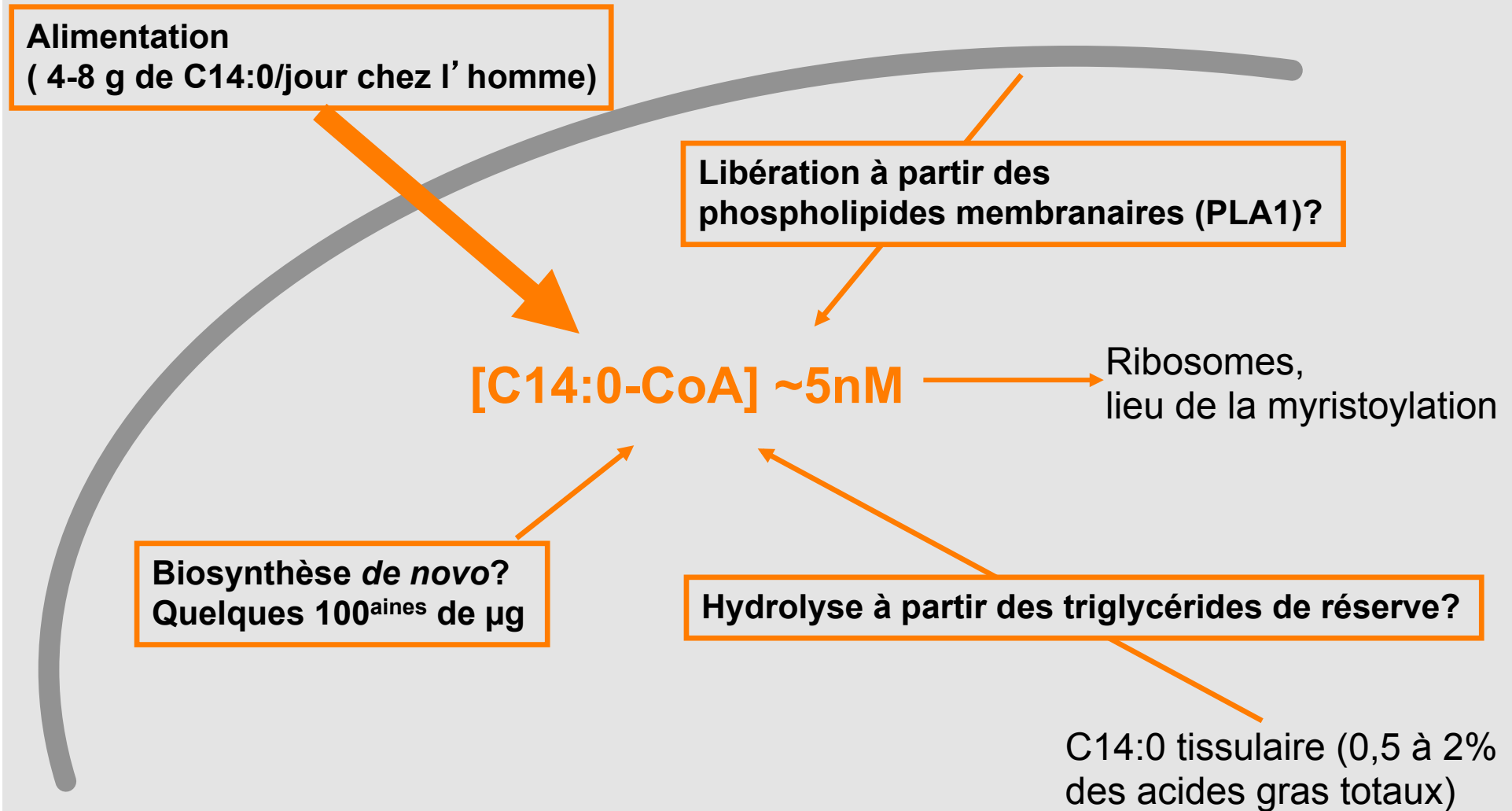
Chez la souris, l'acide myristique alimentaire régule l'expression de la protéine MacMARCKS (protéine myristoylée des macrophages)

Hubbard et al. (1996) J. Nutr. 126, 1563-1570

Chez l'homme, le pool d'acides gras liés par liaison thioester aux protéines des macrophages est modulé par l'apport alimentaire en acides gras

Muszbeck et al. (1996) Lipids 34, S331-S337

Origine de l'acide myristique qui myristoyle les protéines?

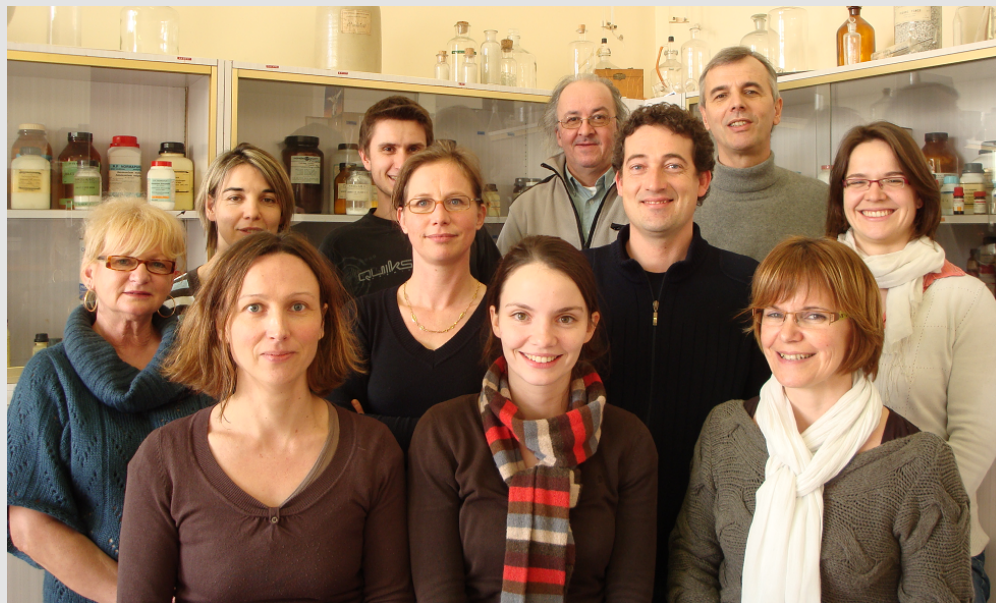


Le niveau de myristoylation des protéines est-il dépendant de la biodisponibilité en acide myristique?

Conclusion

Les acides gras saturés et l'acylation des protéines; des fonctions à découvrir, des besoins à définir

- ❖ La description des rôles physiologiques des acides gras saturés a longtemps été restreinte à leur responsabilité dans la hausse du cholestérol plasmatique chez l'homme et l'animal, en cas d'apports en excès dans l'alimentation (effets désormais controversés).
- ❖ Aux niveaux cellulaires et moléculaires, les effets des acides gras saturés sont encore peu connus.
- ❖ De nombreuses protéines acylées (myristoylées, palmitoylées) restent à découvrir et à étudier.
- ❖ L'importance de la myristoylation pour assurer les fonctions des protéines concernées, la forte affinité de la NMT pour le substrat myristoyl-CoA, et la faible teneur en acide myristique intracellulaire (associée à une très faible biosynthèse endogène), suggèrent que les apports exogènes en acide myristique, *via* l'alimentation, pourraient permettre de réguler de nombreux mécanismes cellulaires.
- ❖ Les recherches sur la relation entre disponibilité et fonctions métaboliques de l'acide myristique et des autres acides gras saturés dans la cellule sont nécessaires à la définition d'éventuelles recommandations pour un apport alimentaire chez l'homme.

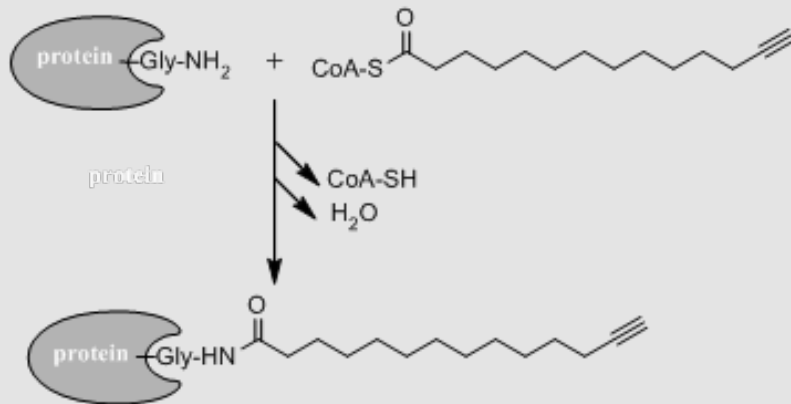


**P. LEGRAND
E. BEAUCHAMP
H. EZANNO
F. PEDRONO
H. BLANCHARD
B. CHOQUE
D. CATHELIN
N. MONTHEAN
C. DUBY
F. BOITREL
R. MARION
J. PIOT**

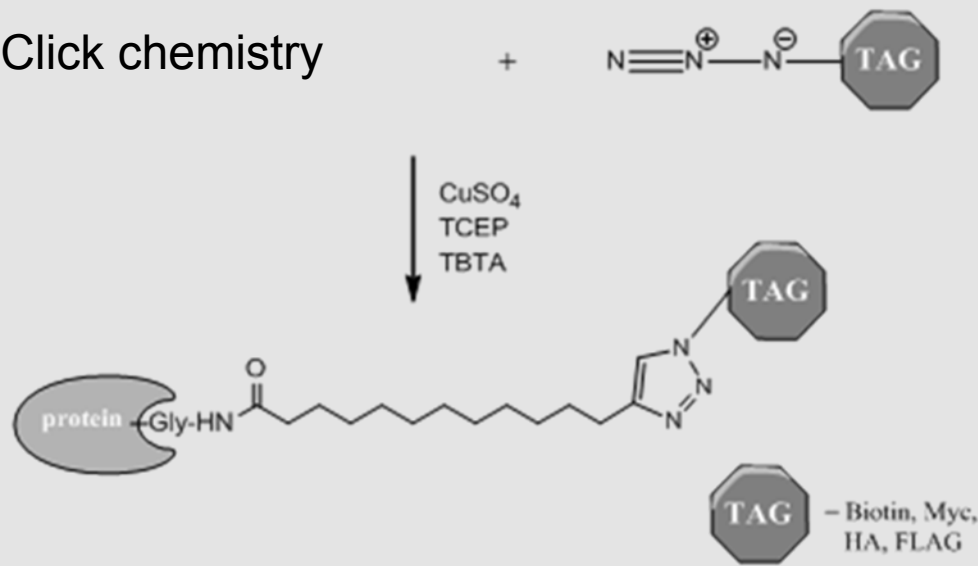


Nouvelles méthodologies de détection des protéines acylées

1-Marquage des protéines par des analogues d'acides gras (azido- ou alcynes)



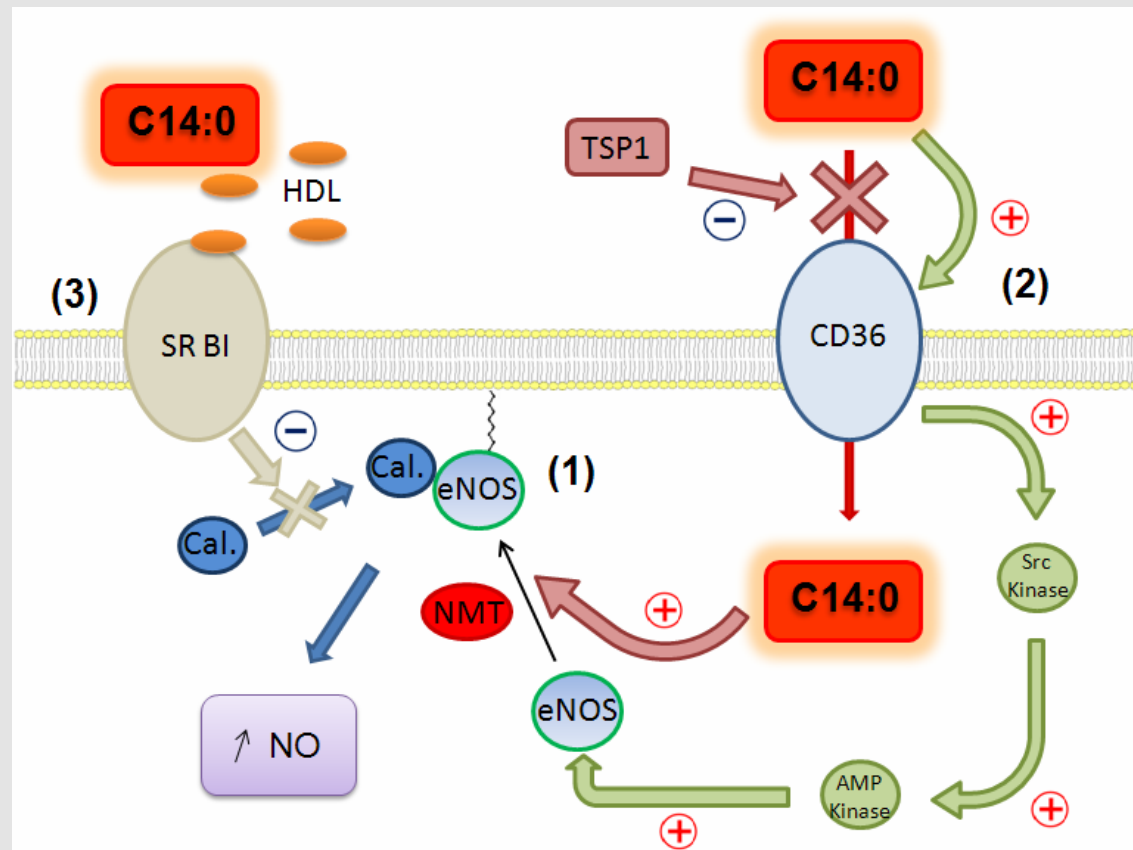
2- Click chemistry



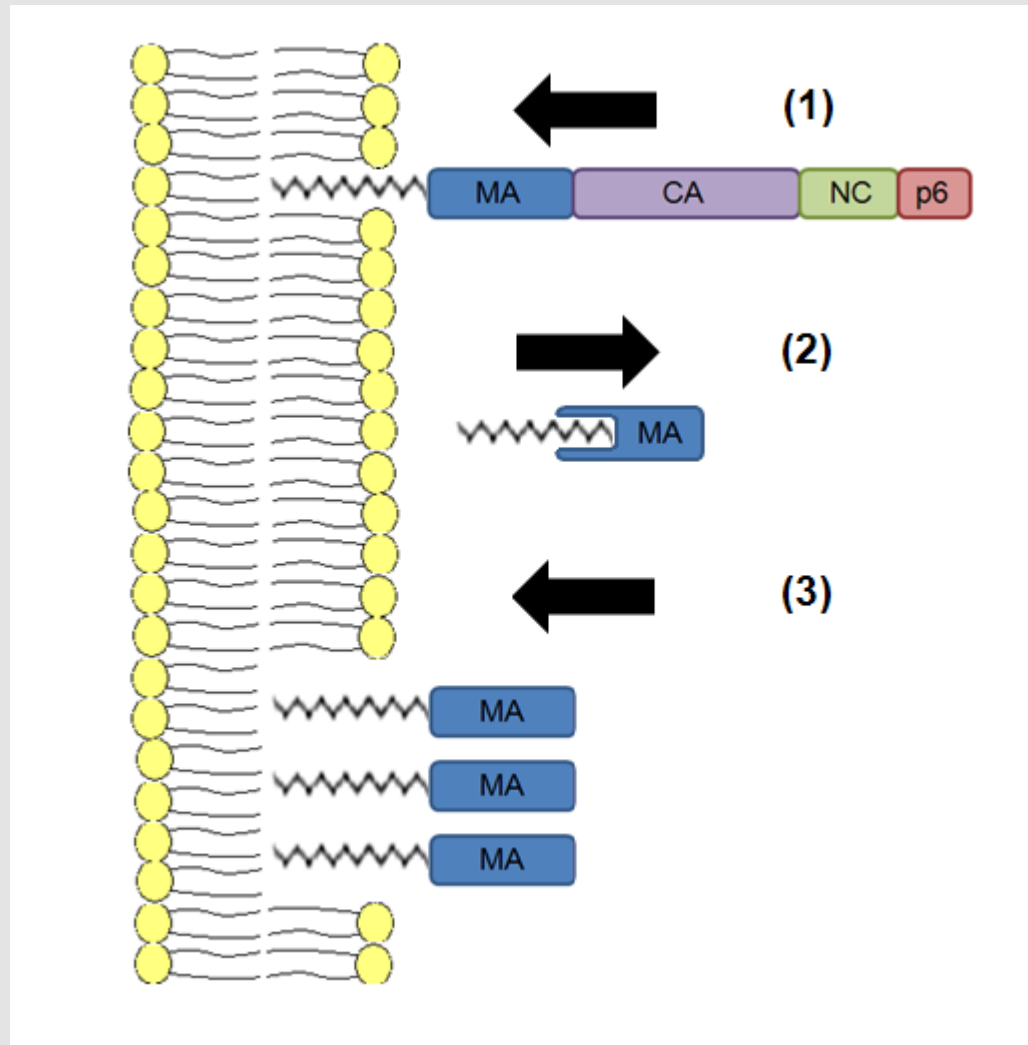
Description en cours du myristoylome
du post-myristoylome
du palmitoylome

(250 protéines dans les neurones de
mammifères Kang et al. (2008) Nature 456,
904-909)

Myristoylation de eNOS



Myristoylation des protéines virales de structure



Recherche d'inhibiteurs de la myristoylation des protéines virales Gag et Nef

Les NMT comme cibles thérapeutiques pour traiter certaines pathologies

Certains protozoaires parasites possèdent leur propre NMT, essentielle à leur survie (*Leishmania major et donovani*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*)



Recherche d'inhibiteurs spécifiques qui n'inhibent pas les NMT humaines

DRUG DISCOVERY

Cross (2010) *Nature* 464, 689-690

Fat-free proteins kill parasites

George A. M. Cross

The addition of a fatty acid to certain proteins is vital for the survival of protozoa that cause sleeping sickness and of their mammalian hosts. Compounds that target this process in the protozoa are now reported.

Mutation de la protéine SHOC2 conduisant à une myristoylation aberrante

SHOC2 normale
SSSLGKEKDSKEKDPKVPS

SHOC2 mutée S2G
GSSSLGKEKDSKEKDPKVPS

Mutation S2G crée un site aberrant de myristoylation

Adressage vers la membrane plasmique au lieu du noyau

Absence de régulation de la voie ras-MAPK

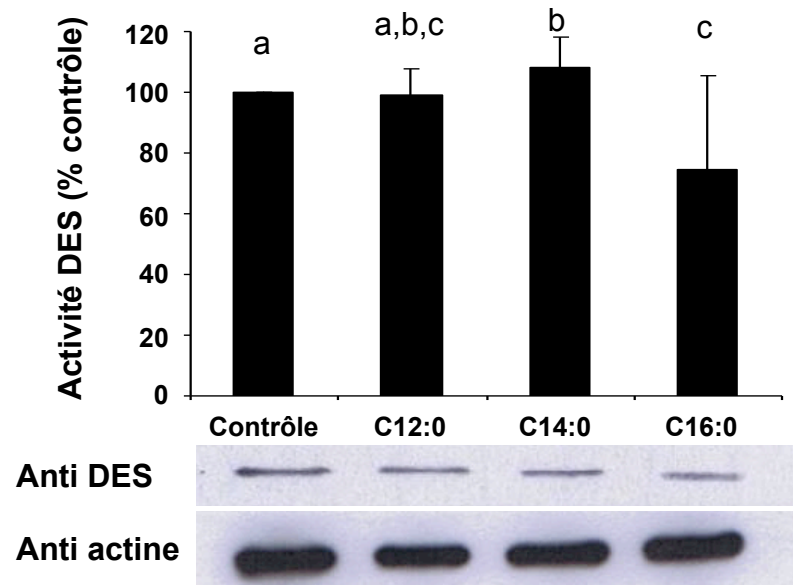
Syndrome Noonan-Like
(dymorphisme facial, petite taille...)



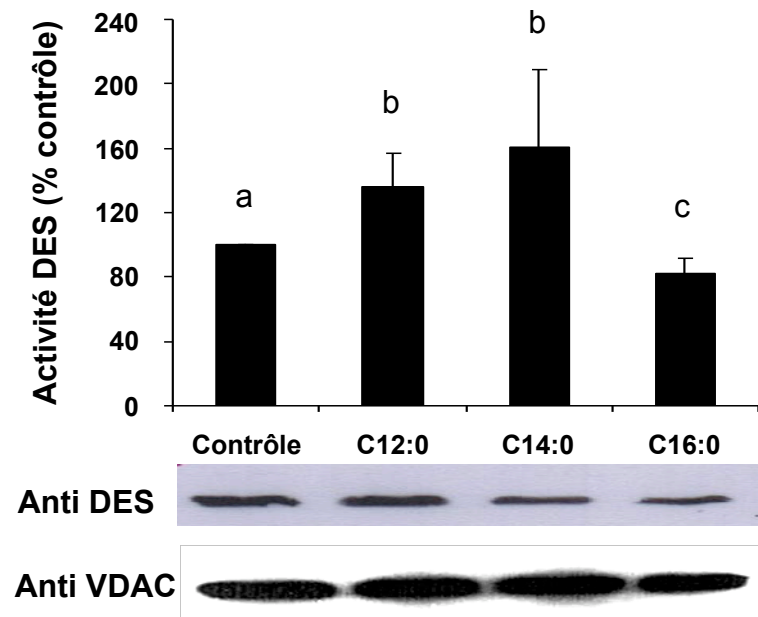
Les ANC

% du contenu énergétique	Lipides totaux	AG saturés	C12:0+C14:0 +C16:0
<i>Apports Nutritionnels Conseillés Édition 2001</i>	30-35	8	
<i>Apports Nutritionnels Conseillés Édition 2010</i>	35-40	<12	<8

Effet activateur de DES1 par le C14:0 dans l'hépatocyte de rat en culture



lysat cellulaire



mitochondries