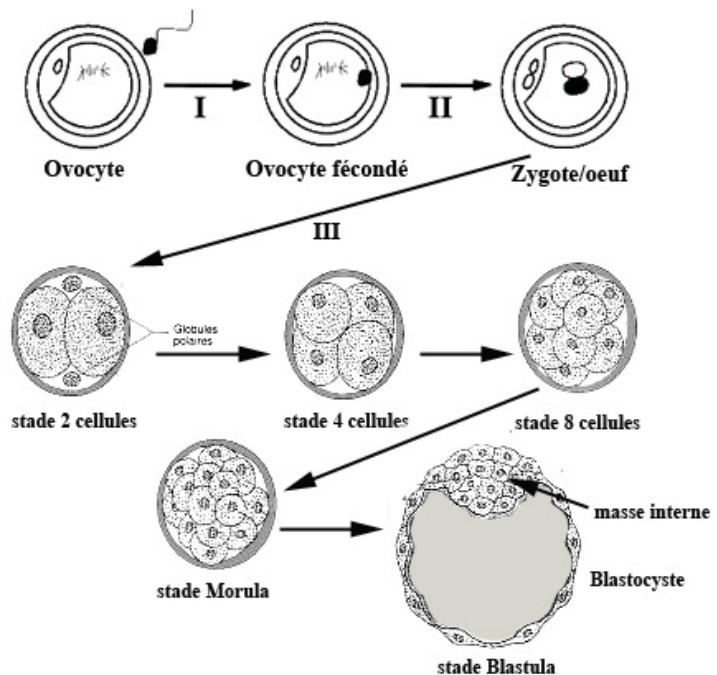


TD 1 Biologie cellulaire PCEM1 2007-2008

Rappels sur la fécondation et les premiers stades embryonnaires

I : Fécondation d'un ovocyte (bloqué en métaphase de la méiose II). II : reprise et fin de la méiose II, émission d'un second globule polaire, individualisation du noyau de l'ovule (pronucleus femelle, en blanc), gonflement du pronucleus mâle (en noir). III : les membranes des pronuclei vont disparaître reconstituant un matériel génétique diploïde. L'œuf va alors subir de nombreuses divisions/mitoses (stade 2, 4, 8 cellules ...) et former successivement la **morula** (32 cellules indifférenciées) puis le **blastocyste (début de différenciation cellulaire)** au cours des premiers stades de la vie embryonnaire. Le stade fœtal succède au stade embryonnaire et consiste en la mise en place des organes vitaux.



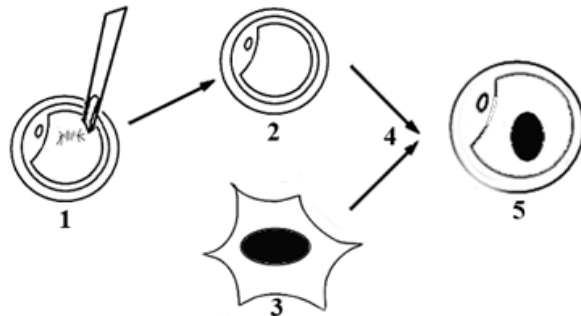
Q1 : Question sur les cellules souches:

- A. Les cellules souches adultes sont totipotentes.
- B. Les cellules pluripotentes peuvent reconstituer un tissu.
- C. Le potentiel de différenciation des cellules au stade morula est plus important que celui des cellules au stade blastula.
- D. Jusqu'au stade morula, les cellules sont totipotentes.
- E. Les cellules superficielles de la peau sont unipotentes.

Définition : Le clonage consiste à remplacer le matériel génétique d'un œuf par celui d'une cellule diploïde (2n), provenant d'un donneur, dans le but de produire des cellules souches voir un individu complet (clone) ayant le même programme génétique que le donneur.

Figure 1 : Technique de Transfert de Noyau dans un Ovocyte énucléé (TNO)

1. Le matériel génétique de l'ovocyte est retiré par une micropipette. 2 : Ovocyte énucléé. 3 Cellule donneuse interphasique (noyau en noir). 4 Pulse électrique provoquant une fusion cellulaire. 5 Ovocyte contenant le matériel génétique diploïde de la cellule donneuse. L'ovocyte est ensuite mis en culture afin qu'il se divise comme un œuf et atteigne le stade morula puis blastula.



Des expériences de TNO sur ovocyte d'agnelles (de race Scottish Blackface) ont été réalisées à partir de trois types de cellules donneuses ovines: des cellules embryonnaires, des fibroblastes fœtaux et des cellules de glandes mammaires adultes. Après fusion cellulaire, les cellules ont été pré-cultivées dans un milieu spécial, le nombre de stade morula ou de blastocyste a été déterminé avant leur transfert dans l'utérus gravidique d'une agnelle. Voici les résultats obtenus

NB : En condition d'élevage classique, environ 6% des fœtus sont perdus lors des gestations chez les agnelles.

Tableau 1 : Résultats obtenus après transfert de noyau dans des ovocytes d'agnelles

Type cellulaire donneur	Nombre de transferts réussis (% par rapport au nombre de transferts tentés)	Nb de morula ou blastocystes obtenus (% par rapport au nombre transféré)	Nb de morula ou blastocystes transférés	Nombre d'agneaux vivants (% par rapport au nombre de blastocystes transféré)
Epithélium mammaire	277 (63)	29 (11,7)	29	1 (3,4)
Fibroblaste fœtal	172 (84)	34 (27,4)	34	2 (5,9)
Cellules embryonnaires	385 (82)	90 (39)	72	4 (5,6)

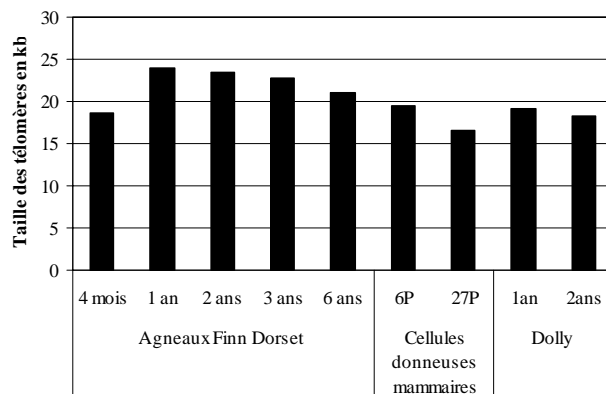
Q2 : Concernant le tableau 1, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Le type des cellules donneuses influence le pourcentage de transferts réussis.
- B. Plus les cellules donneuses sont différenciées, moins le pourcentage d'œufs atteignant le stade morula ou blastocyste est important.
- C. Le rendement en nombre d'agneaux vivants par rapport au nombre de morula/blastocyste transférés est équivalent pour les cellules donneuses de type embryonnaire ou fœtale.
- D. Le nombre de fœtus perdus est équivalent à ce qu'on obtient en élevage classique (lorsque les cellules donneuses sont de type fœtal ou embryonnaire).
- E. En conclusion, plus les cellules donneuses sont indifférenciées, plus le pourcentage de clonage effectif est important.

Les télomères constituent l'extrémité des chromosomes, ils se raccourcissent à chaque division cellulaire dans la plupart des cellules. La taille des télomères serait ainsi une sorte d'**horloge biologique**.

Figure 2 : Taille des télomères chez l'individu cloné (Dolly)

L'animal cloné à partir des cellules épithéliales mammaires (CEM) s'appelle Dolly. La donneuse des CEM avait 6 ans au moment du prélèvement, elle est de la race Finn Dorset. Les CEM qui ont été utilisées pour le clonage de Dolly ont également été cultivées in vitro et ont été repiquées 6 (6P) ou 27 (27P) fois. La taille de télomères des CEM et de Dolly ou d'agneaux de la race Finn Dorset à différents âges a été analysée en Southern blot.



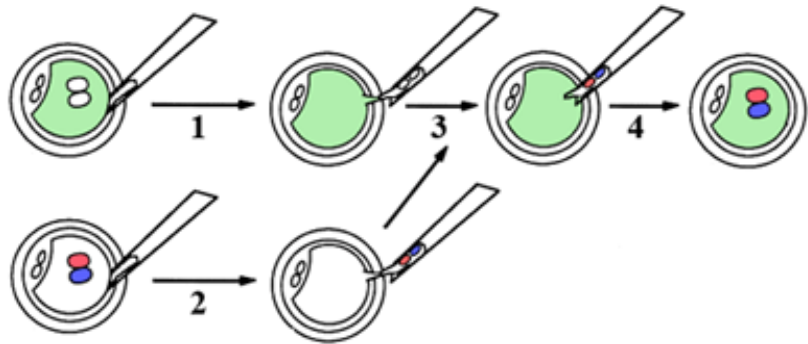
Q3 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Si le clonage est réussi Dolly est de la race Scottish Blackface.
- B. La taille des télomères diminue avec l'âge entre 1 et 6 ans chez les agneaux Finn Dorset.
- C. Dolly présente des télomères courts en comparaison avec un agneau Finn Dorset du même âge. On peut en conclure que la technique de clonage augmente la taille des fragments télomériques perdus à chaque cycle cellulaire chez Dolly.
- D. La culture in vitro des cellules CEM permet d'inhiber la perte télomérique.
- E. Dolly, à la naissance, avait probablement le même « âge biologique » que l'agneuse donneuse au moment du prélèvement (+ le temps de gestation).

Une autre équipe s'est intéressée au clonage, chez la souris, mais selon un procédé différent. La cellule donneuse n'est plus un ovocyte bloqué en métaphase II, mais un œuf possédant les deux pronuclei (avant sa première mitose).

Figure 3 : Technique d'échange de pronuclei (EP)

1 : Retrait des pronuclei de l'œuf (zygote) receveur murin. 2 : Prélèvement des pronuclei de l'œuf donneur. 3 : Injection des pronuclei donneurs dans l'œuf énucléé receveur. 4 : Le nouveau zygote est cultivé dans des conditions permettant son développement.



L'équipe obtient un pourcentage de zygotes atteignant le stade morula ou blastocyste de 90%. D'autres expériences sont alors réalisées en transférant dans le zygote énucléé, non plus un couple de pronuclei mais un noyau issu de cellules embryonnaires au stade 4 ou 8 cellules ou au stade blastocyste. Cette technique sera appelée dans la suite du TD **technique de Transfert de Noyau Interphasique dans un Zygote énucléé** ou **TNIZ**. Aucun des zygotes reconstitués de cette façon et cultivé ne produira de morula ou de blastocyste.

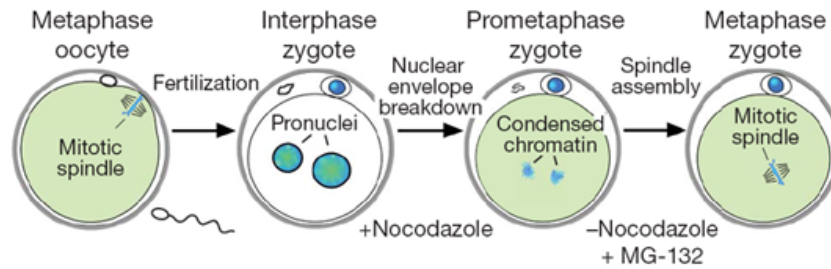
Q4 : D'après les résultats obtenus par le premier et le deuxième groupe de chercheur, quelle(s) est(ont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Le clonage par échange de pronuclei semble plus efficace pour obtenir des morula/blastocyste que le transfert de noyau sur ovocyte énucléée.
- B. Le clonage par transfert d'un noyau est efficace sur un ovocyte énucléée mais pas sur un zygote énucléé.
- C. Il semble qu'une ou plusieurs molécule(s) contenue(s) dans les pronuclei et nécessaire(s) à la poursuite du développement embryonnaire soit(soient) absente(s) des noyaux donneurs au stade 4 et 8 cellules (Figure 3).
- D. On peut supposer que cette(ces) molécule(s) soit(ent) présente(s) dans l'ovocyte, puis soit séquestrée par les pronuclei.
- E. Le transfert de noyau de cellules mammaires ovines dans des zygotes énucléés ovins permettra probablement de cloner un agneau.

Une troisième équipe a développé une technique de clonage par transfert de **chromosomes** et non plus du **noyau complet**, sur des **zygotes** (et non pas des ovocytes) énucléé.

Figure 4 : Technique de transfert de chromosomes (TC)

Selon cette technique les ovocytes fécondés sont « synchronisés » (arrêtés tous ensemble) au stade prométaphase (les chromosomes sont condensés et la **membrane nucléaire a disparu**) de la première division de l'œuf par le nocodazole. Une fois le nocodazole retiré, l'œuf reprend et termine sa prométaphase et l'ajout de MG-132 le bloque au stade suivant : la métaphase (ou les chromosomes condensés et bien individualisés sont tous associés au fuseau mitotique). A ce stade les chromosomes sont aspirés par une micropipette et remplacés par des chromosomes prélevés (selon le même protocole) sur une cellule donneuse.

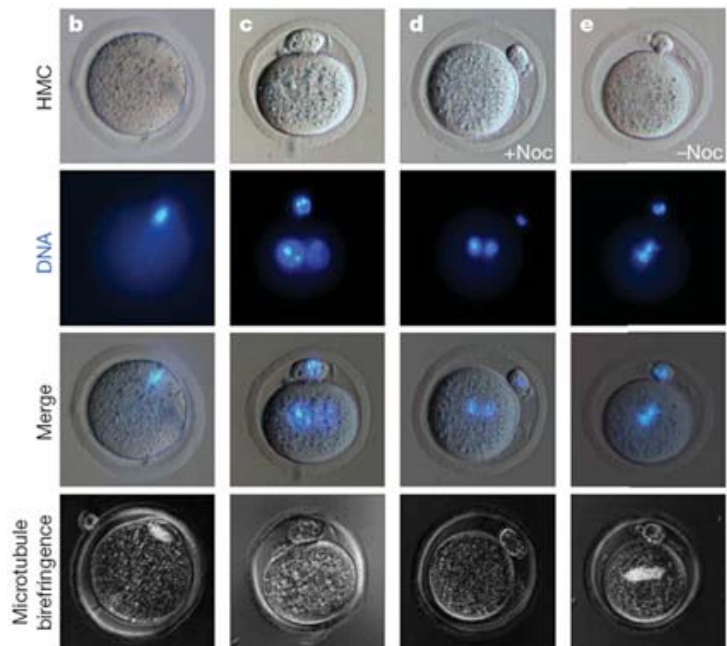


Q5 : Par rapport aux expériences précédentes, quelle est selon vous l'hypothèse de travail de ce troisième groupe, concernant le/les putatifs facteurs nécessaires à la poursuite du cycle ?

Figure 5 : Observation microscopique (stades correspondants à la figure 4)

1ère colonne : stade ovocyte, 2ème colonne stade zygote interphasique, 3ème colonne zygote en prométaphase bloqué par le nocodazole (+ Noc), 4ème colonne stade zygote en métaphase bloqué par MG132.

1^{ère} ligne : observation en microscopie optique, 2^{ème} ligne observation en microscopie à fluorescence (marquage en bleu de l'ADN par le Hoechst). 3^{ème} ligne : superposition des deux premières. 4^{ème} ligne : observation en microscopie à biréfringence (réfringence des microtubules).



Q6 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Les cellules observées à la figure 5 ont un diamètre voisin de 10nm.
- B. Les cellules de souris fluorescent naturellement en bleu.
- C. En microscopie à fluorescence, la longueur d'onde d'émission est supérieure à la longueur d'onde d'excitation.
- D. La microscopie visible permet d'observer facilement les organelles.
- E. La limite de résolution de la microscopie électronique est inférieure à celle de la microscopie à fluorescence.

Q7 : Concernant la figure 5, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Les chromosomes issus des pronuclei semblent condensés dans les colonnes d et e.
- B. En microscopie à biréfringence, il est possible de différencier les stades prométaphase et métaphase.
- C. Les structures très réfringentes observées en b et en e correspondent, à priori, aux microtubules du fuseau mitotique.

D. Si le MG 132 est retiré du milieu de culture, l'œuf devrait terminer sa mitose et passer au stade 2 cellules.

E. Les membranes nucléaires sont identifiables en c mais pas en b et e.

Q8 : Concernant la figure 5, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A. Il semble possible de prélever par micropipette les chromosomes aux stades prométaphase et métaphase.

B. Transférer des pronuclei après avoir prélevé l'ADN au stade c reviendrait à la technique d'EP

C. Transférer un noyau après avoir prélevé l'ADN au stade b reviendrait à réaliser la technique TNO.

D. Le marqueur bleu de l'ADN est toxique à long terme pour les cellules, on pourra donc facilement utiliser la microscopie visible pour prélever les chromosomes.

E. Le marqueur bleu de l'ADN est toxique à long terme pour les cellules, on utilisera donc la microscopie à biréfringence pour prélever facilement les chromosomes.

Des expériences de clonage sont réalisées sur cellules murines (de souris) selon différentes techniques, les cellules donneuses sont plus ou moins différenciées (du zygote aux fibroblastes).

Tableau 2 : Résultats obtenus par différentes méthodes de clonage

Cellule receveuse	Cellule donneuse	Technique	Nb de transferts/ échanges opérés	Nb de transferts/ échanges réussis (%)	Nb de morula et blastocystes obtenus (%)	Nb d'embryons transférés	Nb de naissances (%)
Zygote M	Zygote M	TC	93	66 (71)	53 (80)	48	16 (33)
Zygote I	Zygote I	EP	20	17 (85)	14 (82)	5	1 (20)
Zygote M	Stade 8 cellules M	TC	30	13 (43)	9 (69)	9	2 (22)
Zygote I	Stade 8 cellules I	TNIZ	30	16 (53)	0		
Zygote M	CSE M	TC	1093	323 (30)	201 (62)	174	9 (5)
Zygote I	CSE I	TNIZ	47	16 (34)	0		
Zygote I	CSE M	*	55	35(64)	0		
Zygote M	Fib. M	TC	775	231 (30)	97 (42)	/	/
Ovo. MII	CSE I	TNO	275	212 (77)	73 (34)	73	9 (12)

M = mitose, I = interphase, CSE = Cellules souches embryonnaires, Fib. = Fibroblaste (cellule totalement différenciée). TC = technique de Transfert de Chromosomes, EP = Echange de Pronuclei, TNIZ = Transfert de noyau Interphasique dans un Zygote énucléé en interphase, TNO = technique de Transfert de Noyau dans un **Ovocyte** énucléé (au stade MII). * transfert de chromosomes de la cellule donneuse vers un zygote énucléé en interphase.

Q9 : Concernant le pourcentage de réussite d'obtention des morula/blastula à la figure 5 et les données précédentes, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A. Le pourcentage de réussite de clonage par la technique TNIZ est le même que celui observé par le deuxième groupe de recherche.

B. Le pourcentage de réussite obtenu par la technique EP est proche de celui observé par le deuxième groupe de recherche.

C. Le pourcentage de réussite par la technique TNO est équivalent à celui observé par le premier groupe de recherche.

D. Le pourcentage de réussite par la technique TNO est inférieur à celui observé pour la technique TC, l'inverse est observé concernant le pourcentage de naissance après transfert d'embryon.

- E. Pour cloner l'ADN de cellules adultes (fibroblastiques), les techniques de TC et de TNO sont utilisables.

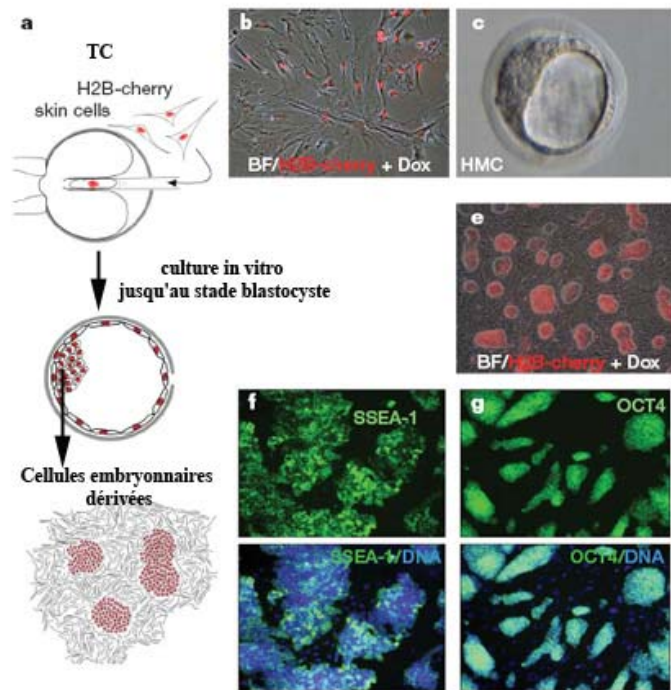
Q10 : Concernant la figure 5, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Si le zygote est en interphase et les cellules souches embryonnaires sont en mitose au moment du transfert, le clonage est possible.
 B. Si le zygote est en interphase et les cellules souches embryonnaires sont en interphase au moment du transfert, le clonage est possible.
 C. Si le zygote est en mitose et les cellules souches embryonnaires sont en mitose au moment du transfert (technique de transfert de chromosomes), le clonage est possible.
 D. Le clonage semble toujours possible (concernant les CSE) dans les conditions expérimentales pour lesquelles la membrane nucléaire des cellules donneuses est absente.
 E. Le clonage semble toujours possible (concernant les CSE) dans les conditions expérimentales pour lesquelles la membrane nucléaire du zygote est absente.

Figure 6 : Obtention de lignées cellulaires clonées, observations en microscopie visible et à fluorescence

b-e : Superpositions d'observations en microscopie à biréfringence (BF) et à fluorescence.

b : fibroblastes de la peau contenant un gène codant pour une protéine nucléaire qui fluoresce en rouge (H2B-cherry skin cells). c : stade blastula obtenu après transfert de chromosomes des cellules décrites en (b). e : colonies de cellules embryonnaires en culture, dérivées de la masse interne du blastocyste en c. f-g : observation en microscopie à fluorescence de colonies de cellules embryonnaires. f Marquage en vert d'une protéine embryonnaire SSEA-1. g : Marquage en vert d'une protéine exprimée dans les cellules non différenciées (OCT4). Contremarquage en bleu de l'ADN



Q11 : Concernant la figure 6, quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

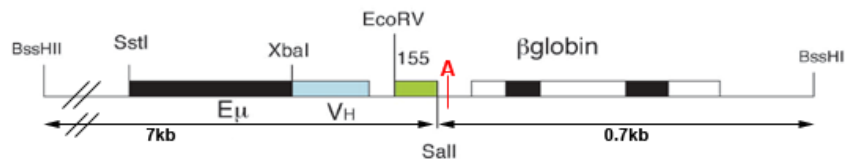
- A. les cellules en b et e possèdent le même génome mais présentent des morphologies très différentes.
 B. les cellules clonées et dérivées en lignées cellulaires (e) continuent d'exprimer la protéine nucléaire rouge, ceci démontre leur caractère clonal.
 C. Les cellules dérivées après clonage expriment un marqueur de non différenciation, alors que les cellules donneuses étaient différenciées, il est donc possible par clonage de «dédifférencier» des cellules adultes.
 D. Par cette technique, il est possible de créer une réserve de cellules souches clonales en culture, pouvant être utilisées ultérieurement.
 E. Les cellules souches ainsi produites ne produiront probablement pas de réaction de rejet si on les implante à l'individu ayant fournis les cellules donneuses.

TD 2 Biologie cellulaire PCEM1 2007-2008

Afin d'étudier la fonction de la protéine Bcl-2, des souris transgéniques surexprimant Bcl-2 au niveau des lymphocytes B ont été créés.

Figure 1 : Vecteur utilisé lors de la transgénèse.

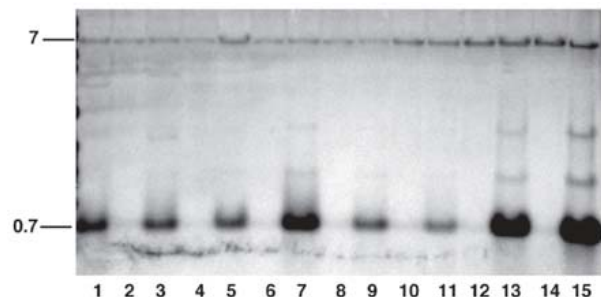
Le vecteur utilisé pour créer les souris transgéniques est le suivant : il se compose d'un promoteur (**cellules B spécifique**) noté V_H précédé d'une séquence Enhancer noté E_{μ} , d'une séquence de 155bp entourée d'un site de restriction EcoRV et d'un site SalI, d'un signal de polyadénylation (noté A), d'une séquence codante pour la bêta globine. Le vecteur est encadré par deux sites de digestion par l'enzyme BssHII.



Le cDNA codant pour Bcl-2 couplé à une courte séquence « tag », d'une taille totale de 900pb a été cloné (inséré) entre les sites de restriction EcoRV et SalI. Puis le transgène a été injecté dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé. Après quelques divisions, l'œuf a été réimplanté dans l'utérus d'une souris gestante. L'expérience a été renouvelée à 15 reprises. 15 souriceaux sont nés

Figure 2 : Vérification du caractère transgénique par Southern blot

Un fragment de la queue de chaque souriceau a été prélevé pour extraire de l'ADN génomique. Cet ADN a été digéré par les enzymes **BssHII** et **SalI**, puis séparé par migration sur gel et transféré sur membrane selon la technique du Southern Blot. La membrane a été hybridée à l'aide d'une sonde radioactive spécifique du gène de la globine, puis un film sensible à la radioactivité a été utilisé pour révéler la présence ou l'absence de la séquence complémentaire de la sonde. Une photo du film est représentée, avec l'indication des tailles des fragments à gauche.



Q1 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

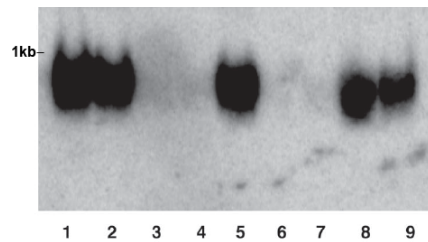
- A. La technique de Southern-blot permet d'évaluer grossièrement le niveau de transcription du transgène.
- B. La technique de Northern-blot permet d'évaluer grossièrement le niveau de transcription du transgène.
- C. La technique de Western-blot permet d'évaluer grossièrement le niveau de transcription du transgène
- D. La technique de Northern-blot permet d'évaluer grossièrement le niveau de traduction du transgène
- E. La technique de Western-blot permet d'évaluer grossièrement le niveau de traduction du transgène

Q2 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. A la figure 2, on cherche à vérifier l'expression de la bêta-globine chez les souriceaux transgéniques
- B. D'après les bandes à 0.7kb, seuls 8 souriceaux sur 15 ont a priori intégré le transgène dans leur matériel génétique.
- C. La bande à 7kb, correspond au segment du transgène entouré des sites BssHII et SalI ne comprenant pas le gène de la bêta-globine.
- D. D'après la bande à 7kb, on peut conclure que l'ensemble des souriceaux sont transgéniques.
- E. La bande à 7kb pourrait correspondre au gène endogène (naturellement présent dans le génome) de la globine.

Figure 3 : Analyse par northern-blot

Un Northern blot a ensuite été réalisé chez 9 souriceaux. Des lymphocytes ont été prélevés chez chaque souriceau, l'ARN a été extrait, séparé sur gel puis transféré sur membrane. Une sonde spécifique de la séquence « tag » a été utilisée pour révéler sa présence.



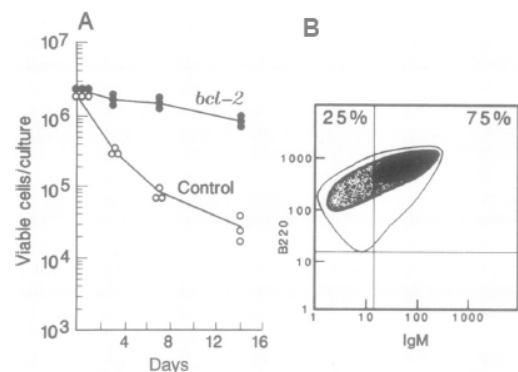
Q3 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Par cette expérience, on cherche à démontrer la présence du transcrite du gène de la bêta-globine, pour confirmer la présence d'animaux transgéniques.
- B. La taille du transcrite observé est supérieure à 1kb, il y a probablement eu un réarrangement du gène codant pour Bcl2-tag.
- C. Cette expérience ne permet pas d'observer la transcription du gène Bcl2 endogène.
- D. Si l'on avait digéré par XbaI et EcoRV, on n'aurait pas obtenu le même résultat.
- E. Parmi les animaux analysés, 5 sont transgéniques et expriment la construction Bcl2-tag.

Figure 4 : Viabilité des cellules sanguines transgéniques.

(A) Des cellules de la moelle osseuse ont été prélevées chez trois animaux transgéniques (ronds noirs) et chez trois animaux contrôles (ronds blancs), puis mis en culture, ex vivo, dans un milieu de culture approprié. Le nombre de cellules vivantes a été mesuré régulièrement sur 14 jours.

(B) Une analyse en cytométrie des cellules transgéniques bcl-2 à 14 jours de culture a été réalisée, après marquage par un anticorps anti B220 couplé à un fluorochrome rouge et un anticorps contre les IgM (membranaires) couplé au fluorochrome vert. Les cellules exprimant les antigènes B220 et les IgM sont des lymphocytes B, les cellules n'exprimant que l'antigène B220 sont des cellules lymphoïdes, précurseurs de lymphocytes B, notées pré-B.



Q4 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Le milieu de culture des cellules doit contenir des antibiotiques de sélection.
- B. Les cellules issues de la moëlle normale prolifèrent in vitro sous l'effet des facteurs de croissance présents dans le milieu de culture.

- C. La durée de vie des cellules transgéniques Bcl2-tag semble être supérieure à celle des cellules non transgéniques.
- D. Il est possible que Bcl2 agisse en inhibant la mort cellulaire.
- E. Bcl2 agit en inhibant la sénescence.

Q5 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Au bout des 14 jours de culture, il ne reste plus que des érythrocytes (globules rouges) dans le milieu de culture des cellules normales.
- B. Au bout des 14 jours de culture, il ne reste plus que des thrombocytes (plaquettes) dans le milieu de culture des cellules transgéniques.
- C. Au bout des 14 jours de culture, il reste 25% de cellules pré-B dans le milieu de culture des cellules transgéniques.
- D. Au bout des 14 jours de culture, il ne reste que des cellules lymphocytaires dans le milieu de culture des cellules transgéniques.
- E. Seules les cellules susceptibles d'exprimer Bcl2-tag sont encore présentes dans le milieu de culture après 14 jours de culture ex vivo.

Figure 5 : Chez plusieurs souriceaux (âge : 6 à 12 semaines) transgéniques et contrôles, des cellules nucléées (lymphocytes pré-B + B + T et cellules myéloïdes) ont été extraites de différents organes (rate, moelle osseuse et ganglions), leur pourcentages respectifs ont été établis.

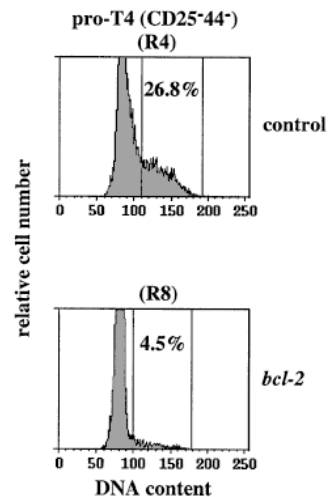
Organe	Composition (% de cellules nucléées)			
	Pre-B	B	Lymphocytes T	Myéloïdes
Rate				
Bcl-2	<2	72 \pm 4	14 \pm 4	4 \pm 1
Contrôle	<2	50 \pm 4	32 \pm 3	6 \pm 2
Moelle osseuse				
Bcl-2	20 \pm 4	43 \pm 9	3 \pm 1	14 \pm 5
Contrôle	18 \pm 6	9 \pm 2	5 \pm 1	38 \pm 2
Ganglions lymphatiques				
Bcl-2	<2	49 \pm 4	44 \pm 5	<2
Contrôle	<2	28 \pm 2	68 \pm 3	<2

Q6 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Le pourcentage des cellules pré-B est significativement plus important dans la moelle osseuse des souris transgéniques que dans celle des souris contrôles.
- B. La majeure partie des cellules de la rate sont des lymphocytes B.
- C. Globalement on observe une augmentation du pourcentage de lymphocytes B chez les souriceaux transgéniques par rapport aux souriceaux normaux quelque soit l'organe concerné.
- D. Par rapport aux données des figures 4 et 5, on peut en conclure que l'hyperprolifération des lymphocytes B est sans doute responsable d'un envahissement des organes étudiés et de ce fait de la déplétion des autres lignées sanguines.
- E. Il est possible que les lignées (autres que les lymphocytes) prolifèrent normalement dans cette expérience.

Figure 6 : Analyse du cycle des lymphocytes T

Des lymphocytes T ont été isolés à partir du Thymus des souris contrôles et transgéniques. Un marquage de leur contenu en ADN a été réalisé grâce à l'iodure de propidium (qui émet une fluorescence rouge). Une analyse en cytométrie a ensuite été réalisée, montrant le nombre de cellules marquées par rapport à l'intensité de fluorescence (proportionnelle à la quantité d'ADN par cellule). Le pourcentage dans les fenêtres R4 et R8 représente le pourcentage de cellules en phase S + G2/M.



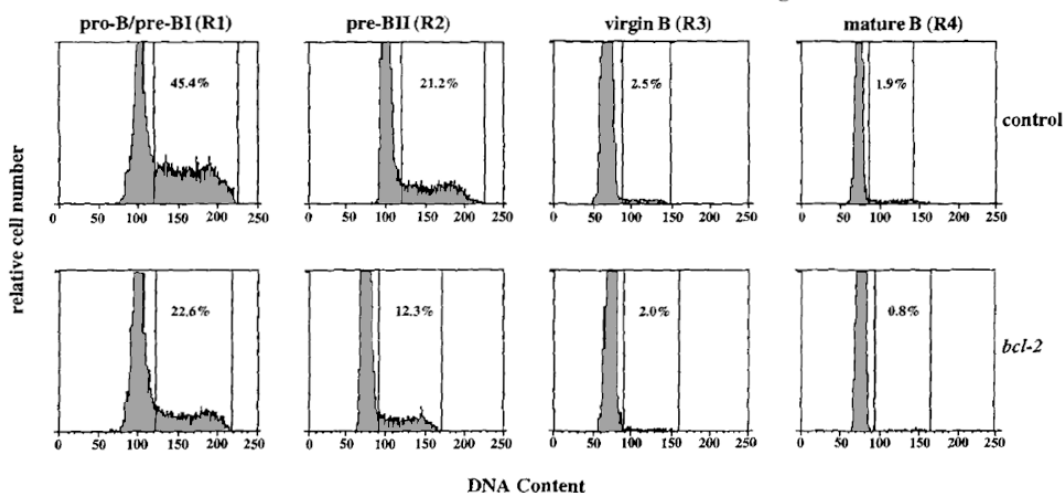
Q7 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. En présence du transgène bcl2-tag, les cellules deviennent tétraploïdes.
- B. Dans les conditions contrôle et bcl2, la majeure partie des cellules est en phase G0/G1.
- C. La majeure partie des cellules ne prolifèrent pas.
- D. Les lymphocytes T des souris transgéniques prolifèrent environ 5 fois moins que chez les souris contrôles.
- E. Les résultats obtenus à la figure 5 concernant les lymphocytes T peuvent s'expliquer en partie par une diminution de la prolifération des lymphocytes T.

Une numération sanguine est réalisée démontrant que le nombre de lymphocytes B est 3 fois supérieur à la normale chez les souris transgéniques.

Figure 6 : Analyse du cycle des lymphocytes B

Une analyse de cycle a été réalisée sur des lymphocytes B à différents stades de développement (de précoce à tardif : pro, pré B, B naïfs (virgin), B mémoires (mature)), chez les souris contrôles et transgéniques bcl2.



Q8 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Il existe une corrélation positive entre niveau de prolifération et immaturité des cellules chez les souris contrôles.
- B. Quelque soit le stade de développement, le pourcentage de cellules en phase S,G2/M est plus important chez les souris contrôles.
- C. La surexpression de bcl2 induit un arrêt en G2/M des cellules.
- D. La surexpression de bcl2 diminue la capacité des lymphocytes B à proliférer.

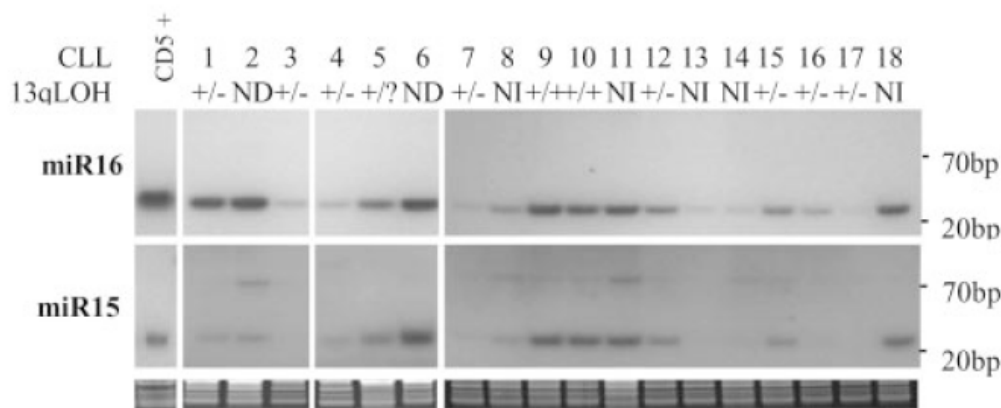
- E. Par rapport à l'ensemble des données précédentes, on peut conclure que Bcl2 agit en inhibant la mort cellulaire et non par activation de la prolifération.

La Leucémie lymphoïde Chronique de type B (LLC) se caractérise par une accumulation de lymphocytes B ayant une faible capacité proliférative et qui surexpriment Bcl2. Dans cette leucémie, 50% des patients présentent une délétion de la région 13q14 (homozygote ou hétérozygote). Cette zone de délétion comprend une séquence codante pour deux micro-ARN notés miR15 et miR16. Ces miRNA sont complémentaires de l'ARNmessenger de Bcl2.

Q 9 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) concernant l'interférence ARN :

- Ce processus permet d'inhiber spécifiquement la traduction et/ou d'induire la dégradation d'un type d'ARNmessenger.
- Ce processus joue un rôle physiologique de régulateur de la synthèse de certaines protéines.
- Ce processus interviendrait dans la mise en place de l'hétérochromatine.
- Par la technique du siRNA (small interfering RNA), les chercheurs détournent la machinerie d'ARN interférence pour éteindre spécifiquement l'expression de certains gènes.
- Les miRNA sont les « équivalents » physiologiques des siRNA,

Figure 7 : Analyse en northern blot de la présence des miRNA-15 et 16 dans les lymphocytes B de patients (CLL) et d'un sujet sain (CD5+). Les miRNA ont été détectés par des sondes spécifiques de chacun d'eux, la délétion 13q14 (13qLOH) est mentionnée +/- hétérozygote, ++ homozygote, NI non interprétable, ND non analysé. Une coloration des ARN totaux par bromure d'éthium (en bas du gel) sert de contrôle de charge.



Q10 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) concernant ces résultats :

- Globalement on note une diminution des miR15 et miR16 chez les patients CLL.
- La quantité des miR15 et 16 est identique chez l'ensemble des patients +/-.
- Il semble qu'il existe deux formes de miR15, l'une d'environ 25pb et l'autre d'environ 70pb.
- Ce résultat peut en partie expliquer la surexpression de bcl2 observée chez les patients CLL
- Les délétions 13q14 provoquent toujours le même niveau de diminution de transcrit

ED3 : Endocytose

Problématique : rôle des chaînes légères de clathrine (CLC)

L'unité structurale de la clathrine, le triskèle, est composé de 3 chaînes lourdes (clathrin heavy chain : CHC) et jusqu'à 3 chaînes légères (clathrin light chain : CLC).

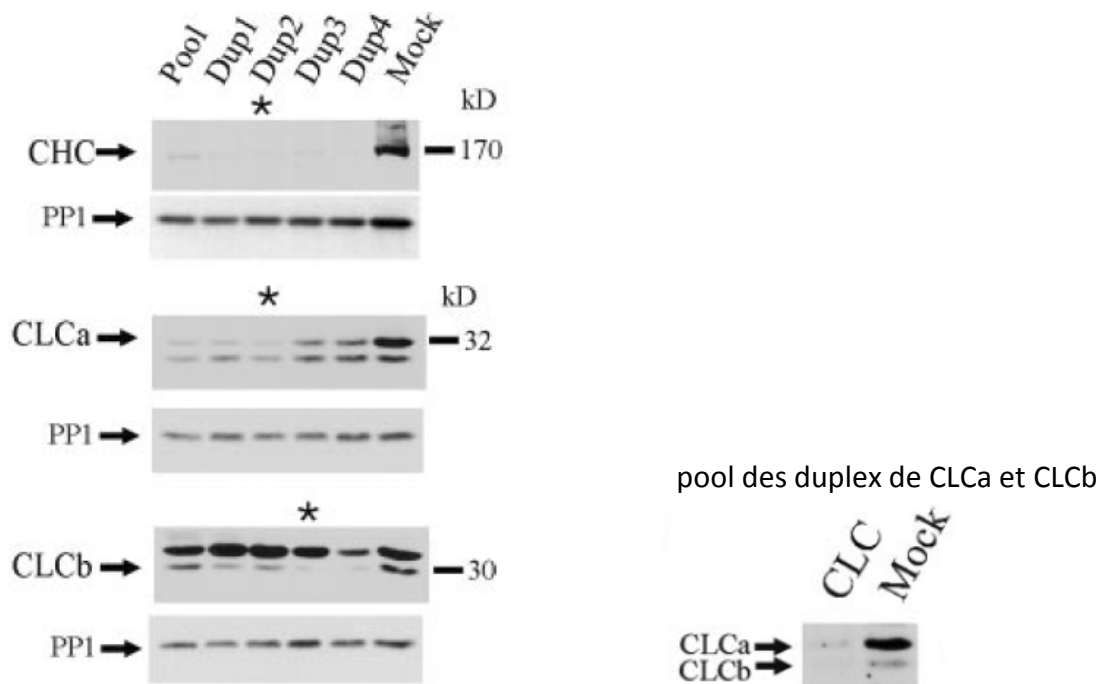
in vitro, il a été montré que les CLC gênent l'assemblage des triskèles sous forme de cages, avec un maximum d'inhibition pour un rapport stoechiométrique 1:1 avec les CHC.

Dans les tissus, ce rapport CLC:CHC est variable, 1:1 dans le cerveau, mais moindre dans les autres tissus (0,2 :1) : à ce taux, l'inhibition semble minimale.

Cet article se propose d'éclaircir le rôle des CLC *in vivo*, en culture de cellules humaines.

1)

Exp1 : Des cultures de cellules immortalisées (HeLa ou Cos7) sont transfectées avec différents duplex de siRNA (small interfering RNA), afin d'étudier le phénotype associé à l'absence des chaînes lourdes ou des chaînes légères de clathrine. L'efficacité de l'inhibition de la production des protéines ciblées est testée 72-96h après transfection : un extrait protéique total des cellules est séparé par SDS-PAGE, et transféré par Western-Blot. La membrane est incubée avec des anticorps spécifiques de CHC ou de CLCa/b (noter que le même anticorps polyclonal reconnaît CLCa et CLCb). La membrane est lavée puis incubée avec des anticorps secondaires couplés à une enzyme qui, en présence de substrat, produit une réaction chimiluminescente détectée par les films. On contrôle la quantité de protéines chargées dans chaque puit par la détection simultanée d'une protéine sans rapport (Phosphatase PP1).



Q1 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - Les expériences visant à mieux comprendre les fonctions d'un gène constituent ce que l'on appelle la génétique classique.

B - le Knock Out (KO) consiste à inactiver un gène en remplaçant une partie de sa séquence codante par un marqueur de sélection.

C - le Knock In (KI) consiste à remplacer un gène une version modifiée de ce gène.

D - l'efficacité du Knock Down (KD) dépend des duplex de siRNA utilisés.

E - il est possible d'inactiver par RNAi plusieurs protéines en même temps.

En plus :

- la détection d'une protéine sans rapport permet de vérifier la spécificité du knock down, c'est-à-dire que le siRNA n'agit pas sur d'autres gènes.

- la détection d'une protéine sans rapport constitue un contrôle positif

- l'utilisation d'un extrait de cellules transfectées sans siRNA (Mock) constitue un contrôle négatif

Q2 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - l'ARN interférence est un processus uniquement artificiel lié à l'introduction d'ARN double brin dans une cellule.

B - l'inactivation à l'aide de siRNA nécessite une complémentarité partielle du duplex d'ARN avec la séquence génomique ciblée.

C - l'extraction des composants moléculaires des cellules nécessite la lyse de celles-ci, à l'aide d'agents physiques ou chimiques.

D - l'électrophorèse des protéines en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) permet de les séparer selon leur charge.

E - le Western-Blot permet le transfert des ARN d'un extrait donné sur une membrane en vue de leur détection ultérieure.

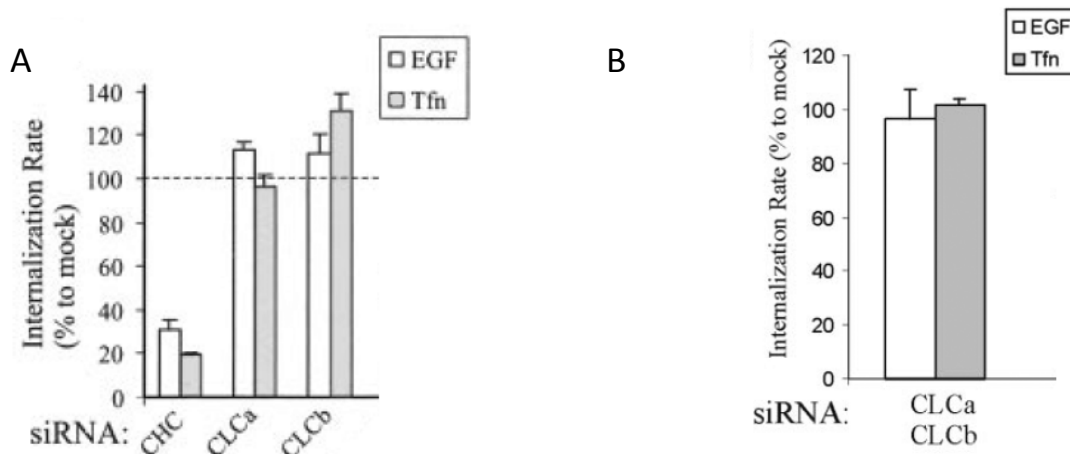
En plus :

- sachant que les chaînes de clathrine ont un poids moléculaire différent de la phosphatase PP1, les anticorps dirigés contre ces protéines doivent être produits chez des espèces animales différentes, afin de pouvoir les détecter par des anticorps secondaires différents

2)

L'endocytose des vésicules tapissées de clathrine permet l'internalisation des récepteurs membranaires et, éventuellement, de leur ligands. Ainsi le récepteur de la transferrine est internalisé puis recyclé à la surface de façon constitutive, que la transferrine soit fixée ou non, alors que l'endocytose du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) dépend de la liaison de son ligand.

Exp2 : test d'internalisation : On mesure de l'efficacité de l'endocytose au cours des expériences de Knock Down : les ligands EGF et Transferrine (Tfn) sont marqués à l'iode radioactif ^{125}I ; les cellules en culture sont incubées avec $[^{125}\text{I}]\text{EGF}$ (1 ng/ml) ou $[^{125}\text{I}]\text{transferrin}$ (1 mg/ml) pendant 1-6min ; puis le milieu est retiré, et les cellules lavées dans un tampon neutre pour se débarrasser des ligands non fixés ; puis les cellules sont incubées 5min avec un tampon acide (Acide acétique 0,2M, NaCl 0,5M, pH 2,8) pour détacher des récepteurs les ligands radiomarqués liés à la surface ; enfin les cellules sont lysées dans 1M NaOH, pour mesurer la radioactivité intracellulaire, c'est-à-dire les ligands internalisés. On calcule le ratio radioactivité internalisée/de surface. Les résultats sont exprimés en pourcentage du ratio obtenu avec des cellules transfectées sans siRNA (Mock).



Q3 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - le récepteur de la transférine se dissocie de son ligand dans les endosomes tardifs, dont le pH est plus bas.

B - le récepteur des LDL se dissocie de son ligand dans les endosomes tardifs, dont le pH est plus bas

C - les CHC sont nécessaires, au moins en partie, à l'endocytose de EGF et Tfn.

D - chacune des CLC, a **ou** b, est nécessaire, au moins en partie, à l'endocytose de EGF et Tfn.

E - la présence des 2 CLC, a **et** b, est nécessaire, au moins en partie, à l'endocytose de EGF et Tfn.

En plus

- les CLC ne jouent pas de rôles dans l'endocytose de EGF et Tfn

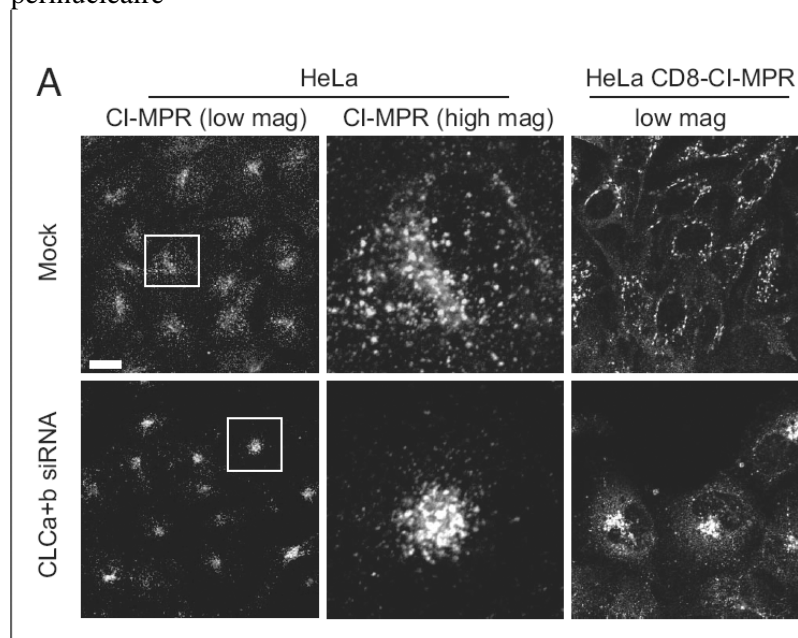
3)

La clathrine agit également sur le trafic du réseau trans-Golgi (trans-Golgi network : TGN) vers le système endosomal.

Un exemple de protéine membranaire transportée par les vésicules de clathrine du Golgi vers les endosomes est le Récepteur du mannose-6-phosphate indépendant des cations (CI-MPR) : ce récepteur fixe, dans le réseau trans-golgi (ou à la surface de la mb plasmique), les hydrolases lysosomales phosphorylées sur certains résidus mannose de leur chaîne oligosaccharidique (phosphorylation qui a lieu dans le cis-golgi) ; le complexe récepteur-ligand est transporté dans le compartiment acide pré-lysosomal (endosomes tardifs), où le pH bas dissocie le complexe ; les hydrolases acides sont ensuite concentrées dans les lysosomes (sans les MPR).

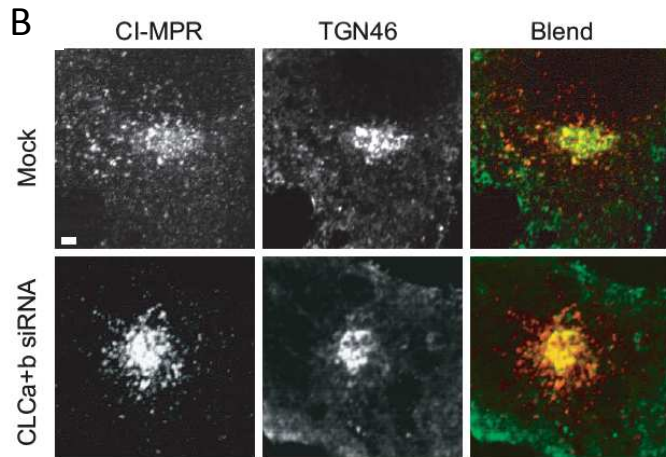
On cherche à déterminer si les CLC interviennent dans ce trafic TGN-endosomes.

exp3A : Localisation cellulaire de CI-MPR en immunofluorescence et microscopie confocale : résultat : le KD des CLC altère distribution du CI-MPR, qui adopte une distribution plus groupée, périnucléaire

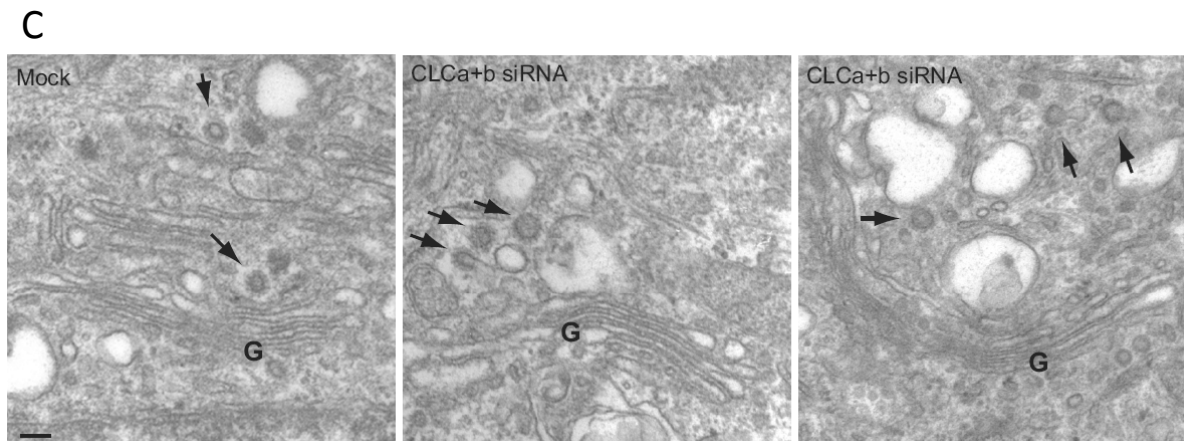


exp3B : Co-marquage de CI-MPR (anticorps monoclonal de souris) et du TGN (anticorps polyclonal de lapin anti-TGN46, un composant du TGN) :

résultat : après KD des CLC, le CI-MPR ne co-localise pas strictement avec le TGN mais plutôt débordé et entoure le TGN.



exp3C : en Microscopie électronique à transmission :
 après KD CLC, les vésicules enveloppées de clathrine (flèches) sont dans l'entourage du TGN, donc leur bourgeonnement n'est pas affecté



Q4 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - la microscopie confocale permet une meilleure résolution que la microscopie photonique standard.

B - la microscopie confocale peut s'utiliser sur des cellules vivantes.

C - la microscopie électronique peut se faire sur des cellules vivantes.

D - un co-marquage nécessite que les anticorps primaires dirigés contre les 2 (ou 3) protéines étudiées soient produits chez des animaux différents.

E - un co-marquage nécessite que les anticorps secondaires dirigés contre les différents anticorps primaires soient couplés à des fluorochromes émettant à des longueurs d'ondes différentes.

En plus

- la microscopie confocale permet de diminuer le bruit de fond généré par la diffusion de fluorescence à partir des plans non focaux.

Q5

A - un co-immuno-marquage peut permettre de démontrer l'interaction physique de 2 protéines

B - après KD des CLC, le CI-MPR est confiné au TGN

C - les CLC joueraient un rôle dans le bourgeonnement des vésicules tapissées de clathrine à partir du TGN

D - les CLC joueraient un rôle dans le trafic des vésicules cargo entre le TGN et le système endosomal

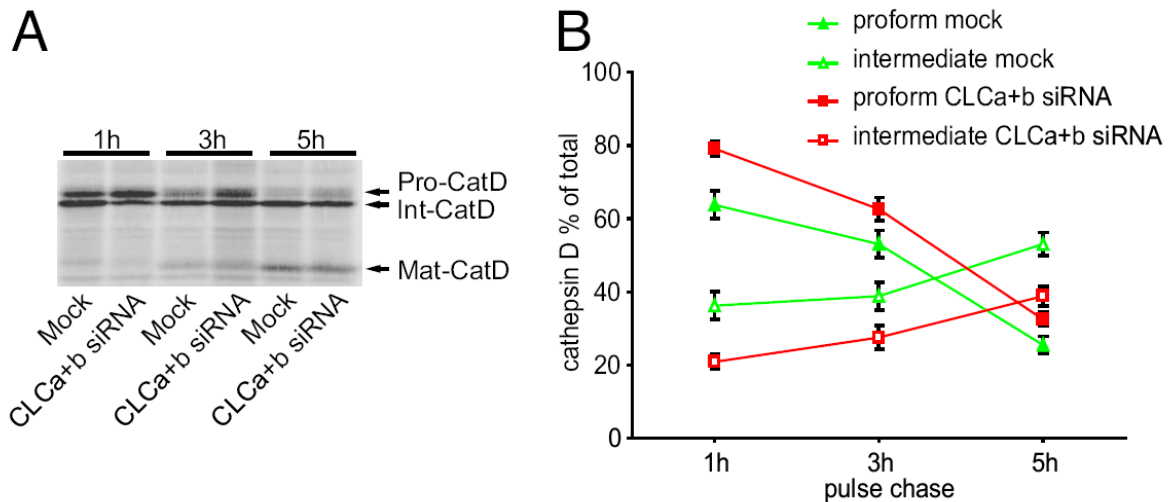
E - les données des exp 2B et 2C sont en cohérentes

4)

étude du trafic des vésicules cargo émanant du TGN :

la cathepsine D est hydrolase lysosomale ciblée vers les endosomes/lysosomes par sa liaison aux MPRs ; sa proforme de 54kD est clivée en forme intermédiaire de 48kD durant le transport aux lysosomes, puis en enzyme mature comprenant 2 chaînes de 34kD+14kD dans les lysosomes ;

exp4 : expérience de pulse-chase : cellules cos7 placées pendant 1h dans un milieu sans methionine/cystéine, puis incubées pendant 2h dans un milieu avec 0.1mCi/ml ³⁵S-méthionine/cysteine (pulse), puis lavée et placées dans un milieu avec met/cys non marquées (chase). Les cellules sont lysées 1, 2 et 5h après : la cathepsin D est immunoprécipitée avec des anticorps spécifiques ; la fraction éluée de l'immunoprécipitation, contenant les différentes isoformes de la cathepsine D, est séparée par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie.



Résultat : le KD des CLC ralentit la protéolyse de la proforme et l'accumulation de la forme intermédiaire

Q6 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - L'immunoprécipitation utilise l'affinité des anticorps pour isoler les protéines antigéniques du lysat cellulaire.

B - la spécificité de l'autoradiographie pour la cathepsine D est rendu possible par la méthode d'extraction.

C - la spécificité de l'autoradiographie pour la cathepsine D est rendu possible par la méthode de purification.

D - la spécificité de l'autoradiographie pour la cathepsine D est rendu possible par la méthode de révélation.

E - l'immunoprécipitation permet d'isoler la cathepsine D radiomarquée de la cathepsine D synthétisée avant le pulse.

En plus

- l'expérience 4 suggère que le KD des CLC accélère le trafic entre TGN et lysosomes

- l'expérience 4 suggère que le KD des CLC ralentit le trafic entre TGN et lysosomes

5)

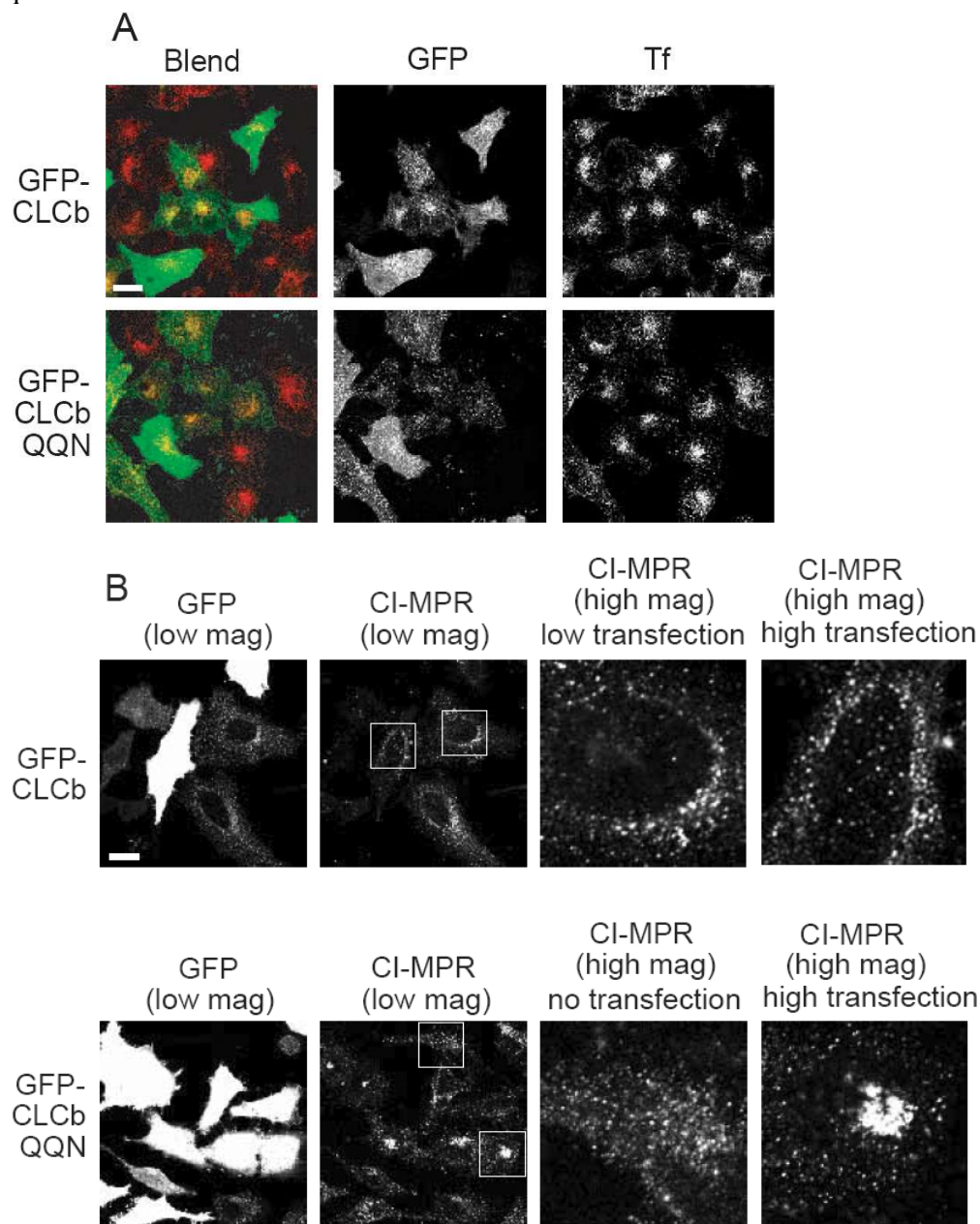
les CLC interagissent avec les protéines HIP1 et HIP1R (huntingtin interacting protein) ; toutes les 2 sont des composants des structures tapissées de clathrine, émanant de la mb plasmique et du TGN ; HIP1 se lie à CHC et AP-2 ; HIP1R se lie plus faiblement à CHC, mais fortement à l'actine ; HIP régule l'assemblage de clathrine, HIP1R l'assemblage de l'actine
le KD de HIP1R entraîne défaut d'assemblage de l'actine et du trafic du TGN

Le domaine N-terminal des CLC permet l'interaction avec la CHC et avec HIP1/HIP1R ; les auteurs s'intéressent à l'effet de la surexpression d'une forme mutée de CLCb (changement du motif EED en QQN) : cette forme est connue pour avoir perdue l'interaction avec HIP mais l'interaction avec CHC est conservée. La construction contient également une séquence codant pour la GFP, fusionnée avec la séquence de CLCb.

exp5A : étude de l'endocytose et du trafic TGN/endosome après sur-expression de la forme mutée de CLCb::GFP :

48h après transfection des constructions de CLCb::GFP, mutée ou non, les cellules étaient incubées avec de la transferrine couplée à un fluorochrome (Cyanine3, émettant dans le rouge) pendant 15min, pour permettre son internalisation, puis fixées, et les distributions de la transferrine et de CLCb::GFP étaient étudiées par microscopie confocale.

Résultat : ni l'expression de CLCb::GFP ni celle de CLCb::GFP(QQN) n'influencent la distribution de la Transferrine, mais la mutation QQN entraîne le même changement de distribution de CI-MPR que le KD.



Q7 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A - l'expression d'un transgène nécessite son intégration dans le génome de la cellule hôte.
- B - l'expression d'un transgène nécessite que sa séquence codante soit précédée de celle de son promoteur naturel, endogène.
- C - la transfection est pareillement efficace dans toutes les cellules en culture.
- D - l'insertion de la GFP est surtout intéressante car elle permet d'étudier la localisation de CLCb par rapport à la transferrine ou a CI-MPR.
- E - l'insertion de la GFP est surtout intéressante car elle permet de savoir quelles cellules expriment le transgène et à quel taux.

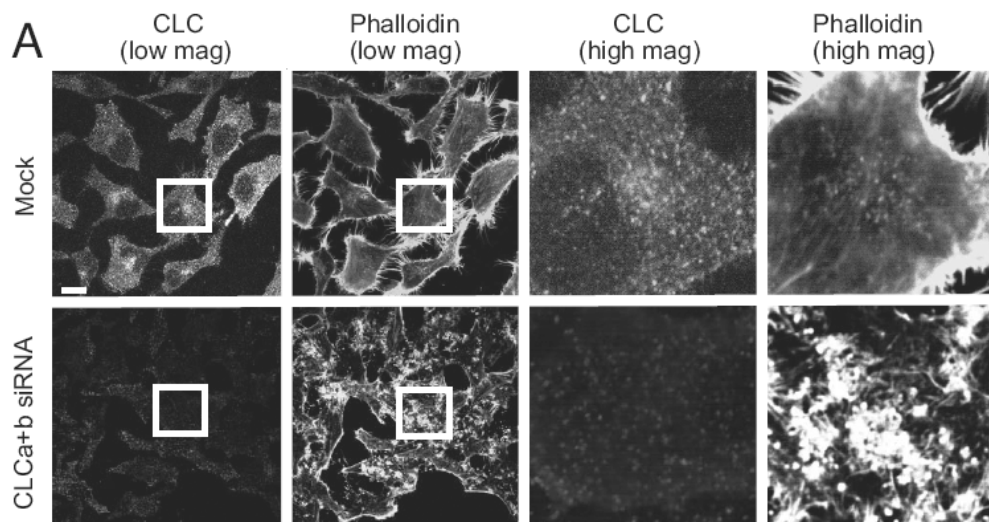
Q8

- A - « la surexpression de CLCb::GFP n'influencent pas la distribution de la Transferrine » : le contrôle négatif manque.
 - B - l'effet de la présence de CLCb::GFP(QQN) sur la distribution de CI-MPR pourrait être dû à la surexpression de la protéine aussi bien qu'à la mutation de sa séquence.
 - C - la surexpression de la forme mutée affecte l'endocytose.
 - D - la surexpression de la forme mutée affecte le trafic TGN/endosomes.
 - E - la surexpression de la forme mutée exerce un effet dominant négatif.
- En plus :
- la perturbation du trafic du TGN pourrait résulter de la perte de l'interaction de HIP1R avec la clathrine.

6)

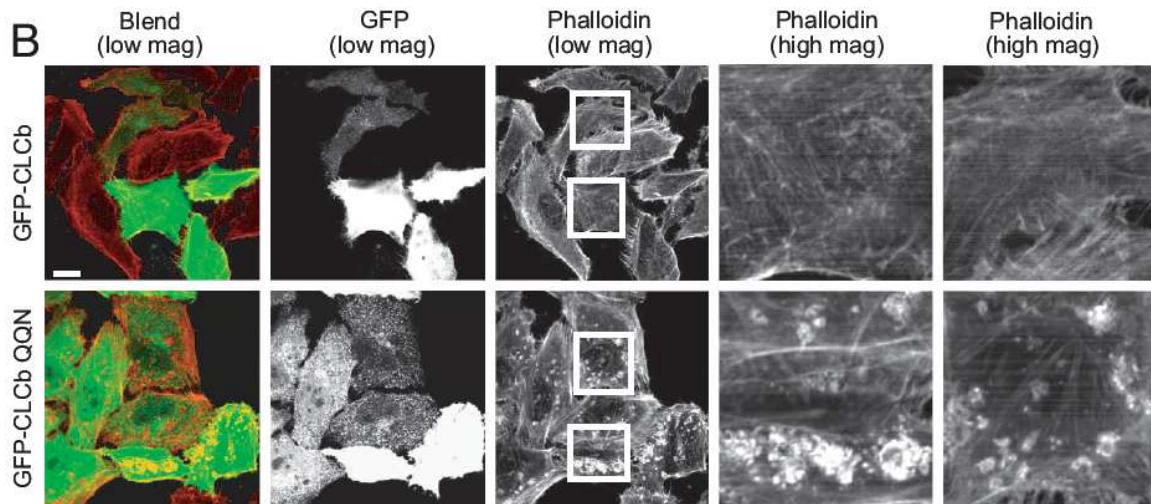
étude du rôle des CLC sur l'assemblage du réseau d'actine :

exp6A : 96h après transfection des siRNA, les cellules sont fixées, incubées avec l'anticorps primaire anti-CLC, puis avec un anticorps secondaire couplé à la FITC en même temps qu'avec de la Phalloïdine (marqueur de l'actine) couplée à la TRITC (Rhodamine) :

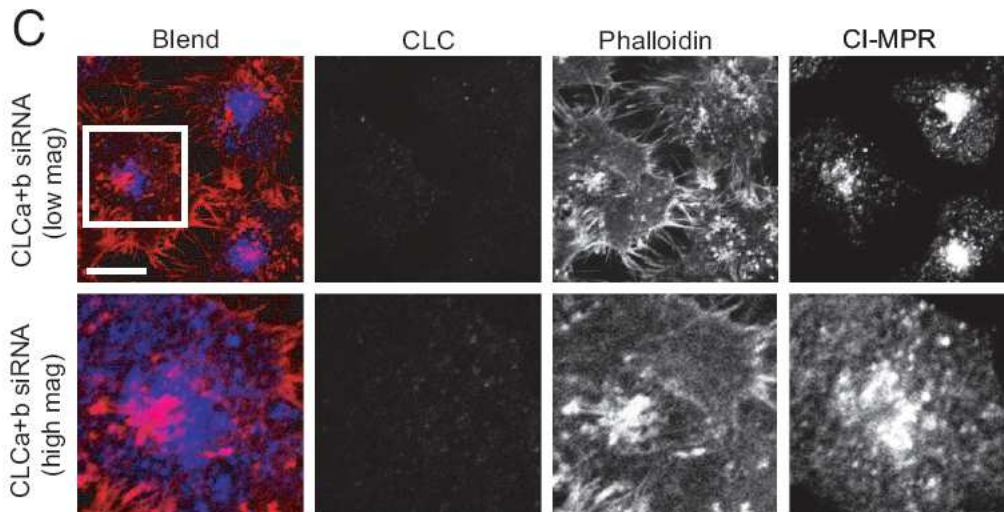


exp6B :

même expérience d'immunofluorescence, dans les cellules sur-exprimant les versions sauvage ou mutée de CLCb :



exp6C : triple marquage :
 patches d'actine a proximite de CI-MPR



Q9 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

A - le marquage avec les anticorps anti-CLC permet d'étudier la localisation des CLC relativement au réseau d'actine

B - le marquage avec les anticorps anti-CLC permet de contrôler l'efficacité du KD

C - le KD des CLC entraine une désorganisation du cytosquelette d'actine

D - la surexpression de GFP::CLCb entraine une désorganisation du cytosquelette d'actine

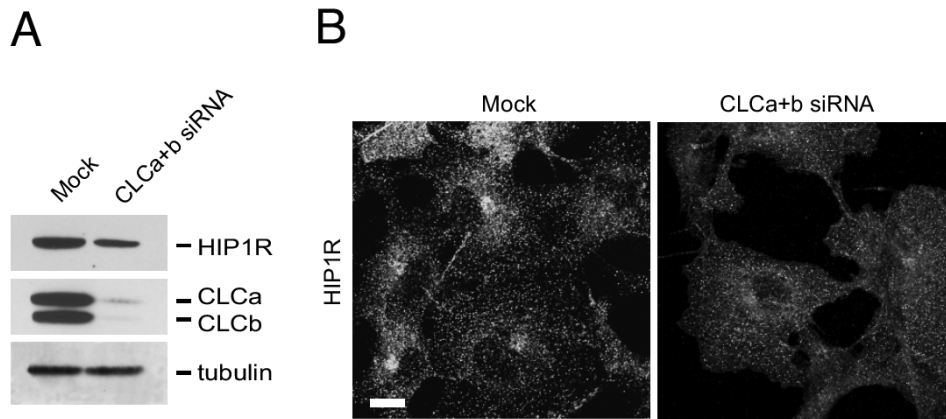
E - la surexpression de GFP::CLCb(QQN) entraine une désorganisation du cytosquelette d'actine

7)

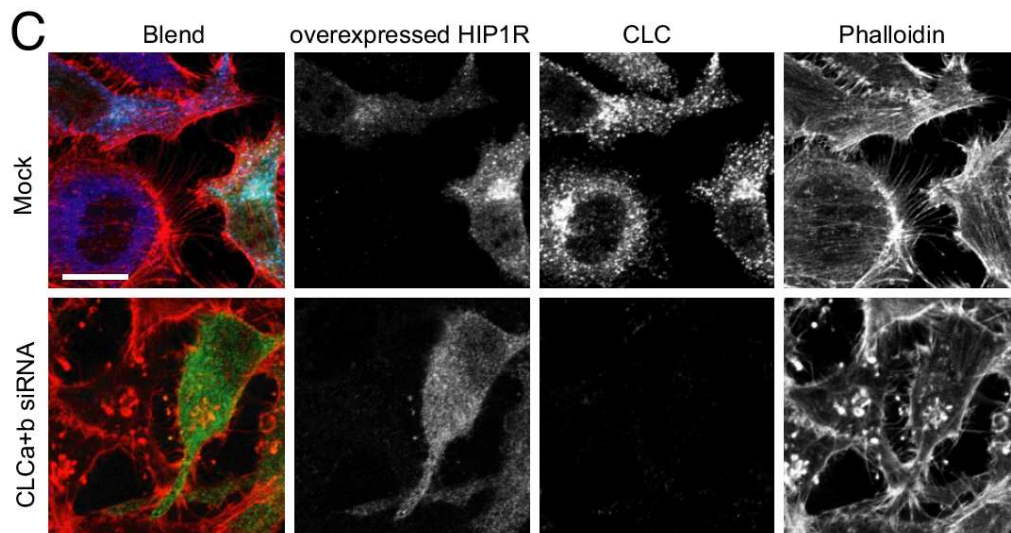
étude de l'influence du KD des CLC sur l'expression et la localisation de HIP1R

exp7A : après KD des CLC, on étudie, en WB, la quantité de HIP1R ; l'efficacité du KD est jugée par un co-marquage des CLC ; l'estimation de la quantité de HIP1R se fait par rapport à une protéine non reliée, la tubuline. Résultat : le KD des CLC entraine une diminution de 25% de HIP1R

exp7B : après KD des CLC, puis immunomarquage avec un anti-HIP1R, on regarde si la distribution de HIP1R est modifiée. Résultat : après KD des CLC, on obtient un marquage plus diffus, moins périnucléaire



exp7C : surexpression de HIP1R



Q10 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- d'après l'exp7A, l'effet du KD des CLC sur le réseau d'actine pourrait être dû à une diminution de l'expression de HIP1R
- d'après l'exp7B, l'effet du KD des CLC sur le réseau d'actine pourrait être dû à une perturbation de la localisation de HIP1R
- d'après l'exp7C, l'effet du KD des CLC sur le réseau d'actine pourrait être dû à une diminution de l'expression de HIP1R
- d'après l'exp7C, l'effet du KD des CLC sur le réseau d'actine pourrait être dû à une perturbation de la localisation de HIP1R
- l'interaction de HIP1R avec les CLCs et la localisation correcte de HIP1R sont nécessaires à la régulation de l'assemblage de l'actine

Au total la fonction de CLC est de recruter HIP1R aux structures tapissées de clathrine , pour réguler l'assemblage de l'actine et le trafic des vésicules dérivées du TGN .

ED4 : Régulation de l'expression des gènes

Problématique : Importance et régulation des enhancers agissant à longue distance sur l'expression des gènes de différenciation tissulaire au cours du développement

Les protéines à doigts de zinc de type GATA interagissent avec les séquences consensus régulatrices (A/T)GATA(A/G).

GATA-1 est un facteur de transcription essentiel pour la différenciation érythroïde normale, agissant comme un activateur transcriptionnel de nombreux gènes-clé spécifiques de la lignée érythroïde ; mais il peut également réprimer certains gènes, comme les proto-oncogènes *Myc* ou *Kit*, coordonnant la diminution de la prolifération cellulaire avec la différenciation érythroïde terminale. Un autre représentant de la famille GATA, GATA-2, est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs multipotents, et les érythroblastes précoces ; son expression décroît ensuite, réprimée par GATA-1 dont l'expression augmente alors.

Le gène *Kit* code pour un récepteur tyrosine kinase, essentiel pour l'hématopoïèse normale ; son expression dans le système hématopoïétique est nécessaire durant les stades précoces, activée par GATA-2, puis délétère dans la différenciation érythroïde terminale, et réprimée alors par GATA-1. L'expression forcée de *Kit* dans les progéniteurs érythroïdes empêche leur maturation ; la perte de l'expression de *Kit* entraîne une létalité embryonnaire par anémie.

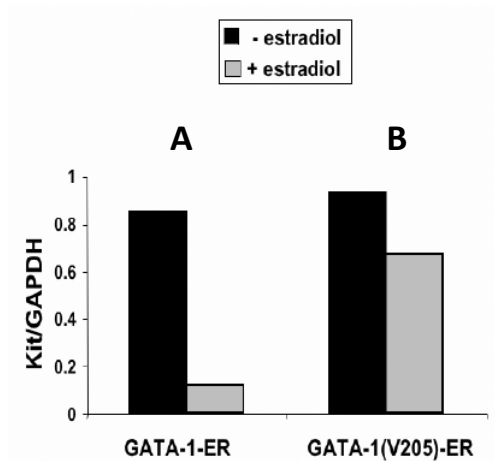
1) Profil d'enrichissement des facteurs GATA au niveau du locus *Kit*

Les auteurs s'intéressent au rôle des facteurs GATA-1 et GATA-2 dans la régulation du locus *Kit* au cours de la différenciation érythroïde : ce locus est contrôlé par des sites régulateurs proximaux et distaux, s'étalant sur plus de 300kb.

Le système : les analyses se font dans une lignée cellulaire érythroïde murine G1E dérivée de cellules ES (embryonic stem cells) immortalisées et rendues déficientes pour GATA-1 ; ces cellules sont arrêtées dans leur différenciation au stade érythroblaste précoce. Elles ont ensuite été manipulées pour exprimer de façon stable une fusion de GATA-1 avec le domaine de liaison au ligand du récepteur aux estrogènes (GATA-1-ER). Un traitement à l'estradiol conduit à l'activation de GATA-1-ER, entraînant une maturation érythroïde synchrone et l'arrêt du cycle cellulaire, ce dont témoignent l'activation des gènes spécifiques de la lignée érythroïde, et la répression concomitante de nombreux gènes, dont *Kit* et *Gata2*.

exp1A : efficacité du système inductible

Dans les cellules G1E exprimant GATA-1-ER (lignée G1E-ER4), on étudie la transcription du gène *Kit*, déterminée par real-time RT-PCR quantitative, avant et après traitement à l'estradiol, et comparée à un gène de référence (GAPDH) dont l'expression ne varie pas lors de l'induction.



Q1)

- une réaction de PCR est par principe quantitative
- une RT-PCR en temps réel permet de quantifier l'ADN de départ
- l'utilisation d'un gène de référence est nécessaire car une RT-PCR ne peut pas donner de quantification absolue
- on peut comparer la proportion relative de 2 fragments distincts, amplifiés par des couples de primers distincts
- l'activation de GATA-1 inhibe la transcription de *Kit*
- la même induction dans les cellules G1E aurait donné des résultats similaires

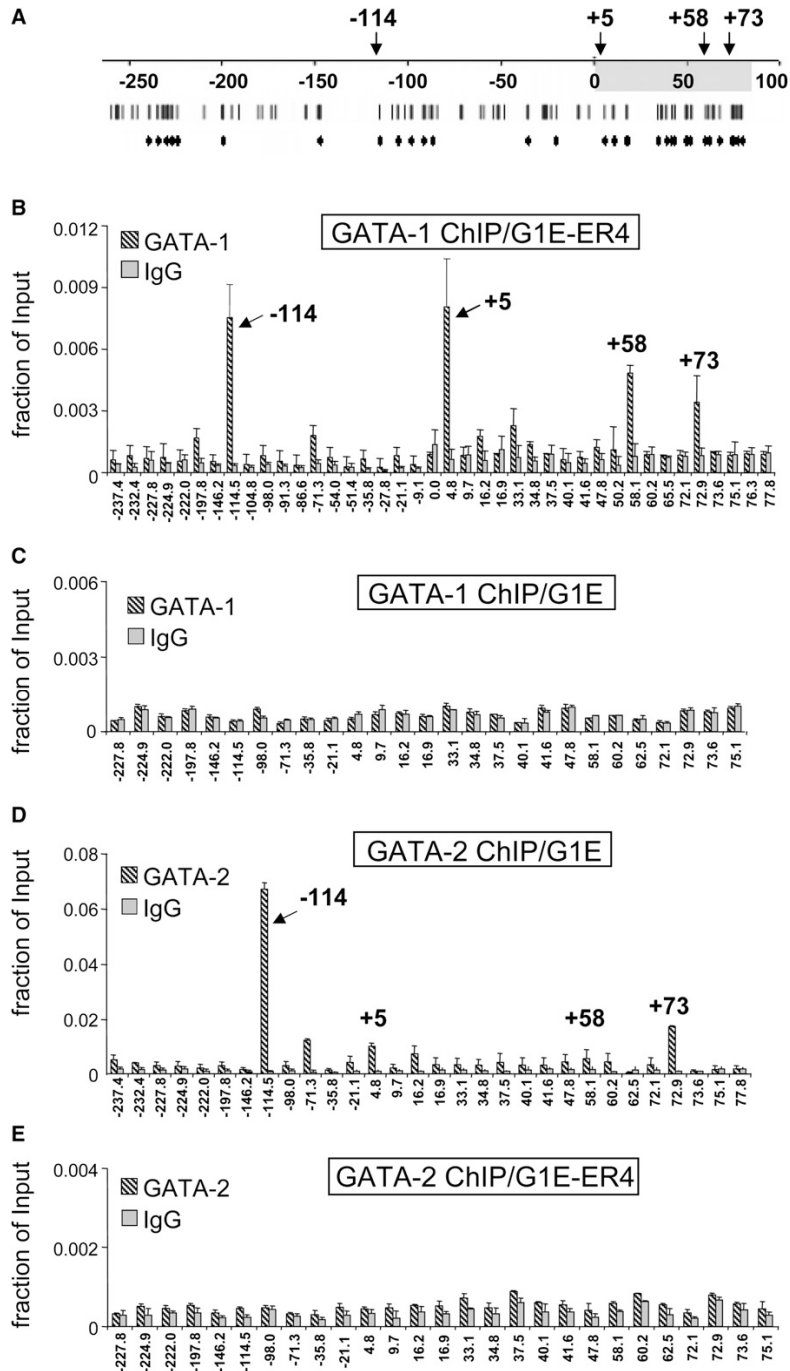
exp2 : Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

étude du profil d'occupation de GATA-1 dans les cellules G1E-ER4 traitée à l'estradiol, par ChIP, sur une région de 310 kb, s'étendant de -230 à + 80kb par rapport au site de début de la transcription (séquence codante en grisée sur le schéma).

31 couples de primers utilisés pour la ChIP couvrent tous les sites GATA prédits par bioinformatique pour avoir une forte importance régulatrice (45 sites; barres verticales sur le schéma) ; d'autres couples de primers s'étendent sur des régions sans motif GATA, notamment le promoteur.

Q2)

- l'Immunoprécipitation de la chromatine nécessite une étape de cross-link, de pontage entre protéines et ADN
- l'exp de ChIP nécessite de fragmenter la chromatine, de manière physique ou enzymatique
- l'exp de ChIP nécessite de normaliser l'abondance de chaque fragment testé avec celle de la chromatine non précipitée
- les exp de ChIP avec des IgG dans les cellules G1E-ER4 après induction permettent de vérifier la spécificité de l'immunoprécipitation par les anticorps anti-GATA-1
- les exp de ChIP avec des anti-GATA-1 dans les cellules G1E permettent de vérifier la spécificité de l'immunoprécipitation par les anticorps anti-GATA-1
- les exp de ChIP avec des anti-GATA-2 dans les cellules G1E permettent de vérifier la spécificité de l'immunoprécipitation par les anticorps anti-GATA-2



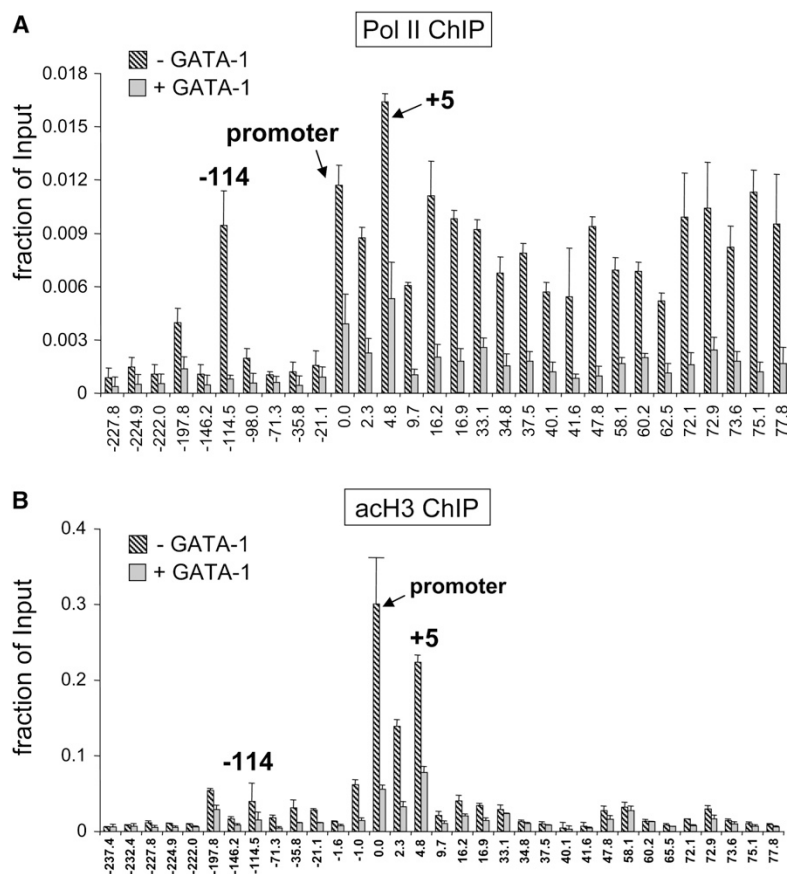
Q3)

- comparer les lignes B et D : l'enrichissement au site -114 est environ 10 fois plus faible pour GATA-1 que pour GATA-2 : la raison en est que GATA-1 est 10 fois moins abondant que GATA-2
- autre explication : GATA-1 se lie 10 fois moins fort à ce site que GATA-2
- autre explication : l'affinité des anticorps anti-GATA-2 est 10 fois plus forte que les anticorps anti-GATA-1
- bien que des fragments distincts soient amplifiés par des couples d'amorces distincts, il est possible de comparer leur enrichissement relatif
- le site -114 est commun à GATA-1 et GATA-2

- GATA-1 et GATA-2 se liant au même site, il est probable qu'ils forment un complexe protéique régulant cet élément
- le site +58 est commun à GATA-1 et GATA-2
- GATA-1 et GATA-2 ont des profils de liaison *in vivo* comparables

2) L'acétylation des Histones et l'occupation de l'ARN polymérase II (PolII) au locus *Kit*

exp3 : Exp de ChIP par des anticorps anti-PolII ou anti-Histone H3 acétylé, dans les cellules G1E (rayé) ou dans les cellules G1E-ER4 traitées à l'estradiol (grisé).



Q4)

- l'enrichissement de l'ARN-polymérase II (Pol II) tout au long de la région codante dépend de la transcription
- l'enrichissement de Pol II aux régions -114 et -198 dépend de l'état d'activation de *Kit*
- L'acétylation de l'histone H3 est associée à l'activation de la transcription
- L'acétylation de l'histone H3 est élevée autour de la région promotrice car le gène est plus transcrit au début qu'à la fin de sa séquence codante
- la présence de GATA-2, PolII et Ach3 à -114 lorsque *Kit* est transcriptionnellement actif suggère que cette région est un enhancer à longue portée dépendant de GATA-2

3) fonction régulatrice des sites de fixation des facteurs GATA

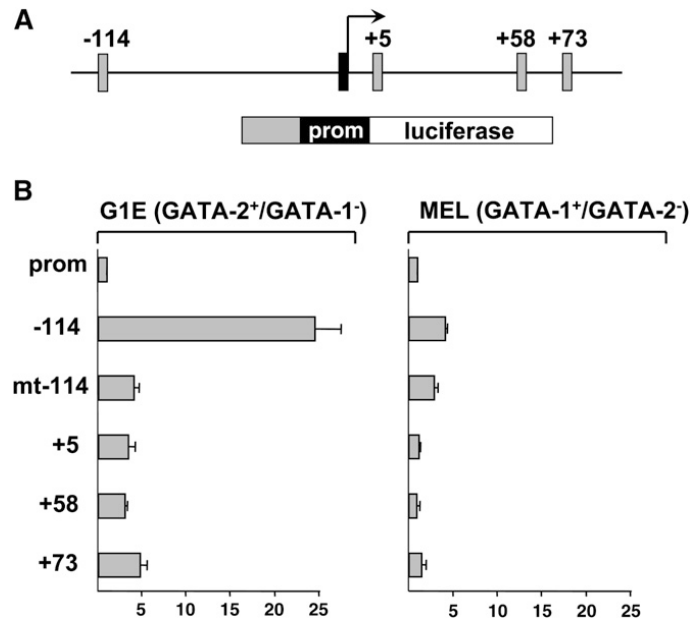
Bien que GATA-1 et GATA-2 se lient à -114, seul GATA-2 est associé avec la transcription active du gène *Kit*

exp4 : gène rapporteur

étude de l'activité enhancer des différents sites de fixation de GATA à l'aide d'un gène rapporteur codant pour la luciférase, une protéine de la luciole qui oxide la luciferine en présence d'ATP, ce qui génère une émission lumineuse ; la quantité de lumière mesurée est proportionnelle à la quantité de protéine produite ;

le gène rapporteur est précédé du promoteur du gène *Kit* et, placées en amont, des différentes principales régions de liaison de GATA (-115, +5, +58, +73) ; les auteurs placent aussi une version de la région -114 contenant des mutations des sites de liaison à GATA (mt-114).

Ces constructions sont transfectées dans des cellules G1E (exprimant GATA-2) ou des cellules MEL (Murine ErythroLeukemia) (exprimant GATA-1) ; 48h après les cellules sont lysées et l'activité de la luciférase est mesurée. L'expression de la construction avec le promoteur de *Kit* seul est établie à 1. Noter que pour palier aux aléas de la viabilité et de la transfection des cellules, un contrôle interne est utilisé, consistant en la co-transfection du gène codant la luciférase de *Renilla* (dont l'émission lumineuse nécessite l'apport d'un autre substrat), sous contrôle d'un promoteur fixe, permettant de normaliser l'activité de la luciférase de la luciole .



Q5)

- La transfection sans intégration dans le génome entraîne une expression transitoire et variable d'une cellule à l'autre
- l'utilisation d'un gène rapporteur permet de quantifier l'activité des éléments régulateurs du gène d'intérêt
- La région -114 augmente l'activité du promoteur, surtout en présence de GATA-2 mais peu de GATA-1
- La région -114 augmente l'activité du promoteur, surtout en présence de GATA-2 mais de manière indépendante de sa fixation
- La région -114 augmente l'activité du promoteur lorsqu'elle est placée à proximité
- la présence de GATA-1 réprime la transcription de *Kit* (exp1) ; l'augmentation de l'expression du gène rapporteur de la construction précédée de la région -114 en présence de GATA-1 pourrait suggérer que celle-ci n'est pas située à proximité du promoteur lorsque GATA-1 est actif.

4) la répression induite par GATA-1 est-elle associée à un changement dynamique de la conformation des chromosomes

exp5 : technique 3C (Chromosome Conformation Capture)

Les cellules sont fixées au formaldéhyde, ce qui crée des liens (cross-link) entre protéines et ADN ; elles sont ensuite lysées, les noyaux sont isolés, et soumis à une réaction de digestion par une enzyme de restriction (BglIII) ; après inactivation de l'enzyme, l'ADN est dilué, et soumis à une réaction de ligation, puis l'ADN est purifié, et les fragments de ligation sont quantifiés par PCR avec des amorces choisies de part et d'autre des jonctions des ligations. La quantité de produits de ligation est proportionnelle à la proximité spatiale des fragments d'ADN examinés. Le point de référence (à partir duquel sont mesurés les fréquences de ligation) est un fragment s'étendant de +1,5 à +5kb, comprenant le site GATA +5.

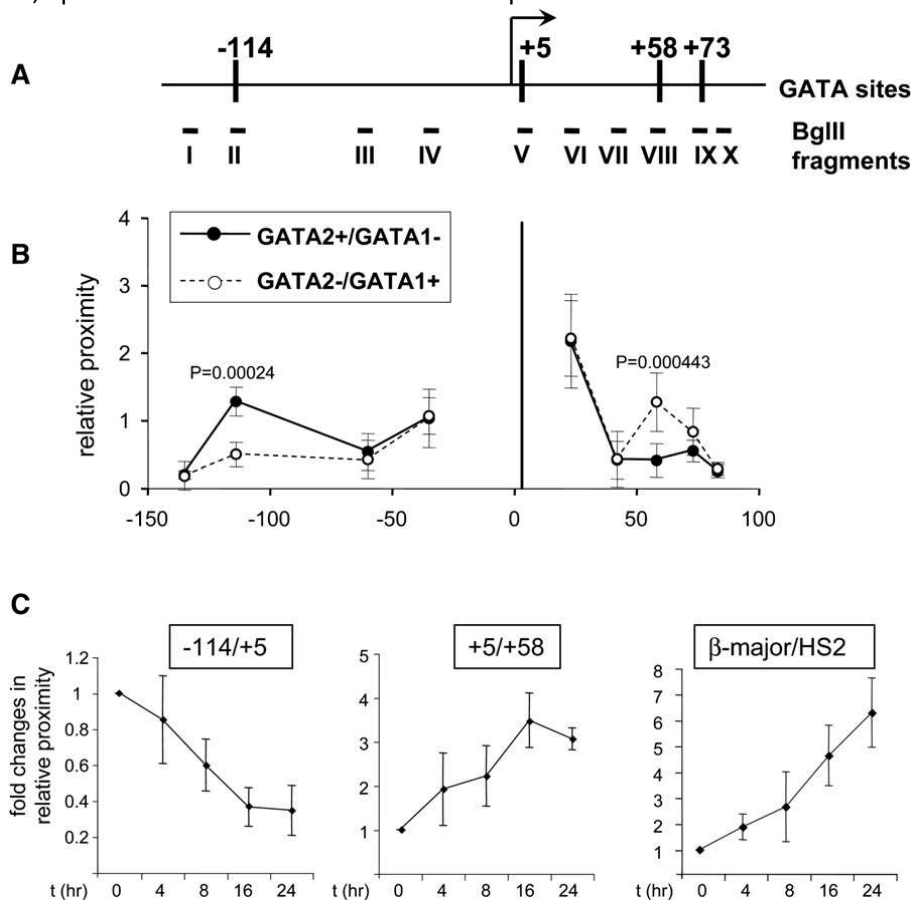
Noter que plusieurs contrôles sont nécessaires (non détaillés) pour pouvoir comparer les différents points :

- contrôle de l'efficacité des couples de primers, normalisation par rapport à une courbe standard
- contrôle de la qualité/quantité de l'ADN servant de matrices (normalisation par rapport à la fréquence de ligation entre 2 fragments du gène de tubuline, dont l'expression ne change pas lors de la différenciation érythroïde).
- contrôle de l'efficacité relative de la digestion par BglIII.

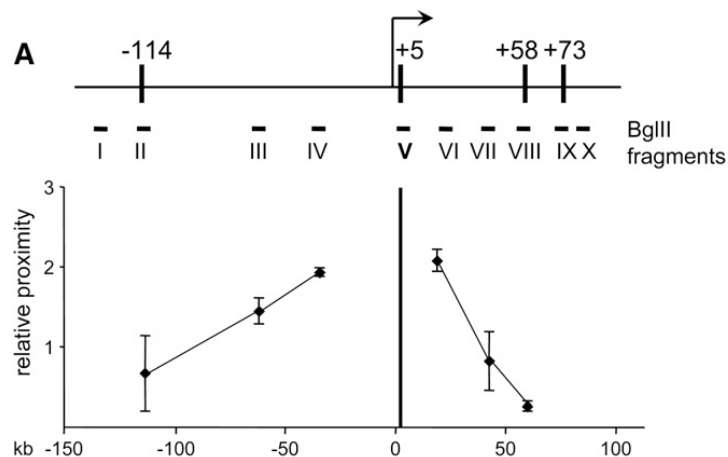
A : schéma de la position relative des fragments étudiés pour leur fréquence de ligation

B : fréquence de ligation des différents fragments avec le fragment V

C : time course, après début de l'induction des G1E-ER par estradiol



ci-dessous : exp contrôle : expérience de 3C dans des fibroblastes NIH 3T3 qui n'expriment pas *Kit* et n'ont pas de GATA-1 ni GATA-2 :



Q6)

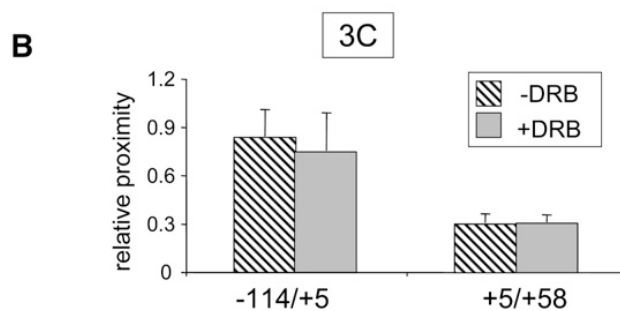
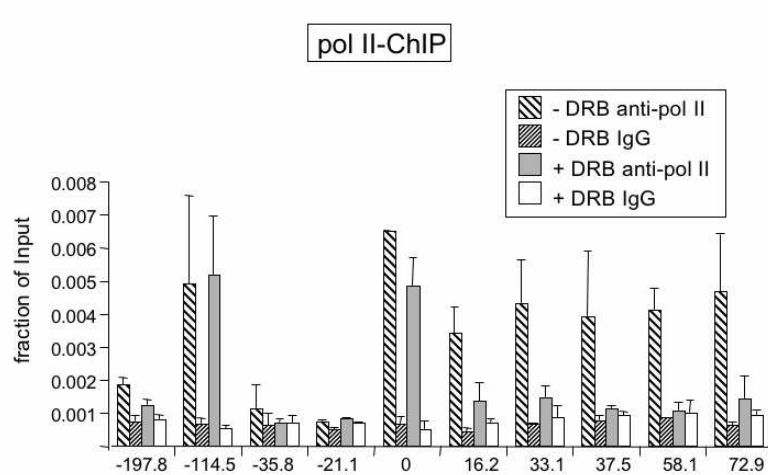
- l'emploi de cette technique indirecte de l'évaluation de l'emplacement relatifs de domaines chromosomiques est rendue nécessaire par l'absence de technique de visualisation directe.
- dans l'expérience contrôle, en l'absence de GATA-1 et de GATA-2, la fréquence de ligation décroît avec la distance, suggérant l'absence de formation de boucles régulatrices
- dans les cellules G1E, la fréquence de ligation des fragments -114 et +5 est supérieure à celle des fragments -60 et +5, ce qui suggère un rapprochement de la région -114 avec le promoteur
- dans les cellules G1E-ER4, la fréquence de ligation des fragments +5 et +58 est plus importante que dans les cellules G1E, suggérant un rapprochement spatial au cours de la différenciation
- dans les cellules G1E-ER4, la fréquence de ligation des fragments -114 et +5 est moindre que dans les cellules G1E, suggérant un rapprochement spatial au cours de la différenciation
- les exp de time course montrent ces données
- des barres d'erreur correspondant à la déviation standard ne se chevauchant pas constitue un critère de significativité

- 5) les changements de configuration chromosomiques induits par GATA-1 sont-ils une conséquence de l'inhibition de la transcription

exp6 :

La technique 3C est employée sur des cellules G1E traitées avec 75 mM de 5,6 dichloro-1-b-d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), qui inhibe la phosphorylation de la Sérine2 du segment C-terminal de l'ARNpolIII, phosphorylation associée à la progression de la PolIII dans la phase d'élongation de la transcription.

- A. contrôle par ChIP par des anticorps anti-PolIII :
- B. technique de 3C sur des cellules G1E avant et après traitement par le DRB, évaluant les fréquences de ligation entre les fragments -114 et +5 d'une part, et +58 et +5 d'autre part.



Q7

- le traitement à la DRB entraîne la perte de la liaison de PolII à la région codante du gène *Kit*
- le traitement à la DRB entraîne la perte de la liaison de PolII à la région promotrice et à la région -114
- le traitement à la DRB affecte spécifiquement l'activation de la transcription
- le traitement à la DRB affecte spécifiquement le processus de la transcription
- le traitement à la DRB affecte spécifiquement les remaniements spatiaux des régions de fixation des facteurs GATA
- les remaniements spatiaux des régions de fixation des facteurs GATA peuvent être une conséquence de l'inhibition de la transcription en soi

6) rôle du co-facteur FOG-1 (Friend of GATA)

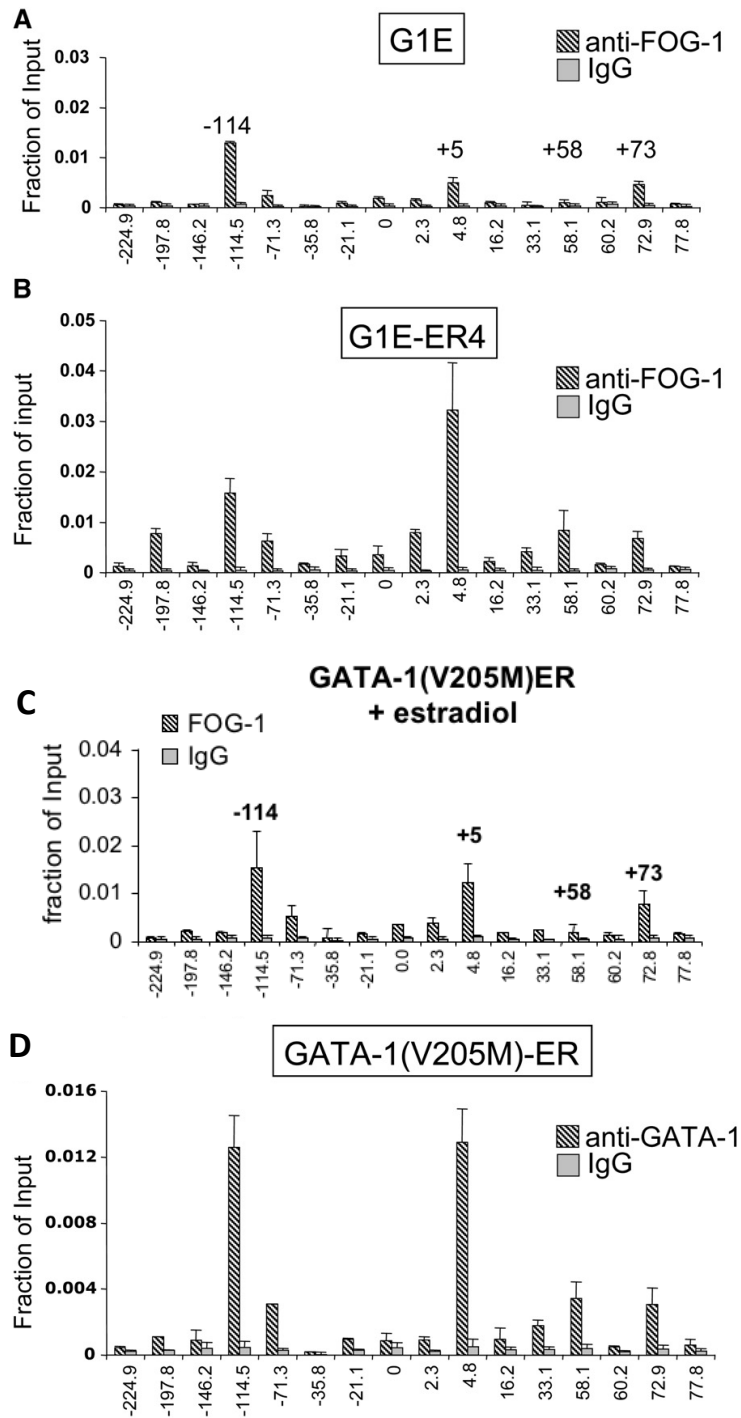
Le facteur FOG-1 interagit physiquement avec GATA-1 et 2 ; il est nécessaire à l'activité activatrice ou répressive de GATA-1.

Un mutant GATA-1(V205M)-ER a été généré, qui abolit l'interaction avec FOG-1

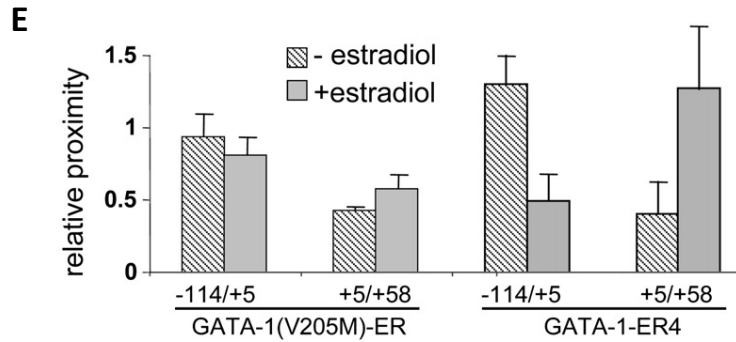
exp7 :

A-D : ChIP

- A. ChIP par des anti-FOG-1 sur des cellules G1E
- B. ChIP par des anti-FOG-1 sur des cellules G1E-ER4, après induction
- C. ChIP par des anti-FOG-1 sur des cellules exprimant GATA-1(V205M)-ER, après induction
- D. ChIP par des anti-GATA-1 sur des cellules exprimant GATA-1(V205M)-ER, après induction



E. Analyse 3C des fragments -114 et +5 d'une part, et +5 et +58 d'autre part, dans les cellules G1E-ER4 et dans les cellules exprimant GATA-1(V205M)-ER, avant et après induction par l'estradiol



Q8)

- Dans les cellules G1E, le profil d'enrichissement de FOG-1 au locus *Kit* est comparable à celui de GATA-2
- Dans les cellules G1E-ER4, le profil d'enrichissement de FOG-1 est comparable à celui de GATA-1
- GATA-1 est en partie nécessaire au recrutement de FOG-1 aux régions +5 et +58
- L'interaction avec FOG-1 est essentielle pour assurer un profil d'occupation correct de GATA-1 au locus *Kit*
- L'interaction avec FOG-1 est essentielle pour la répression du gène *Kit* (exp1B)
- L'interaction avec FOG-1 est essentielle pour la perte de l'interaction des régions -114 et +5 induite normalement par GATA-1
- L'interaction avec FOG-1 est essentielle pour assurer le rapprochement des régions +5 et +58
- Le rôle de FOG-1 dans la formation des boucles passe par la régulation de l'enrichissement de GATA-1

Au total :

Dans les cellules érythroïdes immatures, GATA-2 est lié à l'enhancer -114kb, formant une boucle chromatinienne activatrice rapprochant cet élément régulateur du promoteur. Au cours de la maturation, GATA-1 inactive et remplace GATA-2, et augmente l'interaction du promoteur avec les régions d'aval, qui dépendent de l'interaction avec l'enhancer, ce qui contribuerait à la répression du gène *Kit*. Ces effets de GATA-1 requièrent l'interaction avec FOG-1.

Corrections ED3

Q1

A: F

B: V

C: V

D: V

E: V

+: F

+: V

+: V

Q2

A: F

B: F

C: V

D: F

E: F

+: F

Q3

A: F

B: V

C: V

D: F

E: F

+: F

Q4

A: V

B: V

C: F

D: V

E: V

+: V

Q5

A: F

B: F

C: F

D: V

E: V

Q6

A: V

B: F

C: V

D: F

E: F

+: ralentit

Q7

A: F

B: F

C: F

D: F

E: F

Q8

A: F

B: F

C: F

D: V

E: V

+: V

Q9

A: F

B: V

C: V

D: F

E: V

Q10

A: V

B: V

C: F

D: V

E: V

ED5 : Signalisation cellulaire

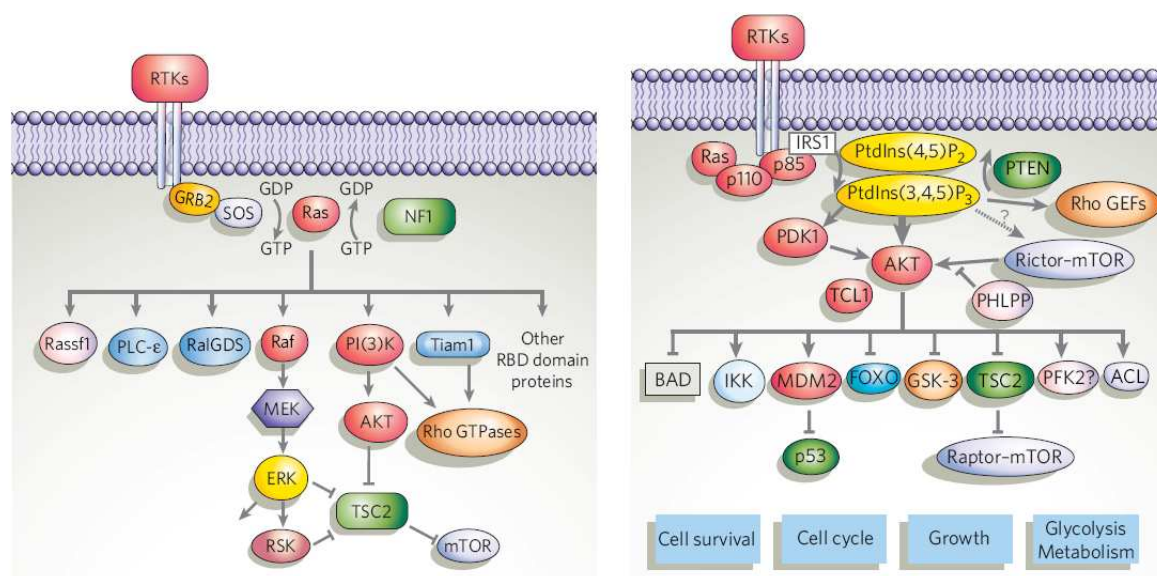
Problématique : relation entre les voies de signalisation induites par des stimuli extracellulaires et la régulation du trafic nucléo-cytoplasmique

Les molécules de signalisation extracellulaire, comme les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones peptidiques et les neurotransmetteurs, activent les RTKs, qui activent 2 éléments-clé des voies de transduction du signal : la petite GTPase Ras et la kinase des lipides PI(3)K.

La transduction du signal en aval de Ras passe par la voie des MAPK : Raf, lié et activé par Ras, va phosphoryler MEK1/2, qui activent ERK1/2, qui phosphorylent les protéines kinases de la famille RSK. Les RSKs sont impliquées dans de multiples processus incluant la régulation transcriptionnelle, le contrôle du cycle cellulaire, la synthèse protéique.

La voie PI3K/Akt, activée par les facteurs de croissance et inhibée par des gènes suppresseurs de tumeur comme PTEN, contrôle la croissance/taille cellulaire, la prolifération, la survie, le métabolisme du glucose.

La plupart des tumeurs humaines se caractérisent par des mutations activatrices de ces facteurs, ou des mutations inactivatrices de leur inhibiteurs (comme PTEN).



Abbréviations

RTKs: receptor tyrosine kinases

Ras : GTPase (protéine G)

GAP : GTPase activating protein

GEF : guanine nucleotide exchange factor

Raf : (as MAPKKK)(sérine/thréonine kinase)

MEK ½ (MAPK/ERK kinase)(as MAPKK)

ERK : extracellular-signal-regulated kinase (as MAPK)

RSKs : ribosomal S6 kinases (RSK1–RSK4)

MAPK : mitogen activated protein kinase

PI(3)K : phosphatidylinositol-3-OH kinase

AKT : protein kinase B (PKB)(sérine/thréonine kinase)

mTOR : mammalian target of rapamycin (serine/threonine kinase)

TSC1 : tuberous sclerosis complex 1 (ou hamartin) : régulateur négatif de mTOR

TSC2 : tuberin : régulateur négatif de mTOR

PTEN : phosphatase and tensin homologue

Le transport nucléocytoplasmique de protéines est régulé par la petite GTPase nucléaire Ran, similaire à Ras. Ran est localisée majoritairement dans le noyau, mais en raison d'un cycle nucléocytoplasmique, de faibles quantités sont également présentes dans le cytoplasme. Le cycle de la GTPase Ran est modulé par l'interaction avec différentes protéines. RCC1 (ou RanGEF), le facteur d'échange de la guanine, est restreint au noyau, tandis que la protéine activatrice de Ran, RanGAP (qui hydrolyse le GTP en GDP), est concentrée dans le cytoplasme.

En raison de cette compartimentalisation des facteurs régulateurs Ran, la forme de Ran liée au GTP est principalement localisée dans le noyau, et le gradient qui en résulte contribue aux échanges de nombreuses protéines et de certains ARNs, à travers les pores nucléaires, par les importines et les exportines.

Le contrôle du transport nucléo-cytoplasmique contribue au contrôle spatial et temporel de la transcription, de la traduction, du cycle cellulaire, et des autres paramètres importants pour les décisions cellulaires.

Q1

- un oncogène est un gène dont il existe une version modifiée conduisant à la prolifération non contrôlée des cellules cancéreuses
- un proto-oncogène est la séquence non mutée d'un oncogène, codant généralement un facteur régulant positivement la prolifération (comme Ras)
- v-ONC est une version mutée d'un oncogène codée par un virus (animal)
- c-ONC est la version sauvage d'un oncogène, ou proto-oncogène
- un gène suppresseur de tumeur (PTEN, p53) : gène freinant la prolifération cellulaire, et dont les mutations inactivatrices conduisent à la transformation cancéreuse des cellules

1) Recherche de nouveaux partenaires de RSK

exp1A-C : crible double-hybride chez la levure (yeast two hybrid (Y2H) screen)

les cellules de levure contenant les plasmides codant pour 3 formes de RSK, fusionnées au domaine d'activation de Gal4 (appât), sont transformés avec une banque de cDNA extraits d'embryons de souris de 9,5 jours fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (proie)

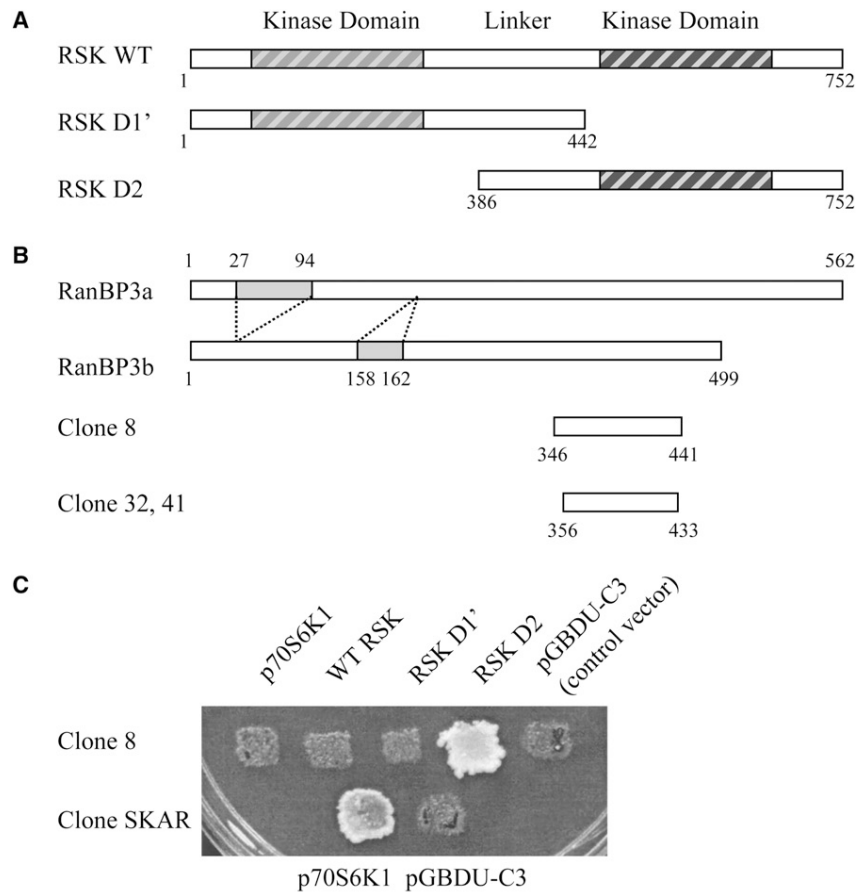
le crible identifie 3 clones contenant des fragments de cDNA codant pour la protéine RanBP3. Cette protéine est connue pour interagir directement avec Ran, et influencer le transport des protéines liées à RanGTP.

pGBDU-C3 : plasmide contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 croissance sur milieu sans Adénine, Uracile ni Leucine

Le clone SKAR est connu pour interagir avec la protéine p70S6K1.

Q2

- le crible Y2H ne permet de retrouver que des partenaires directs
- le crible Y2H met en évidence des interactions qui ont nécessairement une pertinence physiologique
- le crible Y2H est applicable à tous les types de protéines
- une interaction se traduit par la reconstitution d'un facteur Gal4 fonctionnel
- une interaction se traduit par l'expression d'un gène rapporteur (ici d'un gène permettant la croissance des cellules sur milieu sélectif)



Q3

- Le clone SKAR co-transformé avec la protéine de fusion comprenant p70S6K1 constitue le contrôle positif
- le clone 8 co-transformé avec le vecteur pGBDU-C3 permet d'éliminer une activation non spécifique
- l'absence d'interaction avec la forme WT de RSK peut s'expliquer par une plus faible interaction de la forme complète avec RanBP3
- l'absence d'interaction avec la forme WT de RSK peut s'expliquer par un défaut de repliement de la protéine de fusion exprimée chez la levure
- une interaction en Y2H démontre l'interaction physique de 2 protéines

exp1D : co-immuno-précipitation (co-IP)

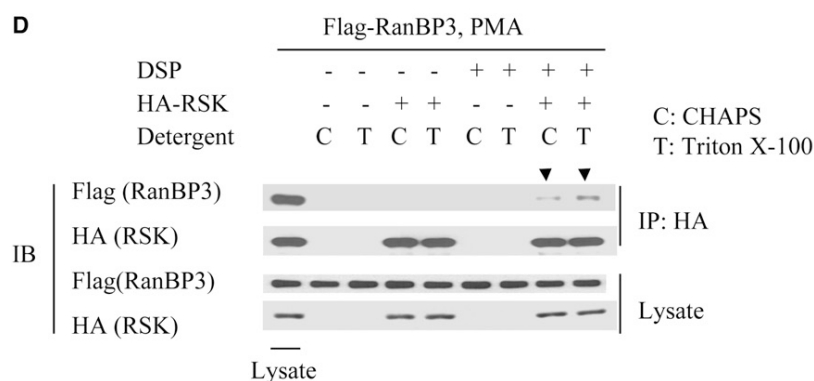
à l'aide de protéines de fusion, comportant des « tag », de brèves séquences (HA ou Flag) reconnues fortement par des anticorps spécifiques.

Des lignées cellulaires immortalisées, Human embryonic kidney (HEK) 293 cells ou human cervical carcinoma HeLa cells, sont transfectées avec HA-RSK ou un vecteur contrôle, et Flag-RanBP3 ; 48h après, les cellules sont traitées ou non avec du PMA pendant 15', qui stimule la voie MAPK puis lysées avec 2 type de détergents (CHAPS ou TritonX100), avec ou sans DSP, un agent permettant le cross-link des protéines entre elles ;

le lysat est utilisé pour une immuno-précipitation (anti-HA) suivie d'un immuno-blot (anti-Flag)

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

DSP : Dithio-bis[succinimidylpropionate]



Q4

- une co-IP permet de retrouver des interactions indirectes
- une co-IP met en évidence des interactions qui ont nécessairement une pertinence physiologique
- une co-IP nécessite l'emploi de 2 anticorps différents, pour l'IP et l'IB
- la mise en évidence de l'interaction après cross-link uniquement suggère une interaction faible et/ou transitoire
- l'expérience inverse aurait pu être réalisée (IP anti-flag et immuno-blot anti-HA)
- le peptide HA interagit faiblement avec le peptide Flag

2) Activité kinase de RSK1/2

l'analyse de la séquence de RanBP3 identifie plusieurs sites possibles de phosphorylation de RanBP3 (motif RXRXXS/T ou RXXS/T) : les sérines S57, S58, S153

exp2C : étude de l'activité kinase de RSK sur la forme sauvage de RanBP3, et sur des formes dans lesquelles sont abolies les sites de phosphorylation suspectés :
des cellules HEK293 sont transfectées avec HA-RSK1(WT) ou HA-RSK1(Δ/Δ) (c'est-à-dire une mutation dans chacun des 2 domaines kinase, abolissant complètement cette activité) ;
48h après, traitement ou non par PMA pendant 15' ;
Immuno-précipitation anti-HA ;
puis mesure de l'activité phospho-transférase de RSK immuno-précipitée sur les protéines recombinantes (produites en bactéries puis purifiées) GST-RanBP3(WT), GST-RanBP3(S57A), GST-RanBP3(S58A) , après incubation avec ATP marqué au ^{32}P ,
migration sur SDS-PAGE, séchage du gel, puis autoradiographie

exp2D :

même exp mais en présence de U0126 : un inhibiteur de la voie MEK/ERK, qui bloque la capacité du PMA d'activer RSK

exp2E : production et analyse de la spécificité des anticorps anti-phospho-S58-RanBP3

les cellules HEK293 sont transfectées avec un vecteur contrôle, RanBP3(WT), RanBP3(S58A), ou RanBP3(S58D)

48h après, traitement par PMA 15'

puis lyse cellulaire et immunoblot

exp2F :

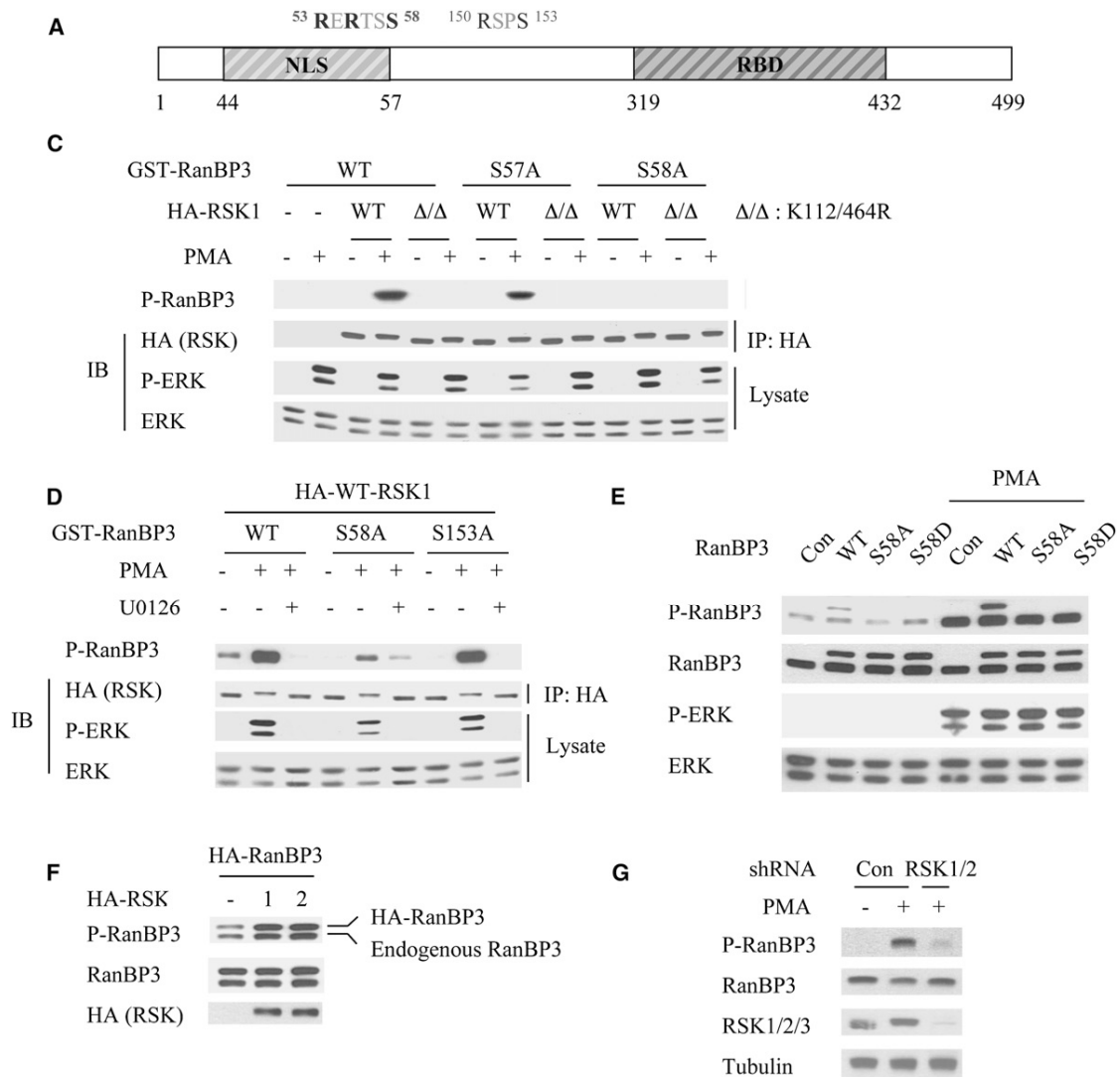
co-transfection des cellules HEK293 avec les plasmides HA-RanBP3 et de HA-RSK1 ou HA-RSK2

48h après, lyse cellulaire puis Immunoblot anti-HA

exp2G : knock down par RNAi de RSK1/2

(par la méthode des shRNA : short hairpin RNA : plasmide exprimé de façon stable par un vecteur rétroviral, codant un ARN de 50nt adoptant une structure en épingle à cheveu, laquelle est clivée dans la cellule pour produire un siRNA : produisant donc KD permanent).

48h après transfection, traitement stimulateur par PMA pendant 15', puis lyse cellulaire, et immunoblot.



Q5

-l'utilisation de RSK immunoprécipitée, et non recombinante, permet d'avoir accès à d'éventuels partenaires dont RSK peut avoir besoin pour exercer son activité kinase

-l'utilisation de RSK immunoprécipitée, et non recombinante, permet d'avoir accès au substrat de RSK

-l'utilisation de RSK immunoprécipitée, et non recombinante, permet d'avoir accès à sa forme active (phosphorylée)

- la phosphorylation de la forme de RanBP3 mutée sur S57 indique que S57 est le site de phosphorylation par RSK

- le contrôle utilisant une forme sans activité kinase de RSK (RSKΔ/Δ) permet de s'assurer que l'activité kinase est bien portée par RSK et non par un autre partenaire co-immunoprécipité

- le PMA, qui active la voie ERK, active l'activité kinase de RSK sur RanBP3
- exp2D : seule RSK activée est capable de phosphoryler RanBP3
- exp2D : la phosphorylation de RanBP3 influence sa liaison avec RSK

Q6

- les expériences de phosphorylation donnent des résultats *in vitro*
- les expériences utilisant des anticorps anti-phospho-RanBP3 donnent des résultats *in vivo*
- exp2E : le PMA augmente l'expression de chacune des versions de RanBP3 testée (WT, S58A, S58D)
- exp2F : RanBP3 transgénique est plus lourde que RanBP3 endogène car elle est phosphorylée
- exp2F : l'expression ectopique de HA-RSK augmente la forme phosphorylée de RanBP3
- exp2G : le KD des RSK diminue fortement la quantité de RanBP3

RSK et Akt reconnaissent et phosphorylent la même séquence (RXRXXS/T) ;

par les mêmes types d'expériences qu'avec RSK, les auteurs montrent que :

les Akt et RanBP3 co-immunoprécipitent (après cross-link)

in vitro, Akt possède une activité kinase sur S58 de RanBP3, activité induite par un traitement à l'insuline, et inhibée par LY294002, un inhibiteur de la voie PI3K

in vivo, la surexpression de Akt augmente la quantité de RanBP3 phosphorylée sur S58, tandis que le RNAi contre AKT1/2 diminue cette forme de RanBP3

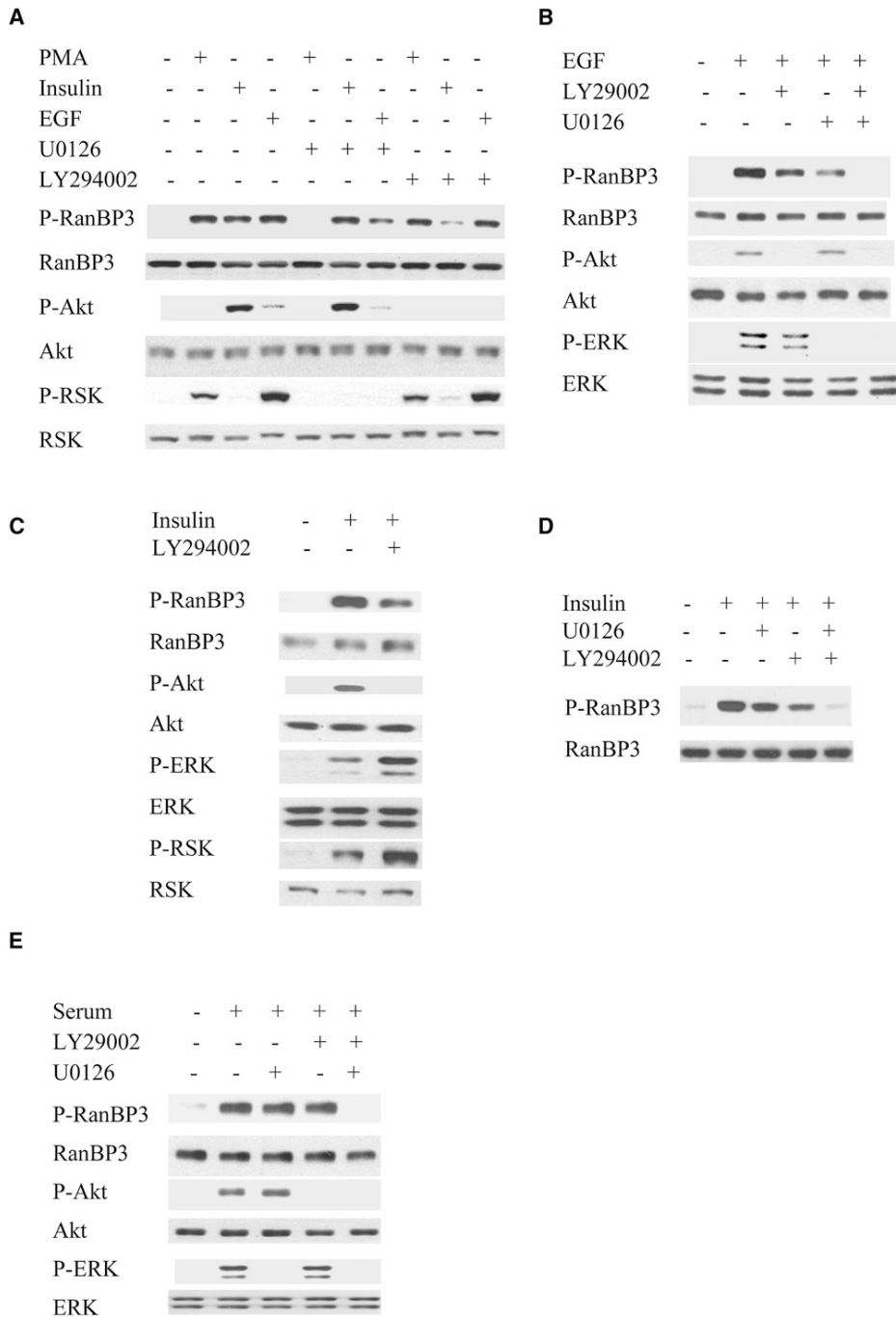
3) rôle des facteurs de croissance

exp3 :

Les cellules HEK293 sont incubées pendant 20h dans un milieu sans sérum, puis incubées pendant 1h avec différents inhibiteurs (U0126, LY294002), puis avec différents traitements stimulants (PMA, insuline ou EGF) pendant 15' puis lyse cellulaire et Immunoblot

Q7 :

- exp3A : tous les types de stimuli testés augmentent la forme phosphorylée de RanBP3
- exp3A : le PMA est un stimulateur spécifique de la voie ERK
- exp3A : l'insuline est un stimulateur spécifique de la voie PI3K
- exp3C (exposition plus longue que exp3A) : l'insuline est spécifique de la voie PI3K
- exp3C : la voie de PI3K/Akt régulerait négativement la voie ERK
- l'EGF, comme le sérum, active les 2 voies
- l'augmentation induite par le PMA est bloquée par U0126 (un inhibiteur de la voie MEK/ERK)
- exp3B : la phosphorylation de RanBP3 induite par l'EGF, qui active à la fois les voies PI3K/AKT et ERK/RSK, est bloquée lorsque U0126 et LY294002 sont employés en même temps
- exp3D : la phosphorylation de RanBP3 induite par l'insuline n'est bloquée que lorsque U0126 et LY294002 sont employés en même temps
- la phosphorylation de RanBP3 intègre des signaux provenant des 2 voies PI3K/AKT et ERK/RSK

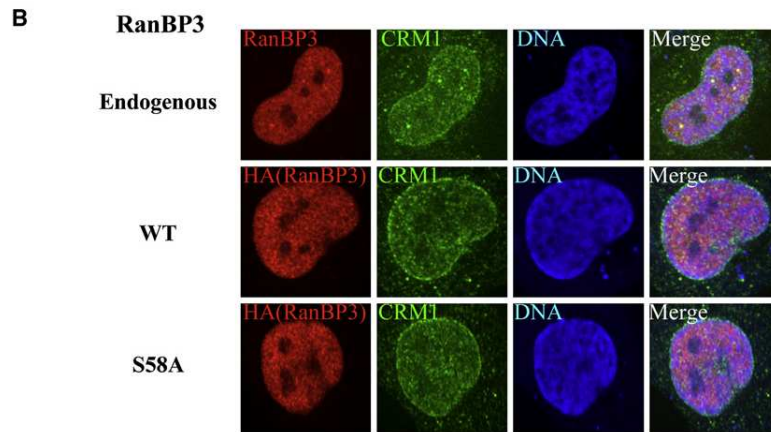


4) Rôle de la phosphorylation de RanBP3

exp4B : Immunofluorescence (IF) : localisation de RanBP3 (et CRM1, une exportine à laquelle se lie RanBP3)

RanBP3 endogène : cellules HeLa fixées et marquées avec un anti-RanBP3, puis microscopie confocale

RanBP3 exogène : transfection des cellules HeLa avec HA-RanBP3(WT) ou HA-RanBP3(S58A), puis marquage avec un anti-HA



Les auteurs ne retrouvent pas d'interaction entre RanBP3 surexprimée et et Ran endogène, *in vivo*, avec ou sans N-ethylmaleimide (NEM), un agent alkylant qui bloque l'activité de RanGAP stratégie alternative

exp4E :

dans un contexte de double knockdown pour RanBP3 et Ran, produit par l'expression de shRNA (introduits par infection de rétrovirus puis sélection des transformants sur puromycine), on induit la ré-expression de Flag-RanBP3 et d'un mutant Ran (HA-E46G-Ran), à l'aide de vecteurs rétroviraux également ;

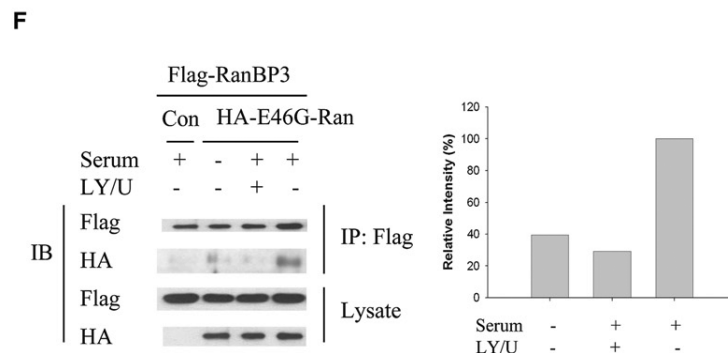
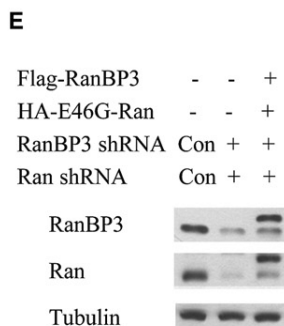
HA-E46G-Ran est un mutant insensible à RanGAP mais subit l'échange de nucléotide induit par RCC1 : il est donc lié au GTP

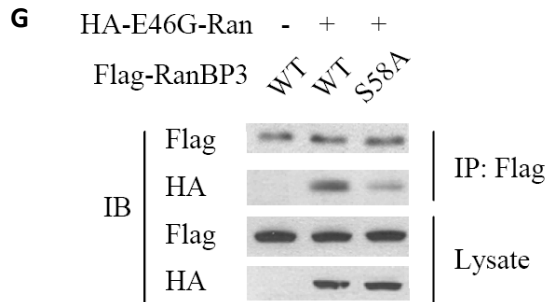
exp4F :

dans le même contexte (double KD puis double ré-expression de Flag-RanBP3 et HA-Ran(E46G)), les cellules sont traitées 1h avec des inhibiteurs (U0126 + LY294002) ; puis 15' avec un milieu contenant 20% de sérum ; puis les cellules sont lysées, en présence d'agent cross-linker (DSP), et une immunoprécipitation est réalisée.

exp4G :

exp identique dans le principe, avec transfection soit de Flag-RanBP3(WT) soit Flag-RanBP3(S58A)





Q8 :

- exp4B : les anticorps anti-RanBP3 détectent en même temps les formes endogène et exogène
- exp4B : les anticorps anti-HA détectent en même temps les formes endogène et exogène
- exp4B : après transfection, la phosphorylation de RanBP3 n'affecte pas sa propre localisation
- l'exp4E équivaut à un Knock-In
- exp4F : la stimulation par le sérum augmente l'interaction,
- exp4F : l'interaction induite par le sérum est inhibée par les inhibiteurs des voies PI3-K et MEK/ERK
- exp4G : l'interaction entre RanBP3(S58A) et Ran(E46G) est diminuée par rapport à RanBP3(WT)
- la phosphorylation de RanBP3 augmenterait sa liaison avec Ran

5) Régulation du gradient nucléo-cytoplasmique de Ran

exp5A : Immunoblot

mesure de l'efficacité du KD de RanBP3 par 2 shRNA

exp5B : IF : anti-RanBP3 et anti-CRM1, ou anti-Ran et anti-RCC1

après RanBP3 RNAi

exp5C : Immunoblot

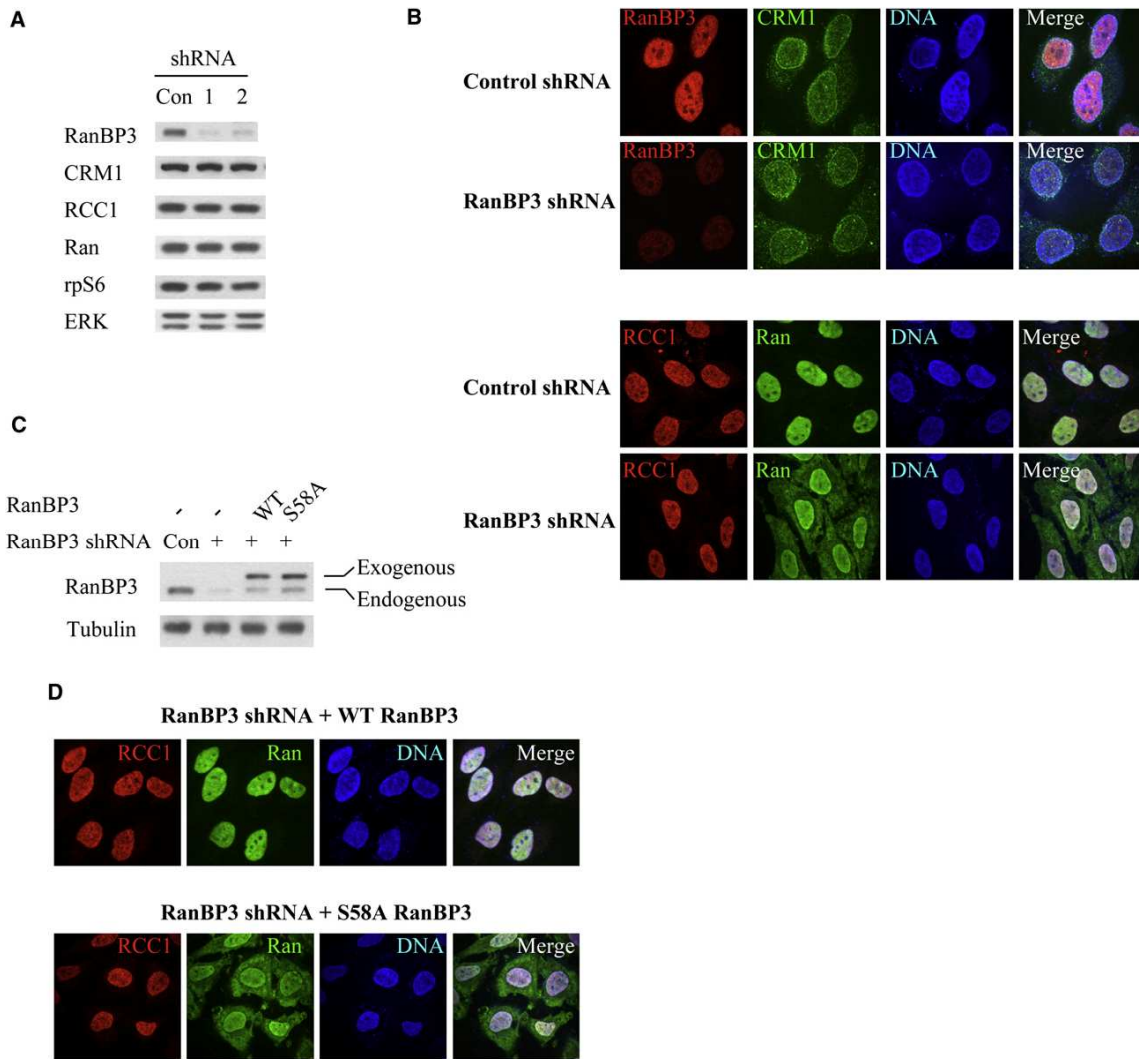
après KD pour RanBP3 dans les cellules HeLa, mesure de l'efficacité de la ré-expression de RanBP3(WT) ou RanBP3(S58A)

exp5D : IF : anti-Ran et anti-RCC1

après KD de RanBP3 puis ré-expression de RanBP3(WT) ou RanBP3(S58A)

Q9

- RanBP3 RNAi n'affecte pas la production de Ran ni RCC1
- RanBP3 RNAi n'affecte pas la localisation de RCC1
- RanBP3 RNAi altère la localisation de Ran : qui tend à s'accumuler dans le cytoplasme, par rapport à l'exp contrôle :
- la ré-expression des transgènes se fait à des taux endogènes
- la ré-expression de RanBP3(WT) mais pas de RanBP3(S58A) restaure une localisation normale de Ran
- la phosphorylation de RanBP3 est impliquée dans le maintien du gradient nucléocytoplasmique de Ran



6) Régulation du transport nucléaire

exp6A-B : IF : étude de l'import nucléaire

micro-injection intra-cytoplasmique de GST-NLS-GFP recombinante purifiée et de tétraméthylrhodamine-dextran (Mr = 70kD), qui ne peut pénétrer par les pores nucléaires ; 10' après injection, les cellules sont fixées et étudiées en microscopie confocale

exp6A : cellules HeLa dans le contexte KD RanBP3 et exprimant Ran(BP3(WT) ou RanBP3(S58A)

exp6B : même expérience avec la protéine ribosomale L12, qui est une cible connue de Ran

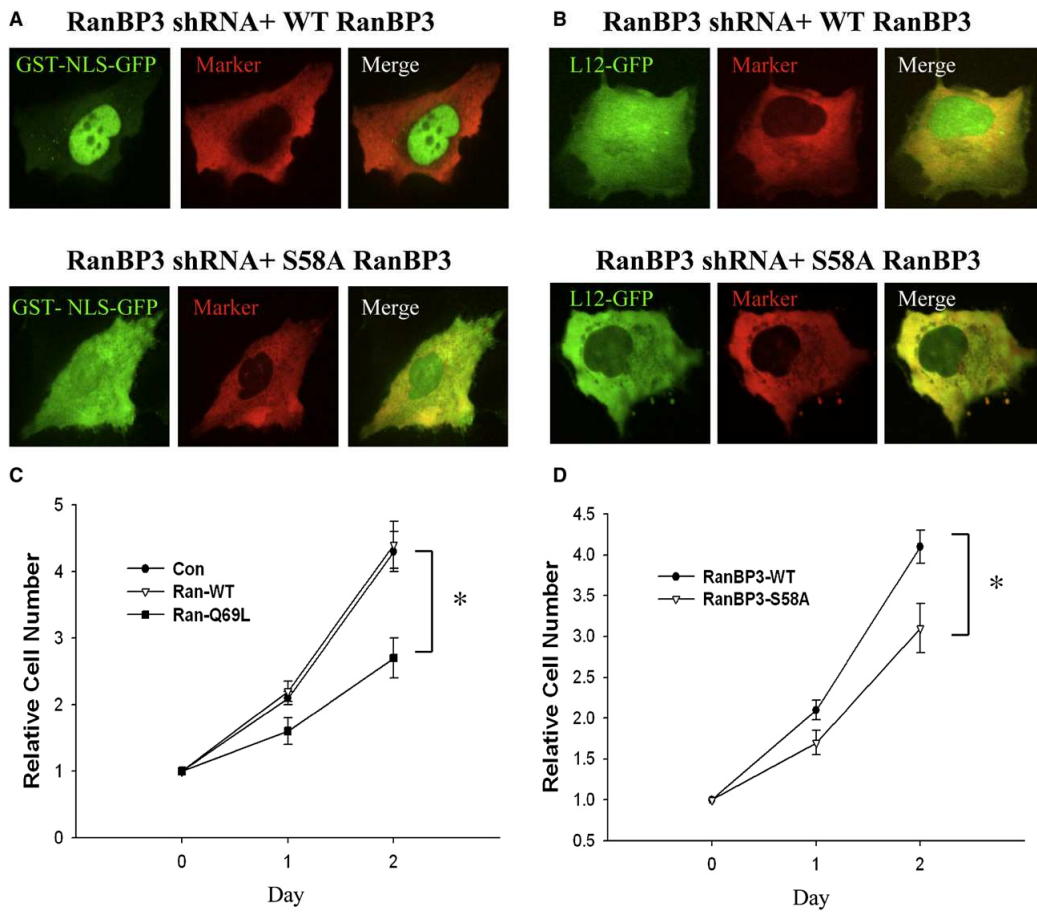
exp6C-D : étude de la prolifération cellulaire

l'altération de l'import de protéines ribosomales affecte l'assemblage des ribosomes et la synthèse de protéines, et donc aussi la croissance cellulaire

A titre de comparaison, un mutant de Ran Q69L, connu pour altérer le transport nucléaire des protéines, affecte aussi la prolifération cellulaire

exp6C : les cellules sont transfectées avec un vecteur contrôle ou avec les versions de WT ou Q69L de Ran, et comptées à différents temps

exp6D : les cellules dans lesquelles RanBP3 a été inactivé par shRNA, et exprimant de façon stable les transgènes RanBP3(WT) ou RanBP3(S58A) sont étalées, et comptées à différents temps



Q10 :

- la séquence NLS entraîne le ciblage vers le noyau, via les importines
- l'expression de la forme mutée S58A de RanBP3 s'accompagne d'un import nucléaire atténué par rapport à RanBP3(WT)
- transport nucléaire de L12-GFP déficient si lors de l'expression de RanBP3(S58A) comparée à WT
- l'expression de RanBP3(S58A) réduit la prolifération par rapport à RanBP3(WT)
- c'est tout pour aujourd'hui

Au total

les voies de signalisation ERK/RSK et PI3K/Akt convergent au niveau de RanBP3, qu'elles phosphorylent sur le même résidu, ce qui conduit à la régulation du gradient nucléocytoplasmique de Ran, donc du transport de macromolécules vers le noyau, et in fine de la croissance cellulaire.

TD 7 Biologie cellulaire PCEM1 2007-2008

Lors de la mise en place du muscle squelettique les myoblastes, cellules précurseurs des fibres musculaires, fusionnent entraînant la formation de myotubes qui sont des cellules multinucléées. Au cours de ce processus, les myoblastes vont sortir définitivement du cycle cellulaire, réprimer l'expression des gènes responsables de sa progression et exprimer le programme de différenciation, comportant de nombreux gènes spécifiques.

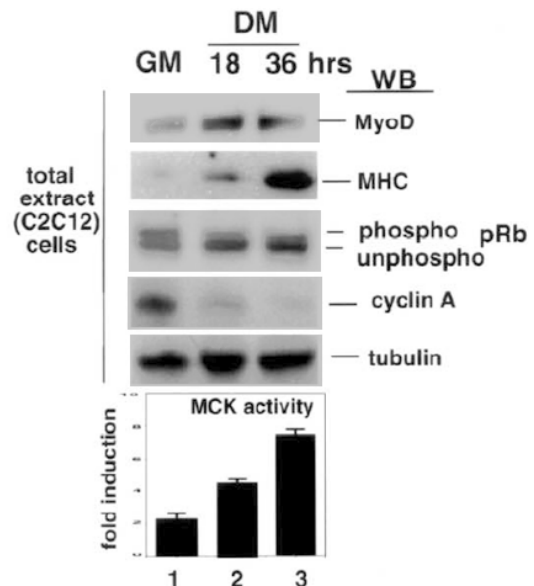
Deux familles de facteurs de transcriptions sont responsables de l'activation de ces gènes ; celles de MyoD et MEF2. Des coactivateurs transcriptionnels tels que les acétyltransférases p300/CBP et P/CAF se fixent à ces protéines lors de la différenciation. Mais dans les myoblastes on les trouve associés à des désacétylases.

Or on trouve aussi parmi les facteurs importants pour le bon déroulement de la différenciation musculaire la protéine du rétinoblastome (pRb) connue chez la plupart des types de cellules pour son contrôle de la progression du cycle cellulaire. pRb aussi peut s'associer à des désacétylases d'histones. Puri P.L. et collaborateurs en sont ainsi venus à étudier les changements qui s'opèrent pour ces protéines lors de la transition entre prolifération et différenciation musculaire chez les souris.

Q1 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Toute cellule différenciée continue à se diviser comme ses précurseurs.
- B. Acétyltransférases et désacétylases d'histones agissent sur les queues N-terminales de ces protéines.
- C. Les désacétylases sont des activateurs de la transcription.
- D. L'acétylation permet de rendre l'ADN plus accessible en créant un excédent de charges positives entraînant la répulsion électrostatique des nucléosomes.
- E. La phosphorylation de pRb par les CDKs permet le passage du point de contrôle G1/S.

Figure 1 : Des myoblastes de souris (C2C12) sont cultivés en milieu de **croissance** (GM, contenant 20% de sérum de veaux foetal) ou en milieu de **différenciation** (DM, contenant 2% de sérum de cheval) pendant 18 ou 36h. On prépare alors des extraits cellulaires totaux qui sont analysés par la technique de l'immunoblot (Western-blot, WB) quant à la présence de diverses protéines : le facteur de transcription MyoD, la chaîne lourde de la myosine (MHC), la protéine du rétinoblastome pRb, la cycline A et la tubuline. On mesure de plus dans ces extraits l'activité de la créatine kinase du muscle (MCK), spécifiquement exprimée lors de la phase tardive de la différenciation du muscle squelettique, tout comme la MHC.

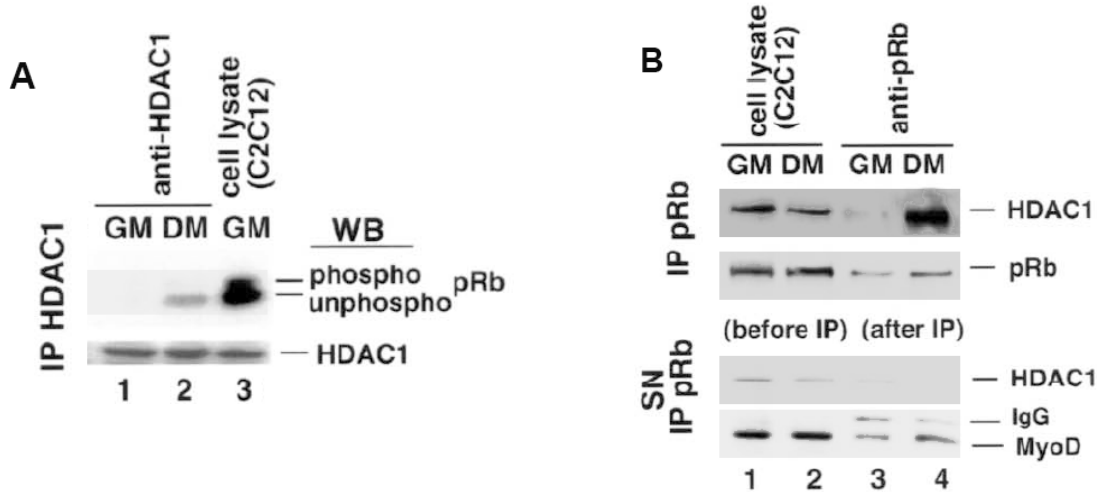


Q2 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. La tubuline est un contrôle qui permet de vérifier que les disparités observées ne sont pas dues à des différences de quantités totales de protéines déposées sur le gel.
- B. Les variations de la quantité de cycline A entre les différentes conditions démontrent qu'elles correspondent à différentes phases du cycle cellulaire.

- C. L'accroissement de la quantité de MyoD en DM concorde avec l'augmentation de l'expression de MHC, de la déphosphorylation de pRb et de l'activité MCK.
- D. Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'activité MCK est responsable de la déphosphorylation de pRb.
- E. La tubuline est spécifiquement exprimée uniquement dans les cellules musculaires.

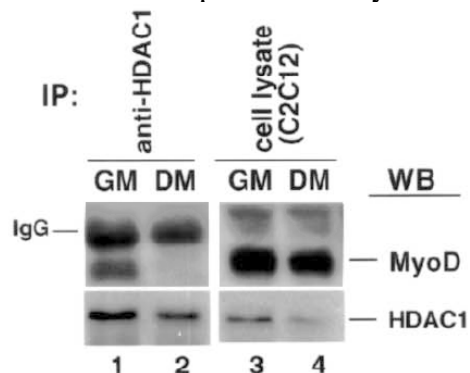
Figure 2 : On réalise alors sur ces extraits cellulaires une immunoprécipitation (IP) avec des anticorps dirigés contre une désacétylase d'histone de type I (HDAC 1) (A) ou contre pRb (B). les extraits totaux (cell lysate), immuno-précipitats et surnageants (SN) sont alors analysés par immunoblot.



Q3 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Tout comme l'immuno-précipitation, l'immunoblot est généralement réalisé dans des conditions non dénaturantes pour les protéines.
- B. L'immuno-précipitation permet souvent de purifier des complexes protéiques.
- C. Ces résultats suggèrent que HDAC 1 est préférentiellement liée à pRb dans sa forme déphosphorylée en GM.
- D. Les résultats des figures 2A et 2B sont contradictoires.
- E. La figure 2B démontre que pRb forme aussi un complexe avec MyoD.

Figure 3 : On procède ensuite de même mais on recherche cette fois-ci la présence de MyoD après immuno-précipitation par HDAC 1.

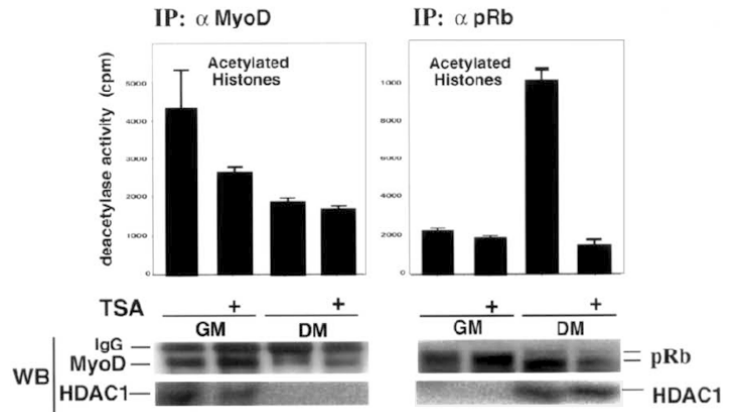


Q4 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. L'ensemble de ces résultats démontre que MyoD, pRb et HDAC 1 forment un complexe ternaire en conditions de prolifération.
- B. La figure 3 démontre que HDAC 1 et MyoD ne sont pas liées lors de la différenciation.

- C. Ces résultats suggèrent que HDAC 1 est préférentiellement liée à MyoD dans les myoblastes et à la forme phosphorylée de pRb dans les myotubes.
- D. On peut supposer que l'activité désacétylase de HDAC 1 est responsable de la répression des gènes spécifiques du muscle squelettique dans les myoblastes.
- E. On ne peut pas exclure que l'activité désacétylase de HDAC 1 n'ait aucun rôle dans la différenciation musculaire.

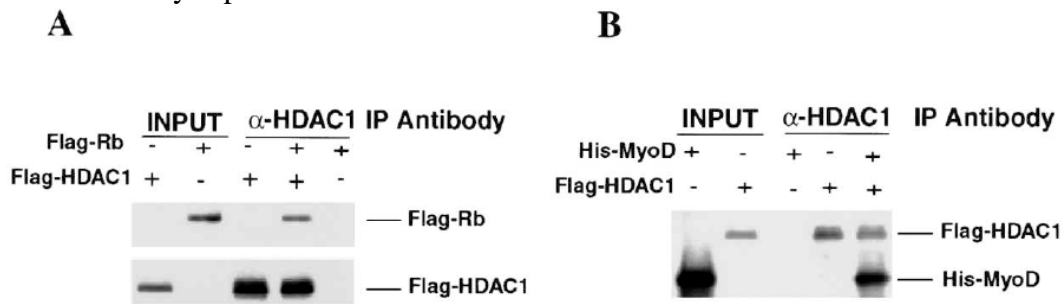
Figure 4 : On réalise maintenant dans les cellules en GM et DM des immunoprécipitations de MyoD et pRb que l'on analyse par immunoblot et dont on mesure l'activité désacétylase sur des protéines histones acétylées purifiées. On traite aussi certaines fractions avec de la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des désacétylase.



Q5 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. La TSA diminue la quantité d'histones acétylées.
- B. Ces résultats démontrent que HDAC 1 perd son activité désacétylase en présence de MyoD lors de la différenciation ainsi qu'en présence de pRb lors de la prolifération.
- C. L'activité désacétylase est associée MyoD dans les cellules en GM et avec pRb dans les cellules en DM.
- D. Ces résultats démontrent que l'association de HDAC 1 à MyoD ou pRb est nécessaire à son activité.
- E. N'excluent pas que l'activité désacétylase soit liée à une autre protéine que HDAC 1.

Figure 5 : Les protéines pRb et HDAC 1 marquées par une étiquette Flag sont alors exprimées dans un système baculovirus (Flag-Rb et Flag-HDAC 1) et la protéine MyoD marquée par un motif poly-histidine dans un système bactérien (His-MyoD). Ces protéines sont purifiées par affinité et la formation de complexes est testée in vitro par incubation de diverses combinaisons deux à deux de purifiats suivie d'une immunoprécipitation de HDAC 1 et d'une analyse par immunoblot.



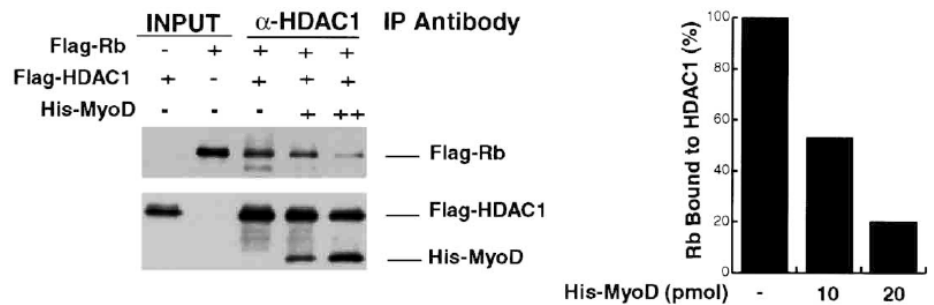
Q6 : Quelle(s) est(sont) la(les) proposition(s) juste(s) :

- A. Tester une interaction in vitro permet de déterminer si celle-ci est directe en s'affranchissant de l'ensemble des autres protéines cellulaires.

- B. Ces résultats n'excluent pas que l'anticorps dirigé contre HDAC 1 puisse se lier à Flag-Rb.
- C. Les résultats obtenus concordent avec ceux des expériences précédentes.
- D. Ces résultats démontrent que Flag-Rb et His-MyoD peuvent se lier directement à Flag-HDAC 1.
- E. Ces résultats n'excluent pas la formation d'un complexe ternaire entre les trois protéines étudiées.

Figure 6 :

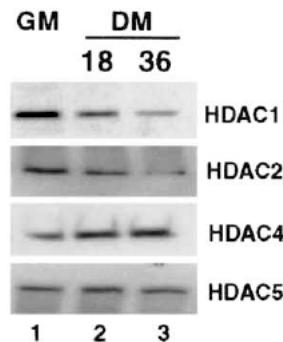
On procède de même en combinant les trois protéines purifiées. L'analyse par immunoblot et la proportion de Flag-Rb liée à Flag-HDAC 1 dans les différentes conditions sont montrées.



Q7 : Les résultats présentés à la figure 6 :

- A. Confirment l'existence d'un complexe ternaire.
- B. Démontrent que MyoD dégrade pRb.
- C. Démontrent clairement que l'affinité de MyoD pour HDAC 1 est plus forte que celle de pRb pour HDAC 1.
- D. Démontrent que MyoD et pRb sont compétiteurs dans l'interaction avec HDAC 1
- E. N'excluent pas la présence d'autres protéines dans les complexes formés in vivo.

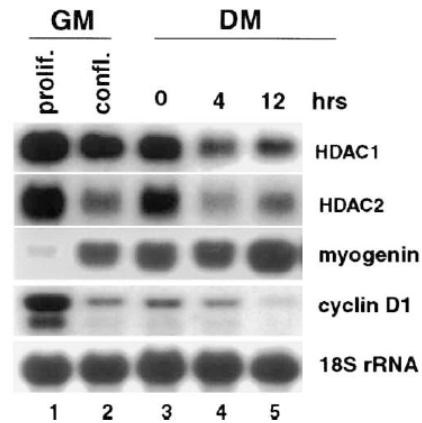
Figure 7 : Analyse par immunoblot de la présence de différentes désacétylases, de classe I (HDAC 1 et 2) ou de classe II (HDAC 4 et 5) dans des extraits cellulaires de C2C12 cultivées en milieu de prolifération ou de différenciation.



Q8 : Propositions concernant les résultats obtenus jusqu'ici :

- A. La figure 7 démontre que les HDAC2,4 et 5 font partie des complexes observés.
- B. L'expression des désacétylases de classe I diminue avec la différenciation.
- C. Les activités désacétylase observées en figure 4 proviennent essentiellement des désacétylases de classe I lors de la prolifération et de celles de classe II lors de la différenciation.
- D. Les résultats suggèrent que l'HDAC2 se comporte comme l'HDAC1 lors du passage de la prolifération à la différenciation.
- E. Ces résultats n'excluent pas que les HDAC4 et 5 soient aussi impliquées dans la différenciation musculaire.

Figure 8 : L'expression de divers gènes a été déterminée par Northern blot sur les ARNs totaux de C2C12 proliférant ou confluentes en milieu de croissance ainsi qu'en milieu de différenciation. On rappelle que la myogénine est un marqueur de la différenciation musculaire précoce et que la cycline D1 est impliquée dans le point de contrôle G1/S.



Q9 : Les résultats présentés à la figure 8:

- Suggèrent que, comme la réduction de la quantité de sérum du milieu, la confluence induit la différenciation.
- Suggèrent que la réduction de l'expression de la cycline D1 dans ces cellules corrèle à leur sortie du cycle cellulaire.
- Confirment les observations de la figure 7 concernat l'expression réduite des désacétylases de classe I lors de la différenciation.
- N'excluent pas que les disparités observées soient liées à l'utilisation de quantités différentes d'ARN totaux
- Démontrent que l'ARN messager de la cycline D1 est dégradé par la myogénine.

On étudie l'impact sur la différenciation de la surexpression de certaines des protéines impliquées. Dans des fibroblastes murins C3H10T1/2 on transfecte différents vecteurs contenant le gène de la GFP ainsi que ceux des autres protéines que l'on veut surexprimer (HDAC1, 2 ou 4). La conversion myogénique est évaluée en comptant le nombre de cellules exprimant un marqueur de différenciation suivi en immunofluorescence (myogénine ou MHC) parmi les cellules exprimant la GFP.

La surexpression de MyoD induit les cellules en différenciation musculaire. Les résultats des comptages sont donnés par le tableau 1.

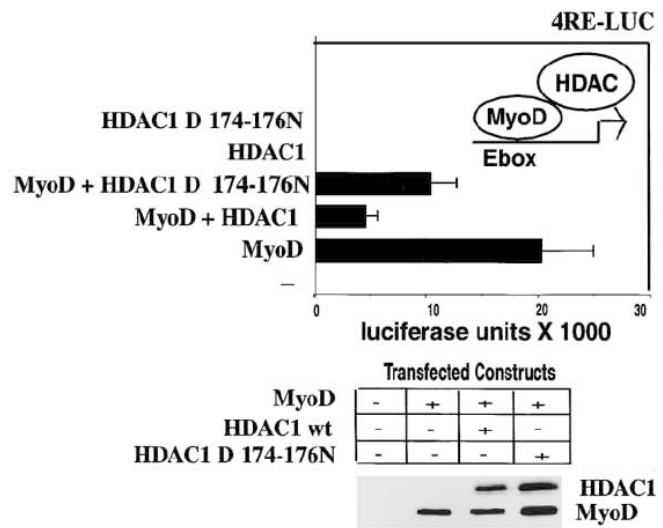
	% de cellules différenciées			
	Myogénine		MHC	
	#1	#2	#1	#2
ADN transfecté	#1	#2	#1	#2
Vecteur vide	<1	<1	<1	<1
MyoD	52	41	23	25
MyoD+HDAC1	45	44	10	11
MyoD+HDAC2	50	44	12	9
MyoD+HDAC4	15	12	7	10

Q10 : Propositions concernant le tableau 1:

- Ces résultats concordent avec les précédents quant à la similarité des rôles des HDAC1 et 2 vis-à-vis de l'expression des gènes de différenciation musculaire.
- Le vecteur « vide » ne l'est pas vraiment puisqu'il contient le gène de la GFP.
- Ces données suggèrent que les HDAC1 et 2 sont impliquées dans la répression des gènes tardifs de la différenciation musculaire.
- Ces résultats démontrent qu'in vivo MyoD active préférentiellement les gènes tardifs de la différenciation musculaire.

- E. La répression des deux gènes par l'HDAC4 suggère un rôle répressif de cette protéine dans les étapes de la différenciation musculaire.

Figure 9 : On utilise maintenant dans les cellules C3H10T1/2 une construction contenant le gène rapporteur de la luciférase ainsi que 4 sites de fixation de MyoD (Ebox de la construction 4RE-LUC). Celle-ci est transfectée seule (-) ou avec des constructions permettant la surexpression de MyoD, de HDAC1 (HDAC1 wt), ou d'un gène muté de HDAC1 dont la protéine n'a pas d'activité désacétylase (HDAC1 D 174-176 N). L'expression de ces gènes est aussi vérifiée par Immunoblot.



Q11 : Propositions concernant la figure 9 :

- Le site de reconnaissance de l'anticorps contre HDAC1 est intact dans la protéine mutante HDAC1 D174-176N.
- L'activité désacétylase de l'HDAC1 est seule responsable de la répression qu'exerce cette protéine sur l'expression.
- Ces résultats démontrent que la protéine mutante HDAC1 D174-176N n'est plus capable de se fixer à MyoD.
- Ces résultats suggèrent que la fixation de HDAC1 indépendamment de son activité désacétylase réduit la capacité de MyoD à activer ses gènes cibles.
- Les résultats n'excluent pas que la protéine mutante HDAC1 D174-176N puisse se dimériser avec des HDAC endogènes fonctionnelles.