

Année Universitaire 2016-2017

Université Claude Bernard Lyon 1

1^{ère} année commune des Etudes de Santé (PACES)

Faculté de Médecine Lyon-Est

13 décembre 2016

EPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

(UE2)

(Pr Laurent SCHAEFFER)

(Pr Jean-Louis BESSEREAU)

Durée de l'épreuve : 60 minutes

Nombre de questions : 12 questions

Les questions sont notées sur 5 points. L'ensemble correspond à un total de 60 points.

Ce fascicule comprend 10 pages numérotées.

IMPORTANT : vous devez vérifier au début de l'épreuve que votre livret est complet

En réponse à chaque question vous pouvez noircir **zéro à cinq cases** sur la grille correspondant à des propositions **justes**

La mutation du gène *REEP1* (*receptor expression enhancing protein 1*) entraîne une maladie dégénérative de l'axone des motoneurones appelée paraplégie spastique héréditaire. Chez l'homme, *REEP1* code une protéine prédite de 208 acides aminés qui appartient à une famille de 6 protéines très similaires. La fonction de REEP1 n'est pas connue.

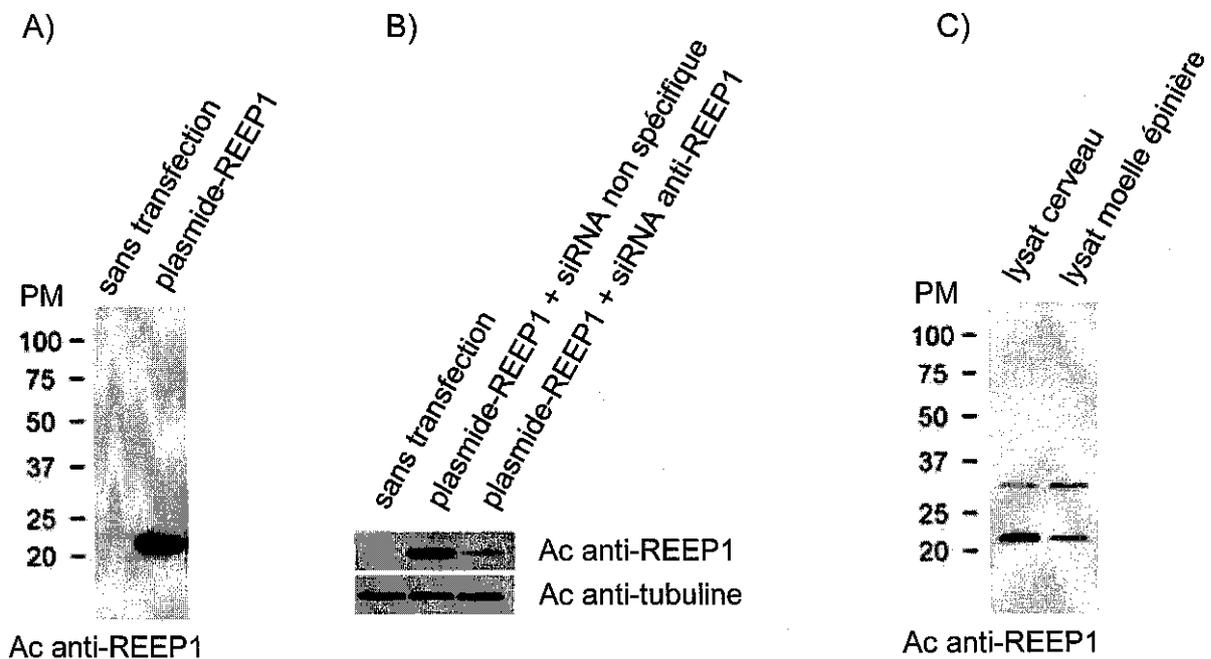
Pour étudier REEP1, les chercheurs immunisent un lapin contre un polypeptide de 20 acides aminés correspondant à un fragment de la séquence de REEP1 absente chez les autres protéines de la même famille. Le sérum du lapin est prélevé et les éventuels anticorps anti-REEP1 sont purifiés par affinité en utilisant le peptide qui a servi à l'immunisation. Les anticorps purifiés anti-REEP1 sont caractérisés dans différentes expériences de western-blot (WB) : pour cela, des extraits protéiques sont fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et de béta-mercaptoéthanol (agent réducteur), avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose.

1-A: les auteurs transfectent un plasmide d'expression de la protéine REEP1 dans des cellules humaines COS7 en culture. Après 48h, les cellules transfectées ou non sont lysées et on analyse les extraits par WB en utilisant les anticorps (Ac) anti-REEP1 purifiés.

1-B: comme contrôle de la spécificité de leurs anticorps, les auteurs transfectent le plasmide d'expression de REEP1 et traitent les cellules avec des petits ARN interférant (siRNA) soit ciblant la séquence de REEP1, soit non spécifiques. On analyse les extraits par WB en utilisant les anticorps anti-REEP1, ou des anticorps anti-tubuline.

1-C: afin de déterminer l'expression de REEP1 dans le système nerveux, on analyse par WB des extraits protéiques de cerveau et de moelle épinière de rat, en utilisant les anticorps anti-REEP1.

Figure 1 :



PM : poids moléculaires en kDaltons

Question 1 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. après transfection, l'ADN plasmidique est transcrit dans le cytoplasme.
2. le gène *REEP1* a été éliminé du génome des cellules COS7.
3. dans le cerveau et la moelle REEP1 est dimérique.
4. la bande à 30kDa détectée dans les extraits de cerveau peut correspondre à REEP1.
5. ces données montrent que REEP1 est exprimé à un niveau plus élevé dans le cerveau que dans la moelle épinière.

Question 2 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

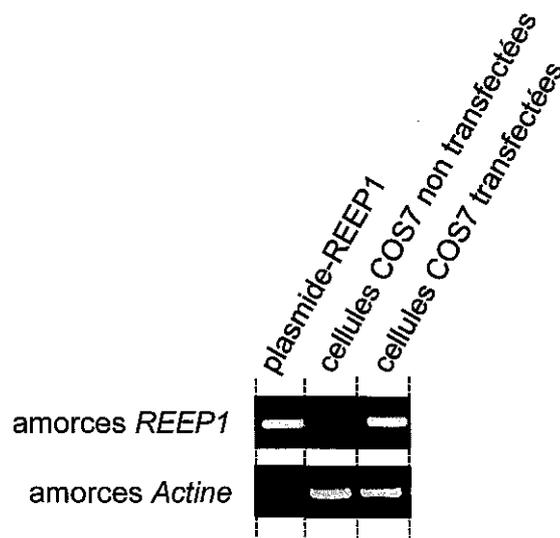
1. une migration en PAGE-SDS sépare les protéines en fonction de leur charge.
2. les anticorps monoclonaux sont produits par des clones cellulaires résultants de la fusion de lymphocytes avec des cellules cancéreuses.
3. un anticorps monoclonal peut reconnaître plusieurs épitopes.
4. un anticorps polyclonal est généralement plus sensible qu'un anticorps monoclonal.
5. le WB permet de mesurer l'abondance relative d'une protéine dans un extrait protéique réalisé à partir d'un tissu.

Question 3 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. l'expérience 1B permet de démontrer que l'efficacité de transfection du vecteur d'expression de REEP1 n'est pas modifiée par les siRNA anti-REEP1.
2. les siRNAs anti-REEP1 provoquent une baisse des niveaux d'ARNm codant REEP1.
3. la quantité de protéine REEP1 présente dans la cellule est directement proportionnelle au niveau d'ARNm *REEP1* présents dans le cytosol de la cellule.
4. l'effet des siRNA est moins durable que ce qui est obtenu en exprimant dans la cellule des petits ARN en épingle (shRNA).
5. les siRNA sont des petites molécules d'ARN simple brin.

Les auteurs déterminent par RT-PCR les niveaux d'ARNm *REEP1* produits après transfection du vecteur d'expression de *REEP1*. Les cellules sont lysées 48h après transfection, l'ARN total est extrait, retro-transcrit en ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse, puis amplifié avec des amorces spécifiques de *REEP1* ou du gène de l'actine. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Pour vérifier que l'étape d'amplification par PCR de *REEP1* est efficace, on réalise un contrôle utilisant le plasmide d'expression de *REEP1* comme matrice d'amplification.

Figure 2 :



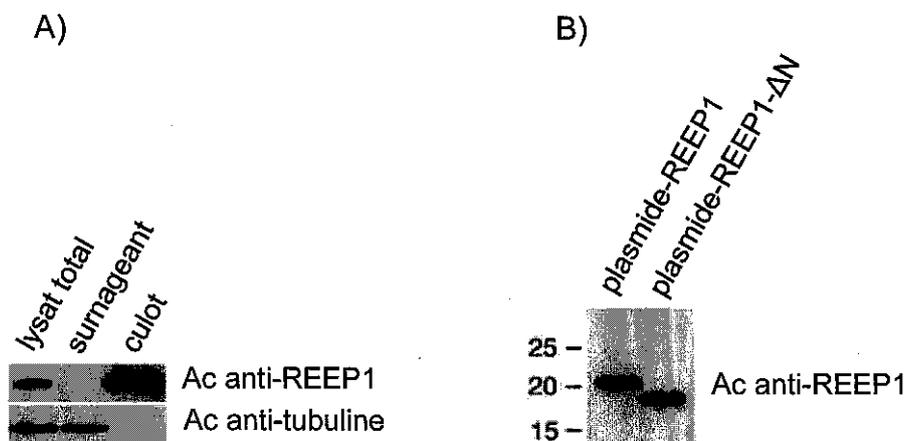
Question 4 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. les produits de PCR visualisés par le bromure d'éthidium sont des molécules d'ADN simple brin.
2. d'après ces données, l'ARNm *REEP1* est aussi abondant que l'ARNm de l'actine dans les cellules transfectées par le plasmide d'expression de *REEP1*.
3. cette expérience montre que le gène *REEP1* ne code qu'une seule isoforme de la protéine *REEP1*.
4. le produit de PCR *REEP1* amplifié à partir des extraits de cellules transfectées ne peut pas être dû à une contamination des ARN par de l'ADN génomique au moment de l'étape de purification de l'ARN total.
5. le produit de PCR *REEP1* amplifié à partir des extraits de cellules transfectées pourrait être dû à une contamination des ARN par de l'ADN au moment de l'étape de purification de l'ARN total.

Les chercheurs analysent la localisation intracellulaire de la protéine REEP1. Deux jours après transfection du plasmide d'expression REEP1, les cellules sont broyées, et une centrifugation à 10.000g permet de séparer la fraction cytosolique (surnageant) du noyau et des organelles (culot). Les fractions sont analysées en WB avec des Ac anti-tubuline ou anti-REEP1 (3.A).

Par ailleurs, les chercheurs identifient dans la partie N-terminale de REEP1 une séquence de 20 acides aminés qui a les caractéristiques d'un peptide signal. Pour tester s'il s'agit bien d'un peptide signal, ils modifient le plasmide d'expression de REEP1 en ôtant les 20 premiers acides aminés et en remplaçant la phénylalanine en position 21 par une méthionine (REEP1-ΔN). Les cellules transfectées par les plasmides REEP1 ou REEP1-ΔN sont analysées en WB avec les Ac anti-REEP1 (3.B).

Figure 3 :

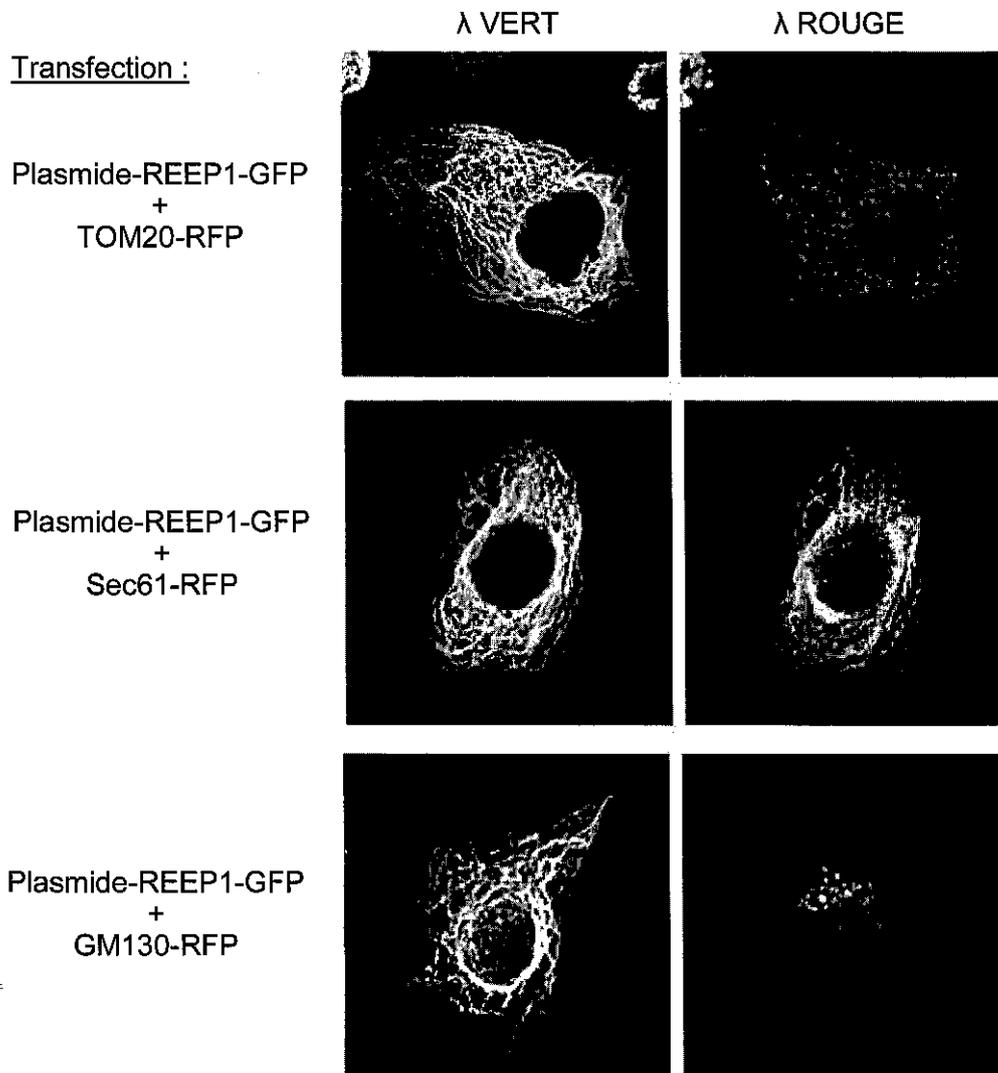


Question 5 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. les résultats obtenus avec les Ac anti-tubuline suggèrent que la quantité de protéines chargée dans le gel A n'a pas été équivalente entre les différents puits.
2. REEP1 est présente dans le culot car c'est une protéine insoluble en milieu aqueux.
3. les résultats de l'expérience 3B suggèrent que REEP1 ne contient pas de peptide signal.
4. les peptides signaux d'adressage des protéines vers le réticulum sont constitués d'acides aminés chargés hydrophiles.
5. la région N-terminale de REEP1 pourrait permettre son association à la membrane d'une organelle.

Pour caractériser plus en détail la localisation de REEP1, les auteurs co-transfectent dans des cellules COS7 des plasmides permettant l'expression de REEP1 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP), et des plasmides exprimant des protéines spécifiques de la mitochondrie (TOM20), du Golgi (GM130), du RE (Sec61) couplées à la Red Fluorescent Protein (RFP). Les cellules sont observées avec un microscope confocal. Les chercheurs constatent un large recouvrement des signaux rouge et vert dans le cas de la co-transfection REEP1-GFP + Sec61-RFP.

Figure 4 :

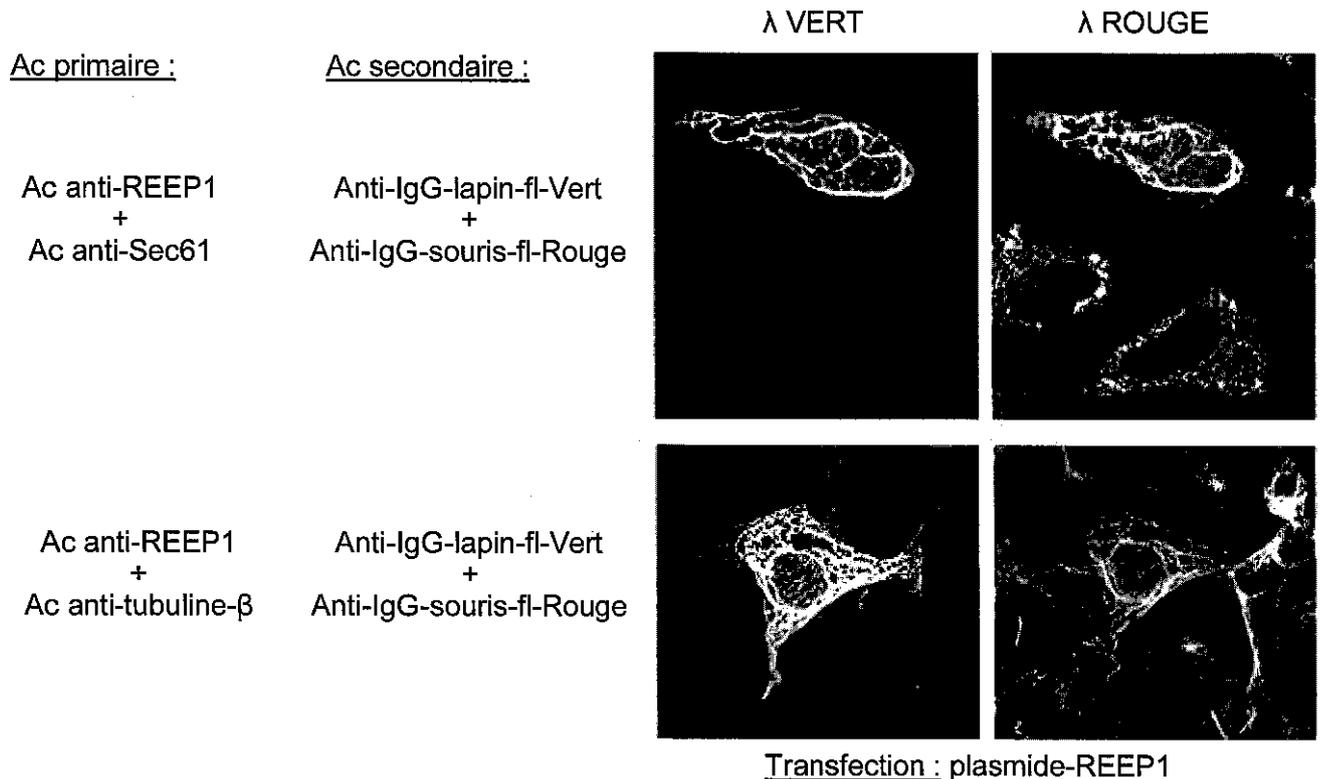


Question 6 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. si l'on ne tient pas compte du bruit de fond, on ne peut voir que les cellules transfectées dans le canal rouge.
2. ces données montrent que REEP1 est présente dans la lumière du RE.
3. si la fonction de REEP1 avait été modifiée par la fusion avec la GFP, elle ne se localiserait plus dans un compartiment spécifique de la cellule.
4. les protéines qui ne se replient pas correctement s'accumulent dans le RE quelle que soit leur destination finale dans la cellule.
5. les cellules peuvent être fixées avant d'observer des protéines fusionnées à des protéines fluorescentes.

Dans une seconde expérience, les cellules COS7 sont transfectées avec le plasmide d'expression de REEP1. Après 48 h, elles sont fixées, perméabilisées et incubées avec les anticorps anti-REEP1 et des anticorps monoclonaux anti-Sec61 ou anti-tubuline générés chez la souris. Après lavage, les lames sont incubées avec des anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à un fluorochrome émettant dans le vert et des Ac secondaires anti-IgG de souris couplés à un fluorochrome émettant dans le rouge. Après lavage les lames sont observées au microscope confocal.

Figure 5 :

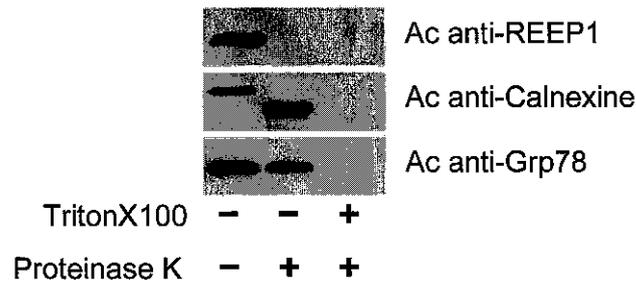


Question 7 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. en rouge, le signal observé dans les cellules non transfectées correspond à du bruit de fond.
2. en vert, on peut affirmer que le signal ne peut pas venir d'une réaction croisée des anticorps primaires ou secondaires avec d'autres protéines.
3. la sur-expression de REEP1 semble modifier la forme du RE.
4. ces résultats indiquent que REEP1 interagit avec la tubuline- β .
5. l'observation au microscope confocal permet d'atteindre une résolution maximale de l'ordre de 20 nanomètres.

Pour étudier la topologie de REEP1, les chercheurs réalisent une expérience de digestion par la protéinase K : les cellules transfectées avec le plasmide d'expression de REEP1 sont broyées, les organelles sont isolées par centrifugation différentielle comme dans l'expérience 3A, puis incubées avec de la protéinase K qui digère les protéines de façon non spécifique, en présence ou en absence de TritonX100, un détergent qui perméabilise les membranes. Après digestion, la fraction des organelles est analysée en WB avec des Ac anti-REEP1, anti-Calnexine, ou anti-GRP78, deux protéines chaperones du réticulum endoplasmique (RE).

Figure 6 :



Question 8 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

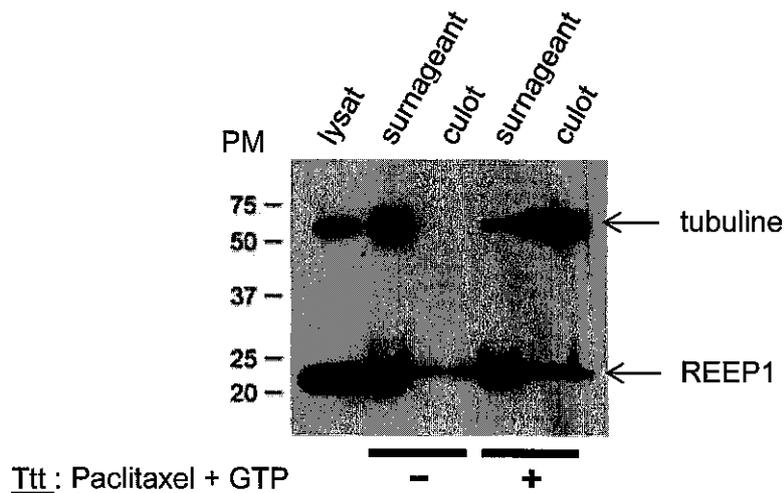
1. ces données montrent que la protéine REEP1 est entièrement dans le cytosol.
2. la séquence reconnue par les Ac anti-REEP1 fait partie d'un domaine extra-membranaire de la protéine REEP1.
3. ces données montrent que la Calnexine possède au moins un domaine non-membranaire présent à la face cytosolique du RE.
4. les Ac anti-Calnexine utilisés dans cette expérience reconnaissent la région de la protéine présente dans la lumière du RE.
5. ces données montrent que le TritonX100 stimule l'activité de la protéinase K.

Question 9 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. la O-glycosylation n'est pas impliquée dans le contrôle de la qualité du repliement des protéines.
2. les protéines membranaires de l'enveloppe nucléaire sont synthétisées au niveau du RE.
3. la lumière du RE est en continuité avec l'intérieur du noyau.
4. l'expression des chaperones est inhibée par la réponse UPR (Unfolded Protein Response ou réponse aux protéines mal repliées).
5. les protéines mal repliées sont dégradées par le protéasome dans la lumière du RE.

Les chercheurs veulent tester si REEP1 interagit avec les microtubules polymérisés en réalisant une expérience de co-sédimentation. Les cellules transfectées avec le plasmide d'expression de REEP1 sont lysées en présence de TritonX100 et centrifugées à 500 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est incubé avec du Paclitaxel et du GTP à 37°C. Le Paclitaxel est une drogue anti-cancéreuse qui empêche la dépolymérisation des microtubules. Après 30 minutes, le lysat est déposé au-dessus d'une solution de sucrose, et centrifugé à 100.000 g, ce qui permet de sédimenter les microtubules polymérisés dans le culot. Les différentes fractions sont analysées par WB révélé avec un mélange d'anticorps anti-tubuline et anti-REEP1.

Figure 7 :



Question 10 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

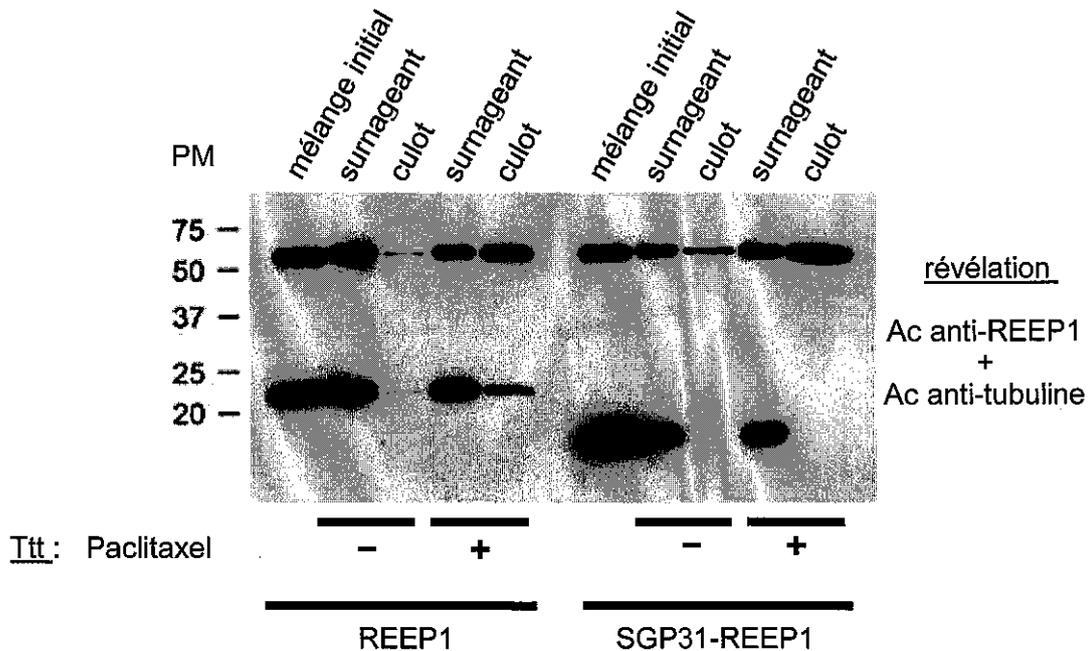
1. en présence de paclitaxel et de GTP, l'expression de la tubuline est augmentée.
2. en présence du paclitaxel et de GTP, la densité de REEP1 augmente.
3. en l'absence du paclitaxel et de GTP, les microtubules se dépolymérisent.
4. la bande à 55kD ne contient que la tubuline non incorporée dans les microtubules.
5. ces résultats sont compatibles avec une interaction entre REEP1 et les microtubules.

Question 11 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. les microtubules participent à la répartition du réticulum endoplasmique dans la cellule.
2. l'instabilité des microtubules participe à la séparation des chromatides sœurs au cours de la mitose.
3. les microtubules sont constitués d'hétérodimères de tubuline alpha et bêta.
4. chaque centre organisateur de microtubules contient une paire de centrioles.
5. les filaments intermédiaires et les microtubules sont polarisés.

Une mutation de *REEP1* identifiée chez un patient crée un codon stop au résidu 112 (mutation « SGP31 »). On exprime en bactéries les formes normale ou mutée de REEP1. Les protéines REEP1 sont purifiées et incubées avec de la tubuline purifiée et du GTP, en présence ou en absence de Paclitaxel. Le mélange est fractionné par centrifugation et analysé comme précédemment.

Figure 8 :



Question 12 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

1. ces résultats montrent que la forme mutante SGP31 de REEP1 inhibe la polymérisation des microtubules:
2. le domaine C-terminal de REEP1 est nécessaire à l'interaction avec les microtubules polymérisés.
3. Ces résultats démontrent une interaction directe entre REEP1 et les microtubules.
4. Ces résultats démontrent une interaction directe entre REEP1 et les dimères de tubuline non polymérisés.
5. On peut prédire que la dégénérescence des neurones liée à la mutation SGP31 est liée à des anomalies du transport axonal dépendant des microtubules.