

Année Universitaire 2014-2015

Université Claude Bernard Lyon 1

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

Faculté de Médecine Lyon-Est

16 décembre 2014

EPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

(UE2)

(Pr Laurent SCHAEFFER)

(Pr Jean Louis BESSEREAU)

Durée de l'épreuve : 60 minutes

Nombre de questions : 11 questions

Les questions sont notées sur 5 points. L'ensemble correspond à un total de 55 points.

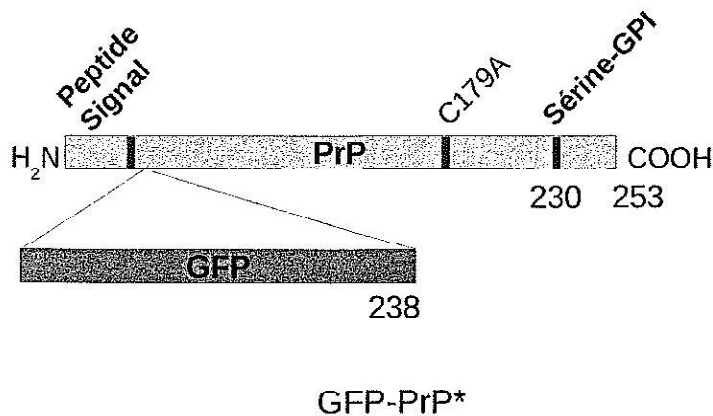
Ce fascicule comprend 12 pages numérotées.

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**

L'accumulation intracellulaire de la protéine Prion (PrP) sous forme agrégée est associée à l'apparition de diverses maladies neuro-dégénératives, transmissibles ou congénitales. Dans le cas des formes congénitales de la maladie, des mutations sont responsables de défauts de repliement ou d'adressage de la protéine. Une étude se propose de caractériser le trafic cellulaire d'une forme mutée de PrP et d'étudier ses conséquences sur le fonctionnement de la cellule.

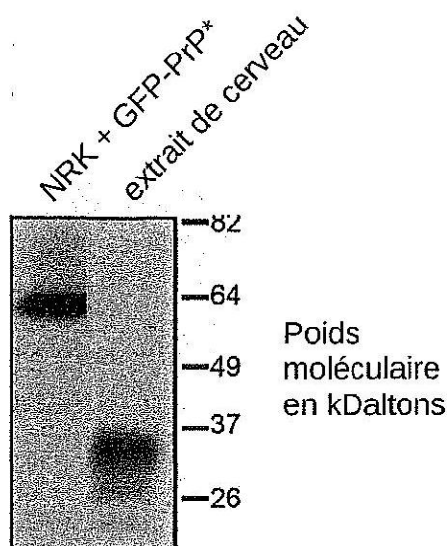
Afin de visualiser le devenir de la protéine, les auteurs créent un vecteur d'expression de la PrP, par insertion de la séquence codante de la protéine dans un plasmide, en aval d'un promoteur pCMV. La PrP contient dans sa partie N-terminale un peptide signal d'adressage vers le réticulum endoplasmique (acides aminés 1 à 22). Une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) est ajoutée sur une sérine en position 230. La séquence codant la GFP, une protéine fluorescente de 238 acides aminés émettant dans le spectre vert, est fusionnée en phase avec la séquence de la PrP à la position 27. Le schéma ci-dessous représente la structure de cette protéine de fusion. À partir de ce vecteur, les auteurs génèrent un variant, noté GFP-PrP*, dans lequel la Cystéine 179 est remplacée par une Alanine (mutation C179A). Les cystéines 179 et 214 forment normalement un pont disulfure dans la protéine PrP et la mutation C179A provoque un mauvais repliement de PrP*.



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

- A- la protéine mature GFP-PrP contient 468 acides aminés.
- B- l'ancre GPI permet d'attacher la protéine à la face interne de la membrane plasmique.
- C- la présence d'un codon STOP à la fin de la séquence codant la GFP provoquerait la sécrétion de la GFP dans le milieu extracellulaire.
- D- la fusion de la GFP, non plus à la position 27 mais à l'extrémité C-terminale de la PrP, ne permettrait pas de visualiser la protéine de fusion après sa sortie du réticulum endoplasmique.
- E- la formation de ponts disulfures dans la lumière du réticulum endoplasmique requiert l'activité des protéines disulfides isomérases (PDI) car l'environnement est réducteur.

Les auteurs veulent comparer le niveau d'expression de la protéine mutée à celui de la protéine sauvage normalement exprimée dans le cerveau. Le plasmide GFP-PrP* est transfecté dans des cellules NRK en culture ("Normal Rat Kidney", issues de rein de rat). On prépare un lysat total des cellules en culture transfectées avec GFP-PrP* et un extrait de cerveau de rat que l'on analyse en western blot (WB) en utilisant un anticorps polyclonal anti-PrP.

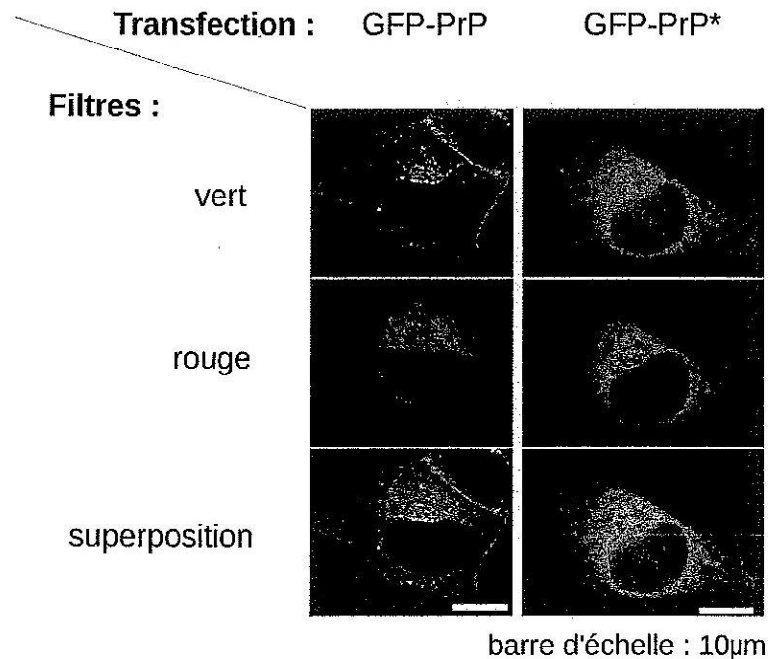


Question 2 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- si le WB était révélé par un anticorps anti-GFP, on obtiendrait un résultat similaire.
- B- la protéine produite à partir du plasmide transfecté migre à une distance différente de la PrP sauvage présente dans le cerveau à cause de la mutation C179.
- C- la protéine PrP endogène a été transférée sur la membrane du WB dans son état natif bien replié au contraire de la protéine GFP-PrP* qui est mal repliée.
- D- le WB permet d'évaluer le niveau de transcription du gène ou du transgène.
- E- un vecteur avec le promoteur naturel du gène de la PrP ne peut pas être utilisé pour exprimer GFP-PrP dans les cellules NRK.

Les auteurs s'intéressent à la localisation des protéines PrP normale et PrP* mal repliée. Ils construisent deux lignées cellulaires exprimant de façon constitutive soit GFP-PrP, soit GFP-PrP*. Ces cellules sont transfectées avec un vecteur permettant l'expression d'une protéine fluorescente émettant une lumière rouge et dont l'extrémité C-terminale se termine par les 4 acides aminés Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL).

Des photos des cellules sont prises en utilisant un microscope confocal. Les images montrent des signaux rouges et verts distincts dans le cas de la GFP-PrP, et des signaux rouges et verts superposés (jaunes) dans le cas de la GFP-PrP*.

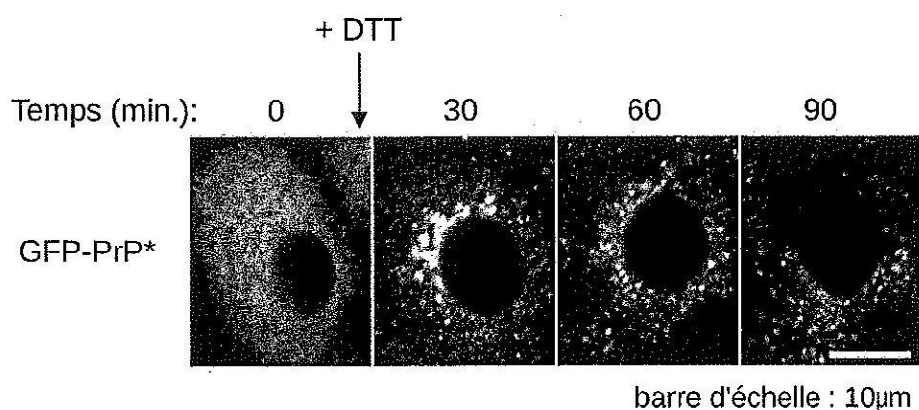


Question 3 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- le signal vert émit par les protéines de fusion pourrait ne pas refléter la localisation physiologique de la protéine.
- B- cette expérience permet d'affirmer que la GFP-PrP est présente dans l'appareil de Golgi.
- C- cette expérience permet d'affirmer que la GFP-PrP* est présente dans le réticulum endoplasmique.
- D- la modification de la localisation par la mutation pourrait être causée par l'insertion de la protéine fluorescente.
- E- une co-localisation de signaux en microscopie confocale suggère fortement une interaction physique des protéines visualisées.

Les auteurs appliquent aux cellules un traitement par le dithiothréitol (DTT), un agent réducteur puissant qui inhibe la formation des ponts disulfures. Ce traitement provoque ce que l'on appelle un stress du réticulum endoplasmique (RE), par accroissement de la quantité de protéines mal repliées dans le RE. Dans la suite des expériences, l'ensemble des observations faites après traitement par le DTT ont été confirmées par l'induction d'un stress du RE avec d'autres agents pharmacologiques (non présenté).

L'imagerie confocale de cellules exprimant GFP-PrP* à différents temps après le début du traitement par le DTT montre une relocalisation rapide de la fluorescence au voisinage du noyau dans des structures évocatrices de vésicules de tailles variées (en 10 à 30 min), puis sa disparition progressive :

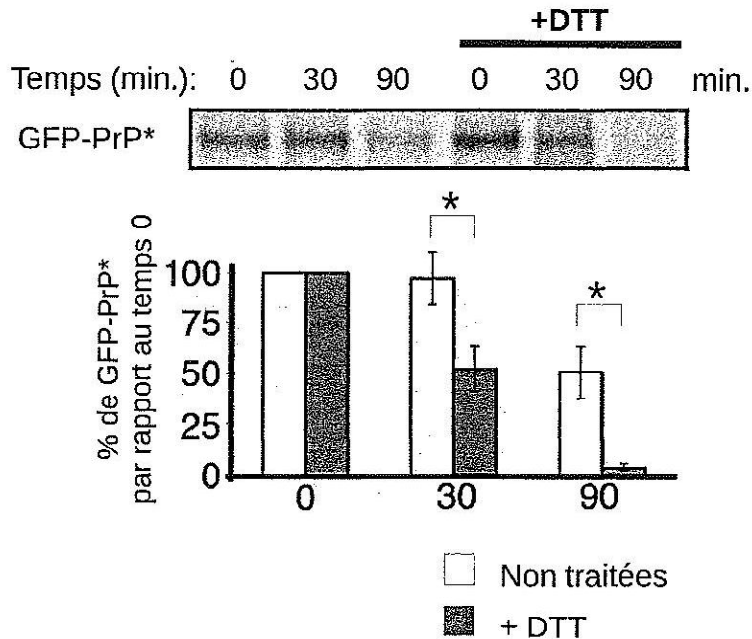


Question 4 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- au lieu d'utiliser une protéine de fusion, on pourrait étudier la localisation de GFP-PrP* dans une même cellule au cours du temps par immunofluorescence avec un anticorps anti-PrP.
- B- en perturbant le repliement de PrP, le DTT pourrait empêcher la formation d'un signal d'export nucléaire permettant d'éloigner la PrP de la périphérie du noyau.
- C- les protéines mal repliées sont dégradées dans la lumière du RE.
- D- le changement de localisation de GFP-PrP* observé après traitement des cellules par le DTT n'implique probablement pas des vésicules recouvertes d'un manteau COPII.
- E- la disparition du signal fluorescent est la conséquence de la diminution de la synthèse de la GFP-PrP*.

Les auteurs veulent déterminer la cinétique de dégradation de GFP-PrP* :

ils effectuent un marquage des cellules exprimant GFP-PrP* en les incubant pendant 12h avec de la méthionine marquée au ^{35}S . Le marquage est suivi d'une chasse, par incubation avec un excès d'acides aminés non marqués. Les cellules GFP-PrP* sont lysées à différents temps après le début de la chasse. On effectue une immunoprécipitation (IP) avec un anticorps anti-GFP sur ces lysats. Après dépôt de l'IP sur gel d'acrylamide en présence de SDS et migration, le gel est révélé par autoradiographie. La quantification est la moyenne de 4 expériences, une étoile indique une différence statistiquement significative.



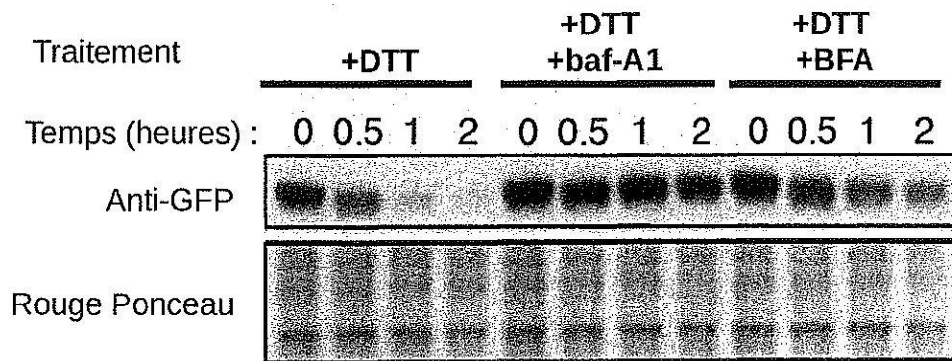
Question 5 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- la marquage des cellules par la méthionine- ^{35}S permet de détecter spécifiquement GFP-PrP* par autoradiographie dans un lysat de ces cellules.
- B- l'étape d'immunoprécipitation par les anticorps anti-GFP est nécessaire pour la détection spécifique de GFP-PrP*.
- C- l'expérience montre que le traitement par le DTT accélère la dégradation de GFP-PrP*.
- D- l'expérience montre que la GFP-PrP* est moins produite après induction d'un stress du RE par le DTT.
- E- on aurait pu analyser la dégradation de la GFP-PrP* en bloquant pharmacologiquement la synthèse des protéines dans les cellules et en évaluant par WB la quantité de GFP-PrP* présente dans un lysat total de cellules à différents temps après le blocage.

Normalement, les protéines mal repliées sont dégradées par le système de dégradation associé au réticulum (ERAD). Les auteurs de l'étude sont surpris de constater que PrP* n'obéit pas à cette règle et ils essaient de comprendre le mode original de dégradation de la PrP* mal repliée.

60 minutes après le début du traitement par le DTT de cellules exprimant GFP-PrP*, les auteurs observent une co-localisation de GFP-PrP* avec le marqueur lysosomal LAMP1. GFP-PrP* n'est plus détectable à des temps plus tardifs.

Les cellules GFP-PrP* traitées par le DTT sont mises en présence de bréfeldine A (BFA), qui inhibe la formation des vésicules à manteau COPII, ou de bafilomycine A1 (baf-A1), qui inhibe les pompes à protons des vésicules. Le lysat total des cellules est ensuite analysé par WB avec un anticorps anti-GFP. La membrane est aussi colorée par le rouge Ponceau qui révèle de façon non spécifique toutes les protéines.

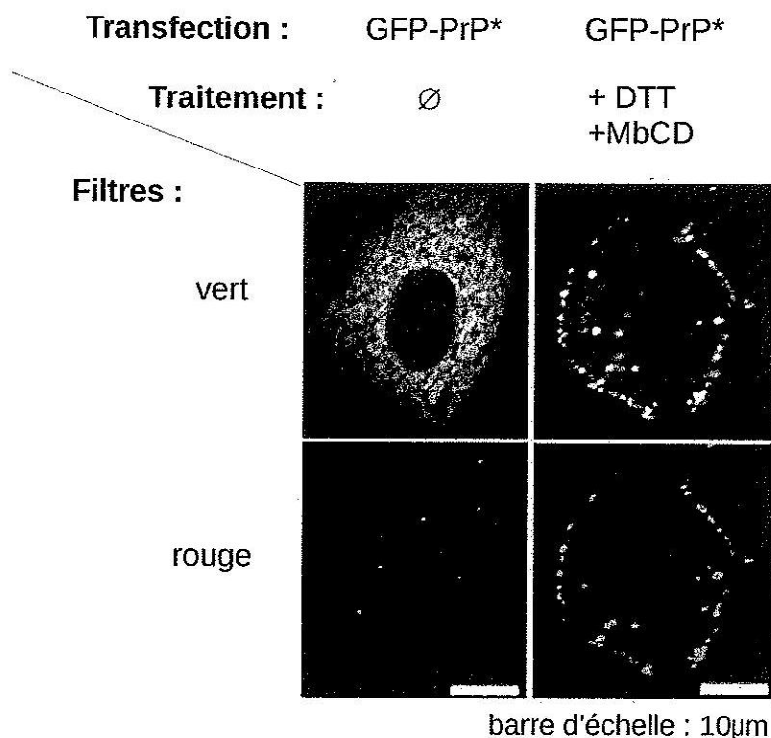


Question 6 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- la Bréfeldine A inhibe le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi.
- B- la bafilomycine A1 devrait provoquer des changements de pH plus importants au niveau des lysosomes que du RE.
- C- cette expérience montre que la dégradation de GFP-PrP* nécessite une étape d'export depuis le RE.
- D- cette expérience montre que la GFP-PrP* s'accumule dans le RE.
- E- cette expérience suggère qu'en présence de DTT la dégradation de GFP-PrP* ne dépend pas de l'activité lysosomale.

Pour analyser la voie suivie par GFP-PrP* dans la cellule après induction d'un stress du RE par le DTT, on utilise la méthyl- β -cyclo-dextrine (MbCD) qui inhibe l'endocytose. Le suivi de la distribution de GFP-PrP* par vidéo-microscopie après induction d'un stress du RE montre que la GFP-PrP* s'accumule à la périphérie de la cellule en présence de MbCD.

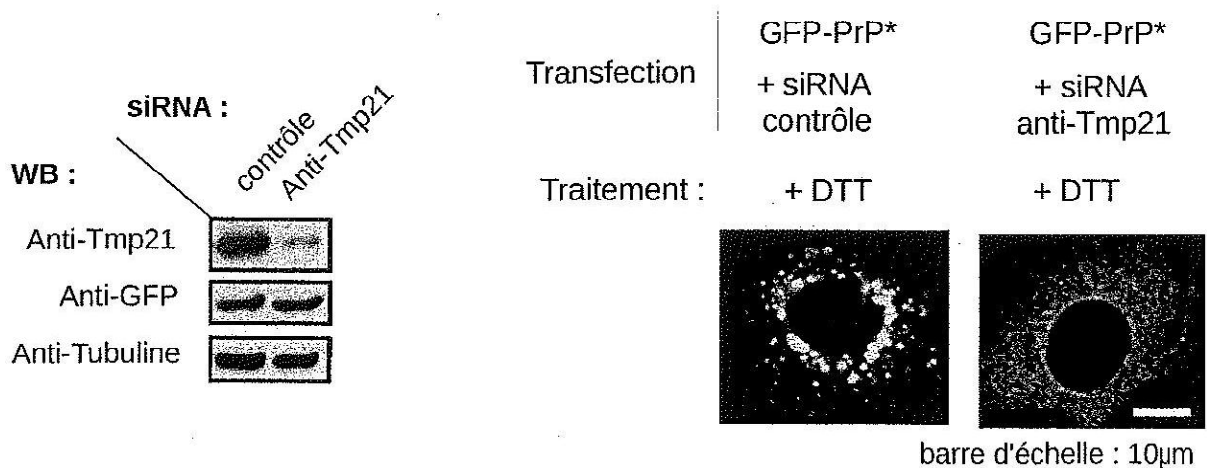
Pour déterminer la localisation de GFP-PrP*, les cellules sont fixées sans perméabilisation de la membrane plasmique 90 minutes après le début du traitement par DTT+MbCD, puis marquées avec un anticorps primaire anti-GFP et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant dans le rouge.



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

- A- les cellules non traitées ne sont pas marquées par les anticorps anti-GFP parce que les anticorps ne peuvent pas accéder aux protéines GFP-PrP*.
- B- la méthyl- β -cyclo-dextrine a perméabilisé la membrane plasmique des cellules.
- C- l'endocytose des protéines à ancre GPI utilise préférentiellement les cavéoles.
- D- cette expérience montre que GFP-PrP* peut atteindre la membrane plasmique.
- E- cette expérience suggère que le stress du RE provoque l'exocytose de GFP-PrP*.

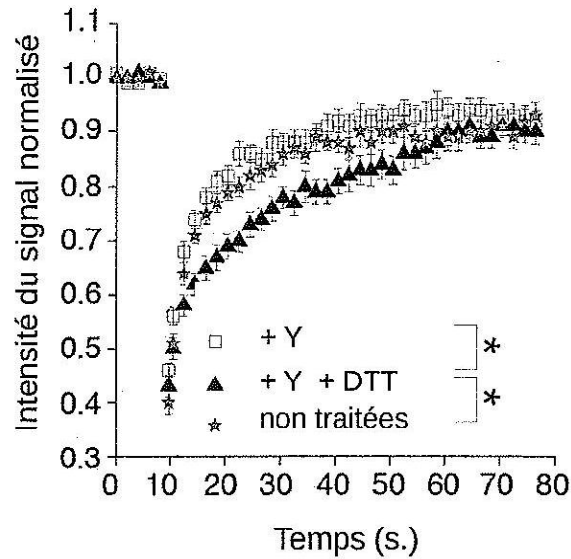
La protéine Tmp21 est impliquée dans le transport des protéines à ancrés GPI. Pour tester son rôle dans le contrôle du trafic intracellulaire de PrP* après induction d'un stress du RE, les auteurs transfectent les cellules exprimant GFP-PrP* soit avec un siRNA spécifique des transcrits Tmp21, soit avec un siRNA « contrôle » ne reconnaissant aucun ARNm de rat. Un western-blot d'un lysat total est réalisé 24 heures après transfection des siRNAs. A ce même temps, d'autres cellules transfectées sont traitées pendant 30 minutes avec du DTT et la distribution de GFP-PrP* est analysée par microscopie confocale.



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

- A- l'efficacité du siRNA utilisé aurait pu être évaluée en utilisant la technique de RT-PCR quantitative.
- B- la protéine Tmp21 qui persiste après inhibition par siRNA n'a plus aucune activité dans la cellule.
- C- la déplétion de Tmp21 diminue la quantité globale de GFP-PrP*.
- D- compte tenu du résultat des expériences précédentes, on peut déduire de cette expérience que l'absence de Tmp21 est nécessaire à la sortie de GFP-PrP* hors du RE.
- E- compte tenu du résultat de cette expérience et des expériences précédentes, on prédit que GFP-PrP* ne sera pas trouvée dans les lysosomes après traitement au DTT des cellules transfectées par le siRNA ciblant Tmp21.

Les auteurs se demandent si le nouveau processus de dégradation de PrP* qu'ils ont mis en évidence permet d'éviter l'accumulation de protéines PrP* mal repliées agrégées et insolubles, qui serait délétère pour la cellule. On réalise des expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) de la GFP-PrP*, après inhibition de l'export du RE par une drogue Y et/ou addition de DTT pendant 30 min. Une étoile indique une différence statistiquement significative des temps de demi-recouvrement.

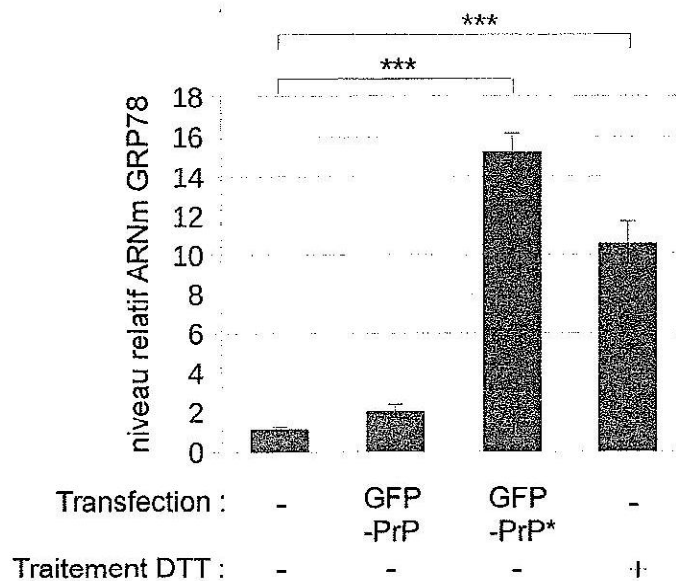


Question 9 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A- le FRAP renseigne sur le temps mis par les molécules photoblanchies pour récupérer leur fluorescence.
- B- le FRAP ne permet pas d'étudier la cinétique de dégradation d'une protéine.
- C- dans cette expérience, le photoblanchiment a été fait au temps 0 s.
- D- cette expérience montre que le défaut de repliement de GFP-PrP diminue sa diffusibilité.
- E- cette expérience montre que le stress du RE diminue la diffusibilité de GFP-PrP*.

Le stress du réticulum endoplasmique s'accompagne souvent d'une réponse cellulaire appelée UPR ("Unfolded Protein Response"). L'UPR implique notamment l'activation de la transcription de gènes codants pour des protéines chaperons telles que GRP78.

Pour déterminer si PrP* induit une réponse UPR, on transfecte des cellules NRK par les vecteurs d'expression pCMV-GFP-PrP ou pCMV-GFP-PrP* et on analyse l'expression de GRP78 par RT-PCR quantitative. Des cellules NRK sont traitées en parallèle pendant 8 heures par du DTT. Les niveaux d'ARNm GRP 78 ont été normalisés à celui de cellules non transfectées et non traitées au DTT. Cette expérience a été reproduite 10 fois et les résultats montrent la moyenne et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne. *** indique une réponse significativement différente du contrôle.



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

- A- l'amplification d'un ARNm par RT-PCR nécessite de connaître la séquence du gène codant le transcrit.
- B- pour quantifier des ARN messagers par PCR, il faut effectuer une première réaction nécessitant une transcriptase inverse.
- C- les ADN polymérases peuvent utiliser des amorces ARN pour la synthèse de l'ADN.
- D- l'utilisation d'une ADN polymérase dépourvue d'activité de correction des erreurs pourrait introduire des mutations dans les produits d'amplification.
- E- l'activité de correction des erreurs de l'ARN polymérase II permet d'éviter de produire des protéines mutées toxiques pour les cellules .

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

- A-** GFP-PrP* est plus transcrit que GFP-PrP.
- B-** cette expérience montre que l'expression de GFP-PrP non mutée induit une réponse UPR.
- C-** en augmentant la quantité de protéines chaperons, l'activation de l'UPR pourrait expliquer la rétention de la PrP* dans le RE en l'absence de DTT.
- D-** dans cette expérience, le traitement par le DTT constitue un contrôle positif de stress du réticulum.
- E-** l'ensemble des expériences réalisées dans cette étude suggère que l'UPR est la réponse principale de la cellule pour éliminer PrP quand elle est mal repliée.