

Année Universitaire 2013-2014

Université Claude Bernard Lyon 1

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

Faculté de Médecine Lyon-Est

19 décembre 2013

**EPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE
(UE2)**

(Pr Laurent SCHAEFFER)

(Pr Jean Louis BESSEREAU)

Durée de l'épreuve : 60 minutes

Nombre de questions : 10 questions

Les questions sont notées sur 5 points. L'ensemble correspond à un total de 50 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**

On se propose de caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans la régénération des axones après section d'un nerf. On utilise comme système expérimental des cultures primaires de neurones des ganglions des racines dorsales (DRG) dans lesquelles il est possible de réaliser des axotomies (coupure d'axones) à l'aide d'un laser.

Le calcium est un signal classiquement impliqué dans la régénération neuronale. Les neurones sont cultivés en présence d'un indicateur calcique dont la fluorescence augmente quand il est lié au calcium et qui a la propriété de se concentrer spontanément dans le cytoplasme des cellules. L'axotomie provoque une augmentation de la concentration du calcium au niveau de la lésion qui se propage de façon rétrograde jusqu'au corps cellulaire du neurone (Figure 1A). Pour analyser ce phénomène on reproduit l'expérience en présence de chlorure de cadmium (CdCl_2) qui inhibe les canaux calciques dépendants du voltage, de tétrotoxine (TTX) qui inhibe les canaux sodiques dépendants du voltage, et après traitement prolongé des cultures par la thapsigargine qui inhibe la pompe à calcium présente sur la membrane du réticulum endoplasmique. La variation maximale de fluorescence enregistrée au niveau du corps cellulaire est quantifiée (Figure 1B).

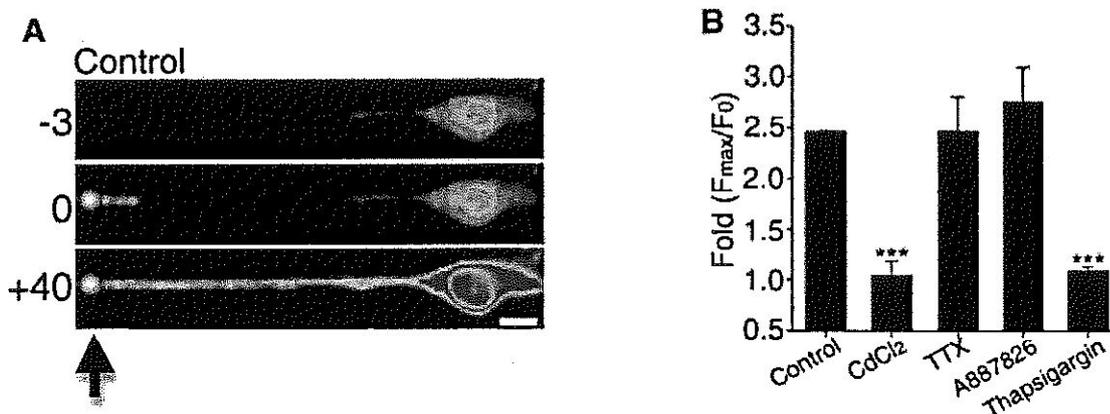


Figure 1 : **A** Visualisation de la fluorescence de l'indicateur calcique dans un neurone de DRG en culture 3 secondes avant axotomie (-3), immédiatement après l'impact du laser (point à la verticale de la flèche)(0) et 40 secondes après impact (+40); le corps cellulaire est à droite de l'image. Barre d'échelle 10 μm . **B** Variations maximales d'intensité de fluorescence au niveau du corps cellulaire. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle.

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

- A- la concentration du calcium total intracellulaire est au moins 1 000 fois inférieure à la concentration du calcium libre dans le milieu extracellulaire
- B- l'ouverture de canaux perméables aux cations dans la membrane plasmique provoque l'entrée d'ions sodium et potassium dans la cellule.
- C- Les principaux sites intracellulaires de stockage du calcium sont le réticulum endoplasmique et les mitochondries.
- D- L'analyse de la figure 1 montre que les canaux calciques dépendants du voltage sont impliqués dans les variations de concentration du calcium intracellulaire consécutives à l'axotomie.
- E- La thapsigargine devrait entraîner une diminution de la concentration de calcium dans le réticulum endoplasmique

Les protéines kinases C représentent une famille de protéines kinases couramment impliquées dans la transduction des signaux calciques. On dispose d'un anticorps de lapin dirigé contre la protéine kinase C_{μ} (PKC_{μ}), ainsi que d'un anticorps de souris spécifique de la forme phosphorylée de la protéine kinase C_{μ} ($p\text{-}PKC_{\mu}$). Les neurones des ganglions des racines dorsales issus de cultures primaires réalisées en présence ou en absence de $CdCl_2$ sont analysés par la technique de western blot une heure après axotomie (Figure 2).

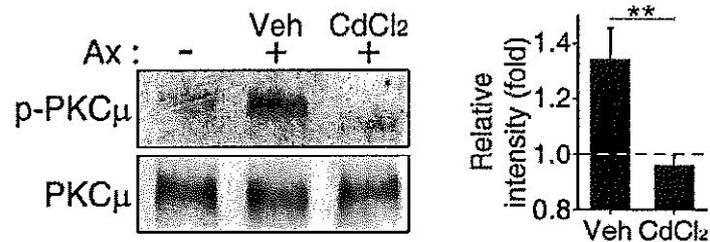


Figure 2 : **Panneau de gauche** Analyse par western blot des niveaux de $p\text{-}PKC_{\mu}$ et PKC_{μ} . Ax: axotomie Veh: véhicule (correspond à la solution contrôle). **Panneau de droite** Quantification des rapports $p\text{-}PKC_{\mu}/PKC_{\mu}$. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. ** $p < 0,01$.

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

- A- Pour réaliser un western blot il faut transférer les protéines sur une membrane
- B- Pour détecter les anticorps anti- $p\text{-}PKC_{\mu}$ on peut utiliser un anticorps de lapin
- C- L'analyse de la figure 2 montre que l'axotomie induit la phosphorylation de la PKC_{μ}
- D- L'analyse de la figure 2 montre que la phosphorylation de la PKC_{μ} dépend des canaux calciques dépendants du voltage.
- E- Les figures 1 et 2 montrent que l'augmentation du calcium intracellulaire est due à une entrée de calcium extra cellulaire par les canaux calciques dépendant du voltage.

Un nombre important de neurones sensitifs de la jambe ont leurs axones dans le nerf sciatique et leurs corps cellulaires dans les ganglions des racines dorsales au voisinage de la moelle épinière. Afin d'analyser *in vivo* les effets de l'axotomie sur la PKC μ , une section du nerf sciatique est réalisée et les DRG qui reçoivent les axones du nerf sciatique sont analysés 24 heures plus tard. Une partie des axotomies sont réalisées en appliquant localement au niveau de la lésion du nerf sciatique de l'EGTA, un agent chélateur du calcium qui empêche son passage à travers les canaux calciques. Les analyses sont faites sur des coupes histologiques de DRG par la technique d'immunofluorescence. Un double marquage est réalisé en utilisant l'anticorps dirigé contre p-PKC μ et un anticorps anti-TUJ1 pour visualiser les neurones dans les DRG (Figure 3).

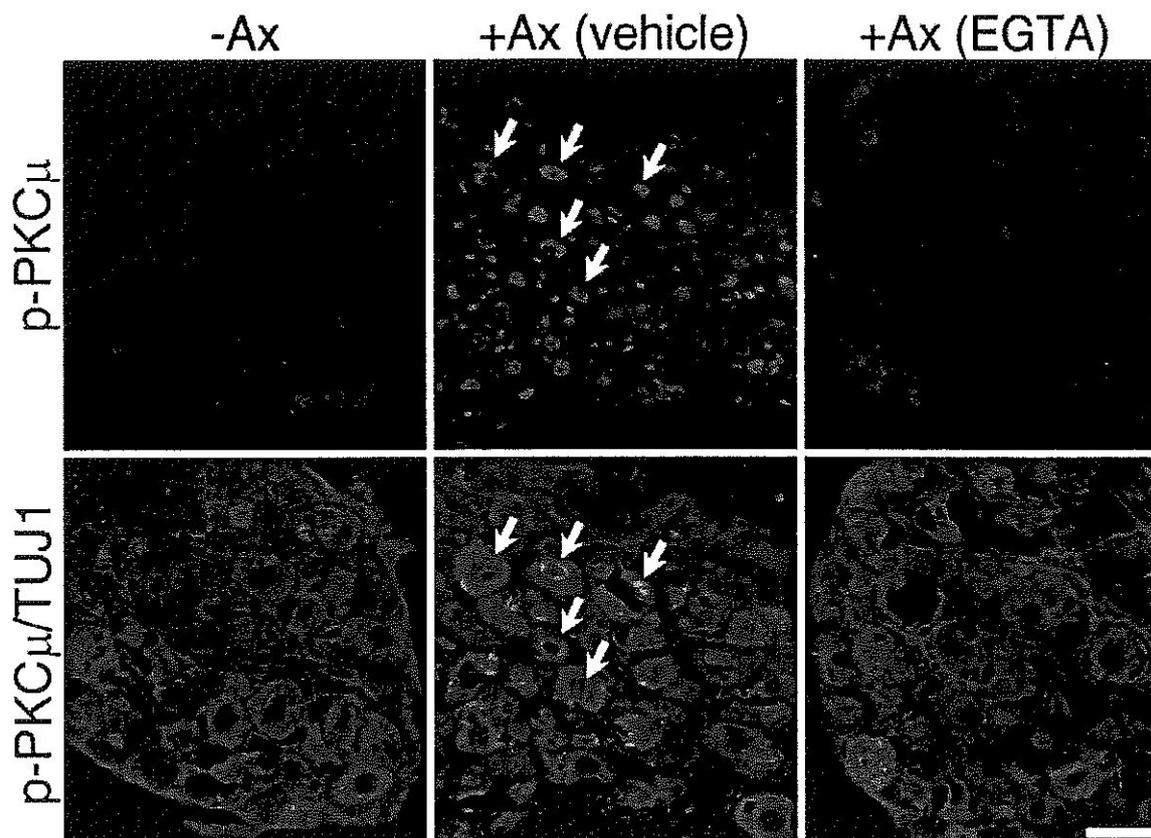


Figure 3 : Double marquage par immuno-fluorescence de p-PKC μ et TUJ1 sur des coupes de ganglions de la racine dorsale avant axotomie (-Ax) ou 24 h après section du nerf sciatique en absence ou en présence d'EGTA au niveau de la section du nerf. **Rangée du haut :** canal correspondant au marquage p-PKC μ ; **rangée du bas,** superposition du marquage TUJ1 à l'image correspondante de la rangée du haut. Les flèches blanches indiquent des noyaux de neurones. Barre d'échelle = 50 μ m.

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

- A- L'anticorps anti-TUJ1 pourrait être un anticorps monoclonal de souris.
- B- L'analyse de la figure montre que la section du nerf sciatique augmente la quantité de PKC dans les corps cellulaires des DRG.
- C- L'absence de modification de la PKC μ après section du nerf sciatique en présence d'EGTA montre que l'entrée de calcium extracellulaire dans les corps cellulaires active la PKC μ .
- D- Pour vérifier que p-PKC μ est présent dans le noyau on pourrait réaliser un co-marquage de la kinase et de l'ADN, respectivement avec l'anticorps anti-p-PKC μ et du DAPI.
- E- Les protéines kinases C ne sont pas les seules kinases activées par l'augmentation du calcium intracytoplasmique

L'acétylation des histones est régulée par deux familles d'enzymes : les histone acétyl transférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC). Ces enzymes sont connues pour réguler l'expression des gènes et pour être elles-mêmes régulées par les voies de signalisation intracellulaires. L'histone déacétylase 5 (HDAC5) est exprimée dans les neurones. Pour déterminer si la signalisation induite par l'axotomie affecte HDAC5, les séquences codantes de HDAC5 et de la protéine fluorescente GFP sont fusionnées pour construire un gène chimérique codant une protéine de fusion HDAC5-GFP. Des cultures primaires de DRG transfectées avec un vecteur d'expression contenant le gène chimérique sont étudiées par microscopie à épifluorescence à différents temps après axotomie. La fluorescence est majoritairement intra-nucléaire avant axotomie. 24 h après axotomie, la fluorescence a diminué considérablement dans le noyau alors qu'elle a augmenté à l'extrémité de l'axone coupé

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

- A-** Pour que la protéine de fusion HDAC5-GFP soit exprimée dans les neurones, il faut impérativement insérer un promoteur adéquat en amont du gène dans le vecteur d'expression.
- B-** La baisse de la fluorescence dans le noyau pourrait être liée à une diminution de la synthèse de HDAC5-GFP
- C-** La protéine HDAC5-GFP est initialement synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique
- D-** Le passage de la protéine de fusion HDAC5-GFP du noyau vers le cytoplasme fait intervenir le transporteur transmembranaire spécifique des histones déacétylases.
- E-** Le passage des histones déacétylases du noyau vers le cytoplasme nécessite l'hydrolyse du GTP.

Les cultures primaires sont traitées avec des activateurs ou des inhibiteurs de PKC pendant une heure, puis analysées en western blot avec des anticorps qui reconnaissent spécifiquement PKC μ , p-PKC μ , HDAC5 et la forme phosphorylée de HDAC5 (p-HDAC5) (Figure 4). Le myristate acétate de phorbol (PMA) et l'ingérol 3-angélate (I3A) sont des activateurs de toutes les PKC. Gö6983 est un inhibiteur de toutes les PKC.

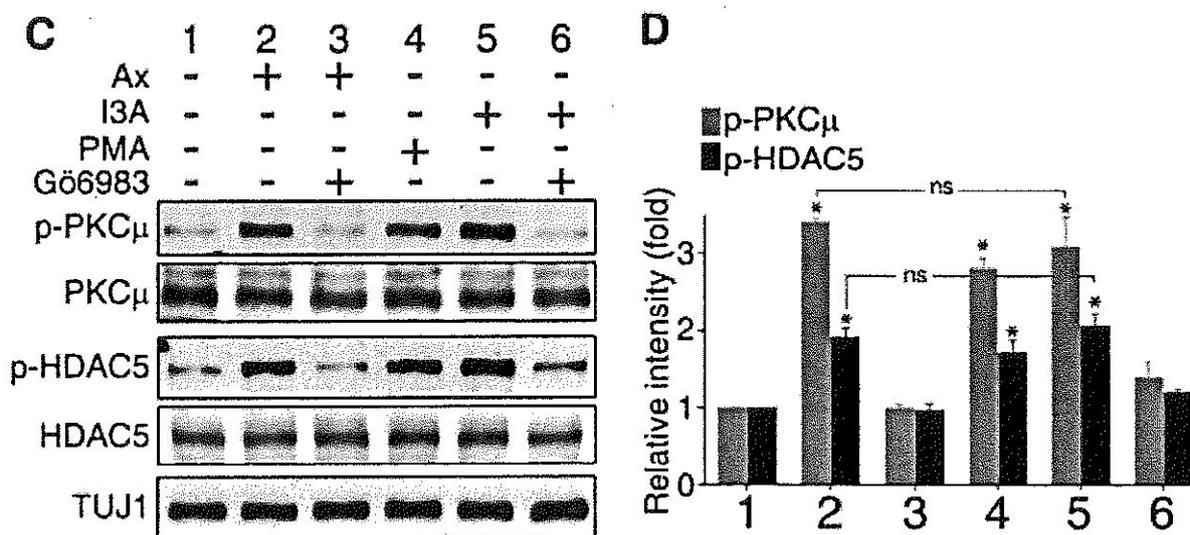


Figure 4: C Analyse par western blot des niveaux de protéines indiquées à gauche en présence (+) ou en absence (-) des composés pharmacologiques indiqués au dessus des images de western blot; - Ax : sans axotomie. + Ax : après axotomie. D Quantification des intensités relatives de p-PKC μ et p-HDAC5 dans les différentes conditions du panneau C. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. * $p < 0,05$.

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

- A- L'analyse de la figure montre que l'axotomie induit la phosphorylation de HDAC5 et de PKC μ .
- B- L'analyse de la figure suggère que l'axotomie induit la dégradation de HDAC5.
- C- Ces expériences démontrent que la phosphorylation de HDAC5 est dépendante de l'activité de PKC μ .
- D- L'analyse de la condition 6 suggère qu'en absence d'axotomie, HDAC5 n'est pas phosphorylée par PKC μ .
- E- HDAC5 est probablement phosphorylée par la PKC μ au niveau d'un résidu tyrosine

Les mouvements de la protéine de fusion HDAC5-GFP sont étudiés par vidéo-microscopie à épifluorescence. Après axotomie, on observe un déplacement de points fluorescents dans les axones. Ces points ont une taille apparente de 200nm et se déplacent tous dans la même direction, du corps cellulaire vers l'extrémité lésée de l'axone.

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

- A- Il faut fixer les cellules pour éviter qu'elles se déplacent pendant l'acquisition des images.
- B- L'analyse des résultats indique que les protéines de fusion HDAC5-GFP se déplacent de façon coordonnée sous forme d'amas d'environ 200nm.
- C- Il est probable que les protéines de fusion HDAC5-GFP soient contenues dans des vésicules.
- D- Le mouvement des protéines de fusion HDAC5-GFP pourrait être produit par l'activité de protéines de la famille des kinésines.
- E- Grâce à leur structure constituée de l'empilement de petits monomères sphériques de tubuline, les microtubules sont flexibles.

Afin de déterminer si les mouvements de HDAC5 ont un effet sur la chromatine, un fractionnement cellulaire est effectué à partir de cultures primaires de DRG pour séparer les noyaux et le cytoplasme. Le fractionnement est réalisé à partir de cultures de neurones ayant subi ou non une axotomie et traités ou non avec de l'EGTA. Les fractions nucléaires et cytoplasmiques sont analysées par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques de HDAC5, de l'histone H3 et de sa forme acétylée sur les lysines 9 et 14 (Figure 5).

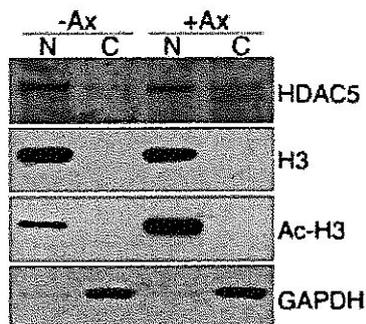


Figure 5: Analyse par western blot de HDAC5 et histone H3 dans des cultures de DRG - Ax : sans axotomie. + Ax : après axotomie. N: fraction nucléaire C: fraction cytoplasmique

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

- A- Le fractionnement cellulaire a sans doute été réalisé par centrifugation différentielle après lyse des cellules.
- B- L'augmentation de l'acétylation de l'histone H3 observée dans ces expériences est l'opposé de ce à quoi on aurait pu s'attendre après passage de HDAC5 dans le cytoplasme.
- C- On peut prédire que des variations de l'acétylation des histones auront des répercussions sur l'expression des gènes.
- D- Pour affirmer que l'histone H3 qu'on analyse dans cette expérience est bien nucléaire, il faudrait s'assurer que la fraction nucléaire n'est pas contaminée par des mitochondries.
- E- Une fois qu'elles ont terminé leur action sur les histones, les HDAC sont recyclées avec les autres protéines de modification de la chromatine dans les corps de Cajal.

Afin de déterminer si HDAC5 est impliquée dans la régulation de l'acétylation des histones par l'axotomie, on décide d'inactiver le gène codant HDAC5 par recombinaison homologue chez la souris (réalisation de souris KO). Les niveaux d'acétylation de l'histone H3 dans les DRG sont évalués par western blot avant et après axotomie. La figure 6 montre le rapport entre les intensités du marquage pour l'histone H3 acétylé et du marquage du marqueur neuronal TUJ1 (Ac-H3/TUJ1).

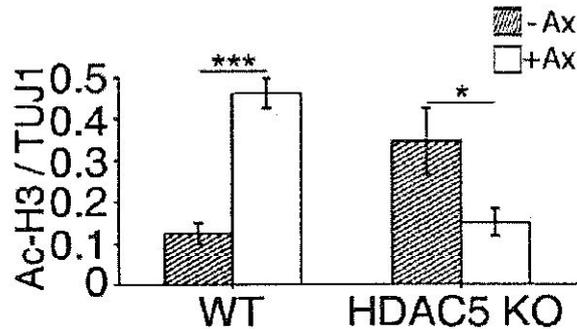


Figure 6 : Rapport entre les niveaux de protéines AC-H3/TUJ1 dans des DRG avant et après section du nerf sciatique (Ax). Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$

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

- A- Pour générer les souris KO HDAC5 il a fallu injecter le vecteur de recombinaison homologue dans des ovocytes fécondés de souris.
- B- L'augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans les DRG des souris KO par rapport aux souris contrôle (WT) n'est pas interprétable si l'expression de TUJ1 est contrôlée par HDAC5
- C- L'augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans les DRG des souris KO indique que l'inactivation de HDAC5 a dû réactiver l'expression d'une histone acétyl transférase (HAT).
- D- L'analyse des résultats indique que HDAC5 régule bien l'acétylation des histones dans les DRG avant axotomie, mais qu'il n'intervient pas dans les événements qui suivent l'axotomie.
- E- L'infection des neurones de DRG par des vecteurs viraux exprimant un shRNA (small-hairpin RNA) ciblant le gène *HDAC5* devrait reproduire à l'identique les résultats obtenus chez la souris KO

Afin de vérifier si la relocalisation de HDAC5 est nécessaire à la régénération axonale, un mutant de HDAC5 strictement nucléaire (HDAC5nuc) est construit en remplaçant les sérines 259, 280 et 498 par des acides aspartiques. Un vecteur d'expression pour HDAC5nuc est introduit dans des neurones de DRG en culture issus de souris WT. Les noyaux sont extraits des neurones transfectés et analysés par western blot.

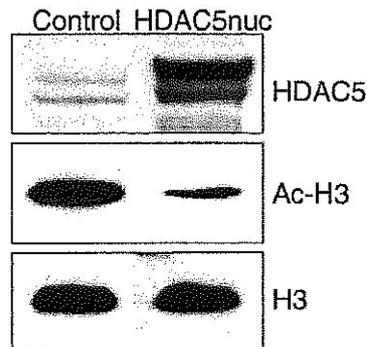


Figure 7 : Détection par western blot de HDAC5, de l'histone H3 (H3) et de l'histone H3 acétylée sur les lysines 9 et 14 (Ac-H3) dans des fractions nucléaires de neurones de DRG mis en culture (Control) ou transfectés par un vecteur d'expression de HDAC5nuc (HDAC5nuc). Ce western blot est représentatif de la répétition de trois expériences indépendantes.

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

- A- La distance entre les acides aminés mutés exclut la possibilité qu'ils fassent partie d'un signal de localisation nucléaire.
- B- La figure 7 montre que HDAC5nuc s'accumule dans le noyau et que les mutations n'ont pas affecté son activité enzymatique.
- C- Les résultats présentés dans la figure 7 suggèrent que les sérines 259, 280 et 498 sont phosphorylées par la PKC μ après axotomie.
- D- Après axotomie, la quantité de HDAC5 détectable par immuno-fluorescence dans le cytoplasme des neurones exprimant HDAC5nuc doit être diminuée par rapport aux cellules ne contenant pas le vecteur d'expression
- E- Si la régénération n'est pas modifiée dans les neurones exprimant HDAC5nuc, il est probable que HDAC5 est capable d'acétyler des protéines cytoplasmiques.

Pour identifier les gènes dont l'expression pourrait être modifiée secondairement à la relocalisation de HDAC5 après axotomie, on compare par une méthode d'analyse globale le niveau des ARNm des gènes exprimés avant et après axotomie dans des cultures de neurones de DRG issus de souris sauvages (WT). On identifie environ 300 gènes dont les ARNm varient après axotomie. On réalise ensuite une section du nerf sciatique et on prépare l'ARN total des DRG d'où émanent les axones sectionnés. On dose par RT-PCR le niveau de certains des ARNm correspondant aux gènes dont l'expression varie après axotomie en cultures (figure 8)

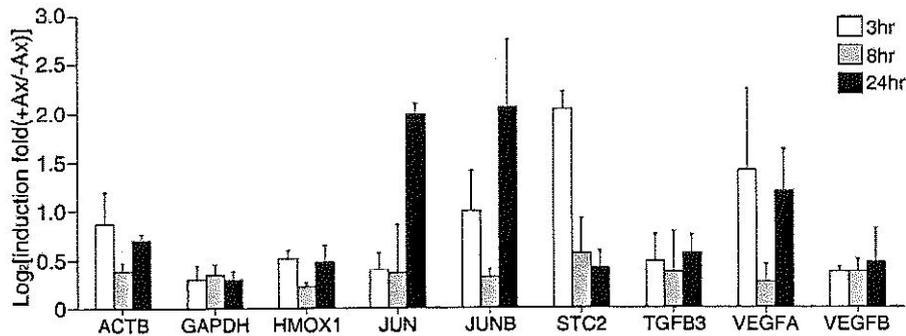


Figure 8 : Rapport entre les niveaux d'ARNm de gènes dont le nom figure sous les histogrammes. Les ARN totaux ont été extraits de DRG 3 h, 8 h et 24 h après section du nerf sciatique. Le niveau de chacun des ARNm a été déterminé par RT-PCR. Les données sont représentées sous la forme du Log2 des rapports entre les valeurs obtenues avant et après axotomie (moyenne \pm erreur standard de la moyenne).

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

- A- La technique de RT-PCR permet de mesurer des quantités d'ARN en utilisant une ADN polymérase.
- B- La RT-PCR est une méthode particulièrement efficace car, en conditions optimales, elle permet théoriquement de tripler à chaque cycle la quantité d'ADN amplifié
- C- Ces résultats ne démontrent pas de façon certaine que la transcription du gène *JUNB* augmente dans les neurones du DRG après section du nerf sciatique.
- D- Si la translocation de HDAC5 est directement responsable de l'augmentation précoce de *JUNB*, cette augmentation devrait être peu sensible à un blocage de la traduction protéique par la cycloheximide.
- E- L'ensemble des résultats de cette étude suggère que l'axotomie induit une augmentation locale de calcium qui se propage jusqu'au corps cellulaire, où elle induit la phosphorylation de $PKC\mu$. $PKC\mu$ phosphorylée induit à son tour la translocation de HDAC5 vers le cytoplasme, ce qui permet l'activation de l'expression de gènes nécessaires à la régénération axonale.