

**Année Universitaire 2012-2013**

Université Claude Bernard Lyon 1

1<sup>ère</sup> année commune des Etudes de Santé (PACES)

Faculté de Médecine Lyon-Est

Jeudi 13 décembre 2012

**EPREUVE DE BIOLOGIE CELLULAIRE**

**(UE2)**

(Pr Laurent SCHAEFFER)

(Pr Jean-Louis BESSEREAU)

**Durée de l'épreuve : 60 minutes**

**Nombre de questions : 10 questions**

Toutes les questions valent le même nombre de points

Ce fascicule comprend 9 pages numérotées.

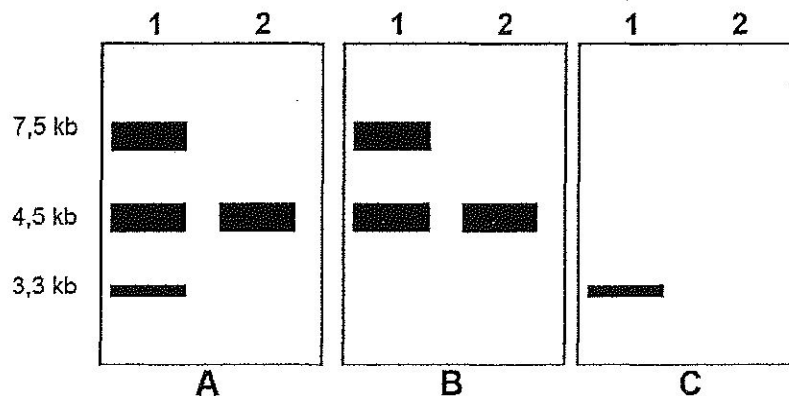
**IMPORTANT** : vous devez vérifier au début de l'épreuve que votre livret est complet

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

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur protéique sécrété qui joue un rôle majeur dans le développement normal et pathologique des vaisseaux sanguins. Il existe deux récepteurs principaux du VEGF appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. VEGFR2 relaie les fonctions principales du VEGF telles que la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales qui forment la paroi interne des vaisseaux. Le rôle du second récepteur Flt1 (également appelé VEGFR1) est moins clair. Une augmentation du niveau d'expression de Flt1 est associée à la pré-éclampsie, une complication sérieuse de la grossesse se caractérisant par une hypertension artérielle et une protéinurie (présence anormale de protéines dans les urines), auxquelles s'associent des anomalies de la microvasculature du rein. On se propose d'analyser plus avant la fonction de Flt1 dans le rein.

**Question 1** - Chez la souris, le gène *Flt1* est constitué de 30 exons contenus dans une région génomique de 140 kilobases (kb). On analyse par northern-blot l'expression de *Flt1* à partir d'ARN total extrait de rein de souris adulte (ligne 1). On fait également migrer de l'ARN extrait de *Escherichia coli* (ligne 2). On utilise pour la détection une sonde radioactive synthétisée à partir d'ADN génomique couvrant soit les exons 4 à 7 de *Flt1*(image A), soit les exons 22 à 28 (image B), soit l'intron 13 (image C)

FIGURE 1 : Représentation schématique des signaux obtenus après révélation des northern-blots



Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A** - Le gène *Flt1* code au moins 3 ARNm distincts.
- B** - Les protéines codées par les différents ARNm sont nécessairement de tailles différentes.
- C** - La technique utilisée pourrait détecter les ARN pré-messagers
- D** - Ces résultats suggèrent qu'il existe un épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *Flt1*.
- E** - La transcription du messenger de plus grande taille est plus forte que celle du messenger le plus petit.

**Question 2** - L'ARNm de 7,5 kb contient une phase ouverte de lecture codant une protéine prédite de 1338 acides aminés dans laquelle on prédit l'existence d'un peptide signal (acides aminés a.a. 1-21), 7 domaines « immunoglobuline » (a.a. 27-738), un segment transmembranaire (a.a. 760-782), un domaine à activité tyrosine kinase (a.a. 1127-1154).

En séquençant l'ADN complémentaire correspondant à l'ARNm de 3,3 kb on constate qu'il est identique à l'ADNc *Flt1* jusqu'à l'exon 12 mais que sa région 3' correspond à 1154 bases de l'intron 13 du gène *Flt1* suivi d'une répétition d'adénines. Le cadre ouvert de lecture s'interrompt 21 bases après la fin de l'exon 12, qui code les acides aminés 553 à 656 dans la protéine Flt1. On appelle sFLT1 (shortFLT1) la protéine potentiellement codée par l'ARNm de 3,3 kb.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A - La coupure de l'extrémité 3' du pré-messager *sFLT1* est liée à la présence d'un signal de polyadénylation dans l'intron 13.
- B - La structure du gène *Flt1* suggère que le contrôle des niveaux relatifs d'ARNm *Flt1* et *sFLT1* est transcriptionnel.
- C - La transcription inverse de l'ARN suivie de PCR (RT-PCR) est une méthode plus sensible que le northern blot pour détecter un ARNm.
- D - La synthèse par le rein de la protéine sFLT1 est plus faible que celle de la forme longue Flt1 car la quantité d'ARNm *sFLT1* détectée dans la figure 1 est inférieure à celle de *Flt1*.
- E - Les données de séquence suggèrent que sFLT1 n'est pas une protéine fonctionnelle.

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

- A - Le peptide signal est une séquence d'acides aminés hydrophobes reconnue par la SRP.
- B - Sur la base des prédictions de séquence, la forme mature de sFLT1 contient 642 acides aminés.
- C - Un anticorps dirigé contre le peptide signal de Flt1 permettra de détecter à la fois Flt1 et sFLT1 par western blot.
- D - Pendant sa synthèse, la région 23-759 de Flt1 contenant les acides aminés 23 à 759 est présente dans la lumière du réticulum endoplasmique.
- E - Les données de séquence indiquent que la forme mature de Flt1 est obligatoirement exposée à la surface de la cellule.

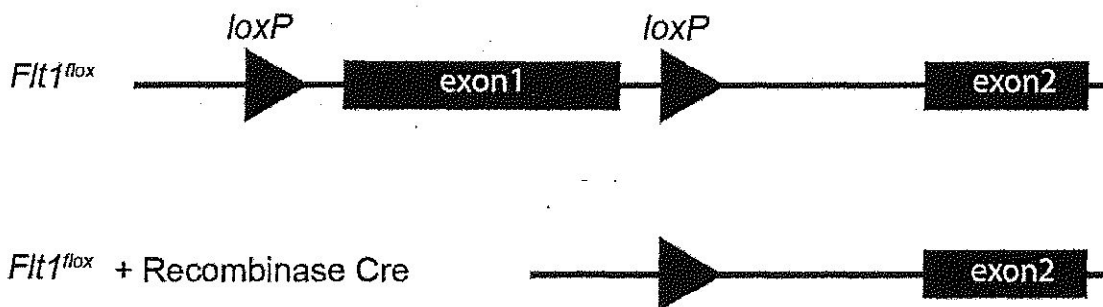
**Question 4** - Au niveau du glomérule rénal, l'endothélium des capillaires est dit fenêtré car il contient des petits pores de 50 à 100 nanomètres (nm). Les capillaires sont entourés par les podocytes qui constituent la barrière de filtration entre le sang et l'urine. Les cellules endothéliales sont séparées des podocytes par une membrane basale sécrétée par les deux types cellulaires.

En utilisant un anticorps contre les domaines immunoglobuline 2 à 5 de Flt1 on détecte par immunofluorescence un fort signal qui dessine le contour des capillaires ainsi que des points fluorescents dans le cytoplasme des podocytes. Par Hybridation *in situ* on détecte les ARNm de FLT1 et sFLT1 dans les cellules endothéliales, En revanche, par hybridation *in situ* on ne détecte que l'ARNm *sFLT1* dans les podocytes.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A - L'utilisation de la microscopie confocale couplée à l'immunofluorescence permet de caractériser la distribution de Flt1/sFLT1 avec une résolution inférieure ou égale à 100 nanomètres.
- B - La protéine sFLT1 détectée dans le glomérule pourrait être produite par un autre organe.
- C - Le signal de fluorescence intracellulaire pourrait correspondre à la localisation de sFLT1 dans l'appareil de trans-golgien.
- D - Le signal de fluorescence intracellulaire pourrait correspondre à la localisation de sFLT1 dans des endosomes.
- E - La distribution de sFLT1 est incompatible avec l'ajout post-traductionnel d'une ancre glypiée (GPI, glycosyl phosphatidyl inositol) à la partie carboxy-terminale de sFLT1.

**Question 5** - Pour tester la fonction du gène *Flt1* chez la souris, on construit une souris dans laquelle l'exon1 de *Flt1* est flanqué de deux sites *loxP* (allèle *Flt1<sup>lox</sup>*). L'expression des protéines Flt1 et sFLT1 à partir de l'allèle *Flt1<sup>lox</sup>* est normale. En revanche, l'expression de la recombinaise Cre catalyse la recombinaison des deux sites *loxP* dans le chromosome, conduisant à la délétion de l'exon1 qui contient le site d'initiation de la traduction (voir schéma ci-dessous). L'expression ubiquiste (dans toutes les cellules) de la recombinaise Cre chez des souris homozygotes *Flt1<sup>lox/lox</sup>* produit un phénotype vasculaire létal caractérisé par un excès de croissance des cellules endothéliales. L'expression de la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur du gène *Nphs1* qui est spécifiquement exprimé dans les podocytes fait apparaître une fuite pathologique de protéines dans les urines et des anomalies morphologiques du glomérule chez les souris adultes.



Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A - Si on répète l'expérience de northern-blot de la question 1 à partir d'ARN extrait des souris *Flt1<sup>lox/lox</sup>* exprimant la recombinaise de façon ubiquiste, on s'attend à ne plus détecter de signal.
- B - Dans les souris *Flt1<sup>lox/lox</sup>* exprimant la recombinaise de façon ubiquiste, le signal détecté par immunofluorescence doit disparaître totalement dans le glomérule.
- C - Dans les souris *Flt1<sup>lox/lox</sup>* exprimant la recombinaise spécifiquement dans les podocytes, le signal détecté par immunofluorescence doit disparaître totalement dans le glomérule.
- D - Ces résultats suggèrent que le gène *Flt1* est exprimé dans tous les organes de la souris.
- E - Ces résultats suggèrent que *Flt1* a un effet inhibiteur sur la formation des vaisseaux.

**Question 6** - Des cultures de podocytes sont réalisées à partir de reins de souris *Flt1<sup>Flox/Flox</sup>* exprimant le CRE recombinase (*Nphs1-cre*). L'ajout de protéine pure sFLT1 dans le milieu de culture de ces podocytes entraîne un changement important de la forme des podocytes. Si au lieu d'ajouter la protéine sFLT1 on ajoute du milieu de culture dans lequel des podocytes issus de souris sauvages ont été préalablement cultivés (milieu conditionné), on observe les mêmes changements morphologiques. Par contre, si le milieu conditionné est incubé avec des billes couplées à un anticorps anti-sFLT1 avant d'être utilisé, aucun changement morphologique des podocytes primaires n'est observé.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A - sFLT1 peut avoir une action autocrine.
- B - sFLT1 induit probablement le remodelage de l'actine des podocytes.
- C - sFLT1 est une protéine sécrétée.
- D - sFLT1 doit être glycosylée au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi.
- E - sFLT1 doit passer par des vésicules couvertes de COP II.

**Question 7** - Pour explorer le mécanisme sous-jacent à l'action de sFLT1, on utilise le même type de culture de podocytes décrites à la question 6. Le fond des boîtes de culture est recouvert avec différentes protéines. Les podocytes adhèrent efficacement à un revêtement de fibronectine ou de protéine sFLT1 purifiée mais n'adhèrent pas aux boîtes couvertes de VEGFR2. La présence de VEGF dans le milieu de culture n'influence pas l'adhésion des cellules sur la fibronectine, sFLT1 ou VEGFR2. Pour caractériser le mode de fixation utilisé par les cellules, un anticorps bloquant la fonction des intégrines est ajouté au milieu de culture. Cet anticorps bloque l'adhésion des podocytes sur la fibronectine, mais pas sur sFLT1. Par contre l'adhésion des podocytes sur sFLT1 est bloquée par l'ajout d'Héparine, un Glycosaminoglycane.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A - Les résultats suggèrent que sFLT1 interagit avec des constituants de la matrice extracellulaire.
- B - L'adhésion des cellules à la fibronectine et à sFLT1 se fait par l'intermédiaire des intégrines.
- C - sFLT1 est un protéoglycane.
- D - sFLT1 se lie aux glycosphingolipides de la membrane.
- E - Les résultats ne permettent pas d'exclure que VEGFR2 interagisse avec les podocytes.

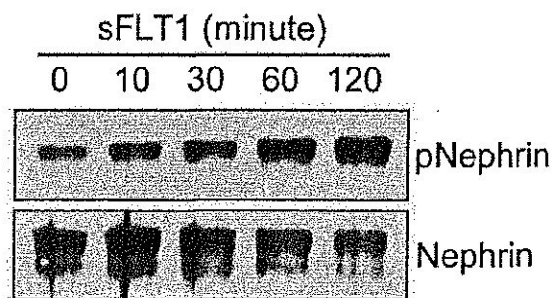
**Question 8** - Dans une autre expérience, la protéine sFLT1 purifiée est ajoutée à des podocytes adhérents en culture. La localisation de sFLT1 dans la culture est déterminée à différents temps par immunofluorescence indirecte avec un anticorps primaire dirigé contre sFLT1, après fixation des cellules. 5 minutes après l'addition de sFLT1, l'émission de fluorescence se concentre autour de points répartis sur toute la surface cellulaire. L'utilisation d'un second anticorps dirigé contre la cavéoline1 montre que ces points sont colocalisés avec la cavéoline 1.

Si l'immunofluorescence est réalisée 45 minutes après l'ajout de sFLT1, les points de fluorescence se concentrent autour d'une zone centrale de la cellule. Ce changement de distribution de sFLT1 ne s'observe pas si un inhibiteur de la dynamine est ajouté en même temps que la protéine sFLT1.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A** - La relocalisation de sFLT1 implique une étape d'endocytose.
- B** - Un mécanisme dépendant des clathrines est impliqué.
- C** - Il a fallu perméabiliser les cellules pour réaliser ces immunofluorescences.
- D** - La relocalisation de sFLT1 dans les cellules se fait sans doute le long des filaments d'actine grâce à une dynéine.
- E** - L'utilisation de la microscopie électronique et d'anticorps anti-sFLT1 couplés à des particules d'or permettrait de déterminer si la relocalisation de sFLT1 passe par des vésicules.

**Question 9** - La néphrine (codée par *Nphs1*) est une protéine transmembranaire contenant des domaines « immunoglobuline » dans sa partie extracellulaire et une région cytoplasmique portant des tyrosines qui peuvent être phosphorylées. La phosphorylation de la néphrine entraîne un remaniement important du cytosquelette des podocytes. On ajoute de la protéine sFLT1 à une culture de podocytes. Par électrophorèse en SDS sur gel de polyacrylamide suivie de western-blot, on analyse la quantité de néphrine phosphorylée à différents temps après l'addition de sFLT1 en utilisant un anticorps qui reconnaît la néphrine totale (Nephrin) ou spécifiquement la néphrine phosphorylée (pNephrin) :



Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A** - Dans cette expérience, le SDS est un détergent utilisé principalement pour perméabiliser les cellules.
- B** - La mesure de la quantité totale de néphrine est nécessaire pour affirmer que sFLT1 stimule la phosphorylation de la néphrine.
- C** - sFLT1 pourrait être un ligand de la néphrine.
- D** - On peut déduire de ces résultats que la néphrine a une activité tyrosine kinase activée par sFLT1.
- E** - La phosphorylation de tyrosines permet généralement d'empêcher la fixation de protéines adaptatrices sur la protéine phosphorylée.



**Question 10** - Un excès de VEGF est connu pour provoquer une hyperprolifération pathologique des cellules endothéliales, mais son effet sur les podocytes n'est pas connu. Pour analyser cet effet, on utilise les cultures de podocytes décrites à la question 6. L'ajout de VEGF purifié dans le milieu de culture n'a pas d'effet sur la morphologie des cellules, et des expériences d'immunofluorescence avec un anticorps primaire dirigé contre le VEGF ne détecte pas la présence de VEGF sur les cellules. Dans une seconde expérience, on ajoute de la protéine sFLT1 purifiée en même temps que le VEGF. 5 minutes après l'ajout simultané de VEGF et de sFLT1, le VEGF est détectable à la surface des cellules par immunofluorescence et on observe un changement de la morphologie des podocytes. Le marquage anti-VEGF est colocalisé avec celui de sFLT1. 30 minutes après l'ajout de VEGF et sFLT1, la localisation du VEGF a changé et l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine LAMP1, un marqueur des endosomes tardifs, montre une colocalisation entre LAMP1 et VEGF. Par contre, le marquage de sFLT1 n'est plus colocalisé avec celui de VEGF à ce stade.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A** - sFLT1 lie le VEGF et induit son endocytose.
- B** - la présence de VEGF dans les endosomes tardifs suggère qu'il sera dégradé par les lysosomes.
- C** - On peut formuler l'hypothèse qu'une des fonctions de sFLT1 dans les podocytes est de limiter l'action du VEGF sur les cellules endothéliales dans les glomérules rénaux.
- D** - sFLT1 a subi une transcytose.
- E** - le VEGF induit le remodelage du cytosquelette d'actine dans les podocytes.