

Université Paris Sud 11 - Faculté des Sciences

Date: 7.1.2014	Unité d'enseignement Biol305: Dynamique cellulaire (L3S5)
Année: 2013/2014	Durée: 2h

Notez le numéro de la question à coté de votre réponse. Il est inutile de répéter la question. Les parties A et B sont à composer sur des feuilles séparées. Notez le numéro d'anonymat sur chaque feuille.

Partie A 8 points sur 20 : 3 points A1, 5 points A2 + A3

Question A1:

COMPLETEZ LES __(vides)___ AVEC LES (1-2) MOTS MANQUANTS SVP (et pas plus!). Vous n'avez pas besoin de recopier la question, mais vérifiez d'avoir mis le numéro de la question correspondante.

CYCLE CELLULAIRE :

- 1) La poly-ubiquitination d'une protéine sert à la faire _____. La poly-ubiquitination est effectuée par des enzymes qui s'appellent des _____.
- 2) Faites un schéma de la chaîne d'activités qui effectuent la poly-ubiquitination d'une protéine.
- 3) Une classe des molécules nécessaires pour la régulation du cycle cellulaire et ciblée par l'ubiquitination s'appelle les _____.
- 4) Les molécules citées ci-dessus (question 3) _____ leurs partenaires, les _____, qui _____ leurs substrats.

=====
APOPTOSE :

- 5) L'apoptose élimine les cellules _____, _____, et _____ dans l'organisme.
- 6) Une caspase est une enzyme qui _____ ses substrats, qui sont des _____.
- 7) Une caspase effectrice est activé par _____.
- 8) Une caspase initiatrice est activé par _____ suivi par _____.

=====
DIFFERENTIATION:

- 9) Quelle devenir peut une cellule totipotent assumer dans l'organisme?

Question A2:

Le prix nobel de médecine de 2013 a été attribué à messieurs Schekman, Rothman et Südhof pour leurs travaux sur l'exocytose. Les travaux de R Schekman portaient sur l'identification de 23 gènes essentiels pour l'exocytose des levures. La levure (*S cerevisiae*) a besoin d'exocytose pour se multiplier. Dès le début (1980) les chercheurs ont pu classer les gènes dans plusieurs catégories correspondant à différentes étapes du processus.

Quelles sont les étapes de l'exocytose, de la synthèse des protéines jusqu'à la libération dans le milieu extracellulaire?

Le blocage (par mutation d'un gène essentiel) de quelle étape va conduire à l'accumulation de vésicules dans la cellule? Le blocage de quelle autre étape va conduire à la disparition des vésicules?

Question A3:

L'attribution du prix Nobel de la chimie à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka en 2012 a été l'occasion de se pencher sur les récepteurs à 7 segments transmembranaires. Il s'agit d'une des deux grandes classes de récepteurs membranaires. Quelle est l'autre classe de récepteur membranaire? Comment est-ce qu'elle fonctionne et quelles sont leurs protéines partenaires?

=====

Partie B 12 points sur 20 sur feuille séparée

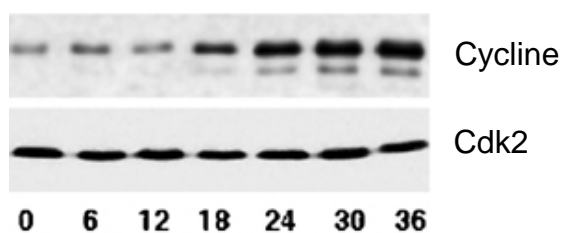
Exercice B1 (7 points)

Dans le but d'améliorer les traitements de cancers actuellement résistants, on recherche de nouvelles molécules capables d'arrêter la croissance des cellules tumorales. L'une des molécules actuellement testées est dénommée DAP, dérivé du cisplatine (qui est lui déjà utilisé en traitement clinique). On sait que le DAP provoque l'arrêt de la division de cellules cancéreuses contre lesquelles le cisplatine est inefficace.

Des expériences réalisées *in vitro* dans la lignée de cancer d'ovaire humain A2780 ont montré que le DAP provoque l'arrêt de la division de ces cellules en phase G1 du cycle cellulaire. On se propose de préciser le mécanisme d'action du DAP par de nouvelles expériences.

Des cellules A2780 ont été traitées par 0,6 μ M de DAP, puis récoltées après différents temps d'incubation et lysées. Une immunoprécipitation en présence d'anticorps spécifiques de la protéine cdk2 est réalisée. Le résultat de l'immunoprécipitation est ensuite analysé par Western-blot en utilisant des anticorps anti-cdk2 ou anti-cycline E. Les résultats sont présentés ci-dessous :

IP: anti-Cdk2



Durée de l'incubation DAP

Figure 1 : Analyse par western-blot de l'immunoprécipitation de cdk2 après action du DAP.

1) Pourquoi dans cette expérience s'intéresse-t-on à cdk2 et à la cycline E ?

2) rappelez le principe d'une expérience d'immunoprécipitation (un schéma peut vous y aider), et analysez les résultats de l'expérience.

Les complexes protéiques immunoprécipités avec l'anticorps cdk2 dans l'expérience ont été incubés *in vitro* en présence de la protéine Rb et d'ATP marqué radioactivement. (On rappelle que la protéine Rb participe à la régulation de la progression de la phase G1 vers la phase S). La phosphorylation de Rb est ensuite évaluée après migration sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes et autoradiographie (figure 2)

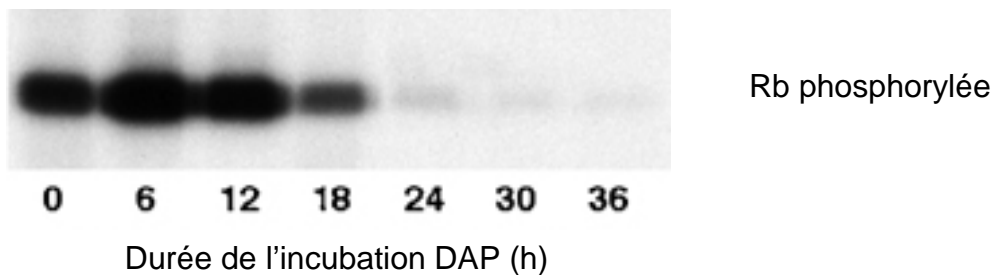
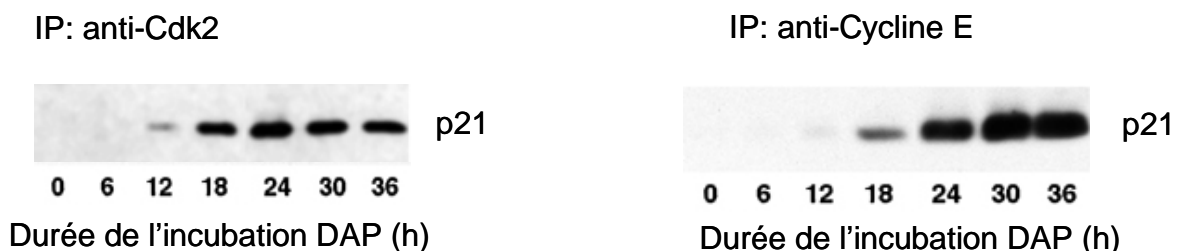


Figure 2 : Analyse par autoradiographie après électrophorèse de la phosphorylation de Rb

3) Pourquoi mesure-t-on la phosphorylation de Rb, et que concluez-vous sur le fonctionnement de cdk2 et cycline E en présence de DAP?

D'autres expériences ont mis en évidence que le DAP induit des dommages dans l'ADN des cellules traitées. On a montré que ces dommages induisent l'expression de la protéine p53, qui induit à son tour l'expression de la protéine p21.

Des cellules A2780 ont été traitées par le DAP dans les mêmes conditions que précédemment. Après récolte et lyse des cellules, on a réalisé des immunoprécipitations, soit avec un anticorps anti-cdk2 soit avec un anticorps anti cycline E. Les immunoprécipités sont ensuite analysés par Western-blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine p21. (figure 3)



Analyse par western-blot de l'immunoprécipitation par anti-cdk2 ou anti-cycline E après incubation avec DAP .

4) A quelle catégorie de protéines appartient p21, et que pouvez-vous dire de sa fonction d'après les résultats de l'expérience ?

5) Pour confirmer que les cellules A2780 s'accumulent bien en phase G1, on peut mettre en évidence l'accumulation de la cycline E par western-blot, comme ci-dessus. **Proposez une autre méthode utilisant un anticorps anti-cycline E qui permettra de préciser la présence et la localisation de cette cycline dans les cellules. Décrivez-en les principales étapes, et expliquez le but de chacune.**

Exercice B2 (5 points)

L'adénosine triphosphate (ATP) est généralement considérée comme un substrat énergétique et une source d'acides nucléiques. Cependant, nous savons maintenant que l'ATP et ses produits de dégradation sont également des médiateurs intercellulaires. L'ATP en particulier peut se lier à deux familles de récepteur, les récepteurs P2Y couplés aux protéines G (12 récepteurs de cette famille identifiés), et les récepteurs P2X qui sont des récepteurs ionotropiques (7 récepteurs de cette famille identifiés).

Vous étudiez le rôle des récepteurs P2X sur des cultures de neuroblastes. Par RT PCR vous avez mise en évidence que ces cellules n'expriment que les récepteurs P2X3 et P2X7 dans cette famille.

Vous commencez par tester la viabilité de ces cellules avec différents traitements pharmacologiques :

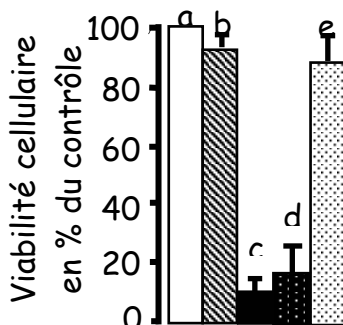
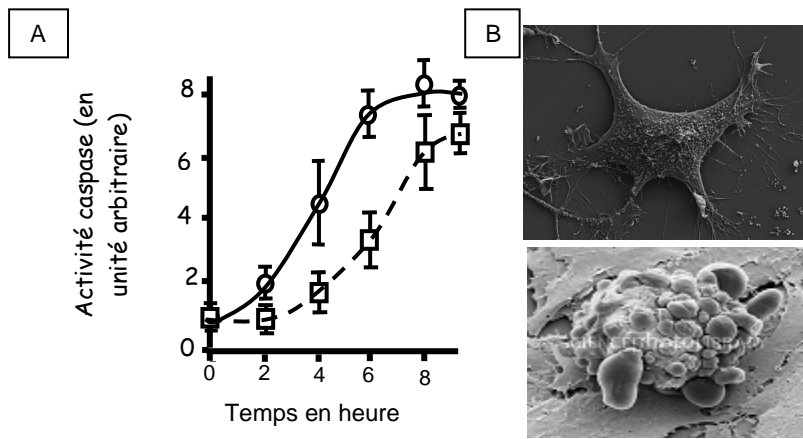


Figure 1 : Viabilité des neuroblastes traités 20 heures avec une solution contrôlée (a) ou contenant 10 μM d'ATP (dose nécessaire à la stimulation de P2X3) (b), 500 μM d'ATP (c), 500 μM d'ATP+antagoniste du récepteur P2X3 (d), 500 μM d'ATP+antagoniste de large spectre bloquant tous les récepteurs P2X (e)

Q1. Quel serait le récepteur impliqué dans l'effet sur la viabilité observé ? (justifiez)

Vous explorez ensuite les voies de signalisation impliquées dans l'effet observé sur la viabilité.

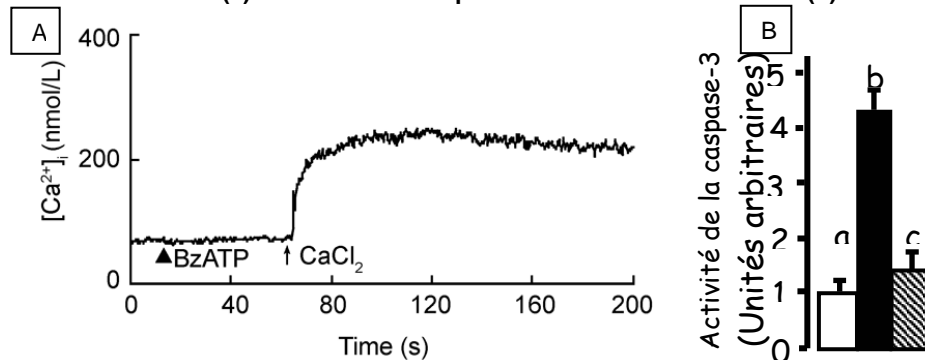
Figure 2 : (A) cinétique d'activation des caspases 3 (carré) et 9 (rond) dans les neuroblastes après traitement avec 500 μM d'ATP. (B) Photo en microscopie électronique de neuroblastes traités 16 heures avec une solution contrôlée (en haut) ou avec 500 μM d'ATP (en bas)



Q2. D'après cette figure quel est le type de mort cellulaire impliqué dans l'effet de 500µM d'ATP ? Justifiez

Q3. Pouvez vous précisez la voie de mort sachant que l'activation de la caspase 8 (qui n'est pas montré dans la figure 2A) est un peu plus tardive que la 3 ? Justifiez

Figure 3 : A) mesure en vidéo microscopie de la concentration en calcium intracellulaire. Les cellules sont initialement dans un milieu de culture sans calcium (Ca^{++}). Au temps 10s vous traitez avec un agoniste spécifique du récepteur P2X7 (BzATP), puis au temps 60 seconde vous rajoutez du calcium dans le milieu extracellulaire ($CaCl_2$) (si on répète l'expérience sans traiter avec du BzATP il n'y a pas d'augmentation de Ca^{++} intracellulaire). (B) activation de la caspase 3 quatre heures après traitement avec un milieu contrôle (a) ou contenant 500µM d'ATP dans un milieu avec (b) ou sans Ca^{++} (c).



Q 4. A partir de cette figure, proposez un mécanisme de signalisation intracellulaire induit par l'activation du récepteur P2X7. Quelles informations nous apporte la figure 3B ?

UE Biol305: Dynamique cellulaire (L3S5) Examen 7.1.2014

Réponses attendues

Question A1 (3 points):

COMPLETEZ LES ___(vides)_____ AVEC LES (1-2) MOTS MANQUANTS SVP (et pas plus!). Vous n'avez pas besoin de recopier la question, mais vérifiez d'avoir mis le numéro de la question correspondante.

CYCLE CELLULAIRE :

1) La poly-ubiquitination d'une protéine sert à la faire _____. La poly-ubiquitination est effectuée par des enzymes qui s'appellent des _____.

Réponses: **DEGRADER; LIGASES D'UBIQUITINE.**

2) Faites un schéma de la chaîne d'activités qui effectuent la poly-ubiquitination d'une protéine.

3) Une classe des molécules nécessaires pour la régulation du cycle cellulaire et ciblée par l'ubiquitination s'appelle les _____.

Réponse: **CYCLINES**

4) Les molécules citées ci-dessus _____ leurs partenaires, les _____, qui _____ leurs substrats.

Réponses: **ACTIVENT ; CDK ; PHOSPHORYLENT**

=====

APOPTOSE :

5) L'apoptose élimine les cellules _____, _____, et _____ dans l'organisme.

Réponses: **EXCEDENTAIRES, OBSOLETES et ENDOMMAGEES**

6) Une caspase est une enzyme qui _____ ses substrats, qui sont des _____.

Réponse: **CLIVE/DEGRADE; PROTEINES**

7) Une caspase effectrice est activé par _____.

Réponse: **CLIVAGE PAR UNE CASPASE INITIATRICE**

8) Une caspase initiatrice est activé par _____ suivi par _____.

Réponses: **MULTIMERIZATION ET AUTOCLIVAGE**

=====

DIFFERENTIATION:

9) Quelle devenir peut une cellule totipotent assumer dans l'organisme?

Réponses : tous

Question A2: (3 points)

Le prix nobel de médecine de 2013 a été attribué à messieurs Schekman, Rothman et Südhof pour leurs travaux sur l'exocytose. Les travaux de R Schekman portaient sur l'identification de 23 gènes essentiels pour l'exocytose des levures. La levure (*S cerevisiae*) a besoin d'exocytose pour se multiplier. Dès le début (1980) les chercheurs ont pu classer les gènes dans plusieurs catégories correspondant à différentes étapes du processus.

Quelles sont les étapes de l'exocytose, de la synthèse des protéines jusqu'à la libération dans le milieu extracellulaire?

Le blocage (par mutation d'un gène essentiel) de quelle étape va conduire à l'accumulation de vésicules dans la cellule? Le blocage de quelle autre étape va conduire à la disparition des vésicules?

Synthèse avec ribosomes attachés à la membrane du RE, insertion cotraductionnelle dans le RE, formation de vésicules de transport, fusion avec appareil de Golgi (cis). Traversé du Golgi (maturation, glycosylation), formation de vésicules d'exocytose, fusion avec membrane cytoplasmique.

Tout blocage de fusion de vésicule devrait conduire à leur accumulation, tout blocage de formation (bourgeoisement) devrait conduire à leur disparition.

Question A3: (2 points)

L'attribution du prix Nobel de la chimie à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka en 2012 a été l'occasion de se pencher sur les récepteurs à 7 segments transmembranaires. Il s'agit d'une des deux grandes classes de récepteurs membranaires. Quelle est l'autre classe de récepteur membranaire? Comment est-ce qu'elle fonctionne et quelles sont leurs protéines partenaires?

Récepteurs couplés à une tyrosine kinase; dimérisation (ou changement de conformation avec réorientation) lors de la fixation du ligand, autophosphorylation, ensuite phosphorylation de substrats, utilisation de protéines adaptatrices (avec domaines SH3 et SH2), exemple MAPK

=====

Exercice B1 (7 points)

1) Pourquoi dans cette expérience s'intéresse-t-on à cdk2 et à la cycline E ?

2) rappelez le principe d'une expérience d'immunoprécipitation (un schéma peut vous y aider), et analysez les résultats de l'expérience.

3) Pourquoi mesure-t-on la phosphorylation de Rb, et que concluez-vous sur le fonctionnement de cdk2 et cycline E en présence de DAP?

4) A quelle catégorie de protéines appartient p21, et que pouvez-vous dire de sa fonction d'après les résultats de l'expérience? (h)

5) Pour confirmer que les cellules A2780 s'accumulent bien en phase G1, on peut mettre en évidence l'accumulation de la cycline E par western-blot, comme ci-dessus. **Proposez une autre méthode utilisant un anticorps anti-cycline E qui permettra de préciser la présence et la localisation de cette cycline dans les cellules. Décrivez-en les principales étapes, et expliquez le but de chacune.**

=====

Exercice B2 (5 points)

Q1. Quel serait le récepteur impliqué dans l'effet sur la viabilité observé ? (justifiez)

Q2. D'après cette figure quel est le type de mort cellulaire impliqué dans l'effet de 500 μ M d'ATP ? Justifiez

Q3. Pouvez vous préciser la voie de mort sachant que l'activation de la caspase 8 (qui n'est pas montré dans la figure 2A) est un peu plus tardive que la 3 ? Justifiez

Q 4. A partir de cette figure, proposez un mécanisme de signalisation intracellulaire induit par l'activation du récepteur P2X7. Quelles informations nous apporte la figure 3B ?