

**Université Paris Sud - Faculté des Sciences**

Date: 8.1.2019	Unité d'enseignement EN188: <b>Dynamique cellulaire (L3S5)</b>
Année: 2018/2019	Durée: 2h

Les parties A, et B sont à composer sur des feuilles séparées. Notez le numéro d'anonymat sur chaque feuille.

**Partie A** Temps conseillé : 1h, 10 points sur 20

**Question A1** (2,5 points): De nombreuses voies de signalisation utilisent des récepteurs à 7 segments transmembranaires. Décrivez les caractéristiques de ces récepteurs (structure globale, interaction avec d'autres molécules de la chaîne de signalisation) et leur mécanisme d'action en incluant la première protéine de la chaîne de signalisation et donnez un exemple.

**Question A2** (2 points): Certains récepteurs à 7 segments transmembranaires provoquent une augmentation transitoire de la concentration du calcium dans le cytosol. D'où vient ce calcium, comment est-ce qu'il entre dans le cytosol et comment est-ce qu'il sort quand la stimulation s'arrête?

**Question A3** (1 point): Quelles caractéristiques des filaments intermédiaires les distinguent des filaments d'actine et des microtubules?

**Question A4** (1,5 points):

L'AMP-PNP est un analogue non-hydrolysable de l'ATP. Quelle protéine du cytosquelette devrait interagir avec l'AMP-PNP et quelle conséquence attendez-vous?

La bactérie E coli exprime la protéine ParM qui forme des filaments ressemblant au cytosquelette des eucaryotes. Afin de caractériser ParM des chercheurs ont analysé le rôle de l'ATP dans la polymérisation de ParM (Moller-Jensen EMBO J 2002). Ils ont incubé 5  $\mu\text{M}$  ParM (monomérique) purifié dans un tampon pendant 60s. Ensuite, ils ont ajouté 500  $\mu\text{M}$  de nucléotides, ADP ou ATP ou ATP $\gamma$ S (un analogue non-hydrolysable de l'ATP). Ils ont enregistré la diffusion de lumière (light scattering) pendant 400 s. Les polymères de ParM sont responsables de cette diffusion de lumière, les monomères ne donnent pas de signal dans cette technique. La figure ci-dessous montre l'évolution de la diffusion de lumière au cours du temps.

**Question A5** (1 point):

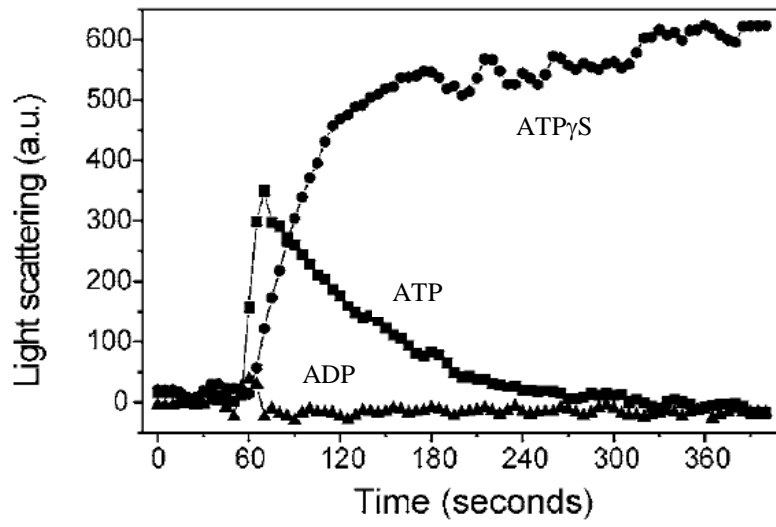
En comparant les courbes obtenues avec ATP versus ADP qu'est-ce que vous pouvez déduire sur le processus de polymérisation de ParM?

**Question A6** (1 point):

La courbe avec ATP $\gamma$ S est différente de celle obtenu avec ATP, pourquoi?

**Question A7** (0,5 point):

La pente initiale de la courbe "ATP" est plus fort que celle de la courbe ATP $\gamma$ S, pourquoi?

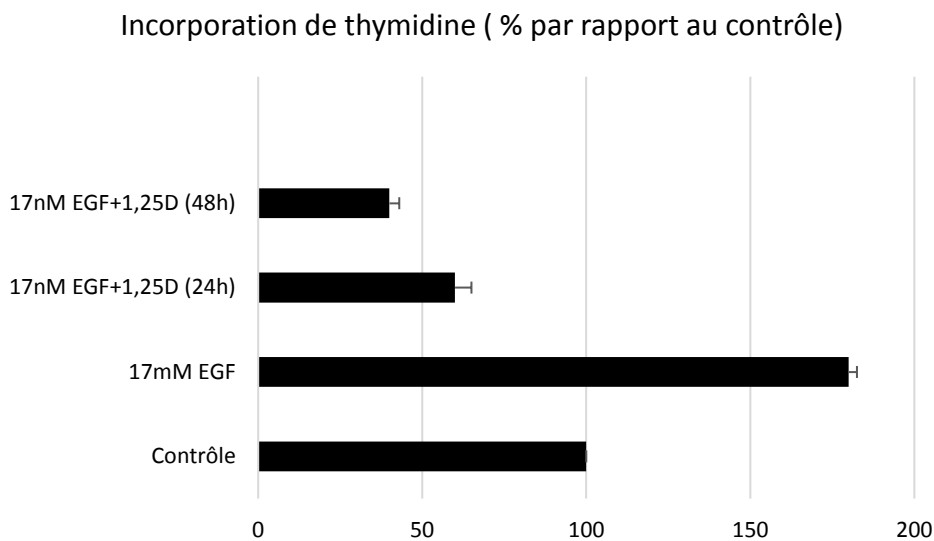


**Question A8** (0,5 point):  
 La courbe "ATP" n'atteint pas le même maximum que la courbe ATP $\gamma$ S, pourquoi?

**Partie B TD/TP** Temps conseillé : 1h, 10 points sur 20

Dans une étude parue dans la revue *Journal of Biochemistry*, des chercheurs ont étudié l'action de la vitamine D sur une lignée de cellules de l'épiderme.

Dans un premier temps, ils ont traité les cellules avec ou sans 1,25 dihydroxyvitamine D (1,25D) (100nM), pendant 24h ou 48h, puis ils ont stimulé ou non de l'EGF (17nM). A la fin du traitement, les cellules ont été incubées avec de la thymidine tritiée pendant 4h. Les cellules ont ensuite été lysées et les macromolécules précipitées par l'acide trichloracétique. La radioactivité associée à ces macromolécules est alors mesurée. La figure 1 présente l'incorporation de thymidine tritiée en pourcentage par rapport au contrôle non traité (sans EGF et sans 1,25D).



**Figure 1** : Incorporation de thymidine tritiée en pourcentage par rapport au contrôle non traité (sans EGF et sans 1,25D).

**Q1 - Quelle est la fonction évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive ? 0,5 point**

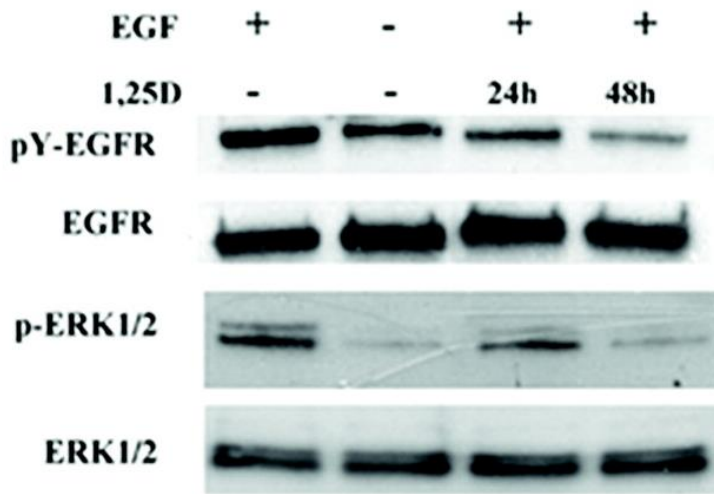
**Q2- Quelles informations sur celle-ci vous apportent l'expérience présentée figure 1 ? 1 point**

Les chercheurs ont ensuite cherché à savoir comment pouvait s'exercer l'effet de la 1,25 dihydroxyvitamine D sur les cellules.

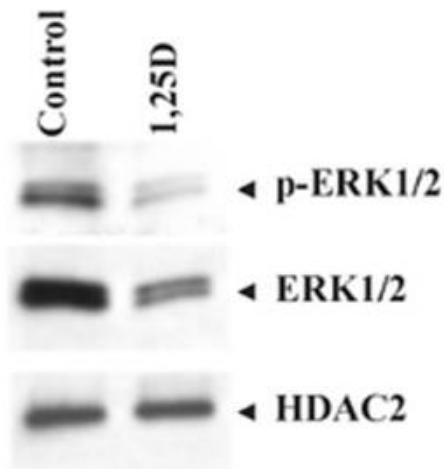
Dans une première expérience, les cellules ont été traitées ou non avec la 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 24h ou 48h puis, à la fin du traitement, incubées 20 minutes en présence ou en absence d'EGF. Après lyse des cellules, des extraits protéiques ont été préparés et les protéines soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les protéines ont été ensuite transférées sur membrane et une immunodétection a été effectuée à l'aide de différents anticorps : anti-EGFR, anti-phosphotyrosine (pY) de l'EGFR, anti-ERK et anti-forme phosphorylée d'ERK (p-ERK1/2) (Figure 2).

Dans une autre expérience des extraits protéiques nucléaires ont été préparés après traitement des cellules avec ou sans 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 48h puis, incubation 20 minutes

en présence d'EGF. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, une immunodétection a été effectuée à l'aide de différents anticorps anti-ERK, anti-forme phosphorylée d'ERK (p-ERK1/2) et anti-HDAC2 (Histone Déacétylase 2) (Figure 3)



**Figure 2 :** Immunodétection de l'EGFR et des MAPKinases : ERK (1 et 2) ainsi que de leurs formes phosphorylées. Les cellules ont été traitées sans (-) ou avec (+) 1,25D pendant 24h ou 48h puis incubées avec (+) ou sans (-) EGF pendant 20 minutes.



**Figure 3 :** Immunodétection des protéines ERK (1 et 2) et de leurs formes phosphorylées, ainsi que de la protéine HDAC2. Les cellules ont été traitées avec (+) ou sans 1,25D puis incubées avec de l'EGF

**Q3- Quel est l'effet du traitement des cellules à l'EGF sur l'EGFR et ERK d'après la figure 2 ? 0,5 point**

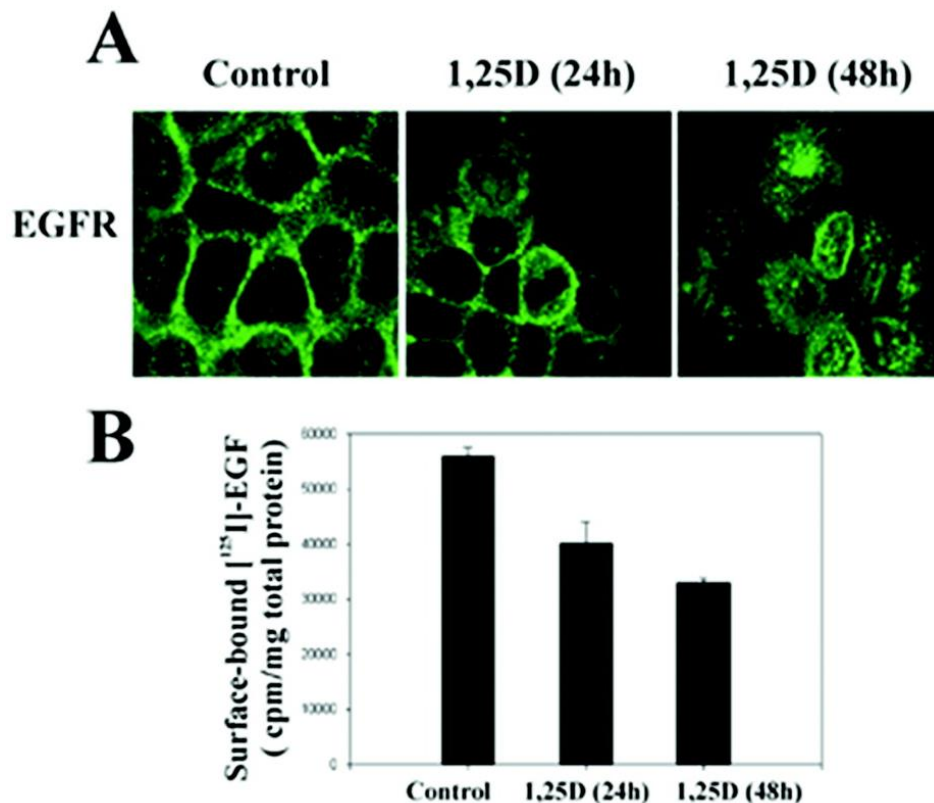
**Q4- En vous appuyant sur vos connaissances, détaillez le mécanisme d'activation de l'EGFR par son ligand? 1 point**

**Q5- Quel est l'effet du traitement des cellules à la 1,25 dihydroxyvitamine D sur l'EGFR et ERK d'après la figure 2 ? 1 point**

**Q6-Décrivez la figure 3. Quel est l'intérêt de l'immunodétection de la protéine HDAC2 ? Quel(s) renseignement(s) supplémentaire(s), par rapport à la figure 2, nous apporte l'expérience présentée figure 3 ?1,5 point**

**Q7- A l'aide de vos connaissances, détaillez la voie de signalisation du récepteur EGFR qui implique les protéines ERK et conduit à la fonction évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive (un schéma accompagnera votre explication)? 2 points**

Afin de comprendre l'effet de la 1,25 dihydroxyvitamine D sur la voie de signalisation EGFR, les cellules ont été traitées avec celle-ci pendant 24h et 48h. Une expérience d'immunofluorescence a ensuite été faite sur les cellules pour mettre en évidence l'EGFR (figure 3A). Les chercheurs ont ensuite évalué la quantité d'EGF liée à la surface des cellules en utilisant de l'EGF marqué. Ces cellules ont été traitées ou non avec de la 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 24 ou 48h (Figure 3B).



**Figure 3 :** A / Immunodétection de l'EGF dans des cellules traitées ou non (contrôle) par la 1,25D. B/ Quantité d'EGF marqué à la surface de cellules traitées ou non (contrôle) par la 1,25D.

**Q8- Une immunofluorescence permet de détecter EGFR dans la figure 3A. Quelle autre type d'expérience auriez-vous pu faire pour détecter la localisation d'une version de ce récepteur dans les cellules en présence ou en absence de 1.25D ? 1 point**

**Q9- Quel est l'effet de la 1,25D sur la localisation du récepteur dans la cellule d'après la figure 3 (A et B) ? 1 point**

**Q10- D'après ces résultats pouvez-vous expliquer les effets de la 1,25D sur la signalisation du récepteur ? 0,5 point**

## Réponses attendues partie A:

**Question A1** (2,5 points): De nombreuses voies de signalisation utilisent des récepteurs à 7 segments transmembranaires. Décrivez les caractéristiques de ces récepteurs (structure globale, interaction avec d'autres molécules de la chaîne de signalisation) et leur mécanisme d'action en incluant la première protéine de la chaîne de signalisation et donnez un exemple.

Protéines de la membrane plasmique avec un domaine extracellulaire (N-terminus) qui fixe le ligand, 7 segments transmembranaires, 3 boucles intracellulaires et un C-terminus intracellulaire. Après interaction avec le ligand, le récepteur active une protéine G hétérotrimérique, composé de sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . A l'état de repos, les 3 sous-unités forment un complexe, la sous-unité  $\alpha$  porte un GDP. Lors de l'activation la sous-unité  $\alpha$  libère le GDP qui sera très rapidement remplacé par un GTP ce qui donne une conformation active à la sous-unité  $\alpha$ .  $\alpha$ -GTP se sépare des sous-unités  $\beta\gamma$  qui restent ensemble.  $\alpha$ -GTP va activer des effecteurs. Elle possède une activité de GTPase qui va hydrolyser le GTP et ainsi auto-inactiver la  $\alpha$ -GTP. Suite à cette autoinactivation, les 3 sous-unités se réunissent de nouveau. La famille des récepteurs à 7 segments transmembranaires comporte de centaines de récepteurs différents et la famille de protéines G comporte 16 membres chez l'homme.

**Question A2** (2 points): Certains récepteurs à 7 segments transmembranaires provoquent une augmentation transitoire de la concentration du calcium dans le cytosol. D'où vient ce calcium, comment est-ce qu'il entre dans le cytosol et comment est-ce qu'il sort quand la stimulation s'arrête?

Stimulation de la phospholipase C par la protéine G, production d'IP3 et DAG par la PLC. IP3 diffuse dans cytosol, active un récepteur-canal (R-IP3) dans la membrane du RE. Ce récepteur libère du calcium du RE. Ensuite un mécanisme d'entrée de calcium de l'extérieur est déclenché utilisant la protéine STIM de la membrane du RE qui active un canal, Orai, dans la membrane plasmique. Il y a des pompes (ATPases) dans la membrane du RE et dans la membrane plasmique qui vont faire sortir le calcium du cytosol.

**Question A3** (1 point): Quelles caractéristiques des filaments intermédiaires les distinguent des filaments d'actine et des microtubules?

Symétrie, donc pas de polarité; pas d'activité enzymatique (ATPase ou GTPase); pas de moteur moléculaire; plus stable/polymérisation et dépolymérisation plus lente.

**Question A4** (1,5 points):

L'AMP-PNP est un analogue non-hydrolysable de l'ATP. Quelle protéine du cytosquelette devrait interagir avec l'AMP-PNP et quelle conséquence attendez-vous?

Actine; actine-ATP polymérise (pas actine ADP); hydrolyse d'ATP par l'actine est important pour la dépolymérisation; l'AMP-PNP va favoriser la polymérisation et empêcher la dépolymérisation; croissance des filaments d'actine jusqu'à l'épuisement des réserves en G-actine

La bactérie E coli exprime la protéine ParM qui forme des filaments ressemblant au cytosquelette des eucaryotes. Afin de caractériser ParM des chercheurs ont analysé le rôle de l'ATP dans la polymérisation de ParM (Moller-Jensen EMBO J 2002). Ils ont incubé 5  $\mu\text{M}$  ParM (monomérique) purifié dans un tampon pendant 60s. Ensuite, ils ont ajouté 500  $\mu\text{M}$  de nucléotides, ADP ou ATP ou ATP $\gamma\text{S}$  (un analogue non-hydrolysable de l'ATP). Ils ont enregistré la diffusion de lumière (light scattering) pendant 400 s. Les polymères de ParM sont responsables de cette diffusion de lumière, les monomères ne donnent pas de signal dans cette technique. La figure ci-dessous montre l'évolution de la diffusion de lumière au cours du temps.

**Question A5** (1 point):

En comparant les courbes obtenues avec ATP versus ADP qu'est-ce que vous pouvez déduire sur le processus de polymérisation de ParM?

La polymérisation de ParM ne fonctionne pas avec l'ADP mais avec l'ATP. Similaire à l'actine. La polymérisation est transitoire suggérant que l'ATP est consommé rapidement par ParM et les filaments se dépolymérisent quand l'ATP est consommé.

**Question A6** (1 point):

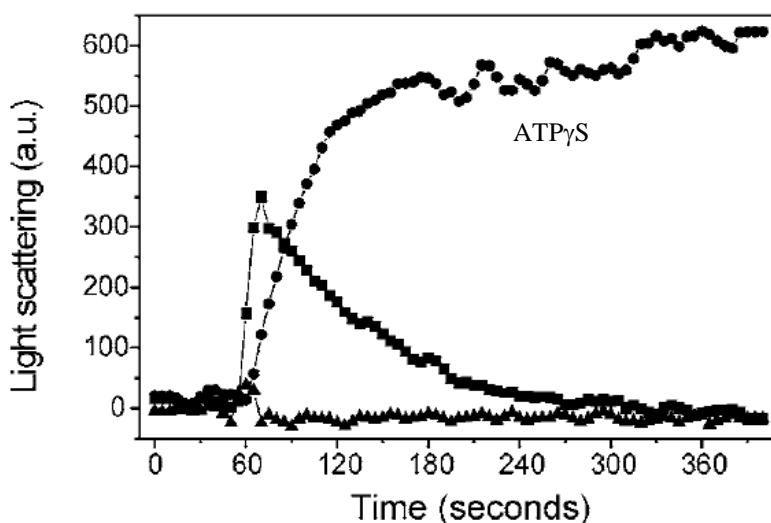
La courbe avec ATP $\gamma\text{S}$  est différente de celle obtenu avec ATP, pourquoi?

Contrairement à l'ATP l'ATP $\gamma\text{S}$  n'est pas hydrolysable, donc les polymères formés restent stables. On atteint peut-être une polymérisation maximale limitée par la concentration en ParM.

**Question A7** (0,5 point):

La pente initiale de la courbe "ATP" est plus forte que celle de la courbe ATP $\gamma\text{S}$ , pourquoi?

L'ATP pourrait avoir une meilleure affinité pour ParM que ATP $\gamma\text{S}$  et donc déclencher plus rapidement la polymérisation.



**Question A8** (0,5 point):

La courbe "ATP" n'atteint pas le même maximum que la courbe ATP $\gamma\text{S}$ , pourquoi?

La dépolymérisation et l'hydrolyse d'ATP sont très rapide et démontent les filaments avant la polymérisation maximale atteinte avec ATP $\gamma\text{S}$

## Réponses attendues partie B:

**Q1 - Quelle est la fonction évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive ? 0.5 point**  
**Incorporation de la désoxythymidine phosphate spécifiquement dans l'ADN si celui-ci est en cours de synthèse donc durant la phase S. Si les cellules répliquent leur ADN, elles vont ensuite se diviser. Evaluation indirecte de la prolifération cellulaire**

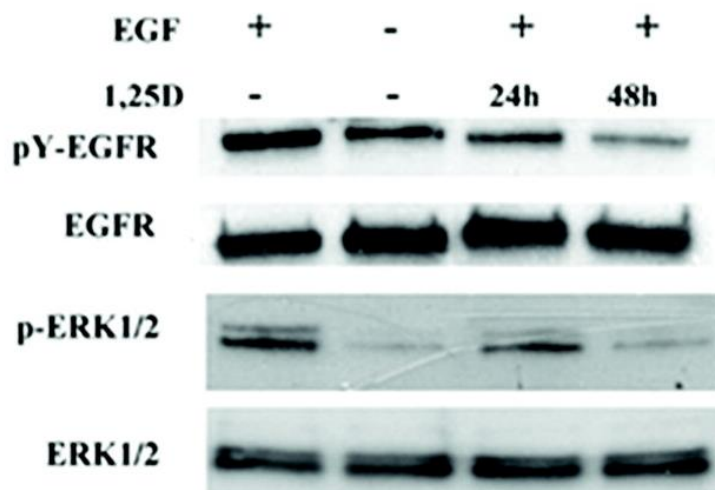
**Q2- Quelles informations sur celle-ci vous apportent l'expérience présentée figure 1 ? 1 point**

**Incorporation de thymidine tritié est augmentée en présence d'EGF. Cet effet est annulé par l'ajout de vitD. Donc l'EGF favorise la prolifération, son action est empêchée par l'ajout de vitD**

Les chercheurs ont ensuite cherché à savoir comment pouvait s'exercer l'effet de la 1,25 dihydroxyvitamine D sur les cellules.

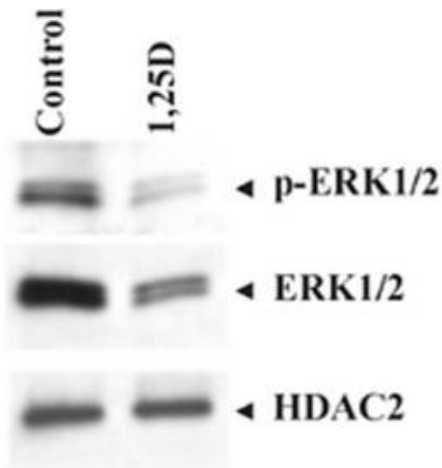
Dans une première expérience, les cellules ont été traitées ou non avec la 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 24h ou 48h puis, à la fin du traitement, incubées 20 minutes en présence ou en absence d'EGF. Après lyse des cellules, des extraits protéiques ont été préparés et les protéines soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les protéines ont été ensuite transférées sur membrane et une immunodétection a été effectuée à l'aide de différents anticorps : anti-EGFR, anti-phosphotyrosine (pY) de l'EGFR, anti-ERK et anti-forme phosphorylée d'ERK (p-ERK1/2) (Figure 2).

Dans une autre expérience des extraits protéiques nucléaires ont été préparés après traitement des cellules avec ou sans 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 48h puis, incubation 20 minutes en présence d'EGF. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, une immunodétection a été effectuée à l'aide de différents anticorps anti-ERK, anti-forme phosphorylée d'ERK (p-ERK1/2) et anti-HDAC2 (Histone Déacétylase 2) (Figure 3)



**Figure 2 :** Immunodétection de l'EGFR et des MAPKinases : ERK (1et 2) ainsi que de leurs formes phosphorylées. Les cellules ont été traitées sans (-) ou avec (+) 1,25D pendant 24h ou 48h puis incubées avec (+) ou sans (-) EGF pendant 20 minutes.





**Figure 3** : Immunodétection des protéines ERK (1 et 2) et de leurs formes phosphorylées, ainsi que de la protéine HDAC2. Les cellules ont été traitées avec (+) ou sans 1.25D puis incubées avec de l'EGF

**Q3- Quel est l'effet du traitement des cellules à l'EGF sur l'EGFR et ERK d'après la figure 2 ? 0.5 point**

**En présence d'EGF, il y a autant protéine EGFR que sans traitement des cellules par l'EGFP ; idem pour ERK ½. La phosphorylation de l'EGFR sur les résidus tyrosine, mis en évidence par l'Ac anti-PY de l'EGFR est augmentée ainsi que la phosphorylation de ERK ½ mise en évidence par l'Ac anti-phospho ERK**

**Q4- En vous appuyant sur vos connaissances, détaillez le mécanisme d'activation de l'EGFR par son ligand? 1 point**

**-Fixation du ligand/ Dimérisation de EGFR/ augmentation de l'activité kinase du récepteur et transphosphorylation des monomères au niveau de résidus tyrosine**

**Q5- Quel est l'effet du traitement des cellules à la 1,25 dihydroxyvitamine D sur l'EGFR et ERK d'après la figure 2 ? 1 point**

**Le traitement à la vit D ne modifie pas la quantité des 2 protéines mais modifie la phosphorylation : moins d'EGFR et de ERK1/2 phosphorylées lorsque les cellules ont été traitées avec la vitD, signal plus faible avec l'EGFR que pour le contrôle (sans EGF). Cette effet est plus visible après 48h de traitement qu'après 24h de traitement à la vit D**

**Q6-Décrivez la figure 3. Quel est l'intérêt de l'immunodétection de la protéine HDAC2 ? Quel(s) renseignement(s) supplémentaire(s), par rapport à la figure 2, nous apporte l'expérience présentée figure 3 ? 1,5 point**

**La figure 3 montre la quantité d'ERK1/2 et d'ERK1/2 phosphorylé dans le noyau. 48h de traitement avec la vitD diminue ces 2 quantités. L'immunodétection avec HDAC2 est un témoin de charge. C'est une protéine nucléaire.**

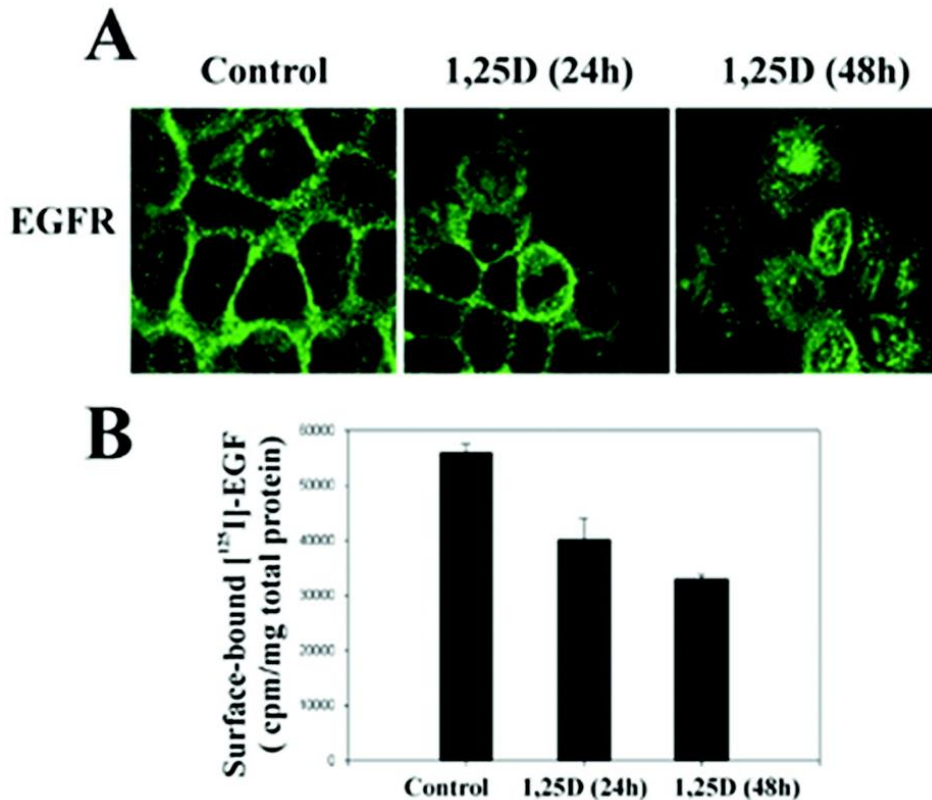
**La figure 3 nous apprend qu'en présence de vitD, ERK transloque moins au noyau.**

**Q7- A l'aide de vos connaissances, détaillez la voie de signalisation du récepteur EGFR qui implique les protéines ERK et conduit à la fonction évaluée par l'incorporation de thymidine radioactive (un schéma accompagnera votre explication)? 2 points**

**Liaison de l'EGFR phosphorylé par des protéines à domaine SH2 (lie les P-Y) comme GRB2. GRB2, protéine adaptatrice lie SOS, GEF pour RAS. RAS activée va stimuler la voie des MAPK kinases, d'abord la MAPKKK. Celle-ci va phosphoryler la MAPKK puis la MAPK (ERK par ex). ERK/MAPK se dimérise et transloque au noyau ou elle va phosphoryler des facteurs de transcription impliqués dans la reprise du cycle cellulaire**

Afin de comprendre l'effet de la 1,25 dihydroxyvitamine D sur la voie de signalisation EGFR, les cellules ont été traitées avec celle-ci pendant 24h et 48h. Une expérience d'immunofluorescence a ensuite été faite sur les cellules pour mettre en évidence l'EGFR

(figure 3A). Les chercheurs ont ensuite évalué la quantité d'EGF liée à la surface des cellules en utilisant de l'EGF marqué. Ces cellules ont été traitées ou non avec de la 1,25 dihydroxyvitamine D pendant 24 ou 48h (Figure 3B).



**Figure 3 :** A / Immunodétection de l'EGFR dans des cellules traitées ou non (contrôle) par la 1,25D. B/ Quantité d'EGF marqué à la surface de cellules traitées ou non (contrôle) par la 1,25D.

**Q8-** Une immunofluorescence permet de détecter EGFR dans la figure 3A. Quelle autre type d'expérience auriez-vous pu faire pour détecter la localisation d'une version de ce récepteur dans les cellules en présence ou en absence de 1.25D ? **1 point**

**Transfection d'une version étiquetée GFP de ce récepteur dans les cellules**

**Q9-** Quel est l'effet de la 1,25D sur la localisation du récepteur dans la cellule d'après la figure 3 (A et B) ? **1 point**

**FigA :** EGFR présent au niveau de la membrane plasmique des cellules sans traitement à la vit D. Le traitement à la vit D montre, notamment après 48h de traitement, une localisation dans des compartiments intracellulaires et moins à la membrane plasmique

**FigB :** La quantité d'EGF marqué lié à la surface des cellules diminue suite au traitement à la vitD. Ce qui suggère qu'il y a moins de récepteur à la membrane plasmique comme visualisé dans l'immunodétection

**Q10-** D'après ces résultats pouvez-vous expliquer les effets de la 1,25D sur la signalisation du récepteur ? **0.5 points**

**La vitamine D provoque l'internalisation de l'EGFR, il y a donc moins d'EGF qui peut se lier au récepteur en surface et activer les récepteurs et la voie de signalisation qui en découle.**