

Licence Sciences de la Vie - L2 S4  
2008 - 2009

**TD**

Biologie Moléculaire de la Cellule 2

Polycopié à apporter en TD

## Quelques rappels importants

**Les TP sont obligatoires** : l'unité de Biologie Cellulaire ne pourra pas être validée sans note de TP. **Une absence devra être justifiée par un certificat médical.**

**Sauf raison exceptionnelle dûment signalée avant la séance, aucun étudiant ne pourra changer de groupe de TD ou de TP.**

**La séance de TP devra être préparée à l'avance** : référez-vous aux instructions données à la fin de l'énoncé de TP (§ « préparation du TP et compte-rendu »)

**Le port de la blouse est obligatoire en TP.**

## Enseignants de TD et TP de Biologie Moléculaire de la Cellule 2

Yannick AZOU (MC) : azou@ibdml.univ-mrs.fr  
Myriam BARATIN (MC) : baratin@ciml.univ-mrs.fr  
Nicolas BERTRAND (MC) : nbertran@ibdm.univ-mrs.fr  
Julie CHAIX (monitrice) : chaix@ciml.univ-mrs.fr  
Frédérique FORQUET (MC) : forquet@ciml.univ-mrs.fr  
Cyril-Léopold KURZ (MC) : kurz@ciml.univ-mrs.fr  
Romain LEVAYER (moniteur) : levayer@ibdml.univ-mrs.fr  
Jonathan LUCHINO (moniteur) : luchino@ibdml.univ-mrs.fr  
Ana REYNDERS (monitrice) : reynders@ciml.univ-mrs.fr  
Thomas RIVAL (MC) : rival@ibdm.univ-mrs.fr  
Arnauld SERGE (MC) : serge@ciml.univ-mrs.fr

## Programme des enseignements

<b>TD</b>	<b>Titre</b>	<b>Responsable</b>	<b>Enseignants</b>
1	Jonction et adhérence	Arnauld SERGE	Yannick AZOU, Romain LEVAYER, Jonathan LUCHINO
2	Cytosquelette	Nicolas BERTRAND	Yannick AZOU, Thomas RIVAL, Nicolas BERTRAND
3	Signalisation	Myriam BARATIN	Julie CHAIX, Jonathan LUCHINO
4	Cytométrie	Léo KURZ	Léo KURZ, Audrey ROMANO
5	Apoptose	Léo KURZ	Léo KURZ, Nicolas BERTRAND
<b>TP</b>			
1	Culture cellulaire	Thomas RIVAL	Thomas RIVAL, moniteurs
2	Actine et microscopie	Arnauld SERGE	Arnauld SERGE, moniteurs
3	Organisation tissulaire	Yannick AZOU	Yannick AZOU, Ana REYNDERS

Molécules de Jonction et d'Adhérence Cellulaire

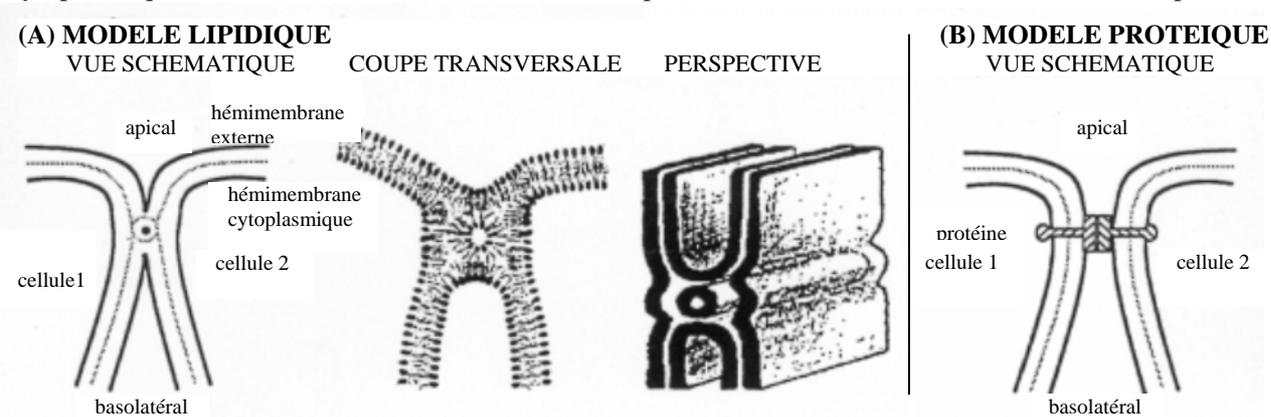
**Exercice 1 : Nature de la barrière épithéliale**

Un épithélium est constitué d'une couche de cellules établissant entre elles des files de jonctions serrées. Ces jonctions serrées établissent une barrière étanche entre le milieu extracellulaire apical et le milieu extracellulaire basal.

La formation des jonctions serrées nécessite la présence de calcium. Il y a quelques années, deux modèles étaient débattus, pour expliquer la structure de ces jonctions étanches :

- 1° modèle : le modèle lipidique (fig. 1A), fondé sur des observations de cryodécapage en microscopie électronique, soutient que chaque file de fermeture dans une jonction étanche résulte d'une fusion de membrane, qui forme un cylindre de lipides au point de fusion. Ce modèle prévoit que les lipides de l'hémimembrane cytoplasmique sont capables de diffuser librement entre les faces apicale et basolatérale, et que les lipides de l'hémimembrane externe sont restreints soit à la face apicale, soit à la face basolatérale (étant donné que les cylindres de lipides interrompent l'hémimembrane externe, et empêchent la diffusion à travers elle).

- 2° modèle : le modèle protéique (fig. 1B) soutient que chaque file dans une jonction étanche est formée d'une chaîne de protéines transmembranaires, dont les domaines extracellulaires se lient les uns aux autres, pour rendre le feuillet épithélial hermétique. Ce modèle prévoit que les lipides de l'hémimembrane cytoplasmique et de l'hémimembrane externe sont capables de diffuser librement entre les faces apicales et



basolatérale.

On cherche à trancher entre ces deux modèles. On dispose d'une lignée de cellules de rein de chien, qui forment un épithélium extrêmement serré, avec des faces apicales et basolatérale bien définies. Après infection de ces cellules par le virus de la grippe, ces cellules vont exprimer une protéine fusogène uniquement à leur face apicale. Cette caractéristique permet de faire fusionner spécifiquement, et de manière très efficace, des liposomes avec la face apicale des cellules infectées, après une brève exposition à un pH bas qui active la protéine fusogène. De cette manière, on peut ajouter à la face apicale des liposomes portant un marqueur fluorescent, et détecter leur migration si elle est permise vers la face basolatérale en microscopie à fluorescence.

Grâce à ces outils, on réalise l'expérience suivante. On prépare des liposomes contenant des lipides fluorescents uniquement dans l'hémimembrane externe. Ces liposomes sont ensuite fusionnés avec un épithélium dans lequel environ la moitié des cellules ont été infectées par le virus. En faisant varier le plan focal du microscope, on examine la fluorescence des faces apicales et basolatérales. En tant que contrôle, on élimine le calcium du milieu, ce qui interrompt les jonctions étanches et on réexamine la face basolatérale. Les résultats sont présentés fig2.

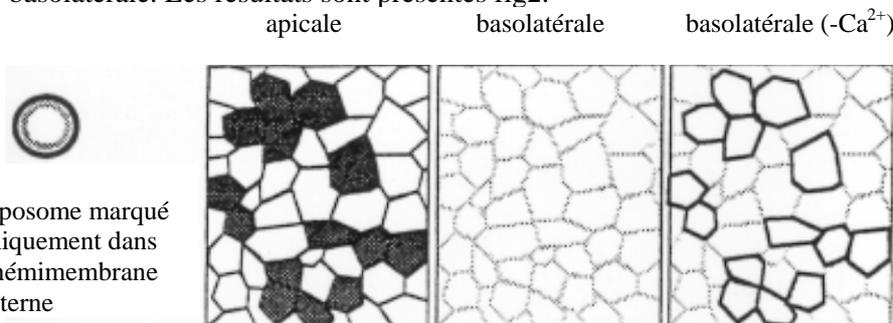
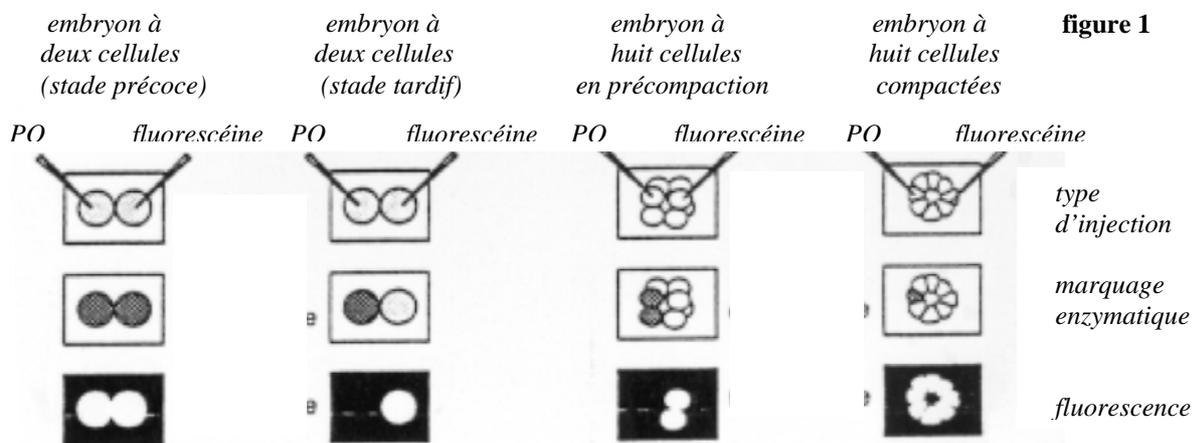


fig2 : Dans chaque expérience, seule la moitié des cellules environ étaient infectées par le virus. Dans les conditions du protocole expérimental, seules les cellules infectées sont capables de fusionner aux liposomes marqués.

- 1) D'après l'image de la face apicale, quel modèle est soutenu par cette expérience ?
- 2) Que montrent les images de la face basolatérale en présence et en absence de calcium, sur la diffusion de composés dans le plan de la membrane ?

## Exercice 2 : Jonctions cellulaires et communication cytoplasmique

Les oeufs de souris fécondés se divisent tout d'abord très lentement. Ils atteignent le stade 2 cellules en 24 heures environ, et le stade 8 cellules en 48 heures. Au stade 8 cellules, ils subissent un processus appelé compaction, illustré sur la fig1. Bien que le mécanisme n'en soit pas clair, les cellules semblent adhérer plus fortement les unes aux autres ; par conséquent le massif de cellules associées de façon lâche devient une boule de cellules étroitement liées. Vous souhaitez savoir quel type de jonctions intercellulaires est présent avant et après ce changement dans l'adhérence. Afin d'étudier cette question, vous utilisez de très fines micropipettes de verre, qui vous permettent de mesurer des modifications électriques, et d'injecter en même temps un enzyme la peroxydase (PO de masse moléculaire 40 000 daltons) ou un marqueur fluorescent la fluorescéine (de masse moléculaire 330 daltons). La fluorescéine émet une lumière jaune vif sous illumination aux UV, et la peroxydase peut être détectée en fixant les cellules et en les incubant avec des substrats appropriés. Vous injectez les deux substances marqueurs dans une seule cellule, dans des embryons aux stades « 2 cellules précoce », « 2 cellules tardif », « 8 cellules en précompaction » et « 8 cellules compactées ». Puis, vous analysez la propagation éventuelle de chacun de ces marqueurs aux cellules voisines. Les résultats sont donnés fig1.



- 1°) Quels types de jonctions cellulaires ces expériences mettent-elles en évidence ? Précisez à quel(s) stade(s) du développement chaque type est observé.
- 2°) A quel(s) stade(s) du développement, détecterait-on un couplage électrique si l'on injectait un courant par l'électrode d'injection de la PO, et que l'on enregistrait les modifications du voltage avec l'électrode d'injection de la fluorescéine ?
- 3°) A quoi peut être dû la compaction de l'embryon au stade 8 cellules ?
- 4°) Expliquez quelle est la structure de chaque type de jonction cellulaire mis en évidence ici, et comparez leurs propriétés.

## Exercice 3 : Adhérence cellule - substrat

La fibronectine est une grande glycoprotéine qui entre dans la composition de la matrice extracellulaire. Elle contient sur sa longueur plusieurs domaines de liaison ; l'un d'eux se lie à des récepteurs à la fibronectine à la surface cellulaire. La fibronectine peut faire adhérer des cellules à des surfaces auxquelles elles ne se lieraient pas autrement, tel qu'un support plastique. Ceci fournit un test simple pour identifier la partie de la molécule reconnue par le récepteur à la fibronectine.

Un support de culture en plastique est recouvert de fibronectine ou autre protéine. Une suspension de cellules est alors ajoutée, et laissée incuber 30 min. Enfin, le support est lavé et le nombre de cellules adhérentes est compté :

- a) aucune cellule n'adhère sur plastique nu
- b) 80 à 90% des cellules adhèrent en présence de fibronectine
- c) la sérumalbumine adhère au plastique mais ne permet pas l'adhérence des cellules
- d) Un segment de fibronectine de 108 a.a. (situé aux trois quarts environ de la longueur de la molécule, depuis l'extrémité N-terminale) n'adhère pas au plastique. Toutefois, si ce segment est couplé chimiquement

à la sérumalbumine (par un pont disulfure entre deux résidus cystéines), alors l'hybride de protéines adhère au plastique et permet l'adhérence des cellules.

1°) Que déduisez-vous de ces observations ?

L'activité de divers peptides synthétiques correspondant à différentes portions du segment de 108 a.a. est alors analysée, pour localiser plus précisément la région active de la fibronectine. Deux types de tests sont menés :

Dans le premier test, des peptides sont attachés par liaison covalente, via un résidu cystéine, au plastique recouvert de sérumalbumine, et on teste leur capacité à promouvoir l'adhérence des cellules. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Dans le second test, les boîtes de plastique sont revêtues de fibronectine native, et les cellules sont incubées pendant 30 min dans les boîtes, en présence des peptides synthétisés indiqués dans le tableau suivant. Les boîtes sont lavées, et le nombre de cellules ayant adhéré est compté. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 1**

Peptide	Séquence	Concentration nécessaire pour un attachement de 50% des cellules (nmol/mL)
Fibronectine		0,10
Peptide 1	YAVTGRGDSPASSKPI(SINYRTEIDKPSQM)(C)	0,25
Peptide 2	YAVTGRGDSPASSKPI(C)	1,6
Peptide 3	SINYRTEIDKPSQM(C)	>100
Peptide 4	VTGRGDSPA(C)	2,5
Peptide 5	SPASSKPI(C)	>100
Peptide 6	VTGRGD(C)	10
Peptide 7	GRGDS(C)	3,0
Peptide 8	RGDSPA(C)	6,0
Peptide 9	RVDSPA(C)	>100

Le (C) à l'extrémité C-terminale de chaque peptide indique la position du lien cystéine du peptide à la protéine porteuse

**Tableau 2**

Peptide	Séquence	Pourcentage de l'adhérence cellulaire de départ
Peptide 10	GRGDSPC	2,0
Peptide 11	GRGDAPC	1,9
Peptide 12	GKGDSPC	48
Peptide 13	GRADSPC	49
Peptide 14	GRGESPC	44
Aucun peptide		47

2°) Les 2 expériences utilisent différents essais pour détecter le segment de liaison aux cellules de la fibronectine. L'adhérence des cellules dans les boîtes signifie-t-elle la même chose dans les 2 essais?

3°) D'après les résultats des tableaux, déterminer la séquence en acides aminés reconnue par les cellules sur la fibronectine.

Un peptide contenant la séquence de la fibronectine requise pour l'adhérence des cellules a été couplé à la matrice d'une colonne de sépharose. Puis, les protéines de la membrane plasmique ont été solubilisées à l'aide de détergents et déposées sur la colonne. La colonne a ensuite été lavée, puis éluée en ajoutant au tampon de lavage soit un peptide GRGDSP, soit un peptide GRGESP. Une protéine de 140kDa est éluée en présence du peptide GRGDSP, mais pas en présence du peptide GRGESP.

4°) A quoi peut correspondre cette protéine ?

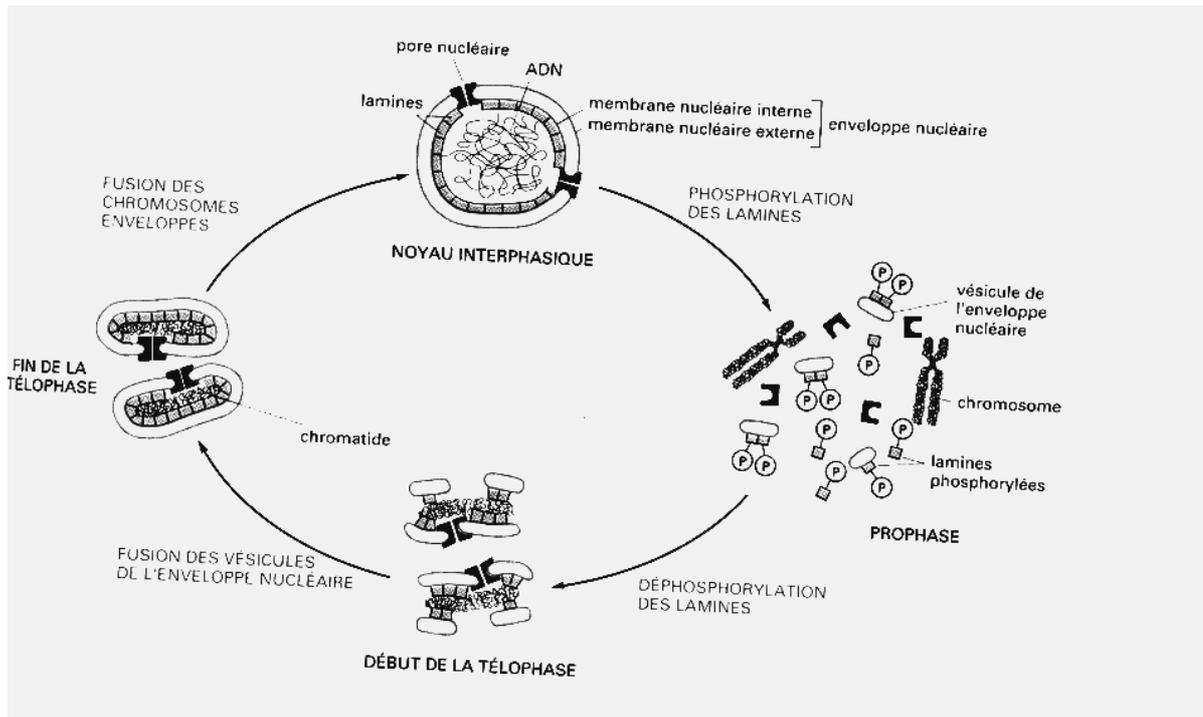
Le Cytosquelette
------------------

## Exercice n°1 : Phosphorylation des lamines

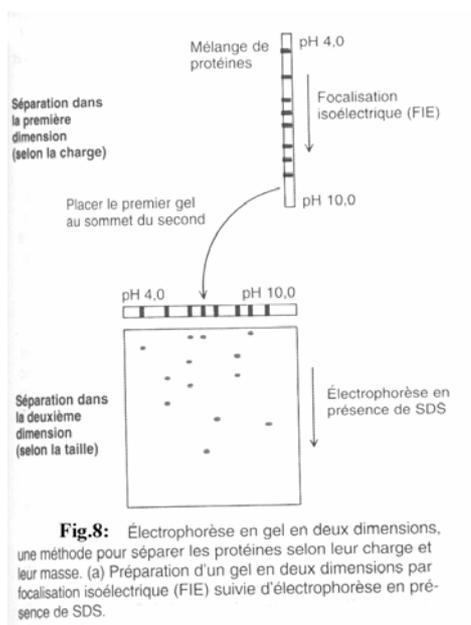
L'enveloppe nucléaire est renforcée par un réseau fibreux de lamines (la lamina nucléaire), qui soutient la membrane du côté nucléaire. Quand la cellule entre en mitose, la membrane nucléaire se fragmente et la lamina nucléaire se désassemble (**fig.7**). L'assemblage et le désassemblage de la lamina nucléaire pourraient être contrôlés par la phosphorylation réversible des lamines A, B et C, étant donné que les lamines de cellules en mitose portent significativement plus de phosphate que les lamines de cellules en interphase.

Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation, vous marquez des cellules avec de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine, puis vous purifiez les lamines A, B et C de cellules en mitose et de cellules en interphase. Vous analysez alors par électrophorèse bidimensionnelle sur gel (**fig.8**) chacune des lamines purifiées, et un mélange de lamines de cellules en mitose et en interphase (**fig.9A**). Vous traitez également des échantillons identiques par la phosphatase alcaline et vous les analysez de la même manière (**fig.9B**)

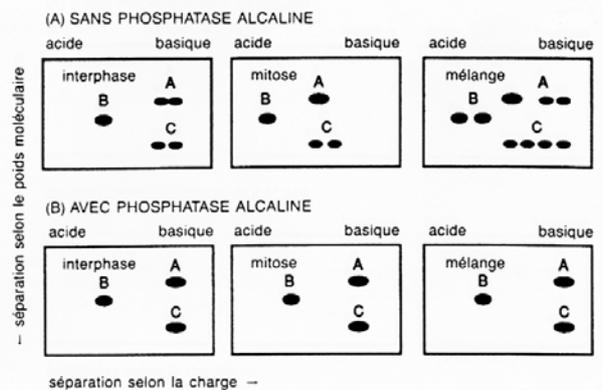
- A- Quelle est l'action de la phosphatase alcaline? Quel résultat donne le traitement à la phosphatase alcaline? Pourquoi?
- B- Pendant l'interphase, combien de groupements phosphate sont attachés aux lamines A, B et C? Combien sont attachés pendant la mitose? Comment pouvez-vous le dire?
- C- Pourquoi, dans les expériences destinées à mesurer des différences de phosphorylation, de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine a été utilisée, plutôt que du  $^{32}\text{P}$ -phosphate? En quoi les audiogrammes auraient-ils été différents si on avait utilisé du  $^{32}\text{P}$ -phosphate?
- D- Pensez-vous que ces résultats prouvent que le désassemblage des lamines au cours de la mitose est provoqué par leur phosphorylation réversible?



**Fig.7: Rupture et reformation de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose.** La phosphorylation des lamines à la prophase contribue à déclencher le désassemblage de la lamina nucléaire, ce qui à son tour amène l'enveloppe nucléaire à se morceler en vésicules. La déphosphorylation des lamines à la télophase contribue à inverser le processus.



**Fig.8:** Électrophorèse en gel en deux dimensions, une méthode pour séparer les protéines selon leur charge et leur masse. (a) Préparation d'un gel en deux dimensions par focalisation isoélectrique (FIE) suivie d'électrophorèse en présence de SDS.



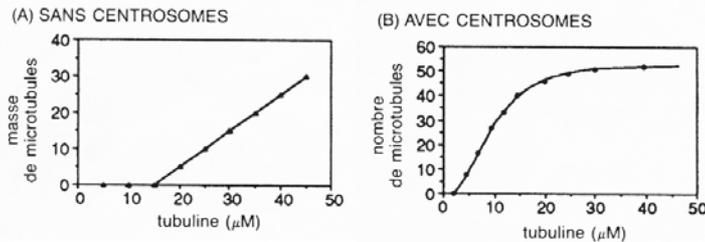
**Fig. 9:** Séparation bidimensionnelle des lamines nucléaires de cellules en interphase et en mitose  
(A) Pas de traitement par la phosphatase alcaline. (B) Traitement par la phosphatase alcaline. Les lettres indiquent les positions des lamines A, B, et C. Les lamines purifiées de cellules en interphase et en mitose ont été ajoutées pour donner le mélange. Les protéines acides sont chargées plus négativement ; les protéines basiques sont chargées plus positivement.

## Exercice n°2: Assemblage *in vitro* de la tubuline en microtubules

On pense que la fonction des microtubules repose sur leur organisation spatiale spécifique dans la cellule. Comment sont créés les arrangements spatiaux spécifiques, et qu'est-ce qui

détermine la formation et la disparition des microtubules individuels?

Afin d'aborder ces questions, des chercheurs ont étudié l'assemblage *in vitro* de la tubuline en microtubules. Dans les solutions où la tubuline est inférieure à 15  $\mu\text{M}$ , les microtubules ne se forment pas, mais, quand on augmente la concentration au-dessus de 15  $\mu\text{M}$ , des microtubules se forment facilement (**fig.10A**). Si des centrosomes sont ajoutés à la solution de tubuline, des microtubules commencent à se former à moins de 5  $\mu\text{M}$  (**fig.10B**). Remarque: des tests différents sont utilisés dans les deux expériences- poids total des microtubules fig.10A, et nombre de microtubules par centrosome fig.10B- mais la baisse de concentration critique pour l'assemblage des microtubules en présence de centrosomes est indépendante du type de test)



**Fig. 10:** Croissance des microtubules en absence (A) et en présence (B) de centrosomes, en fonction de la concentration en tubuline (Problème 11-23). Les concentrations se réfèrent aux dimères de tubuline, qui sont les sous-unités assemblées.

- A- A votre avis, pourquoi la concentration à laquelle les microtubules commencent à se former (concentration critique) est-elle différente dans les deux expériences?
- B- A votre avis, pourquoi la courbe de la figure 10A augmente-t-elle linéairement avec des concentrations de tubuline croissantes (au-dessus de 15  $\mu\text{M}$ ), alors que la courbe de la figure 10B atteint un plateau à 25  $\mu\text{M}$  environ?
- C- La concentration en dimères de tubuline (sous-unités utilisées pour l'assemblage) dans une cellule typique est de 1 mg/ml, et le poids moléculaire d'un dimère de tubuline est de 110 000. Quelle est la concentration molaire en tubuline dans les cellules? Comparer la concentration cellulaire aux concentrations critiques des deux expériences fig.10. Quelles sont les implications en ce qui concerne l'assemblage des microtubules dans les cellules?

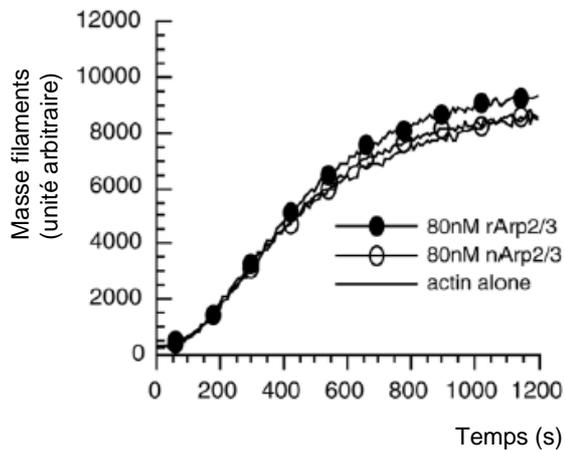
### Exercice n°3 : assemblage *de novo* des microfilaments d'actine

Le complexe Arp2/3 (Arp : actin-related protein), composé de 7 sous-unités (Arp2, Arp3, p41, p34, p21, p20, p16), favorise l'assemblage *de novo* des microfilaments d'actine. Cet assemblage se réalise selon plusieurs étapes. Afin de comprendre comment agit le complexe Arp2/3 et afin de déterminer le rôle des différentes sous-unités qui le composent, l'approche suivante est développée : un complexe Arp2/3 dit recombinant (rArp2/3) est obtenu par synthèse simultanée des différentes sous-unités du complexe. Il est ainsi possible d'obtenir un complexe complet ou un complexe dont on veut éliminer une sous-unité. En parallèle, on peut obtenir un complexe Arp2/3 complet dit natif (nArp2/3) par purification à partir d'un lysat de cellules eucaryotes.

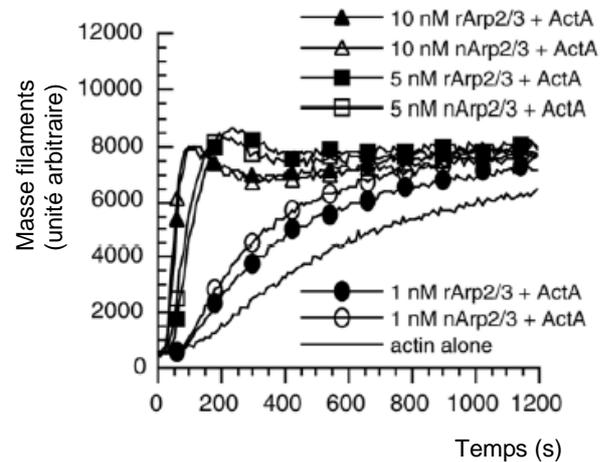
1. Rappeler les différentes étapes de l'assemblage *de novo* d'un microfilament d'actine, indiquer l'étape limitante et tracer la courbe « Masse des filaments assemblés=f(t) ».
2. Afin de comparer les propriétés des complexes Arp2/3 natif et recombinant vis-à-vis de l'assemblage des microfilaments d'actine, l'expérience suivante est réalisée : on met en présence, dans une solution saline contenant de l'ATP, de l'actine globulaire ou G-

actine et le complexe natif ou recombinant ; on quantifie alors au cours du temps la masse de filaments d'actine formés. Dans un deuxième temps, la même expérience est réalisée mais en ajoutant au système réactionnel la protéine ActA connue pour activer le complexe Arp2/3.

Les courbes obtenues dans les deux expériences sont données ci-dessous :



Expérience 1

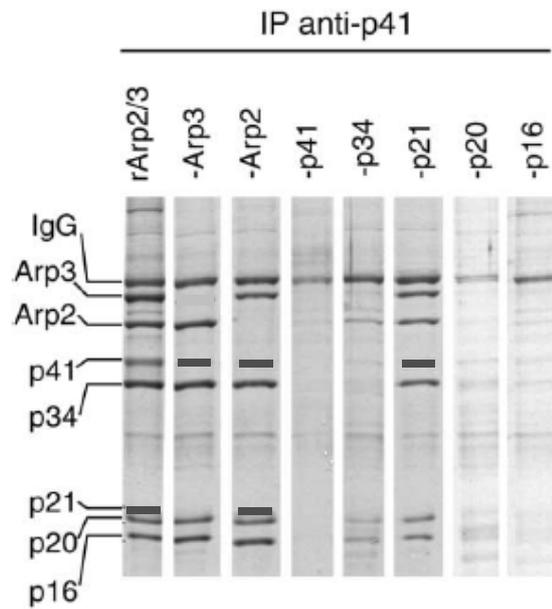


Expérience 2

Interprétez les résultats de ces deux expériences et identifier l'étape de l'assemblage *de novo* sur laquelle agit le complexe Arp2/3.

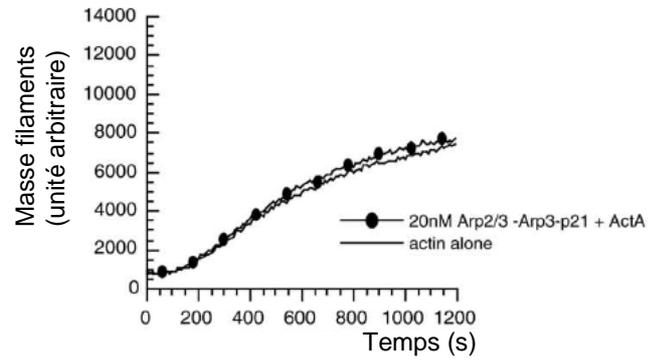
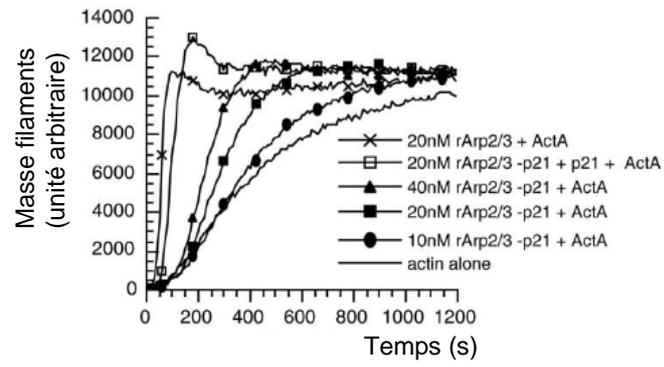
Que peut-on conclure sur les propriétés respectives des complexes complets recombinants et natifs ? Quelle est l'importance de cette conclusion ?

3. Pour déterminer le rôle des différentes sous-unités du complexe Arp2/3, on décide d'étudier les propriétés de complexes Arp2/3 ne comportant qu'une combinaison de 6 des 7 sous-unités du complexe originel. On réalise donc une synthèse simultanée d'une combinaison de 6 des 7 sous-unités. Dans un premier temps, on veut étudier la composition exacte de ces complexes incomplets. Pour cela, on réalise une immunoprécipitation après synthèse avec un anticorps dirigé contre la sous-unité p41 et on analyse l'immunoprécipité en SDS-PAGE avec coloration du gel au bleu de coomassie. Les résultats sont donnés ci-dessous :



Interprétez les résultats, donner la composition exacte des différents complexes recombinants incomplets et proposer des hypothèses sur le rôle de p34, p20 et p16.

4. Afin d'étudier le rôle de p21 et de Arp3, les complexes recombinants ne comportant pas ces sous-unités sont purifiés puis on les met en présence de G-actine dans une solution saline contenant de l'ATP et ActA. De la même façon qu'au 2., la masse de filaments d'actine formés est mesurée en fonction du temps. Les résultats obtenus sont donnés ci-dessous :



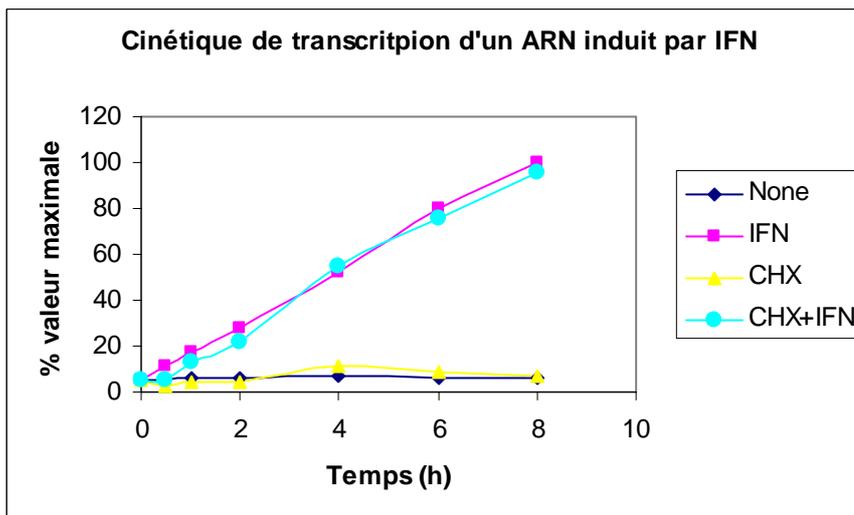
Interprétez les résultats et concluez sur les fonctions de p21 et Arp3.

## Signalisation Cellulaire

Les cellules modulent leur activité pour s'adapter aux variations de leur environnement. Elles reconnaissent divers stimuli extérieurs et traduisent cette reconnaissance en une réponse qui correspond souvent à l'expression de gènes jusqu'alors quiescents. Les cytokines forment une famille variée d'hormones polypeptidiques et de facteurs de croissance qui régulent de nombreux processus cellulaires. La voie de signalisation JAK/STAT utilisée par la majorité des cytokines est la voie de transduction la plus directe conduisant des facteurs de croissance extracellulaire au noyau. Cette voie a été caractérisée il y a plus de 10 ans dans le contexte de la réponse aux IFN de type I ( $\alpha/\beta$ ) et II ( $\gamma$ ).

1- Différents gènes sont induits suite à la stimulation par l'IFN $\alpha$ . Le graphe suivant montre la cinétique de transcription d'un de ces gènes en présence ou en absence de cycloheximide (CHX) qui inhibe la synthèse protéique.

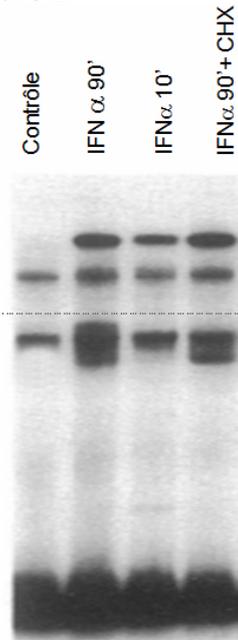
Figure 1



Quelles sont les caractéristiques de la transcription de ce gène ?  
Que pouvez vous en déduire ?

2- Les séquences d'ADN nécessaires à la transcription des gènes induits par IFN $\alpha$  ont été identifiées. L'élément minimal requis pour la réponse à l'IFN $\alpha$  est ISRE (Interferon Stimulated Response Element). Des expériences de gel retard ont été réalisées avec des extraits protéiques préparés à partir de cellules stimulées ou non avec de l'IFN $\alpha$  en présence ou en absence de CHX.

**Figure 2**

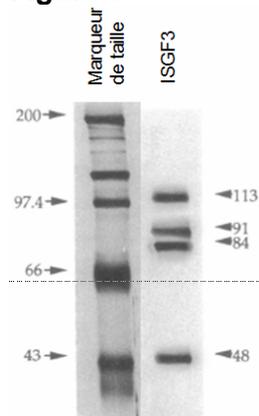


Combien de complexe protéine/ISRE pouvez-vous observer après stimulation par l'IFN $\alpha$ ? Quelles sont les caractéristiques de chacun de ces complexes? (Cinétique/synthèse protéique).

En fonction de celles-ci et des données observées en figure 1, quel complexe vous semble directement impliqué dans l'induction de la transcription des gènes stimulés par l'IFN $\alpha$ ?

3- Caractérisation du complexe d'intérêt dénommé ISGF3 (Interferon Stimulated Gene Factor 3). ISGF3 a été purifié et déposé sur un gel d'électrophorèse dénaturant afin de séparer les différents protéines le composant.

**Figure 3**



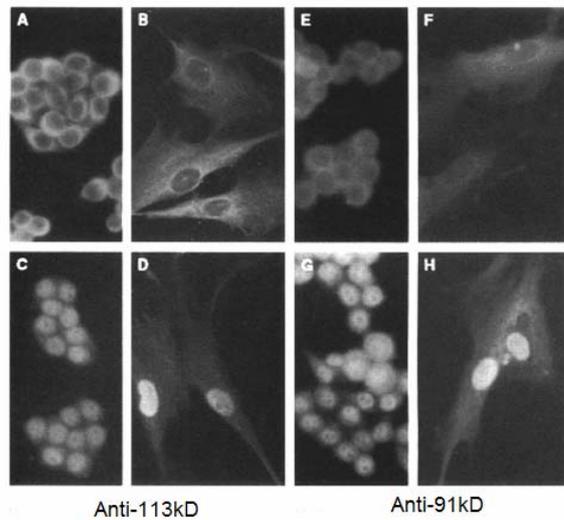
Décrire le complexe ISGF3.

4- Chacune de ces protéines ont été isolées et des anticorps spécifiques ont été générés. La partie Nterminale des protéines de 84 kD et de 91kD est strictement identique. La protéine de 91kD possède 38 acides aminés en plus.

Il a été montré que les protéines de 84kD, 91 kD et 113 kD sont présentes séparément dans le cytoplasme de cellules non traitées et qu'elles forment un complexe après stimulation par l'IFN $\alpha$ . La p48 ne s'associe qu'après dans le noyau. Afin de localiser ce complexe au cours

de l'activation des expériences d'immunofluorescence avec les anticorps anti-91kD et anti-113kD ont été réalisées.

**Figure 4**



Des cellules humaines HeLa (A, C, E et G) et des cellules FS2 (B, D, F et H) ont été cultivées avec de l'IFN $\alpha$  (500U/ml ; 30min) (C, D, G et H) ou du milieu de culture (A, B, E et F). Puis elles ont été marquées avec les anticorps indiqués.

Que pouvez vous observer?

Que peut on en déduire?

5- Sachant que la phosphorylation de protéines joue un rôle majeur dans de nombreuses voies de transduction du signal, l'importance de la phosphorylation dans la réponse à l'IFN $\alpha$  a été évaluée.

**Tableau 5.1 : Modulation de la transcription des gènes induits par l'IFN $\alpha$  par des inhibiteurs de kinases**

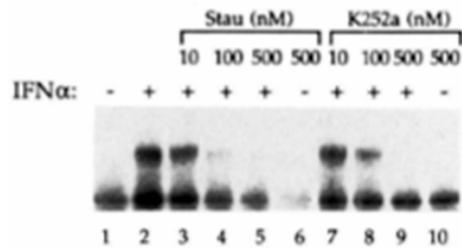
	+IFN $\alpha$			
	Aucun	stau** 0,3 $\mu$ M	K252a*** 0,3 $\mu$ M	Tampon
Induction relative de la transcription	1	0,2	0,2	0,9

\* Inhibiteur de protéines kinases dépendant de l'AMPc et du GMPc

\*\* Staurosporine : Inhibiteur puissant de protéines kinases

\*\*\* Inhibiteur puissant de protéines kinases

**Figure 5 : Formation du complexe ISGF3 en présence des inhibiteurs de kinases**



Quel est l'impact des inhibiteurs de la phosphorylation sur la réponse anti-virale, la transcription de gènes médiée par l'IFN $\alpha$  et la formation du complexe ISGF3?  
 Que peut on en déduire?

Fort de ces résultats la phosphorylation des protéines contenues dans le complexe ISGF3 a été évaluée par des expériences d'immuno-précipitation après incorporation de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.3

**Tableau 5.2 : Phosphorylation des protéines du complexe ISGF3**

Traitement	Protéines			
IFN $\alpha$	113	91	84	48
-	-	-	-	-
+	+	+	+	-
+ +Stau	-	-	-	-
+ +NaF*	+	+	+	-

(+) phosphorylé

(-) non phosphorylé

\* NaF empêche la translocation nucléaire

Quelles sont les protéines phosphorylées?  
 Quel est l'effet de NaF?  
 Que peut on en déduire?

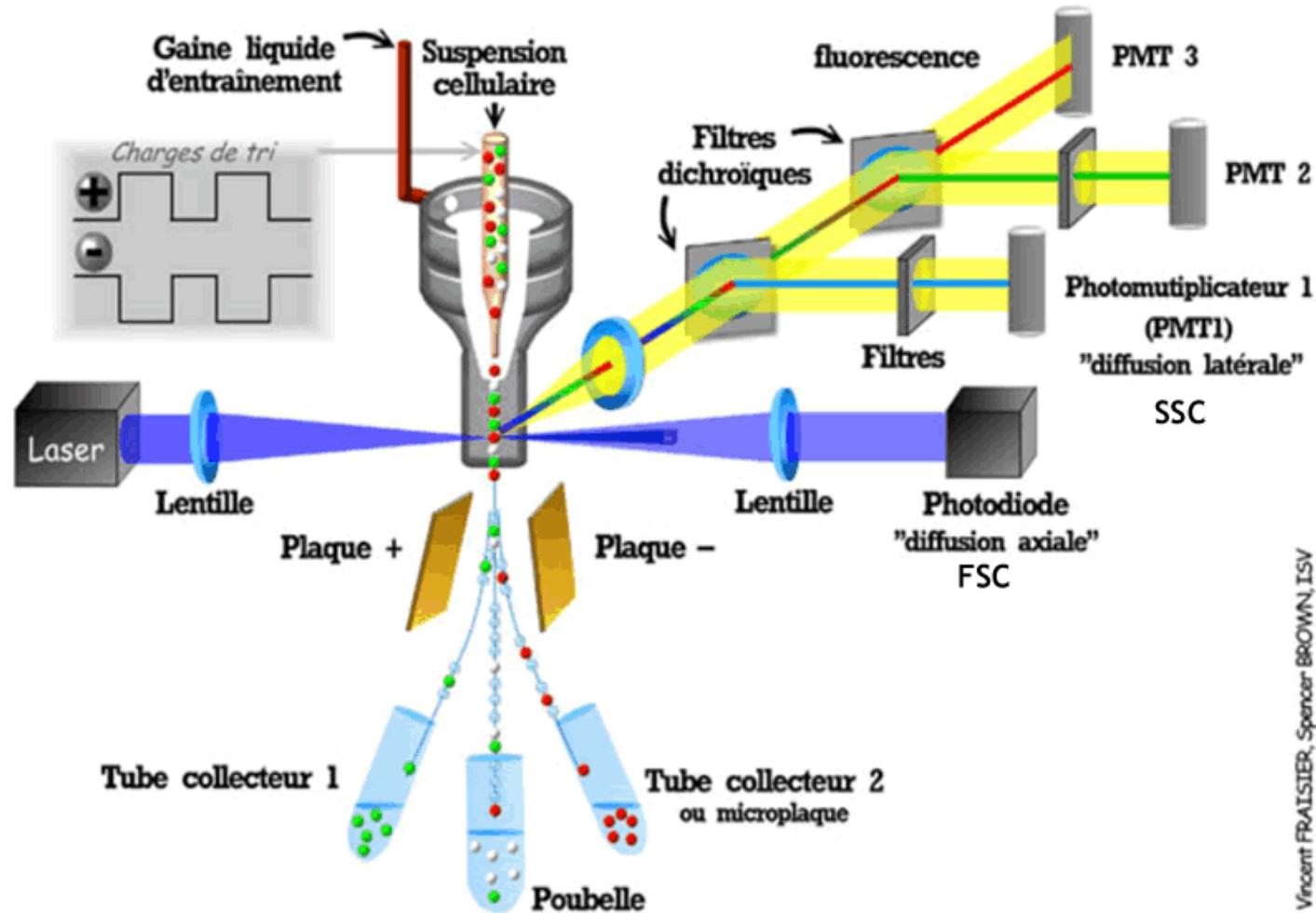
Des expériences ont montré par la suite que le récepteur à l'IFN $\alpha$  était directement associé aux tyrosine kinases Tyk2 et JAK1 nécessaires à la phosphorylation du complexe ISGF3 et que ces kinases étaient activées lors de la fixation de l'IFN $\alpha$  à son récepteur.

Les protéines présentes dans les complexes ISGF3 ont été appelées STAT pour Signal Transducer and Activator of Transcription; Ainsi 113kD correspond à STAT2, 91kD et 84kD à STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\gamma$  respectivement.

6- En fonction de toutes les données dont vous disposez, pourriez-vous décrire les étapes (faire un schéma) de la transduction du signal induite par l'IFN $\alpha$ .

## La cytométrie de flux

### Représentation schématique d'un cytomètre de flux



#### Énoncé 1 : Utilisation du FACS appliquée au SIDA

SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) est une maladie transmissible causée par le rétrovirus HIV = human immunodeficiency virus. La maladie progresse durant une période variant de 6 mois à plus de 5 ans. La progression de la maladie est caractérisée par l'accentuation d'un syndrome immunodéficitaire. Le phénomène central de la maladie est l'atteinte sélective des cellules  $T_H$   $CD4^+$  (lymphocytes T Helper qui porte le marqueur de surface  $CD4$ ). Le virus a un tropisme pour ces cellules et son effet cytopathogène entraîne la mort cellulaire. Le FACS permet l'analyse quantitative des sous-populations de lymphocytes T : les  $CD4^+$  et les  $CD8^+$  à l'aide d'anticorps monoclonaux. ( $CD4^+$  cellule  $T_H$  ou  $T_4$ ,  $CD8^+$  cellule  $T_C$  ou  $T_8$ ). On décrit 4 catégories chez les séropositifs :

- PA = porteur asymptomatique,
- SAC = syndromes d'adénopathies chroniques (ganglions persistants),

- ARC = aids related complex syndrom (différents signes cliniques de la maladie: grosse rate, toux persistante, diarrhée,...) ,
  - SIDA = stade terminal (infections et cancers opportunistes).
- Cellules T4 : 35 à 55 % des lymphocytes totaux, 500 à 1100 cellules/mm<sup>3</sup>, limite inférieure encore normale 430 cellules/mm<sup>3</sup>.  
 Cellules T8 : 19 à 37 %, 200 à 800 cellules/mm<sup>3</sup>. Rapport normal T4/T8 de 1 à 2,3. Interprétez les valeurs du tableau 1 :

Nombre de patients	T4 / mm3			T8 / mm3	
	< 200	≥ 200 < 400	≥ 400	< 1 000	≥ 1 000
PA 98	7	12	79	75	23
SAC 46	1	11	34	36	10
ARC 20	6	6	8	13	7
SIDA 36	29	4	3	35	1

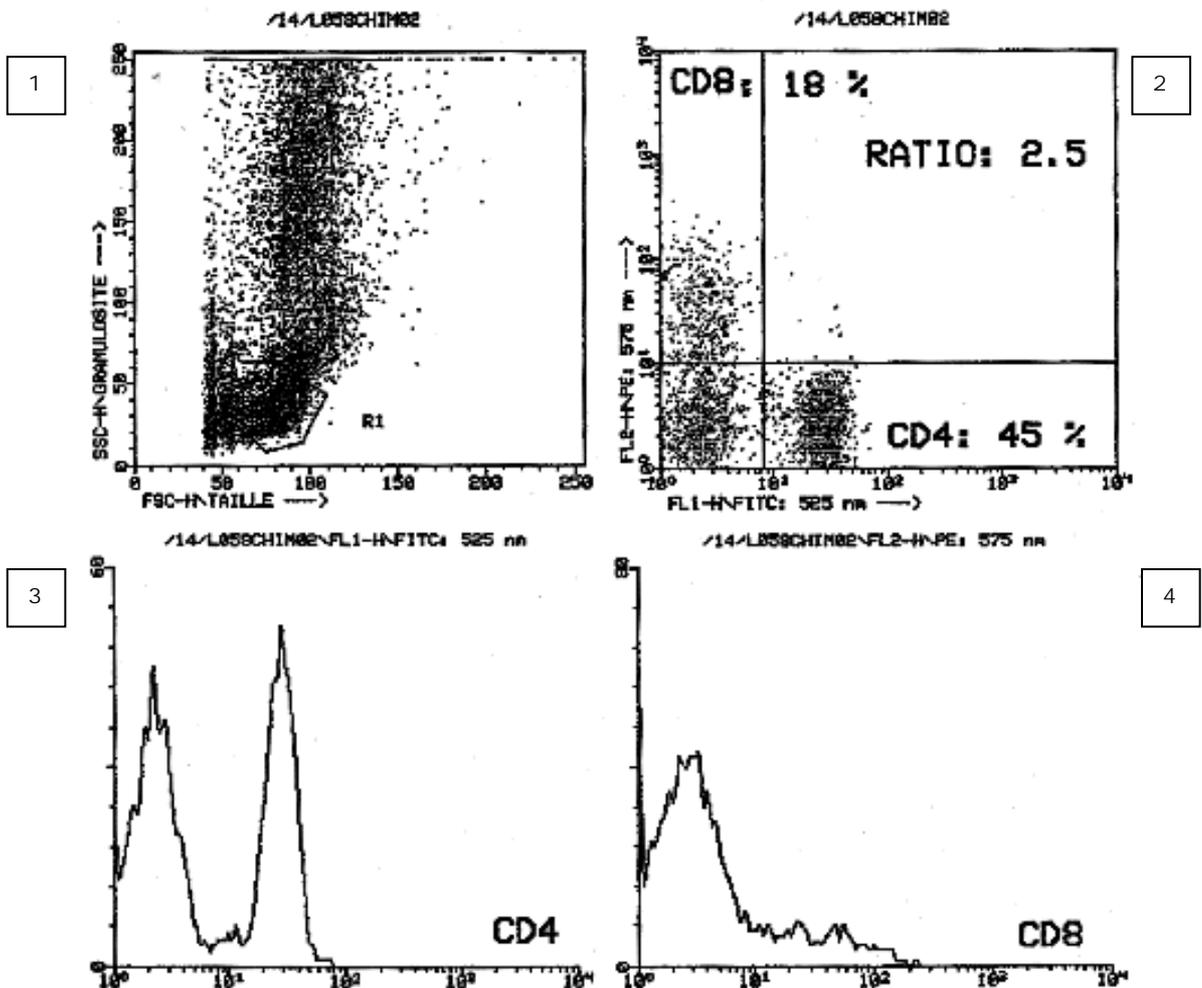
  

Nombre de patients	Rapport T4/ T8		
	< 0,5	≥ 0,5 < 1	≥ 1
PA 115	28	40	46
SAC 55	13	22	20
ARC 33	17	12	4
SIDA 45	40	5	0

### Énoncé 2 : Histogrammes

Analyse de la population de lymphocytes du sang périphérique chez des patients atteints de leucémie. On va définir le rapport CD4/CD8 chez ces patients pour avoir une indication de la gravité de la leucémie. On effectue un marquage des cellules avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.

- 1) Analyse, suivant la diffraction des échantillons, de la taille des cellules en abscisse et de leurs granulosités en ordonnée (1),
- 2) Analyse de la fluorescence. Seuil : valeurs supérieures à 100 considérées comme positives (2,3 et 4).

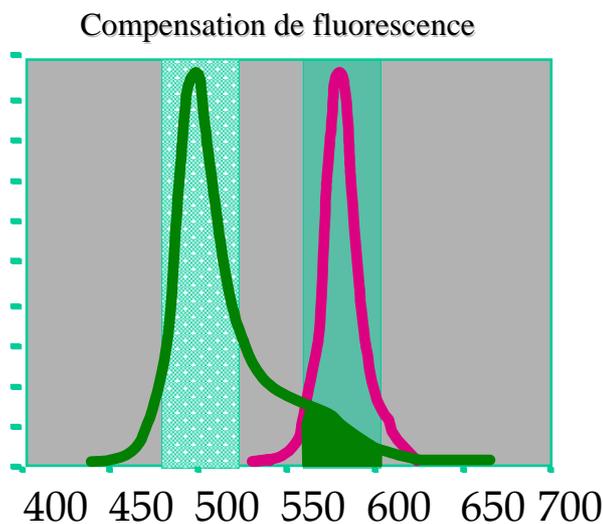


### Énoncé 3 : Principe de la compensation de fluorescence

Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition des 2 signaux de fluorescence.

Sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais pas en orange (PE), est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des 2 fluorescences.

Le système de compensation permet de soustraire artificiellement la fluorescence orange qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC dans le canal de la PE.



### Énoncé 4 : Application en Cancérologie

Marquage spécifique de l'ADN pour la mesure du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est-à-dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire. La mesure du cycle cellulaire par des méthodes classiques de cytométrie de flux divise le cycle en 3 phases :

- G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> = phase d'activation des cellules,
- S = phase de synthèse de l'ADN,
- G<sub>2</sub>/M phase de mitose.

La cytométrie de flux permet de déterminer la distribution des cellules dans le cycle cellulaire : les cellules contenant 2N chromosomes d'ADN sont les cellules en G<sub>1</sub> et les cellules non proliférantes. Les cellules contenant 4N chromosomes d'ADN sont en G<sub>2</sub> ou en mitose. Entre ces 2 valeurs, on trouve les cellules en phase S.

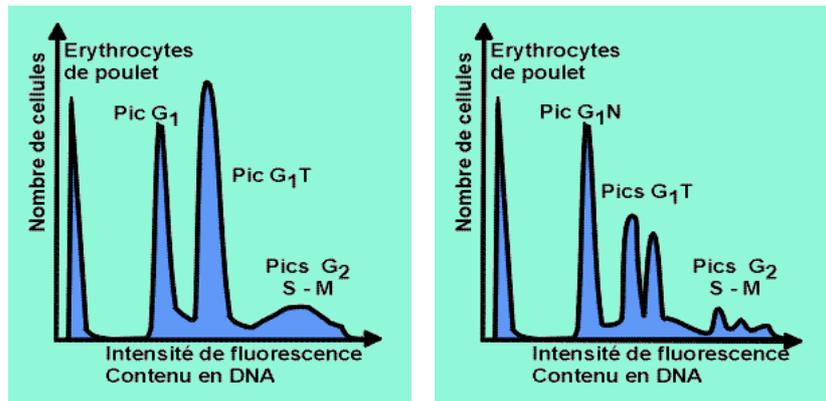
La cytométrie de flux offre une méthodologie rapide et simple à mettre en œuvre pour l'analyse du cycle cellulaire :

- En pharmacologie : Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues (drogues antimitotiques, immunothérapie).

Grâce à la cytométrie de flux, on a pu classer les tissus normaux en 3 catégories :

- les tissus à prolifération rapide (moelle osseuse, muqueuse gastrique, ovaire, testicule, peau)
- les tissus à prolifération lente (poumon, foie, rein, glandes endocrines, endothélium vasculaire)
- les tissus qui ne prolifèrent pas (muscle, os, cartilage, nerf).

Cette classification a un intérêt clinique important : les effets toxiques de la chimiothérapie et de la radiothérapie sont beaucoup plus marqués sur les tissus à prolifération rapide.



- En cancérologie : elle permet de suivre la prolifération d'une tumeur, de voir la présence de cellules avec des contenus anormaux d'ADN :

Les cellules cancéreuses contiennent en général des éléments aneuploïdes, c'est-à-dire un contingent de cellules ayant plus de 2N chromosomes, ou bien multiploïdes c'est-à-dire avec un contingent contenant plusieurs clones de cellules ayant une quantité d'ADN anormale.

### Énoncé 5 : L'hybridation génomique comparative (CGH)

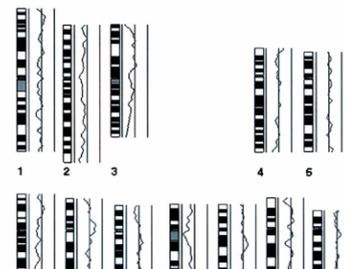
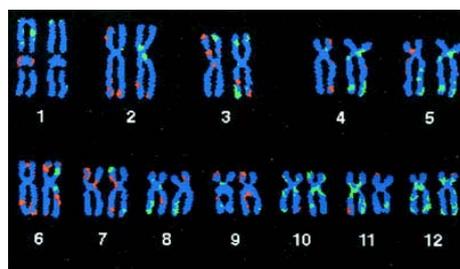
On peut obtenir un caryotype par cytométrie de flux à partir de l'ADN d'un tissu.

Principe : L'ADN à analyser est extrait et marqué par un fluorochrome vert par exemple (fluoresceine). De l'ADN normal de référence est marqué par un fluorochrome rouge (rhodamine). Les 2 ADN sont hybridés avec des chromosomes en métaphase normaux colorés par le DAPI.

Analyse : Les chromosomes sont sélectionnés et analysés l'un après l'autre. La fluorescence rouge est enregistrée puis la fluorescence verte avec les mêmes paramètres. Un programme informatique fait l'analyse comparative des 2 intensités et donne un résultat graphique.

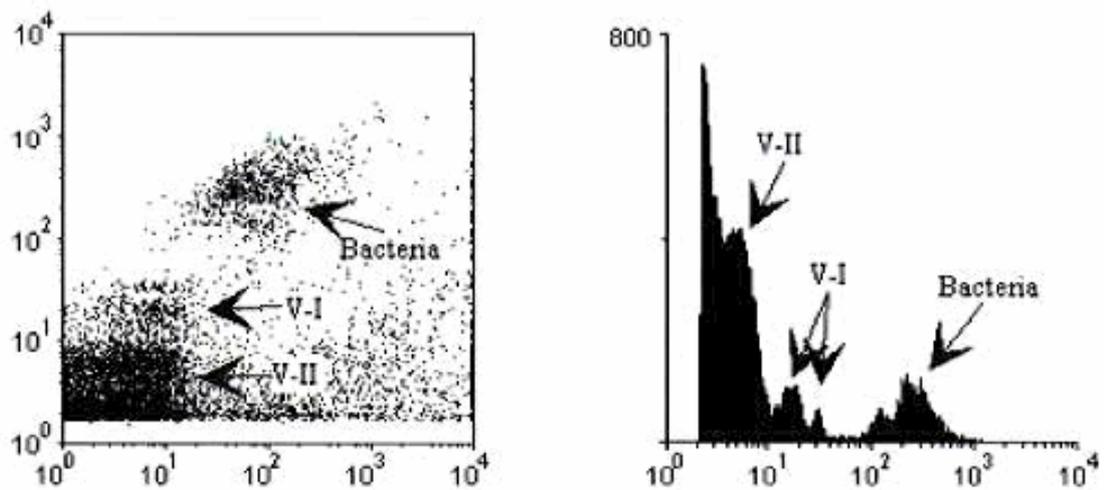
Interprétation : Les déviations significatives permettent de détecter des délétions et des amplifications d'une zone d'un chromosome donné.

On note que les déviations par rapport à la ligne médiane sont physiologiques dans les régions centromériques qui apparaissent en grisé. L'anomalie des chromosomes sexuels est due à l'utilisation d'une mitose masculine hybridée avec de l'ADN de patient féminin.



Énoncé 6 : Les virus de l'océan : la cytométrie en flux révolutionne leur étude.

L'adaptation de la technique de cytométrie en flux à l'étude de ces virus a permis d'obtenir des comptages précis de ces particules, après marquage de leur contenu en acides nucléiques. Les scientifiques ont ainsi mis en évidence deux populations distinctes de virus, qui pourraient affecter l'une les eucaryotes, l'autre les bactéries. Cette technique va ainsi permettre une meilleure connaissance de la répartition et du rôle de ces virus dans les océans.



**L'APOPTOSE**

**Enoncé 1 :**

Aux stades précoces de l'apoptose, des changements se produisent à la surface de la membrane cellulaire. Une des altérations de la membrane plasmique est la translocation de la phosphatidylserine (PS) de la couche interne à la couche externe (Fig 1), exposant ainsi PS à la surface externe des cellules apoptotiques où il peut être spécifiquement reconnu par les macrophages. L'annexine V, une protéine de 35-36Kd qui se lie aux phospholipides de façon  $Ca^{2+}$  dépendante, a une forte affinité pour PS, et peut donc être utilisée pour détecter les cellules en apoptose aux stades précoces. Mais l'annexine V peut aussi détecter les cellules en nécrose car elles perdent leur intégrité membranaire. On doit alors différencier les cellules apoptotiques de cellules nécrotiques, on peut le faire en utilisant le propidium iodide (PI). Le PI est un colorant vital, donc les cellules apoptotiques seront annexine V positive et PI négative puisque l'apoptose permet d'assurer une intégrité de la membrane plasmique jusqu'aux stades avancés de la mort cellulaire tandis que les cellules nécrotiques ou les cellules mortes seront annexine V et PI positives (Fig 2).

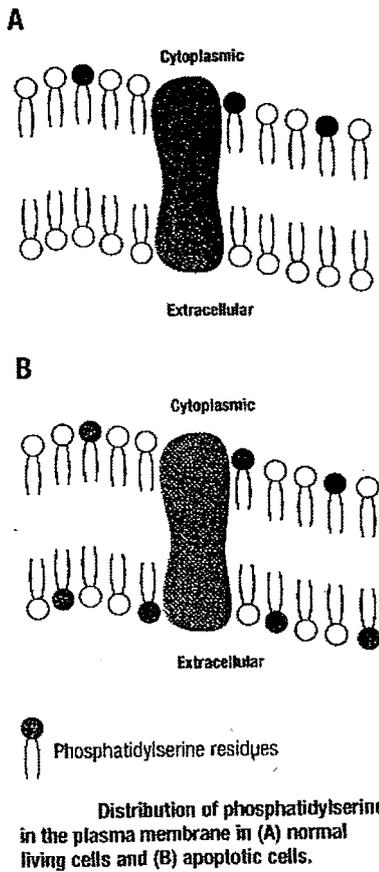


Figure 1

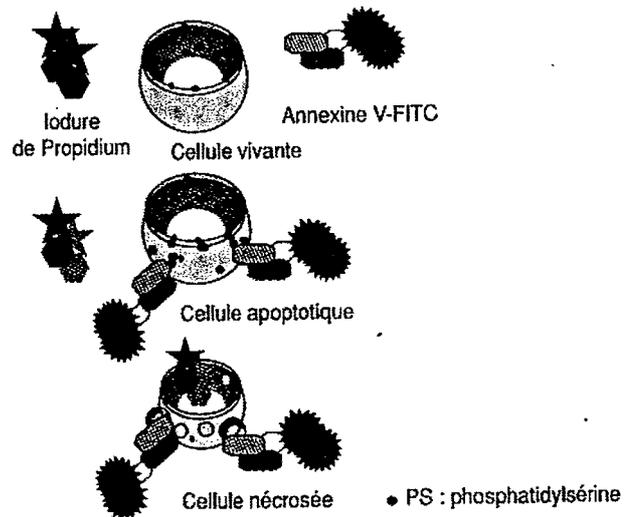


Figure 2

L'annexine V est typiquement conjugué à un fluorochrome la fluoresceine isothiocyanate (FITC couleur verte) pour identifier les cellules apoptotiques en cytométrie de flux (FACS), le PI émet une couleur rouge.

Fas ligand (FasL) et son récepteur Fas sont impliqués:

- dans les processus apoptotiques au niveau du développement des cellules T,
- dans l'apoptose médiée par les cellules T cytotoxiques.

On peut induire in vitro l'apoptose médiée par Fas dans les cellules sensibles en réalisant le pontage des récepteurs Fas avec un anticorps monoclonal anti-Fas.

- 1) Des cellules T humaines leucémiques sont non-traitées (A) ou traitées 5h (B) ou 12h (C) avec un anticorps anti-Fas humain. Puis les cellules sont incubées avec l'annexine V-FITC dans un tampon contenant du PI. Les cellules sont analysées par FACS. Les résultats sont reportés sur la Fig 3, les histogrammes représentent l'analyse de l'annexine V et les dot-plots l'analyse du PI. Interprétez.

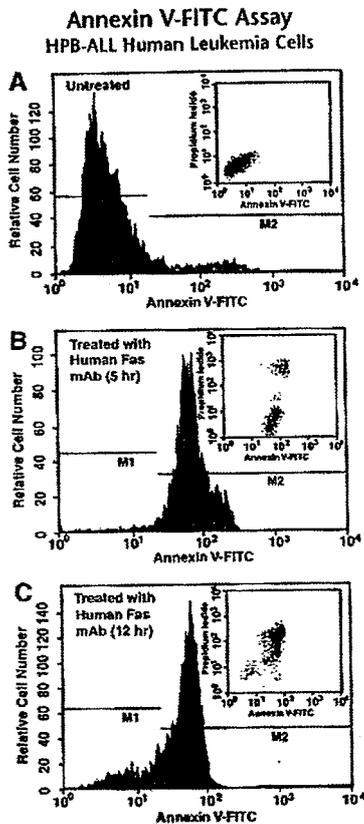


Figure 3

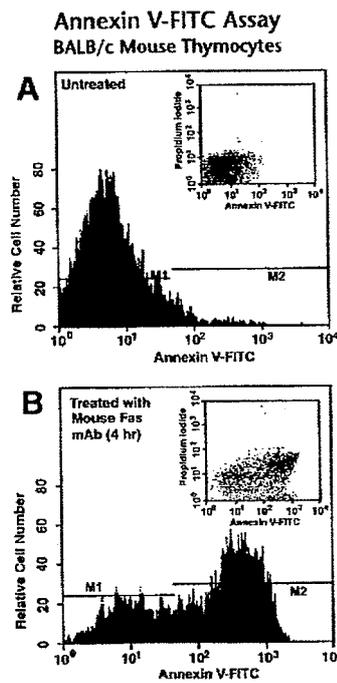


Figure 4

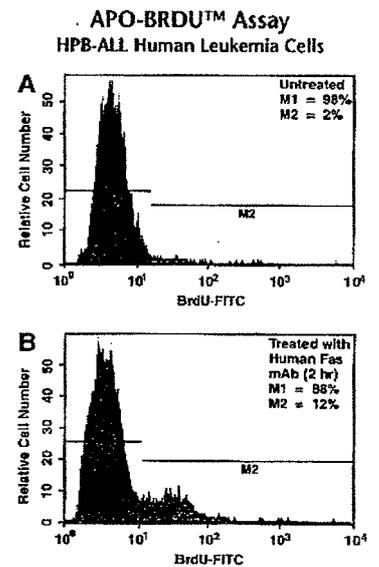


Figure 5

- 2) La même étude est réalisée sur des cellules murines, des thymocytes. Des thymocytes de souris BALB/c sont isolées à partir du thymus sur des souris âgées de 4 semaines (gros thymus). Ils sont cultivés pendant 4 heures sans anticorps (A) ou en présence d'un anticorps anti-Fas murin (B). Les cellules sont ensuite incubées avec de l'annexine V-FITC dans un tampon contenant du PI puis

analysées par FACS. Les résultats sont reportés sur la Fig 4, les histogrammes représentent l'analyse de l'annexine V et les dot-plots l'analyse du PI. Interprétez la Fig 4.

La fragmentation de l'ADN est un critère d'apoptose facilement mesurable. Elle résulte de l'activation d'endonucléases qui dégradent la chromatine en fragments de 50 à 300Kb puis ensuite en fragments plus petits de 200pb. Une méthode d'analyse utilise la terminal deoxyribonucleotide tranferase (TdT) qui catalyse l'addition de deoxyribonucleotides triphosphates couplés au brome (Br-dUTP) aux extrémités 3'-OH de l'ADN simple ou double brin de cellules fixées donc perméabilisées. Le grand nombre de fragments d'ADN entraîne une abondance en extrémités 3'-OH dans les cellules apoptotiques comparées aux non-apoptotiques. Après incorporation des Br-dUTPs, les sites sont identifiés par un anticorps anti-BrdU couplé au FITC. Les fragments d'ADN colorés sont analysables par cytométrie de flux (FACS).

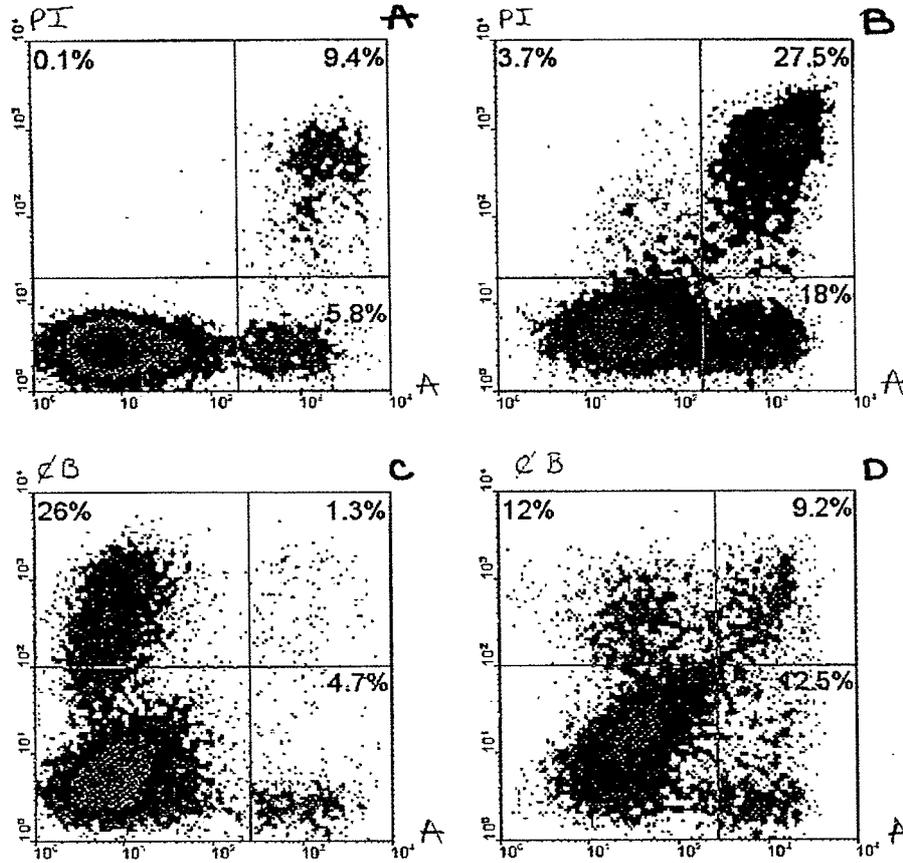
- 3) Des cellules T humaines leucémiques sont cultivées 2h en absence (A) ou en présence (B) d'anticorps anti-Fas humain. Les cellules sont fixées et incubées avec du Br-dUTP en présence de l'enzyme TdT afin d'incorporer le Br-dUTP aux extrémités 3'-OH exposées. Br-dUTP est détecté avec un anticorps anti-BrdU marqué à la fluoresceine. Les fenêtres M1 et M2 démarquent les populations non-apoptotiques et apoptotiques, respectivement. Analyser la Fig 5.

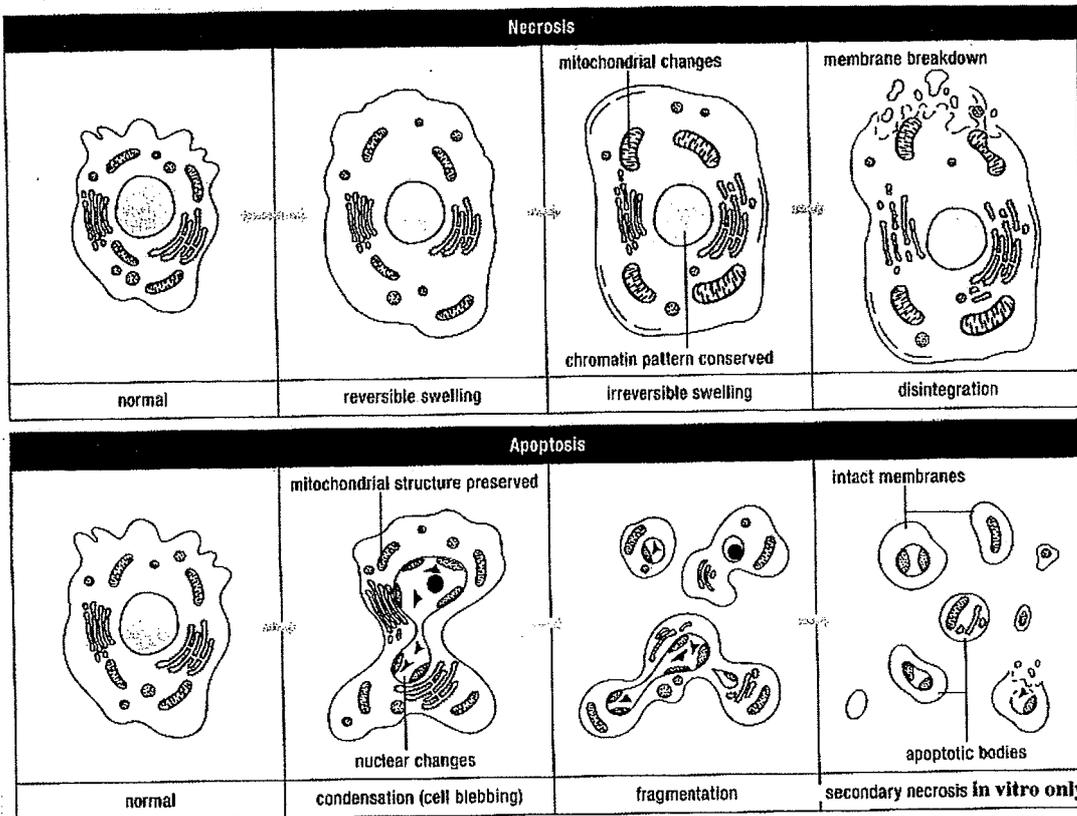
## **Enoncé 2 :**

Cet exercice décrit le développement d'un procédé permettant la détection concomitante de l'apoptose et la caractérisation d'un phénotype cellulaire (typage) par cytométrie de flux (FACS). Du sang de boeuf est collecté de la veine jugulaire (cou) et mélangé à de l'heparine. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont isolés sur un gradient de Ficoll ( $d=1.077g/ml$ ) et lavées 3 fois avec du tampon phosphate (PBS phosphate buffered saline). Les PBMC sont cultivées pendant 48 h jusqu'à une densité de  $2 \times 10^6$  par tube. Ensuite, afin d'induire la prolifération des PBMC, on ajoute des inducteurs mitotiques artificiels (ionomycine: apport d'ions intracellulaires qui mime une réponse à un signal de prolifération).

Dans cette étude, les PBMC sont soit infectées par le virus BHV-1 (bovine herpes virus) afin d'induire l'apoptose dans les cellules stimulées par un mitogène ou soit subissent une simulation d'infection sans virus en contrôle. Puis les cellules sont incubées 30min avec un anticorps de souris dirigé contre les IgM de surface bovines présentes sur les lymphocytes B. Après 2 lavages en PBS, elles sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à la phycoerythrine (PE) pendant 30min. Un lavage supplémentaire, et les cellules sont incubées avec de l'annexine V-FITC et du PI. Les cellules sont analysées au FACS pour la fluorescence verte (FITC), orange (PE) et rouge (PI). Les résultats sont portés sur la Fig ci-dessous. En A et C contrôle par simulation de l'infection, B et D les cellules sont infectées par BHV-1 et incubées 24h. A et B détection de l'apoptose précoce avec l'annexine V-FITC et PI, C et D détection concomitante de l'apoptose (annexine V-FITC) et du phénotype lymphocyte B (PE).

Les cellules nécrotiques et les cellules en apoptose tardives, toutes les deux PI positives, ont été éliminées de l'étude. Le pourcentage des cellules positives est indiqué sur chaque panneau. La détection de l'annexine se trouve en abscisse et PI (A,B) ou PE (C,D) en ordonnée. Interprétez les résultats.





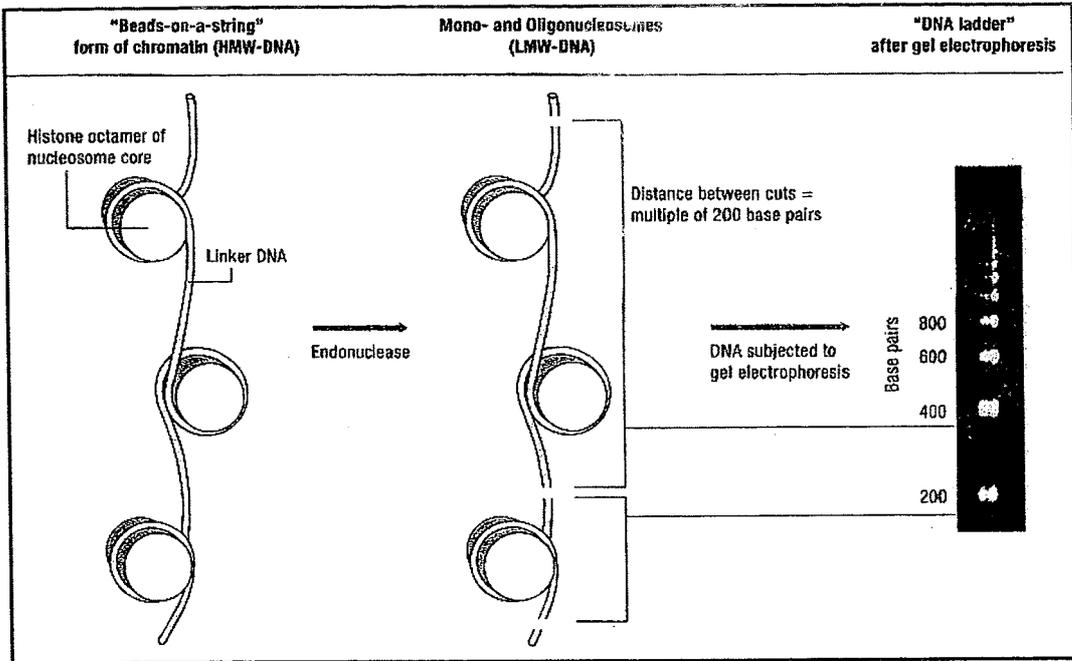
1

	Nécrose	Apoptose
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Perte de l'intégrité membranaire</li> <li>*Floculation de la chromatine</li> <li>*Gonflement de la cellule et lyse</li> <li>*Pas de formation de vésicules, lyse complète</li> <li>*Désintégration des organelles par gonflement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Vacuolisation de la membrane mais sans perte de son intégrité</li> <li>*Aggrégation de la chromatine à la membrane nucléaire</li> <li>*Rétrécissement de la cellule</li> <li>*Formation de vésicules liées à la membrane : corps apoptotiques</li> <li>*Les organelles restent intactes</li> </ul>
Biochimie	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Perte de la régulation de l'homéostasie des ions</li> <li>*Pas de besoin énergétique</li> <li>processus passif se produit aussi à 4°C</li> <li>*Digestion de l'ADN au hasard, smear d'ADN en électrophorèse sur gel d'agarose</li> <li>*Fragmentation de l'ADN postlytique</li> <li>événement tardif de la mort</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Régulation fine des étapes d'activation et enzymatiques</li> <li>*Energie dépendante (ATP)</li> <li>processus actif mais pas à 4°C</li> <li>*Fragmentation de l'ADN mono ou oligonucléosomale, profil en barreaux d'échelle en électrophorèse sur gel</li> <li>*Fragmentation de l'ADN prélytique</li> <li>événement précoce de la mort</li> </ul>
Physiologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Mort de groupes cellulaires</li> <li>*Causée par des perturbations non physiologiques</li> <li>*Phagocytose par des macrophages</li> <li>*Réponse inflammatoire significative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Mort de cellule individuelle, seule</li> <li>*Induite par des stimuli physiologiques</li> <li>*Phagocytose par des cellules adjacentes ou des macrophages</li> <li>*Pas de réponse inflammatoire</li> </ul>



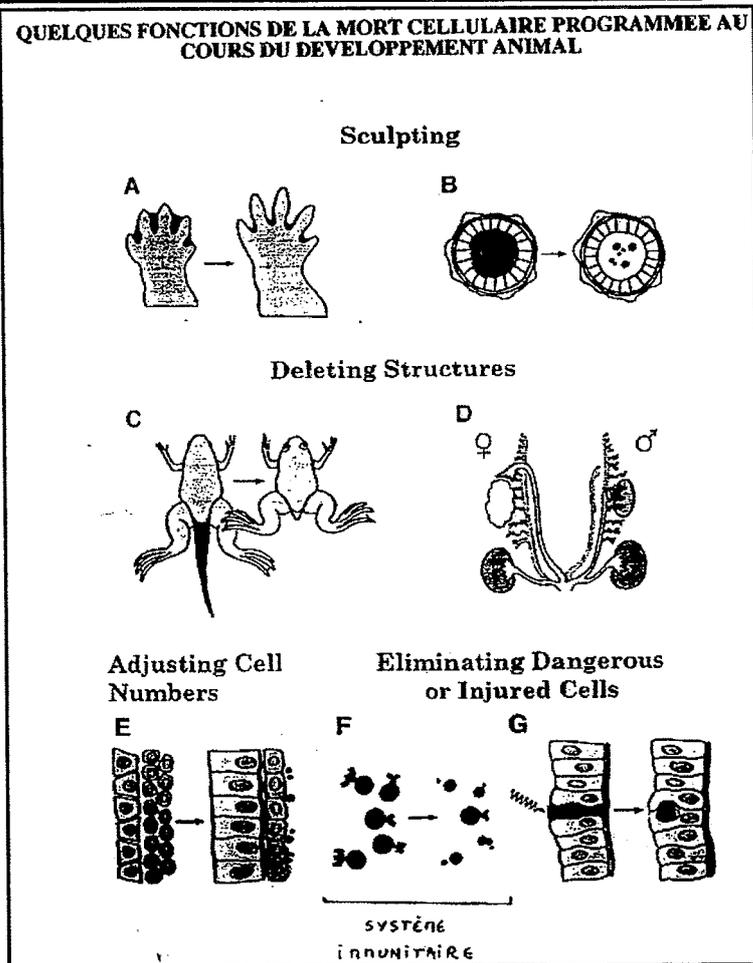
2

3

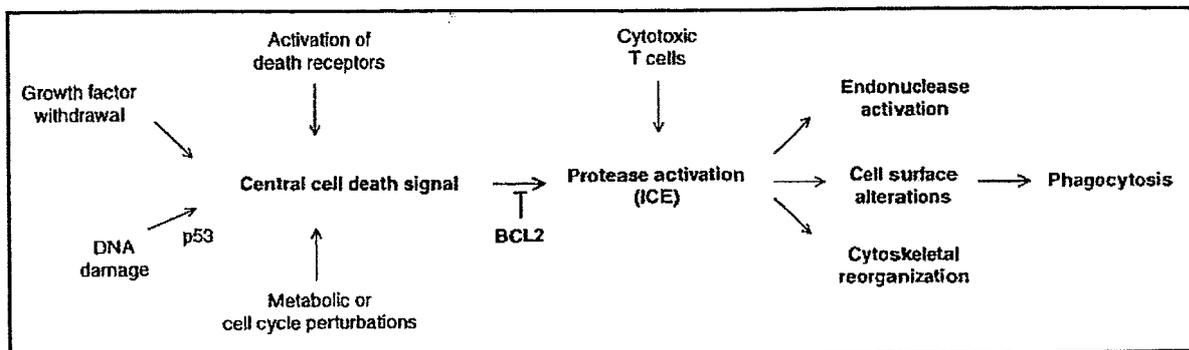


**QUELQUES FONCTIONS DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE AU COURS DU DEVELOPPEMENT ANIMAL**

4



5



6