

EXERCICE 1 (SUJET EXAMEN TD 2011-2012) :

Le virus SV40 est un virus à ADN qui infecte les singes de type Rhésus et peut provoquer l'apparition de tumeurs. Il est utilisé en recherche et en biotechnologie pour la création de lignées cellulaires immortalisées c'est-à-dire capables de se multiplier en culture indéfiniment. Son pouvoir immortalisant est lié à l'expression de plusieurs protéines dont l'une est appelée Protéine « Grand T ». La protéine Grand T produite *in vitro* a été microinjectée dans le cytosol de cellules en culture. Après incubation à 37°C, la présence de la protéine Grand T a été analysée par un marquage immunofluorescent à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine Grand T. En parallèle, la même expérience (microinjection et marquage immunofluorescent) a été réalisée avec la protéine BSA qui est une protéine du plasma sanguin. Les résultats des marquages sont présentés dans la figure 1.

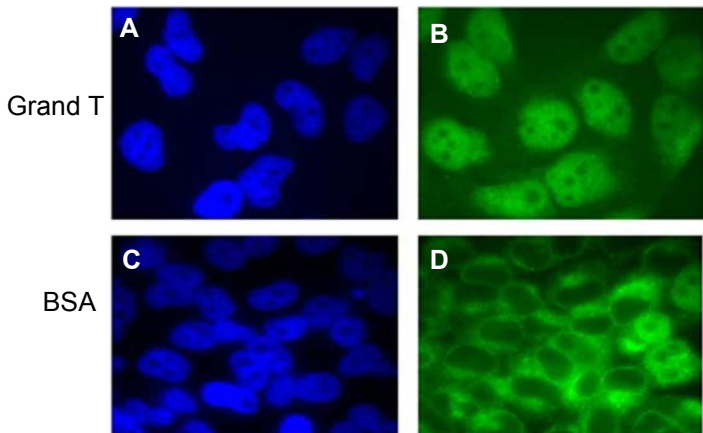


Fig. 1 : En A et B, les cellules ont reçu une microinjection de la protéine Grand T ; en C et D les cellules ont reçu une microinjection de la protéine BSA. En A et C, les cellules ont été marquées avec un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce en bleu ; en B, les cellules ont été marquées avec des anticorps spécifiques anti Grand T fluorescents; en D les cellules ont été marquées avec des anticorps anti BSA fluorescents.

En A et B, les mêmes cellules ont été observées soit en fluorescence bleue soit en fluorescence verte au même grossissement. Idem pour les cellules en C et D. Les images peuvent être superposées.

1. Expliquez, par un schéma, le principe du marquage par immunofluorescence (cf TP). Commentez et analysez la fig 1.

L'analyse de la séquence primaire de la protéine Grand T a révélé le motif suivant qui a intrigué les chercheurs : GlyProLysLysLysArgLysValCys entre la position 161 et 169. La protéine BSA, allongée, à l'extrémité Nter, par la séquence 161-169 de Grand T précédemment évoquée, a été synthétisée (BSA161-169wt). Une 2^{ème} forme de BSA allongée en N-ter par le peptide suivant GlyProLysLysAsnArgLysValCys (BSA 161-169mut) et une BSA allongée d'une séquence de 9 acides aminés aléatoires (BSA-aléat) ont également été synthétisées.

Des expériences de microinjection cellulaire de ces formes natives ou modifiées de BSA, suivie par un immunomarquage ont été réalisées comme précédemment et les résultats sont présentés fig. 2.

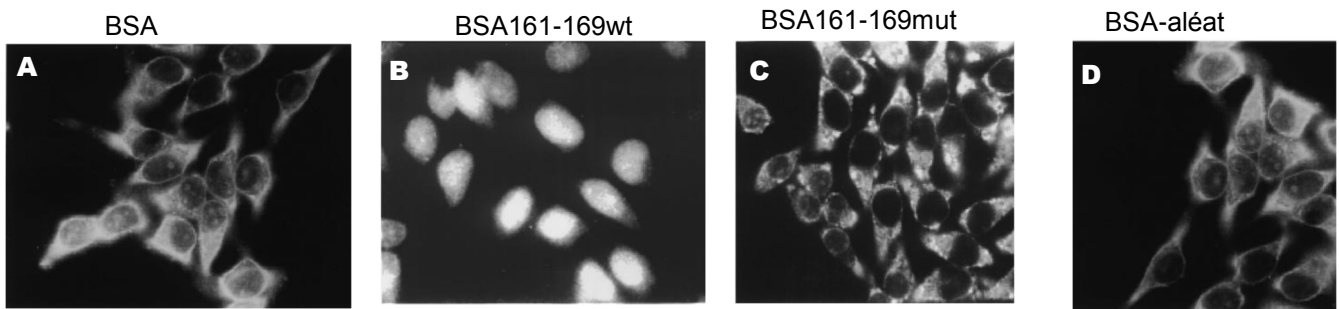


Fig. 2 : Les cellules ont été microinjectées avec, soit la protéine BSA native (BSA en A), soit la protéine BSA allongée en N-ter avec le peptide 161-169 de Grand T (BSA161-169wt en B), soit la protéine BSA allongée en N-ter avec le peptide 161-169 de Grand T muté (BSA161-169mut en C), soit la protéine BSA allongée d'une séquence aléatoire (BSA-aléat en D). La BSA a ensuite été détectée par immunofluorescence dans les cellules.

2. Quelle est la particularité de la séquence 161- 169 ? Quelle modification la mutation apporte-t-elle au peptide ?.

Commentez ces images et proposez un rôle à la séquence 161-169 de Grand T

Dans une expérience suivante, les cellules ont reçu une microinjection de protéine BSA161-169wt seule ou associée à un excès de 100 fois du peptide 161-169 libre (non couplé à la BSA) ou du peptide de 9 acides aminés de séquence aléatoire (aléat). La BSA a ensuite été détectée par immunofluorescence ; les images sont présentées fig. 3. En complément à cette expérience, des concentrations croissantes de la protéine BSA radioactive ainsi que la protéine BSA161-169 radioactive ont été injectées dans les cellules. Après incubation, à 37°C, les cellules ont été lysées, le lysat contenant l'ensemble des organites sub-cellulaires a été centrifugé à basse vitesse et durant un temps court (1000 g, 10 min). La radioactivité présente dans le culot de centrifugation a été comptée. Les résultats sont présentés dans la figure 4.

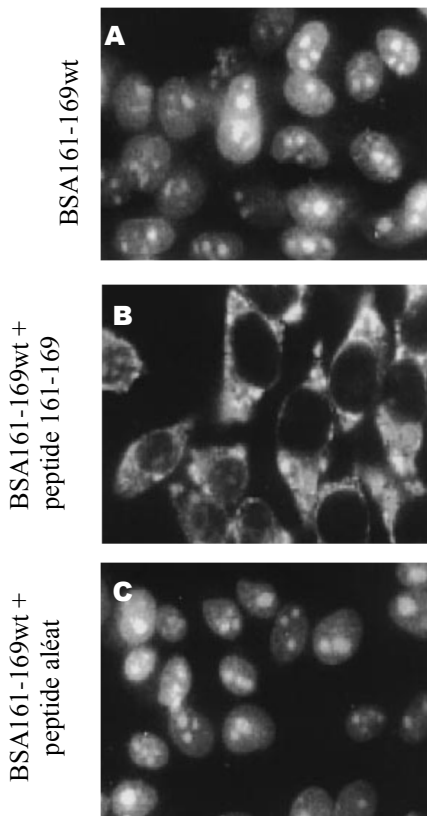


Fig. 3 : les cellules ont reçu une microinjection de BSA161-169wt (en A), de BSA161-169wt et du peptide 161-169wt en excès molaire de 100 fois (en B) ou de BSA161-169wt + un excès molaire de 100 fois du peptide aléatoire (en C).

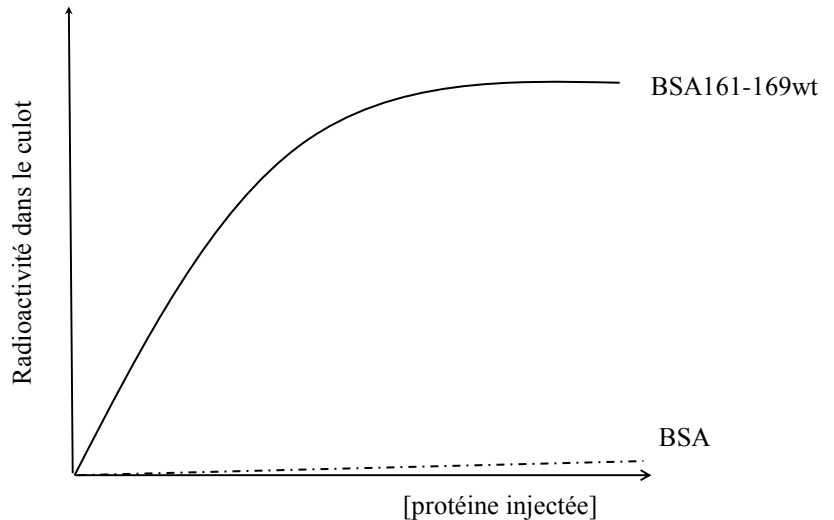
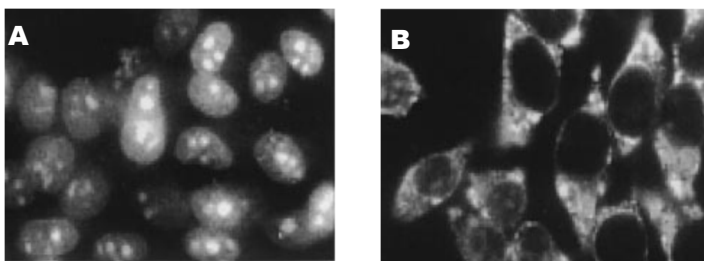


Fig. 4 : Radioactivité incorporée dans le culot de centrifugation après microinjection de BSA ou de BSA161-169wt radioactives. Au bout de 10 min, les cellules ont été lysées et la radioactivité des culots a été mesurée. (Rq : la phase de plateau enregistrée avec BSA161-169wt n'est pas liée à un remplissage maximal de l'organite sub-cellulaire par la protéine)

3. Quel est le compartiment sub-cellulaire isolé dans le culot après centrifugation ? Que suggèrent ces 2 expériences présentées fig. 3 et 4 quant au mécanisme d'entrée de la protéine dans la compartiment sub-cellulaire ?

Dans une dernière expérience, la membrane plasmique des cellules a été perméabilisée ou pas par traitement à la digitonine (qui ne perméabilise que les membranes plasmiques). Les cellules ont été incubées ou non en présence d'hexokinase, de glucose et d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (roténone) et de BSA161-169wt. Après immunomarquage, les images sont présentées fig. 5.



Avec perméabilisation, sans hexokinase, glucose et roténone

Avec perméabilisation, plus hexokinase, glucose et roténone

Fig. 5. Immunomarquage des cellules après perméabilisation, incubation avec BSA161-169wt en présence (en B) ou non (en A) de glucose, d'hexokinase et de DNP.

4. Rappelez la réaction catalysée par l'hexokinase, 1^{ère} enzyme de la glycolyse. Quelle est la conséquence pour la cellule de l'inhibition de la chaîne respiratoire ? Quel est l'intérêt de ce double traitement infligé aux cellules dans cette expérience ? Quelle information apporte-telle ?

Exercice 2 : Sujet TD 2014: Etude de l'adressage de la protéase cathepsine D (sujet examen 2016-2017).

1. La séquence codante déduite de l'ARNm de l'enzyme cathepsine D a été clonée dans un plasmide d'expression utilisé dans des expériences de transcription/traduction *in vitro* en présence d'un acide aminé radioactif. Dans les essais 1 et 3, la traduction a été réalisée sans addition de vésicules microsomales, dans les essais 2 et 4, la traduction a été réalisée en présence de vésicules microsomales et les microsomes ont ensuite été collectés par centrifugation. Dans l'essai 3, après traduction, les protéines ont été traitées avec une glycosidase (enzyme hydrolysant les liaisons osidiques) ; dans l'essai 4, après centrifugation, les membranes microsomales ont été dispersées par addition de détergents puis les protéines ont été traitées par la glycosidase. Les protéines des essais 1 et 3 et seulement celles des microsomes des essais 2 et 4 ont été analysées par PAGE-SDS et autoradiographie. Le résultat est présenté fig. 1:

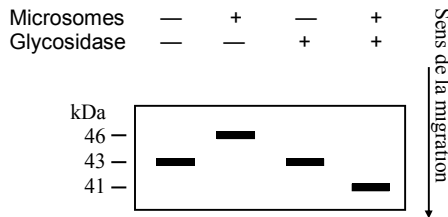


Fig. 1 : Autoradiographie montrant l'expression de Cathepsine D produite par transcription/traduction *in vitro* en présence de [³H]-Leu. En 1 et 3, la traduction a été réalisée en absence de microsomes. En 2 et 4, la protéine Cathepsine D a été traitée par une glycosidase après sa synthèse et avant l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS). Le gel a été révélé par autoradiographie. Seule, la partie du gel montrant les protéines de masse moléculaire comprise entre 50 et 40 kDa est présentée.

Le séquençage de l'extrémité Nter des protéines de masse 46, 43 et 41 kDa a été réalisé par la méthode d'Edmann qui décroche un par un les amino-acides à partir de l'extrémité Nter, lesquels sont ensuite identifiés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Les résultats obtenus pour la leucine et la méthionine sont présentés fig. 2.

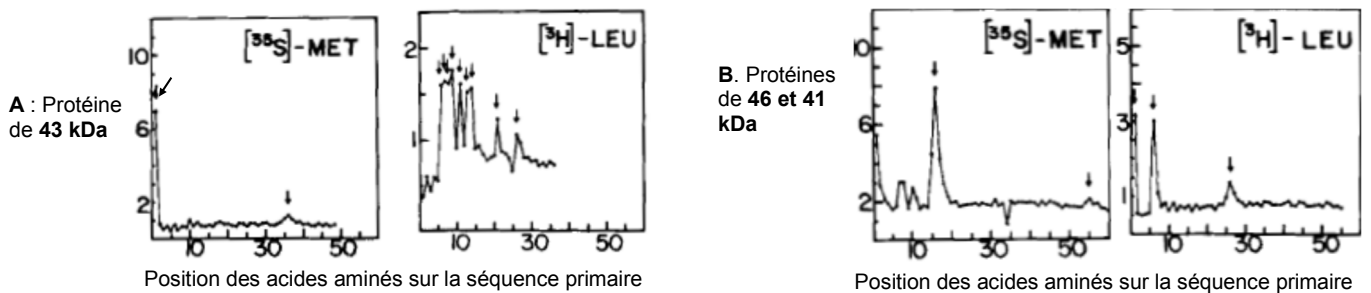


Fig. 2 : Analyse par HPLC des acides aminés décrochés de la protéine à partir de l'extrémité N-ter. Les acides aminés identifiés sont, à gauche, la méthionine, à droite la leucine. Chaque pic indique la présence de l'acide aminé étudié à la position indiquée sur l'axe des abscisses. Les pics à considérer sont indiqués par une petite flèche.

2. Après cette expérience *in vitro*, les chercheurs ont mené une expérience *in vivo* en injectant directement le plasmide d'expression codant la cathepsine D dans le noyau des ovocytes de *Xenopus* (l'ovocyte est une grosse cellule de 1 mm de diamètre destinée à former l'ovule de ce batracien. Du fait de sa taille, elle constitue un bon modèle cellulaire pour des études *in vivo*. L'expression de la Cathepsine D a été suivie dans cette cellule au cours du temps grâce à une expérience de *pulse-chasse* en présence de leucine tritiée : après microinjection, les cellules ont été incubées 3 min en présence de [³H]-Leu puis, après lavage des cellules, un excès de leucine froide a été ajouté. La radioactivité a été comptée dans les cellules et dans leur milieu de culture au cours des 2 heures qui ont suivi la chasse. Les résultats sont présentés dans le tableau I.

La localisation de la radioactivité a été précisée grâce à une expérience d'autoradiographie sur coupes d'ovocytes observées en microscopie électronique aux différents temps. Les grains d'argent ont été identifiés sur 3 types de compartiment et le nombre de grains d'argent a été comptabilisé. Les résultats sont présentés fig. 3.

Temps (min)	0	5	20	60	80	120
Dans les cellules	100%	95 %	92%	90%	90%	90%
Dans le milieu de culture	0%	5%	8%	10%	10%	10%

Tableau I : la radioactivité a été mesurée dans les 120 min qui ont suivi la chasse, au niveau des cellules et dans le milieu de culture de ces cellules. Les valeurs indiquées représentent le pourcentage de la radioactivité initiale incorporée dans les protéines cellulaires. (On considérera que la synthèse des protéines endogènes est négligeable par rapport à la synthèse de la cathepsine D).

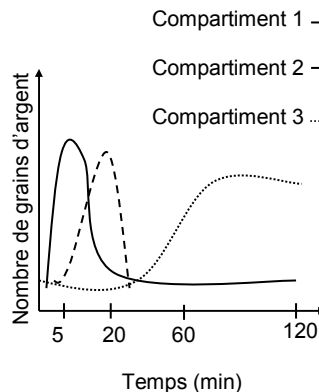


Fig. 3 : Localisation sub-cellulaire de la Cathepsine D repérée sur des coupes d'ovocytes observées en microscopie électronique à transmission après autoradiographie. Les cellules ont été prélevées après microinjection du plasmide d'expression, pulse/chasse et lavage, dans les 0 à 120 min après la chasse. Les grains d'argent déposés sur les coupes ont été comptabilisés.

.../...

3. La protéine Cathepsine D exprimée dans l'ovocyte, après microinjection du plasmide et pulse/chasse en présence de [³H]-Leu, a été analysée par PAGE-SDS et autoradiographie au cours du temps. Les résultats sont présentés fig.4. En parallèle, l'activité enzymatique de la cathepsine D exprimée par les cellules ayant reçu le plasmide a été mesurée (au moment de la chasse, un inhibiteur de synthèse protéique a été ajouté pour bloquer la synthèse de nouvelles protéines). Les résultats sont présentés fig. 5.

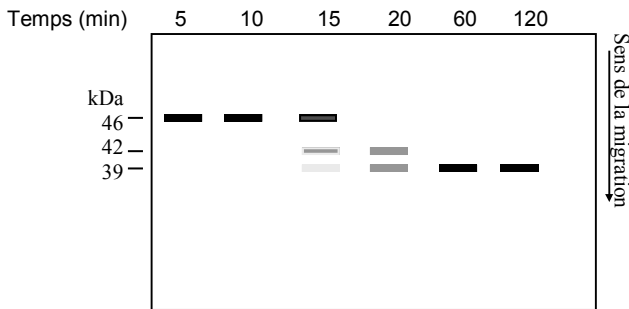


Fig. 4 : Analyse, par PAGE-SDS et autoradiographie, de l'expression de la Cathepsine D dans les 2 h qui ont suivi sa synthèse.

Les ovocytes de *Xenopus* ont reçu le plasmide d'expression de Cathepsine D par microinjection nucléaire. Les cellules ont été ensuite incubées 3 min en présence de [³H]-Leu puis une chasse a été réalisée. La protéine Cathepsine D a été ensuite analysée dans les 2 h qui ont suivi sa synthèse en PAGE-SDS et autoradiographie.

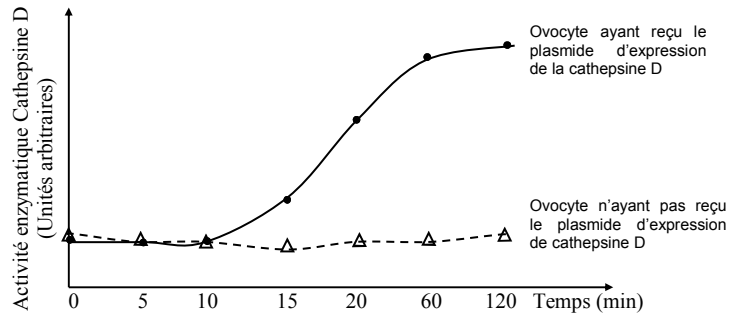


Fig. 5 : Analyse de l'activité enzymatique de Cathepsine D dans les 2 h qui ont suivi sa synthèse.

Les ovocytes de *Xenopus* ont reçu le plasmide d'expression de Cathepsine D par microinjection nucléaire. Après pulse/chasse, un inhibiteur de synthèse protéique a été ajouté aux cellules. Aux différents temps analysés, un lysat cellulaire a été préparé et l'activité enzymatique de la cathepsine D présente dans ce lysat a été mesurée sur un substrat spécifique de cet enzyme.

4. L'expression de la Cathepsine D a été induite dans les ovocytes par microinjection nucléaire du plasmide (mais sa synthèse n'a pas été réalisée en présence d'acides aminés radioactifs). 10 min après le début de l'expérience, les cellules ont été incubées pendant 3 min avec de l'UDP-N-Acétyle Glucosamine marqué au ³²P. A différents temps suivant la chasse (= addition de UDP-N-Acétyle Glucosamine non radioactif), la cathepsine D a été analysée par PAGE-SDS suivie d'une autoradiographie. Les résultats sont présentés fig. 6.

Par ailleurs, la cathepsine D retrouvée dans le milieu d'incubation des ovocytes au bout de 120 min (cf tableau I) ne s'est pas révélée radioactive.

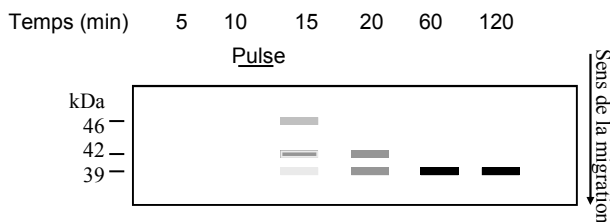


Fig. 6 : Les ovocytes de *Xenopus* ont reçu le plasmide d'expression de cathepsine D par microinjection nucléaire. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de UDP-N-Acétyleglucosamine marqué au ³²P. Le marquage radioactif au ³²P de la cathepsine D a été évalué en fonction de sa taille et au cours du temps grâce à une nouvelle électrophorèse en PAGE-SDS suivie d'une autoradiographie. (Attention : ici, la cathepsine D n'est pas marquée radioactivement du fait de l'incorporation de [³H]-Leu). Seule, la partie du gel montrant les protéines de masse moléculaire comprise entre 50 et 35 kDa est présentée.

5. Finalement, le plasmide d'expression de Cathepsine D a été modifié : les nucléotides codant la séquence KDEL ont été ajoutés en 3' de la séquence codante de cathepsine D de façon à produire une protéine ayant la séquence KDEL en Cter. Toutes les expériences précédentes décrites ont été réalisées. Les résultats sont les suivants :

- Les résultats présentés en Fig.1 et 2 restent inchangés avec Cathepsine D-KDEL.
- Tableau I : Toute la radioactivité reste dans les cellules et aucune radioactivité significative n'est trouvée dans le milieu d'incubation
- Fig. 3 : Presque 100% des grains d'argent restent associés au compartiment 1. Quelques grains sont visibles sur le compartiment 2 et aucun n'est observé sur le compartiment 3.
- Fig. 4 : Sur les 120 min de l'expérience, seule la bande à 46 kDa est détectée.
- Fig. 5 : L'activité enzymatique exprimée par les cellules ayant reçu le plasmide d'expression de Cathepsine D-KDEL s'est révélée identique à celle mesurée dans les cellules contrôle n'ayant pas reçu de plasmide.

Tout en répondant aux questions suivantes, vous procéderez à une analyse des différentes expériences, vous proposerez des explications et des hypothèses ou des conclusions. Vous chercherez à mettre en relation les informations apportées par ces différentes expériences en confrontant les informations qu'elles apportent.

1. *Précisez la nature de la fraction microsomale. En vous appuyant sur vos connaissances et sur l'analyse des figures 1 et 2, expliquez l'existence des 3 protéines de masse apparente 43, 46 et 41 kDa et précisez ce qui est à l'origine de ces variations de taille. L'information apportée par l'addition des microsomes et l'utilisation de la glycosidase doit vous permettre de comprendre ces variations de masse de la protéine.*
2. *En conjuguant les informations apportées par la réponse à la question 1, le tableau I et la fig.3, décrivez les étapes de l'adressage de la cathepsine D. Vous justifierez votre réponse par des arguments tirés des expériences. Vous identifierez les 3 compartiments mentionnés dans la fig. 3.*

3. Que signifie l'apparition des bandes de taille inférieure à 46 kDa qu'indique la fig. 4. Que signifie l'existence du doublet 42KDa/39KDa. En utilisant les résultats de la fig. 3 et ceux de la fig. 5, localisez dans la cellule l'évènement mis en évidence fig. 4 et précisez son rôle.
4. Pourquoi a-t-on incubé les cellules avec ce composé radioactif ? Quelle information ce résultat apporte-t-il ? En quoi permet-il de préciser la nature du compartiment 3 présenté dans la figure 3. Commentez l'absence de marquage radioactif de la protéine Cathepsine D présente dans le milieu d'incubation.
5. Quel est le rôle de KDEL ? Expliquez en quoi sa présence en Cter de cathepsine D peut-elle expliquer les différences de résultats obtenus dans les expériences.

Exercice 3 : (tiré du sujet d'examen 2016-2017)

La séquence codante du gène d'une protéine soluble nucléaire a été modifiée de façon à ce qu'une fois traduite, cette séquence code une protéine ayant une séquence signal d'adressage au réticulum endoplasmique à l'extrémité N-terminale. Le reste de la séquence est par ailleurs non modifiée.

Lorsque cette protéine ainsi modifiée est synthétisée par la cellule, où pensez-vous que cette protéine se trouvera majoritairement localisée, dans le noyau ou le réticulum endoplasmique ? Justifiez votre réponse.