

La protéine SUN 1 est une protéine de l'enveloppe nucléaire, dont l'extrémité N-terminale est attachée à la lamine A (protéine codée par le gène *Lmna*). La protéine SUN 1 traverse la membrane nucléaire interne, et interagit avec la nesprine dans l'espace intermembranaire nucléaire. La progeria est une maladie due à une mutation du gène *Lmna*, et qui se caractérise par un vieillissement prématuré.

WT= Wild Type (sauvage pour les anglophobes)

Lmna -/- : cellule homozygote invalidée pour le gène *Lmna*

Sun 1 -/- : cellule homozygote invalidée pour le gène *Sun 1*

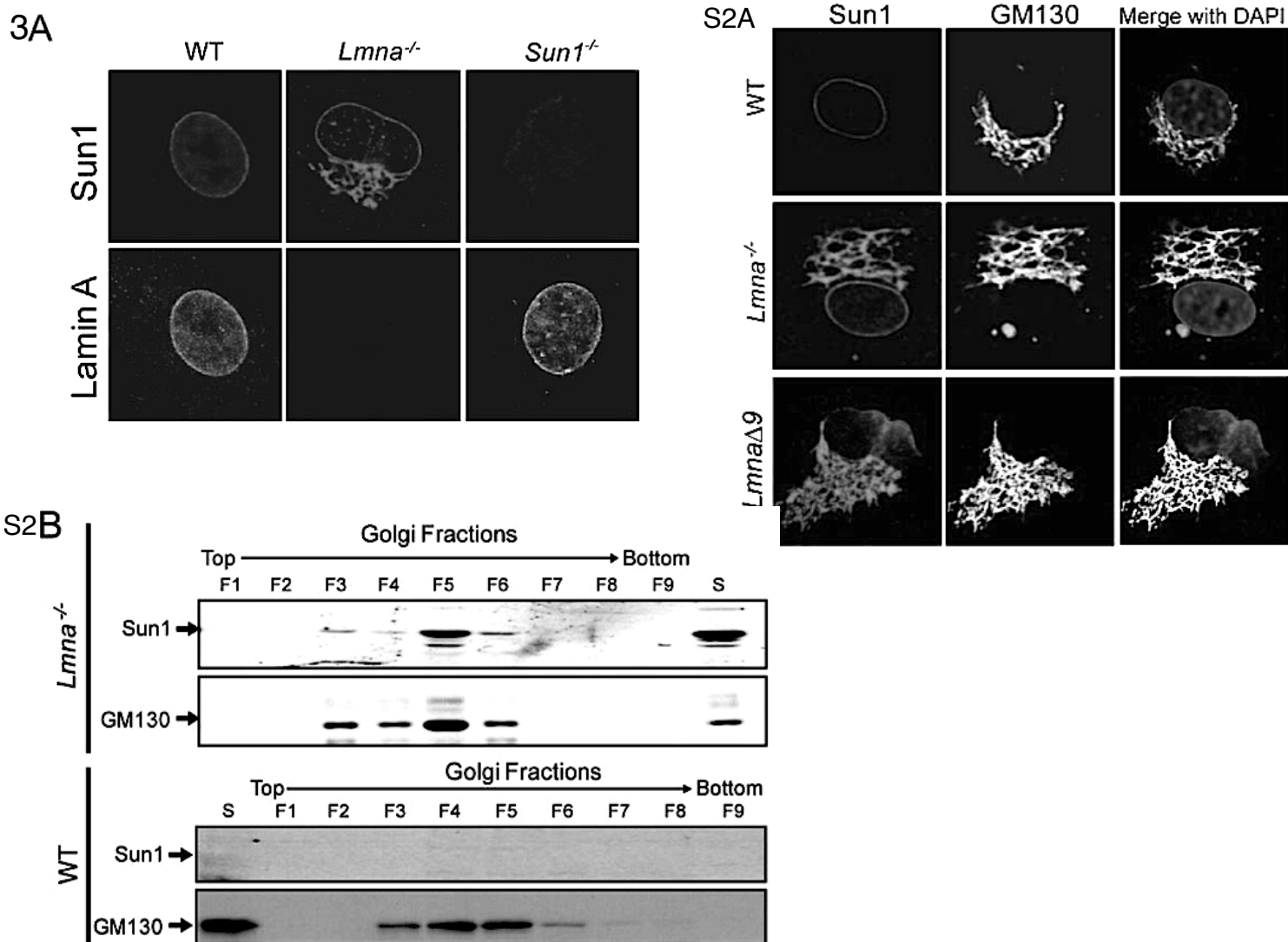
GM130: marqueur du Golgi

*Lmna*Δ9: cellule mutée sur le gène *Lmna*, engendrant une délétion de 9 acides aminés

Figure 3A: immunomarquage avec anticorps anti-SUN 1 (rouge, 'fin gris :p) et anticorps anti-Lamine A (vert, donc gris :p) dans des cellules WT, *Lmna* -/- et *Sun1* -/- (merge, c'est quand on superpose mais en noir et blanc c'est pas génial)

Figure S2A: immunomarquage avec anticorps anti-SUN 1 et anti-GM130 dans des cellules WT, *Lmna* -/- et *Lmna*Δ9

Figure S2B: immunoblot (utilisation d'anticorps anti-SUN1 et d'anticorps anti-GM130), comparaison par gradient de sucrose de fraction cytosolique (S) et de fractions du Golgi dans des cellules *Lmna* -/- et WT



Doc 3A: Vous observez la présence anormale de SUN 1 un peu autour du noyau dans les cellules *Lmna* -/-.

Doc S2A: En marquant le Golgi et la SUN 1, vous observez donc une accumulation de SUN 1 au golgi dans ce cellules.

Doc S2B: Vous confirmer l'accumulation par western-blot: en effet chez ces cellules *Lmna* -/-, vous avez de la SUN 1 dans la fraction golgienne n°5. Ce doc vous apporte également l'information qu'il y a de la SUN 1 dans le cytoplasme (fraction S, à droite) ainsi que du marqueur du Golgi dans le cytoplasme, là on a l'impression que le Golgi «fuit», il laisse échapper des protéines dans le cytoplasme. Sauf que de cette info là tout de suite on s'en fout ^^/

=> On retient de cet ensemble qu'il y a accumulation au Golgi de SUN 1 dans les cellules *Lmna* -/-

QCM 11: À propos des figures 3A, S2A, et S2B

A) La protéine SUN 1 et la lamine A se situent au niveau de la membrane nucléaire dans les cellules WT

B) On démontre que SUN 1 s'accumule au niveau du Golgi dans les cellules *lmna* - / -

C) On suggère que SUN 1 n'a pas besoin de la présence de lamine A pour se localiser au niveau de la membrane nucléaire

D) On suggère que le mutant *lmna*Δ9 ne produit pas la protéine SUN 1

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Pour le A => Alors même si les photos sont pas sorties, le A était de toute façon vrai avec votre cours ;)

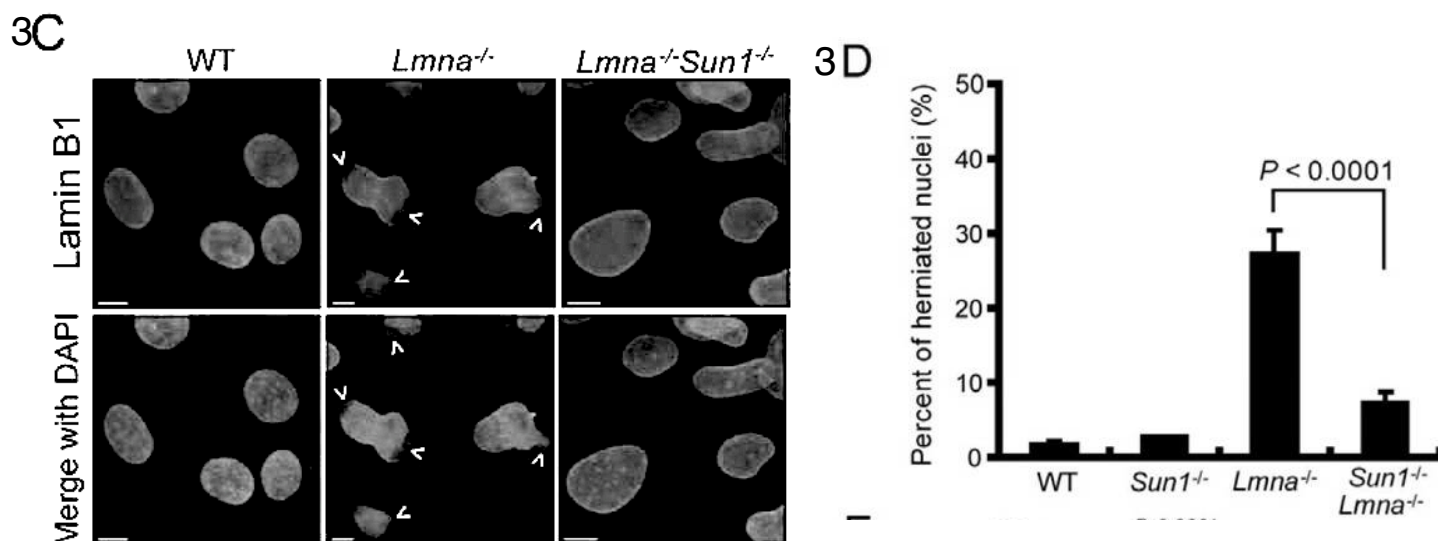
Pour le C => En effet, chez les cellules *lmna* - / - , SUN 1 se situe de toute façon à la membrane nucléaire. On ne le démontre pas, mais on le suggère ;)

Pour le démontrer, il faudrait marquer à la fois la membrane nucléaire et SUN1 puis faire un merge, ainsi qu'un WB du marqueur de la membrane nucléaire et de la SUN1.

Figure 3C: immunomarquage de la lamine B1 dans des cellules WT, Lmna - / - et Lmna - / - Sun 1 - / -

Figure 3D: boîte à moustache (à bien réviser pour votre biostat) des pourcentages de déformations nucléaires

À savoir: les petites flèches ou triangles visibles dans les images de microscopie repairent les problèmes nucléaires ;)



Doc 3C: Le fait de marquer la lamine B1 (qui est une protéine nucléaire) permet de bien voir le noyau d'une part, ça permet éventuellement de vérifier si y a pas des interactions foireuses (comme dans le prochain ensemble de doc).

Là vous voyez chez les *lmna* - / - , ya des problèmes nucléaires important, qui n'apparaissent pas chez les cellules *lmna* - / - *Sun 1* - / - . Donc le fait de ne plus avoir de SUN 1 quand à la base on n'avait pas de lamine A semble réduire les problèmes nucléaires.

DOC 3D: On le voit bien avec ce diagramme, où les cellules *lmna* - / - présentent un fort pourcentage de défauts nucléaires, réduit dans le cadre des cellules *lmna* - / - *SUN 1* - / -

=> On se dit que l'accumulation de SUN 1 est responsable d'une augmentation des problèmes nucléaires

QCM 12: À propos des figures 3C, 3D, et des figures précédentes

A) Le Golgi des cellules *lmna* - / - présentent des extrusions de sa membrane

B) La perte de SUN 1 chez une cellule sauvage entraîne l'apparition de défauts de l'enveloppe nucléaire

C) On démontre que les irrégularités nucléaires ne s'expliquent pas uniquement par la perte de lamine A

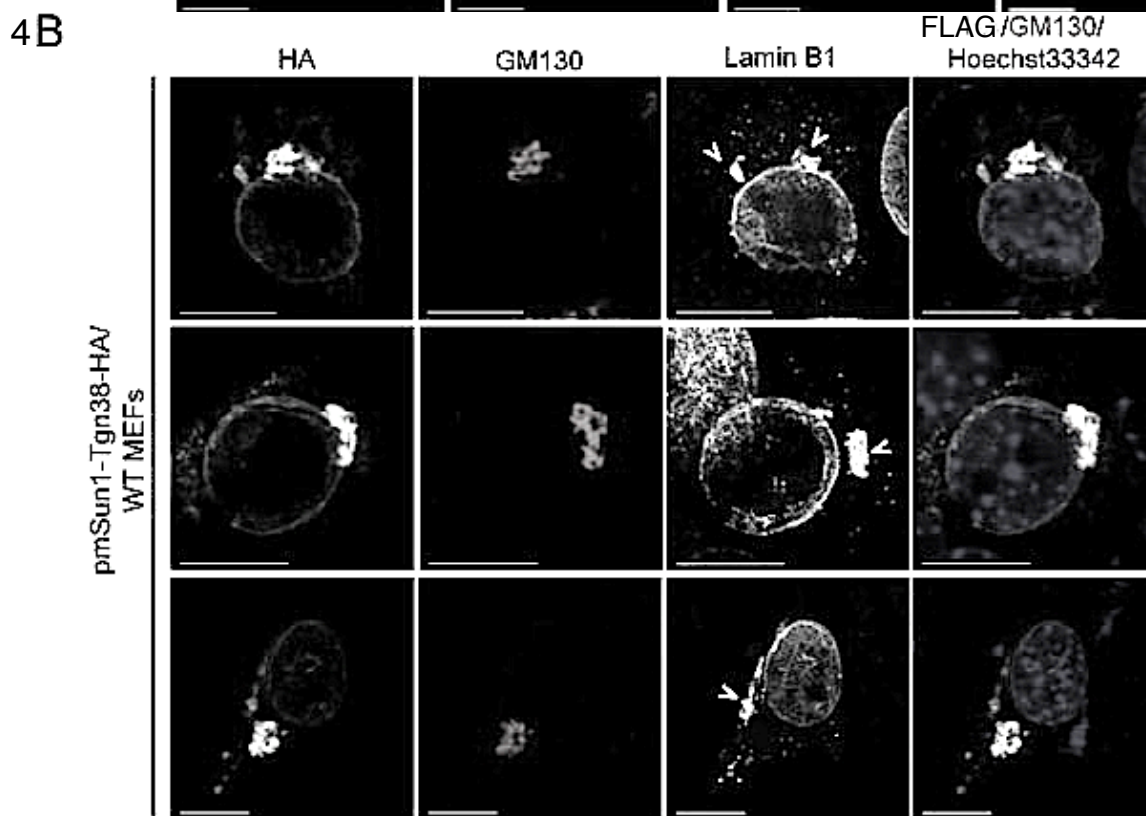
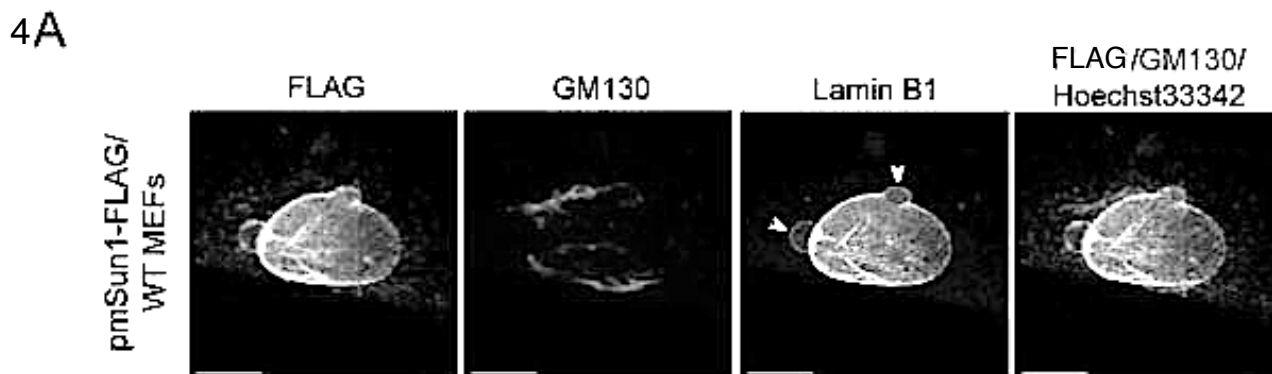
D) On démontre que réduire l'accumulation de SUN 1 au niveau du Golgi modère les irrégularités nucléaires dans les cellules *lmna* - / -

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Figure 4A: on transfecte dans un MEF sauvage (Mouse Embryonic Fibroblast, mouse= souris) un gène hybride FLAG-pmSUN 1 (m pour mouse, p pour plasmide) et on réalise un immunomarquage (anticorps anti-FLAG, anticorps GM130, anticorps Lamine B1, FLAG est une étiquette), coloration de l'ADN à l'Hoechst

Figure 4B: on transfecte un gène hybride pmSUN 1-Tgn38-HA dans des MEFs sauvages (Tgn38 est une protéine du Golgi), et on réalise un immunomarquage (anticorps anti-HA, anticorps anti-GM130, anticorps anti-Lamine B1)

Figure 4C: Localisation de la lamine B1 (Mock= contrôle)

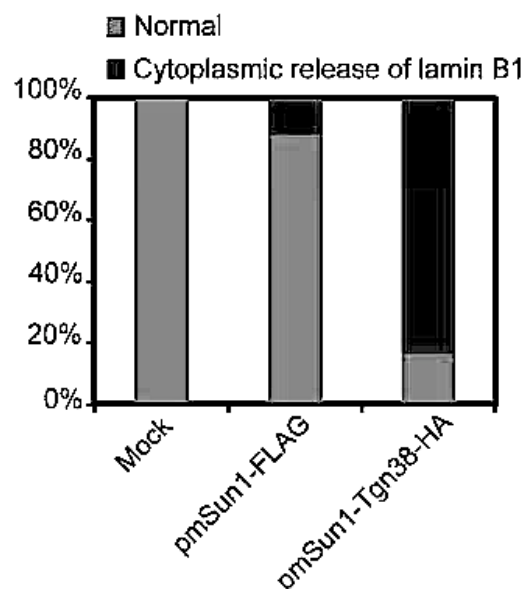


Doc 4A: Là on rajoute à une cellule sauvage un gène hybride composé de SUN 1 et d'une étiquette FLAG (qu'on pourra immunomarquer). Du coup, notre cellule sauvage a beaucoup de SUN 1, que ce soit sa SUN 1 normale qu'elle produisait physiologiquement, ou de la SUN 1 hybride. On constate d'ailleurs qu'il y a des hernies nucléaires, comme on l'avait pensé très fort avant le qcm 12.

Doc 4B: là ce qui est cool, c'est qu'on va visualiser la SUN 1 hybride accumulée au Golgi, et pas de l'autre SUN 1 physiologique de notre cellule sauvage. On observe qu'il semble y avoir une interaction entre la lamine B1 et la SUN 1 hybride.

Doc 4C: en effet, on s'aperçoit que l'accumulation golgienne de SUN1 hybride augment le relargage de la lamine B1 dans le cytoplasme.
=> On retient ce résultat: interaction entre accumulation de SUN 1 hybride au Golgi et le relargage cytoplasmique de la lamine B1

4C



(to release= libérer, sortir, relâcher :p)

QCM 13: À propos des figures 4A, 4B, 4C, et des figures précédentes

- A) On démontre qu'une accumulation de SUN I au Golgi augmente la redistribution cytoplasmique de la lamine B1
- B) On démontre que la lamine B1 est surexprimée dans les MEFs WT transfectés par le gène pmSUN 1- Tgn38-HA
- C) On suggère que la lamine B1 est une protéine cytoplasmique
- D) On suggère qu'il y a une redistribution cytoplasmique de la lamine B1 dans les cellules Lmna - / -**
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Pour le D:

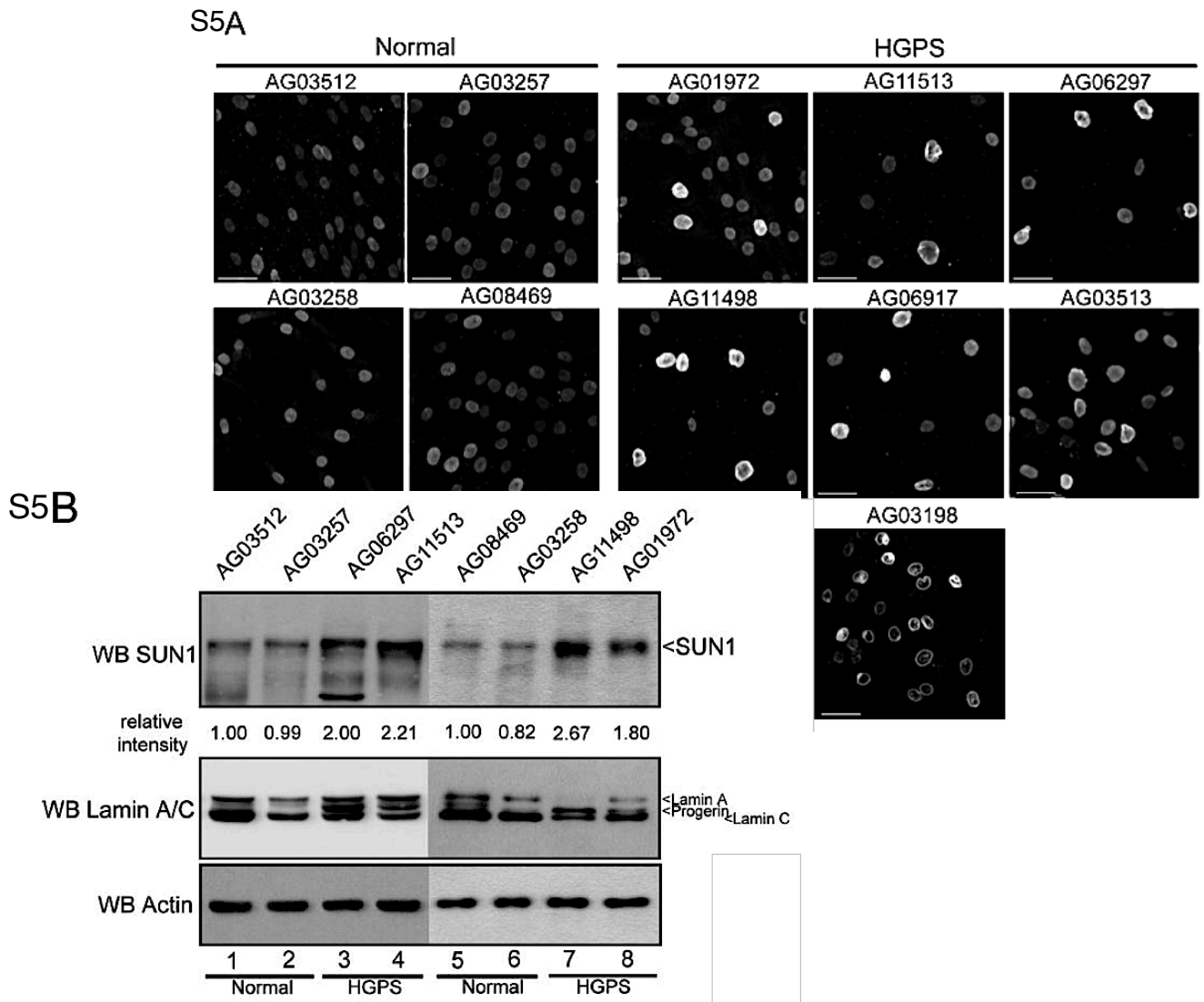
On avait retenu «Accumulation de SUN 1 dans le Golgi des cellules Lmna - / -», à cette info vous rajoutez la suggestion (suggestion et pas démonstration puisqu'on observe une SUN 1 hybride, et pas une SUN 1 normale) que «l'accumulation de SUN1 au Golgi entraîne une distribution cytoplasmique de la lamine B1» et vous obtenez l'item D/

Figure S5A: immunomarquage de SUN 1 dans des fibroblastes de peau de 4 individus normaux et de 7 individus atteints de progeria (HGPS: Hutchinson Gilford Progeria Syndrome)

Figure S5B: westernblot (WB) de SUN 1, lamine A, progérine (= prélamine A), lamine C et actine

Figure 6A: Immunomarquage de SUN 1, lamine B1. Le DAPI visualise l'ADN.

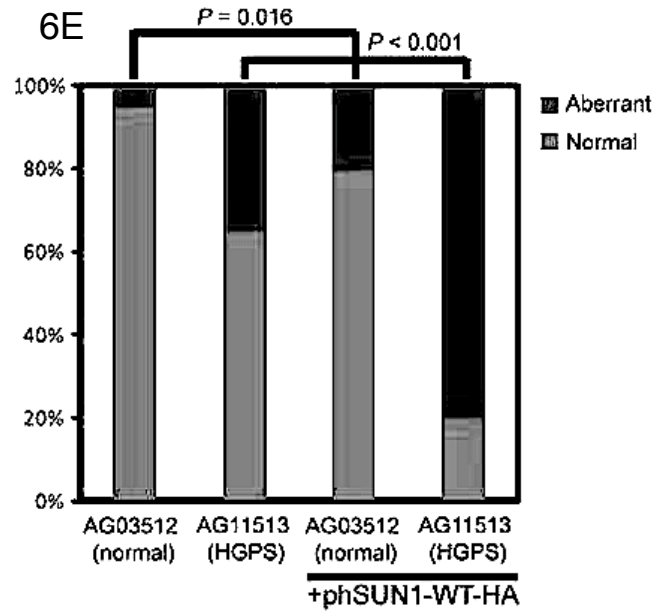
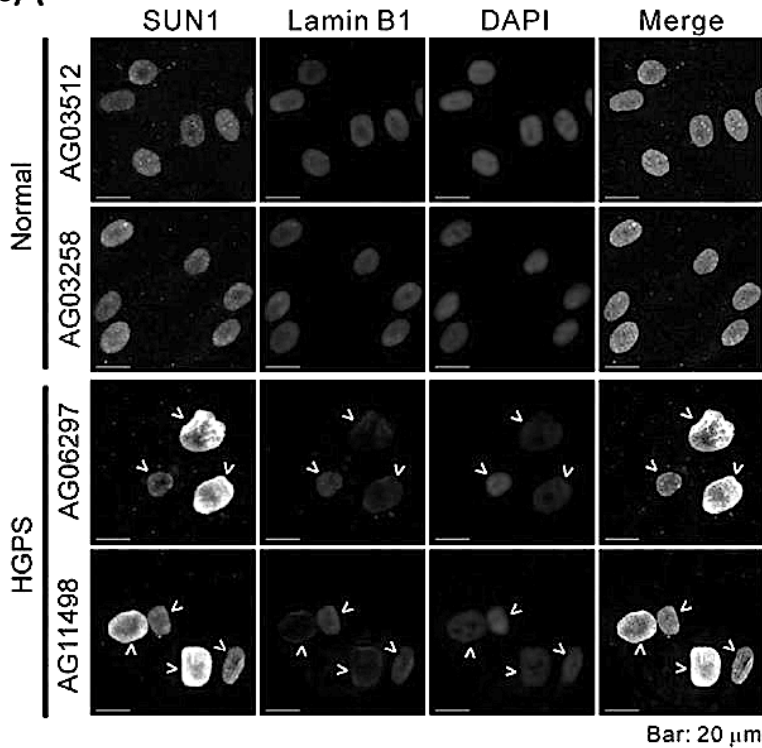
Figure 6E: joli graphique des pourcentages d'aberrations nucléaires chez nos fibroblastes, avec et sans ajout de phSUN1-WT-HA



Doc S5A: les noyaux des cellules malades sont plus brillants, révélant donc une accumulation de SUN1 dans leur noyau. Attention parce que les cellules malades ne sont pas des cellules Lmna - / -, là ce sont des cellules atteintes de progeria, donc mutée pour le gène de lamine A. C'est une situation différente que d'avoir de la lamine A mutée ou pas de lamine A.

Doc S5B: le wester confirme par l'intensité relative qu'il y a trop de SUN 1 dans les cellules malades.

6A



Doc 6A: voilà vous observez vos protéines favorites chez des cellules HGPS et tout

Doc 6E: Là vous regardez deux choses:

- à gauche, le fait d'être HGP entraîne des problèmes nucléaires
- à droite, le fait d'avoir trop de SUN 1 (même histoire car SUN 1 + SUN 1 hybride) a les mêmes conséquences

QCM 14: À propos des figures S5A, S5B, 6A, 6E, et des figures précédentes

A) On trouve de la progérine dans les fibroblastes WT

B) On démontre que SUN 1 s'accumule dans les fibroblastes HGPS

C) On suggère fortement que la surexpression de SUN 1 dans les fibroblastes HGPS ou WT augmente les déformations nucléaires

D) On suggère que la surexpression de SUN 1 dans les fibroblastes HGPS est due à un défaut de son turn-over*

E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

*balance entre synthèse et dégradation

Pour le D:

Il est parfaitement juste, en fait pour la petite histoire il y a toute une partie de l'expérience originelle qui consiste à prouver qu'il y a un défaut de turn-over de SUN 1 quand il y a des problèmes avec la lamine A. Je ne vous ai pas mis cette partie parce que c'était déjà hyper long, et ça faisait appel à des méthodes que vous n'avez pas vu (*ARN-interférents et tout, rien que le nom doit vous donner la chaire de poule* ^^).

Donc là, dans les cellules HGPS, il y a soit une synthèse trop importante, soit une mauvais dégradation.

(ils ont prouvés qu'il y avait une inhibition de la dégradation)

Figure S6A: Immunomarquage de RBBP4 (marqueur de l'hétérochromatine) dans des cellules WT et *Lmna*^{-/-}
Figure 7A: Immunomarquage de RBBP4 ou d'H3K9me3 (triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, marqueur de l'hétérochromatine) et de SUN1 dans des fibroblastes normaux et HGPS.

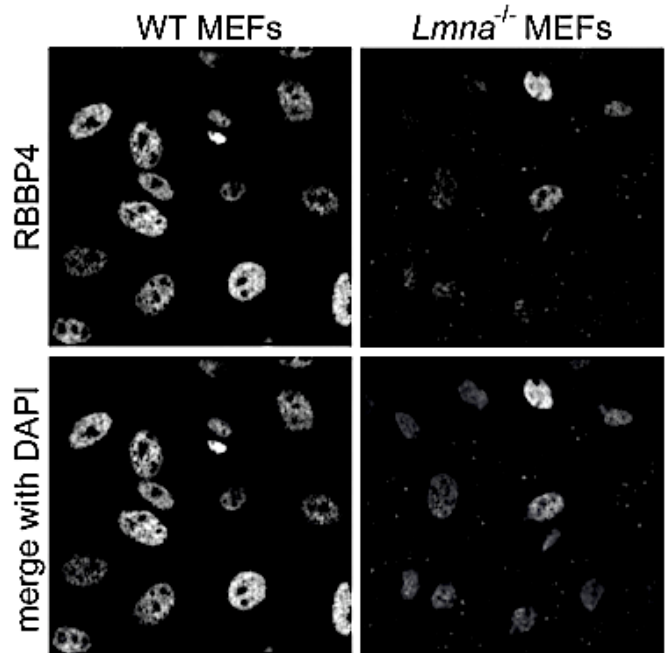
Vous voulez voir les interactions entre lamine A et hétérochromatine, puisque vous connaissez votre cours et savez que l'hétérochromatine périphérique s'accroche à la lamine A:

Doc S6A: vous visualisez l'hétérochromatine chez des sauvages et chez des *Lmna*^{-/-} : vous constatez qu'il y en a moins chez les cellules *Lmna*^{-/-} !

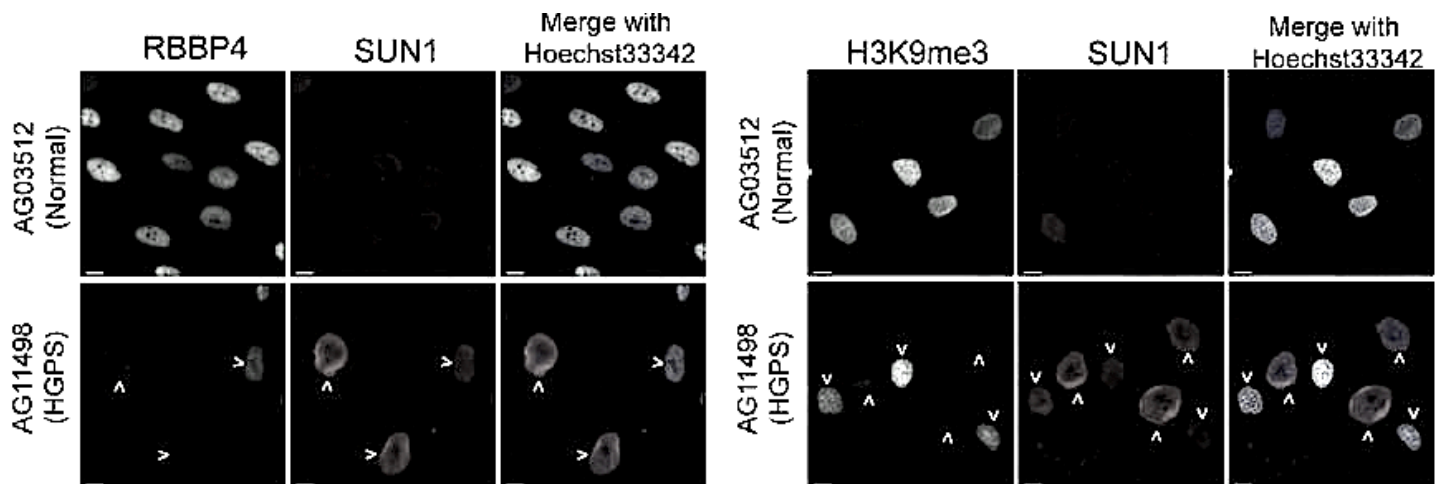
Doc 7A: la même, mais chez des sauvages et des HGPS, et vous visualiser également qu'il y en a moins chez les HGPS.

⇒ Vous vous dites, ah ben tiens, j'ai une maladie caractérisée par une sénescence accélérée, et pour laquelle des cellules perdent leur hétérochromatine périphérique puisque elles ont des problèmes de lamine A.

S6A



7A



QCM 15: À propos des figures S6A, 7A et des figures précédentes

- A) La méthylation de SUN I par l'histone H3 est caractéristique de l'hétérochromatine
- B) On observe une corrélation inverse entre l'expression de SUN 1 et le taux de RBBP4 ou de H3K9me3
- C) Ces résultats suggèrent fortement que les cellules HPGS présentent une importante perte de l'hétérochromatine
- D) On suggère que les dérégulations de l'hétérochromatine dans les cellules HGPS est à l'origine d'une sénescence accélérée
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses

Voilà, j'espère que ça vous aura servi !

Pour les petits curieux qui veulent se rendre compte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541428>