

*Bonjour à tout le monde et bienvenue pour ce dernier cours de biologie cellulaire ; le prof commence par dire qu'il a eu énormément de questions venant de votre part, qui lui ont fait soulever de nombreuses ambiguïtés dans son cours et qu'il en tiendrait compte pour le concours. Il ne pourra pas répondre à toutes les questions c'est pourquoi il commencera son cours par une sorte de TD contenant 3 exercices soulevant les interrogations les plus populaires qu'il a rencontrées dans vos questions. Je rappelle aussi que bien évidemment il ne vous demande **pas** d'apprendre par cœur le nom des gènes ou des choses comme ça. Notez bien que la forme des questions posées pour ce TD ne sera pas celle du concours qui sera donc la même que l'an dernier.*

## MINI TD

### 1° Concernant la mise en culture des fibroblastes primaires: laquelle (ou lesquelles) de ces propositions est (sont) correcte(s)?

- A- Les fibroblastes de culture primaires peuvent effectuer un nombre illimité de division à condition de remplacer suffisamment souvent le milieu de culture adéquat.
- B- Un avantage de travailler avec des cellules en cultures est de travailler avec un contenu cellulaire plus homogène qu'un tissu.
- C- Aucune cellule humaine mise en culture n'est capable de pousser directement sur le plastique des boîtes de pétri.
- D- Des lignées immortelles peuvent être obtenues de manière spontanée mais il s'agit d'un phénomène très rare pour les cellules humaines.
- E- La mise en culture primaire de fibroblaste de peau nécessite de travailler avec des virus.

#### Réponses:

- A- Faux: ça c'était la vision du début du XX<sup>ème</sup> siècle à cause d'expériences qui n'ont jamais pu être reproduites, enfin c'est grâce aux Américains que l'on sait que les cultures primaires des cellules somatiques (des fibroblastes) ont un nombre limité de division.
- B- Vrai ; c'est dans son cours.
- C- Faux: certaines en sont capables comme les fibroblastes, et pour le mot « directement » c'est oui aussi les fibroblastes vont créer des liaisons avec le plastique, en fait ils considèrent le plastique de la boîte de pétri comme la matrice extracellulaire.
- D- Vrai: c'est un phénomène rare (mais moins rare pour les cellules de souris)
- E- Faux: le traitement par des virus (ou par des radiations ionisantes) est nécessaire pour l'immortalisation mais pas pour la mise en culture primaire.

(Le prof dit que ce n'est pas du par cœur c'est juste de la logique...)

2° Les patients atteints de PBD (Peroxisome Biogenesis Disorder) présentent une déficience d'activité DHAP-AT qui intervient dans la biosynthèse de certains glycérophospholipides. L'activité DHAP-AT mesurée dans des fibroblastes de peau mis en culture primaire à partir d'individus normaux est environ de 10 unités. On estime que le taux d'erreur de mesure de cette enzyme n'excède pas 20% (*en gros entre 8 et 12 unités c'est pareil*). Des fibroblastes de 7 patients PBD ont été mis en culture primaire et l'activité DHAP-AT mesurée est de 2 unités pour le patient RCDP, 1 unité pour le patient ZS1, 1 unité pour le patient ZS2, 1 unité pour le patient ZS3, 0,1 unité pour le patient IRD, 0,2 unité pour le patient HPA, et 2 unités pour le patient NALD. Des hétérocaryons entre ces fibroblastes malades et des fibroblastes normaux ont été générés. L'efficacité de la fusion a été estimée comme le pourcentage de cellule multinucléées et se situe généralement à 90%. Trois jours après la fusion toutes les cultures de cellules expriment une activité entre 8,8 et 12 unités (*ça correspond à un niveau normal*).

*Le prof vous dit que le texte contient beaucoup d'informations superflues et qu'il faut savoir faire le tri, par contre le texte contient toutes les informations nécessaires pour répondre. En gros le nom de l'enzyme n'est pas très important en soit.*

### Laquelle (ou lesquelles) des ces propositions concernant les mutations des 7 patients PBDs est (sont) correcte(s)?

- A- Les mutations sont toutes portées par le même gène.
  - B- les mutations forment 7 groupes de complémentation.
  - C- Les mutations des patients ZS1, ZS2, ZS3 sont portées par le même gène et les mutations RCDP et NALD par un
- Biologie cellulaire du 29/01/10 La Ronéo est indépendante de la Faculté de Médecine et ne peut en aucun cas servir de support officiel pour l'examen.*

autre gène.

**D-** Les mutations sont dominantes.

**E-** les mutations sont complémentées par le génome des fibroblastes normaux.

**Réponses:**

Les patients ZS1, ZS2, ZS3, RCDP, IRD, HPA et NALD sont patients qui ont une mutation sur ces gènes là.

*Schéma 1 et 2*

→ Rappel:

- Petit rappel sur la fusion des cellules, on a besoin souvent d'agent pour l'induire bien qu'elles puissent aussi être spontanées. On a une première étape où les cytoplasmes sont fusionnés mais pas les noyaux au bout de quelques jours, puis après une 2ème étape qui correspond à la fusion des enveloppes nucléaires et on forme la vraiment un hybride cellulaire.
- La complémentation d'une mutation récessive, c'est l'habilité à restaurer une fonction en combinant dans une même cellule : le génotype de 2 cellules dont au moins une est mutante et 2 gènes dont au moins 1 est mutant.
- Test de récessivité: restauration du phénotype sauvage par introduction dans la cellule du gène sauvage

→ Ici il s'agit donc d'un test de récessivité. On aurait parlé de test de complémentation si on avait croisé 2 cellules mutantes !!

**A-** Faux: on ne peut pas savoir puisqu'il s'agit d'un test de récessivité (et non de complémentation)

**B-** Faux: idem

**C-** Faux : idem

**D-** Faux: tous les hétérocaryons ont un niveau d'enzyme similaire au niveau des cellules normales : les mutations sont complémentées par le génome des fibroblastes normaux. Les mutations sont donc toutes récessives.

**E-** Vrai

3° les fibroblastes des patients sont maintenant fusionnés deux à deux et les résultats d'activité DHAD-AT (3 jours après la fusion) sont donnés dans le tableau:

	<b>RCDP</b>	<b>ZS1</b>	<b>ZS2</b>	<b>ZS3</b>	<b>IRD</b>	<b>HPA</b>	<b>NALD</b>
<b>RCDP</b>	<b>2</b>						
<b>ZS1</b>	<b>8,8</b>	<b>1</b>					
<b>ZS2</b>	<b>9</b>	<b>9,8</b>	<b>1,1</b>				
<b>ZS3</b>	<b>8,5</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>1</b>			
<b>IRD</b>	<b>11</b>	<b>0,7</b>	<b>11,4</b>	<b>10</b>	<b>0,1</b>		
<b>HPA</b>	<b>10,5</b>	<b>1</b>	<b>8,3</b>	<b>9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	
<b>NALD</b>	<b>10</b>	<b>8,9</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>10,7</b>	<b>2,1</b>

Laquelle (ou lesquelles) des ces propositions est (sont) correcte(s)?

**A-** RCDP et ZS1 appartiennent au même groupe de complémentation.

**B-** Les 7 patients appartiennent à 5 groupes de complémentation.

**C-** les fibroblastes ZS1 et IRD sont probablement mutés dans le même gène.

**D-** il existe un groupe de complémentation comprenant 3 patients

**E-** le génome des fibroblastes NALD complémente la mutation RCDP.

## Réponses:

→ Rappel:

### *Schéma 3 et 4*

▪ Test de complémentation: établit l'allélisme de deux mutations récessives (*il faut au préalable établir un test de récessivité comme cela a été fait précédemment*), on confronte 2 mutants pas comme précédemment où l'on confrontait le mutant avec le sauvage. Il permet de déterminer si deux mutations appartiennent au même groupe de complémentation.

Ici on peut suggérer fortement que chaque gène appartient à 2 groupes distincts de complémentation, ça traduit le fait que chaque mutation est portée par des gènes différents. On le suggère fortement mais on ne l'affirme pas car on peut avoir des cas de suppression intra-génique (*2 mutations portées par le même gène qui vont se compléter et donner un phénotype sauvage*) mais ça reste des cas exceptionnels. Dans le schéma 3 c'est la co-expression des gènes non mutés (M1 et M2) qui permet de rétablir le phénotype sauvage.

*Donc si pas de complémentation, les mutations appartiennent aux mêmes gènes et si complémentation sauf cas exceptionnelle de suppression intra génique les mutations appartiennent à 2 gènes distincts et on dit qu'ils appartiennent à des groupes de complémentation distincts, j'espère vous avoir éclairé.*

Par rapport aux résultats du tableau on peut voir que lorsque l'on croise des mutants RCDP et ZS1 on a une activité enzymatique de 8 unités donc normale donc il y a complémentation donc RCDP et ZS1 appartiennent à 2 gènes distincts. Par contre si l'on croise des mutants ZS1 et HPA l'activité enzymatique est de 1 unité donc faible donc phénotype muté donc pas de complémentation donc ZS1 et HPA appartiennent au même gène.

A- Faux:

B- Vrai: les groupes de complémentation sont :

\_RCDP car il se complémente avec tous les autres sauf avec lui-même évidemment.

\_ZS1, IRD, HPA car ils ne se complémentent jamais entre eux, ils appartiennent donc aux mêmes gènes et forment donc ce que l'on nomme un groupe de complémentation

\_NALD

\_ZS2

\_ZS3

C- Vrai

D- Vrai, c'est le groupe ZS1, IRD, HPA

E- Vrai on a une activité de 10 unités si on croise NALD et RCDP donc phénotype normal (sauvage) donc complémentation.

## SUITE DU COURS

### **E) signalisation cellulaire :**

#### **1) Généralités :**

#### **2) Exemple des récepteurs membranaires de type Tyrosine Kinase :**

Les récepteurs les plus connus sont les récepteurs couplés aux tyrosines kinases (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G.

### *Schéma 5*

Les RTK sont les plus répandus des récepteurs : 50 gènes différents (50 groupes de complémentations si vous voulez) codent pour des RTK.

Ils comportent tous un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire souvent lié à un sucre et une partie intracellulaire qui possède une activité enzymatique. Ce sont des récepteurs très importants: ils signalent la présence d'insuline et de facteurs de croissance. Les Tyrosine-Kinases sont des enzymes qui sont spécialisées dans la phosphorylation des résidus tyrosine, si l'on phosphoryle une protéine on va modifier sa charge sa structure et donc agir sur sa fonction (à chaque kinase correspond une phosphatase). Par rapport à la régulation génique on a ici des phénomènes qui peuvent s'activer se faire et se défaire très rapidement.

Ces récepteurs sont souvent associés à des radeaux lipidiques et donc sont concentrés à la surface, cette disposition est très importante car une étape clé de la transmission du signal est la formation d'homodimère de ces récepteurs et donc plus la concentration en récepteurs est importante et plus la formation d'homodimère est facile et donc meilleur sera le signal alors que dans le cas contraire le signal est moins important.

#### *Schéma 6, 7, 8,9 et 10*

L'arrivée de ligand dans le milieu extracellulaire va provoquer une homodimérisation du récepteur. Cette homodimérisation va provoquer une activation du domaine intracellulaire qui va agir comme une enzyme: donc effectuer une phosphorylation en utilisant de l'ATP. Le récepteur va d'abord s'auto-phosphoryler: c'est la transphosphorylation qui va se continuer

Un récepteur phosphorylé sur les tyrosines permet la fixation de protéines (appelées aussi protéines d'échafaudage) aux domaines SH2 et certaines de ces protéines vont contenir plusieurs sites SH2 et aussi avoir des sites tyrosine phosphorylase. Ces protéines peuvent fixer d'autres tyrosines phosphorylées: créant ainsi un réseau protéique autour de ce récepteur homodimérisé. Ces protéines d'échafaudage vont aussi contenir des domaines SH3 permettant la fixation d'autre protéine de signalisation.

On a besoin de ce réseau complexe pour signaler et pas seulement de l'homodimérisation afin d'effectuer la transmission dans le cytosol qui se fera à partir d'un certain seuil de complexité du réseau.

A partir de là on a 2 grandes voies de signalisation qui signaleront à l'ensemble de la cellule: Map-kinase et phosphoinositides.

#### **A- Voie Map-Kinase:**

C'est une voie très conservée dans les organismes eucaryotes (levure, invertébrés), elle intervient dans le contrôle de nombreux programmes cellulaires (divisions, migrations, différenciations...) c'est une voie souvent perturbée dans les pathologies: cancers... C'est aussi une cible pharmacologique importante.

#### *Schéma 11*

L'ensemble des phénomènes vus précédemment vont permettre l'activation de la protéine RAS qui est une protéine G monomérique associée à la membrane et qui va provoquer une cascade de phosphorylation par l'activation des MAP kinases.

Notons que RAS lorsqu'il est modifié est un oncogène très puissant.

RAS existe sous 2 formes :

- inactive : associée à du GDP,
- active : associée à du GTP.

Pour passer du GDP au GTP il s'agit d'un simple échange grâce à une protéine GEF (Guanine nucléotide Exchange Factor) et pour passer du GTP au GDP il s'agit d'hydrolyse grâce à 1 protéine GAP (GTPase Activating Protein). Ils y a autant de protéine GAP et GEF qu'il y a de protéine G monomérique différente. RAS possède donc une protéine GAP et GEF particulière il s'agit de p120gap et SOS pour GEF.

On a la protéine RAS qui possède des espèces de portes pouvant s'ouvrir et se fermer (**switch 1** et **switch 2**) ainsi que derrière ces portes un site de reconnaissance du GDP ou GTP. SOS se fixe sur SWITCH 1 et 2 (S1 et S2) de RAS-GDP, l'insertion d'une hélice alpha de SOS déplace S1 du site de fixation du GDP et le GDP diffuse, laissant la place pour le GTP qui prend la place. RAS va pouvoir activer la voie des MAP Kinases est donc modifier le programme cellulaire.

Les fonctions de RAS sont multiples :

- dans le cytosquelette où elle va contrôler tout le cytosquelette.
- Dans la prolifération où elle peut induire des tumeurs si elle fonctionne mal
- Dans l'apoptose

Une cellule humorale est capable de se développer en dehors de son milieu pas comme des cellules normales, on fait se développer des cellules non sur un support plastique (ce dernier pourrait jouer un rôle de matrice) mais dans une gélose qui empêche donc tout contact avec le plastique et voit des colonies qui se développent et qui représentent des cancers en formation. Si une cellule est surexposée à RAS elle reconnaît le danger et entre en sénescence: arrêt de la prolifération. On considère donc aujourd'hui la sénescence comme un mécanisme suppresseur de tumeur.

### Schéma 12

Si on reprend on a donc une ouverture suffisante de l'échafaudage protéique pour activer RAS avec tout d'abord l'homodimérisation de récepteur, la fixation de protéine à domaine SH2 avec formation de l'échafaudage moléculaire qui va entraîner grâce aux domaines SH3 la formation de complexe de réseau protéique et on aura une concentration locale en protéine d'échange à domaine SH3 comme SOS qui va entraîner l'activation de RAS (RAS-GDP → RAS-GTP).

RAS-GTP va dans le cytosol et active une série de kinases en 3 étapes:

- L'étape des Map Kinase Kinase Kinase ou Map KKK: (exemple protéine RAF) Spécialisé dans la phosphorylation de la **serine** et la **thréonine** d'autres Kinases : les Map KK
- Map KK: spécialisé dans la phosphorylation de la **thréonine** et la **tyrosine** d'autres Kinases : les Map K.
- Map K: Phosphoryle la **serine** et la **thréonine** sur des facteurs de transcription dans le nucléoplasme, ces Map K vont donc aller dans le nucléoplasme activer des facteurs de transcription en les phosphorylant sur la sérine et la thréonine afin d'activer la transcription de gène. Exemple du facteur de transcription AP1 qui active le gène de la cycline D.

## **B- Voie des Phosphoinositides:**

C'est une voie impliquée dans de nombreuses réponses mais moins utilisée que la voie des Map K. Le cycle du phosphatidylinositol (PI) est activé par la dimérisation de récepteur, on ensuite la fixation de PI 3-K (phosphatidylinositol 3'-Kinase) qui vont phosphoryler des lipides de la membrane : on va avoir un premier lipide PIP2 (phosphatidylinositol diphosphate) qui va être phosphorylé et transformé en PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate). Le 2ème point de départ est l'activation de PLC (Phospholipase C) qui clive PIP2 en IP3 et DAG (qui lui restera toujours lié à la membrane), IP3 (inositol triphosphate) va pouvoir diffuser dans le cytosol et être le point de départ d'une nouvelle signalisation.

### Schéma 13

On commence d'abord par la sous-voie avec la fixation de PI 3-K qui va donc transformer PIP2 en PIP3, PIP3 va ensuite servir de point d'ancrage à la protéine AKT via des domaines PH (Pleckstrin homologie). On va avoir donc une augmentation locale de la concentration en AKT qui va changer la conformation d'AKT qui va être phosphorylé et qui va donc pouvoir induire le cycle cellulaire, l'expression de gène de la prolifération, inhibe l'apoptose, active les enzymes (type télomérase) et active la traduction à travers la kinase mTOR qui est une sérine thréonine Kinase, mTOR va moduler elle-même certains ARNm qui vont être impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse). Ces voies sont hyperactivées dans les tumeurs et sont donc des cibles pharmacologiques importantes...

PIP3 peut aussi servir de point d'ancrage à des protéines BTK qui elles mêmes vont permettre la fixation de PLC.

PLC va induire la formation d'IP3 qui va gagner le cytosol et se fixer sur la membrane du Golgi du RE et ça va toujours provoquer la libération intracellulaire d'ions calcium du RE et des mitochondries. → le Ca<sup>++</sup> se fixe sur la calmoduline qui est alors activée, celle ci entraîne l'activation d'enzyme et de protéines kinase.

Le DAG lui va phosphoryler une Kinase qui va à son tour phosphoryler des protéines cytoplasmiques et inhibe les RTK.

### **3) Exemple des récepteur couplé aux protéines G :**

#### *Schéma 14*

Il ya un d'autre type de récepteur, c'est le cas des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, ces récepteurs contrôle l'activité d'une protéine cible par l'intermédiaire d'une protéine G maintenant hétérotrimérique. Ces protéines hétérotrimériques fonctionnent donc comme un transmetteur entre le récepteur (qui est un récepteur à 7 domaines transmembranaires) et un effecteur. Ces effecteur sont nombreux, ce sont des seconds messagers comme l'AMPC, l'IP3 ou le DAG A partir de facteur différents il y a activation d'une même voie.

La quantité de gène codant pour ces RCPG est extrêmement importante chez l'homme => 3% du génome humain !! L'olfaction consomme énormément de ces récepteurs

Le premier messenger peut être: un ligand extracellulaire, des ions Ca<sup>++</sup>, un photon...

- Acide aminé ou dérivé (histamine, sérotonine,...)
- glycoprotéines ou peptides (FSH, TSH, LH...)
- lipides hydrosolubles (prostaglandines, cannabinoides...)

Ces récepteur sont la cible de plus de 50% des agents thérapeutiques sur le marché, ils sont impliqué dans énormément de maladies comme certaines toxines bactériennes comme le choléra ou la coqueluche. La liste est énorme, elle sert entre autre au récepteur du virus du sida GP120.

#### *Schéma 15*

Voyons maintenant brièvement le fonctionnement, on a donc un récepteur à 7 domaines transmembranaires et on a les 3 sous unité Alpha Beta et Gamma de la protéine G hétéro trimérique. Le premier messenger va entrainer une modification du récepteur qui va permettre l'échange GDP → GTP et activer ces protéines G localisé sur la face cytosolique de la membrane plasmique. Cette activation de G\_Alpha par le GTP va entrainer la dissociation de l'hétérotrimère en un monomère G-Alpha-GTP et un dimère le G-Beta-G-Gamma, chacune de ces 2 protéines va servir de point de départ pour la signalisation. On à un système de rétro-régulation négative par action d'une GTPase qui va redonnée du G-Alpha-GDP qui se fixera au dimère Beta-Gamma et reformera une hétérotrimere sous forme inactive.

Exemple de l'adrénaline:

En fonction du type de récepteur on peut avoir des réponses différentes avec un même ligand, ici l'adrénaline.

- récepteur  $\beta$ -adrénergique  $\rightarrow$  G $\alpha$ s-GTP  $\rightarrow$  activation de l'adénylate cyclase  $\rightarrow$  production d'AMPc
- Récepteur  $\alpha$ 2-adrénergétique  $\rightarrow$  G $\alpha$ i-GTP  $\rightarrow$  inhibition de l'adénylate cyclase  $\rightarrow$  diminution de la concentration d'AMPc.

G $\alpha$ s (s= stimulant)

G $\alpha$ i (i= inhibiteur)

On voit donc que l'on peut avoir des effets complètement opposés en fonction du type cellulaire et plus précisément du type de récepteurs.

La sous unité Beta-Gamma qui est libérée va entraîner l'activation d'autres voies de signalisations qui vont revenir sur les voies vues précédemment. Elle va entraîner l'activation de la voie des MAP-K via SOS et aussi activer la voie des phosphoinositides via PI 3-K.

### *Schéma 16*

L'AMP cyclique, quand à lui, est un activateur enzymatique notamment des protéines kinase-A (PKA) formé de 2 Su régulatrices et de 2 Su catalytiques (donc 4 Su au total). Lorsque la protéine est sous forme de tétramère elle est inactive. Les Su régulatrices contiennent des sites de fixation d'AMPc et lorsque l'AMPc se fixe il y a activation de PKA par libération des Su catalytiques qui deviennent actives.

Ces Su catalytiques de PKA vont être transloquées dans le noyau et provoquer la phosphorylation de facteur de transcription comme CREB et fait le lien entre l'AMPc et la transcription.

*VOUALA, on y est la bioC s'est fini, il vous souhaite de bonnes révisions et se tait à jamais (enfin jusqu'à l'an prochain...). Quand à moi aussi c'est fini !! snif snif et resnif...je VOUS souhaite beaucoup de courage et de persévérance, arrachez vous sa paye toujours. Enfin vous avez de gros POUTOUS baveux de la part Benjammin, de Matilde et le mien. Sur CE salut et BANZAI !!*

Schéma 1 :

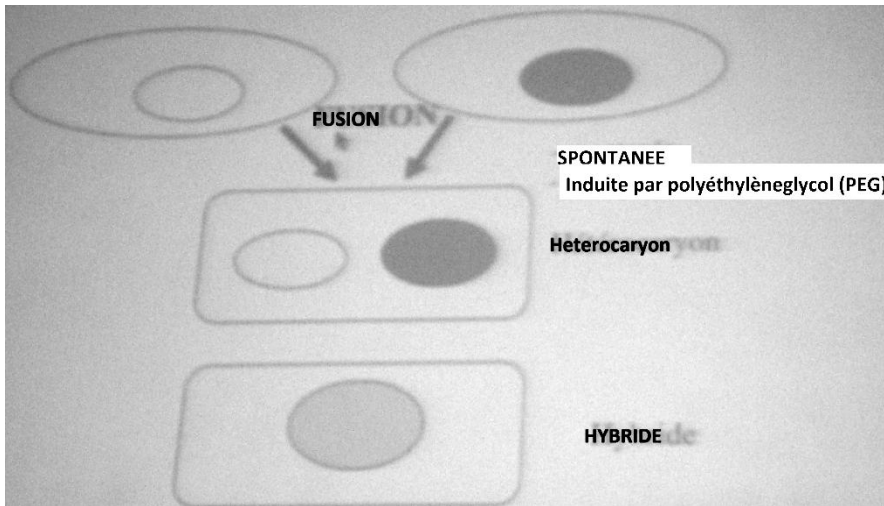
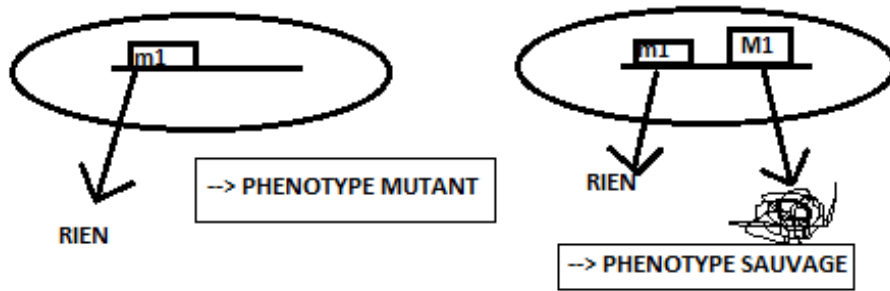


Schéma 2 :



### TEST DE RECESSIVITE

Schéma 3 :

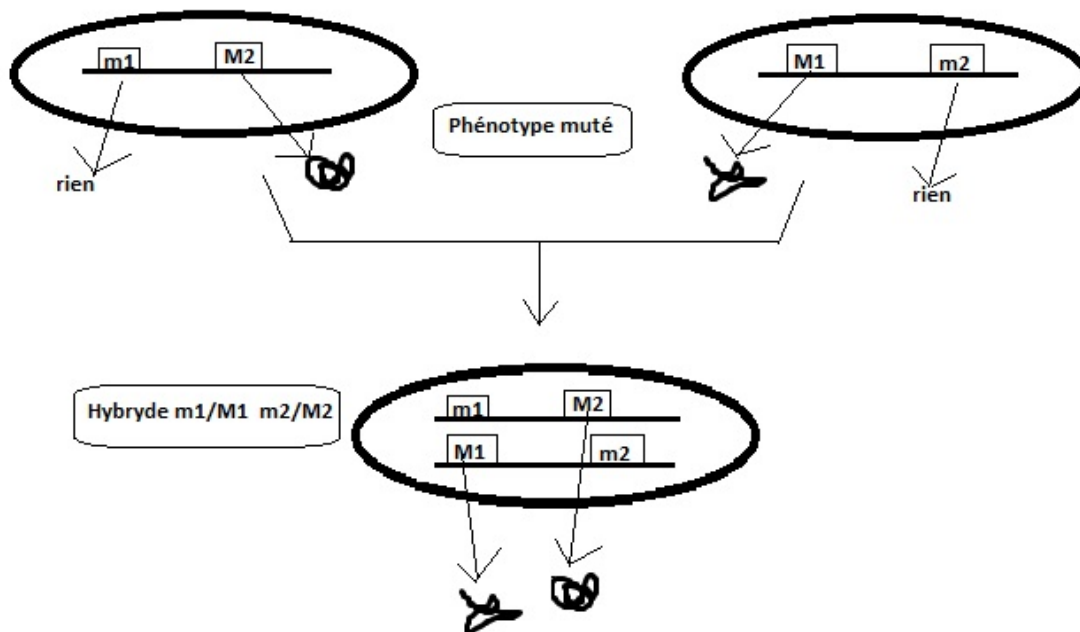


Schéma 4 :

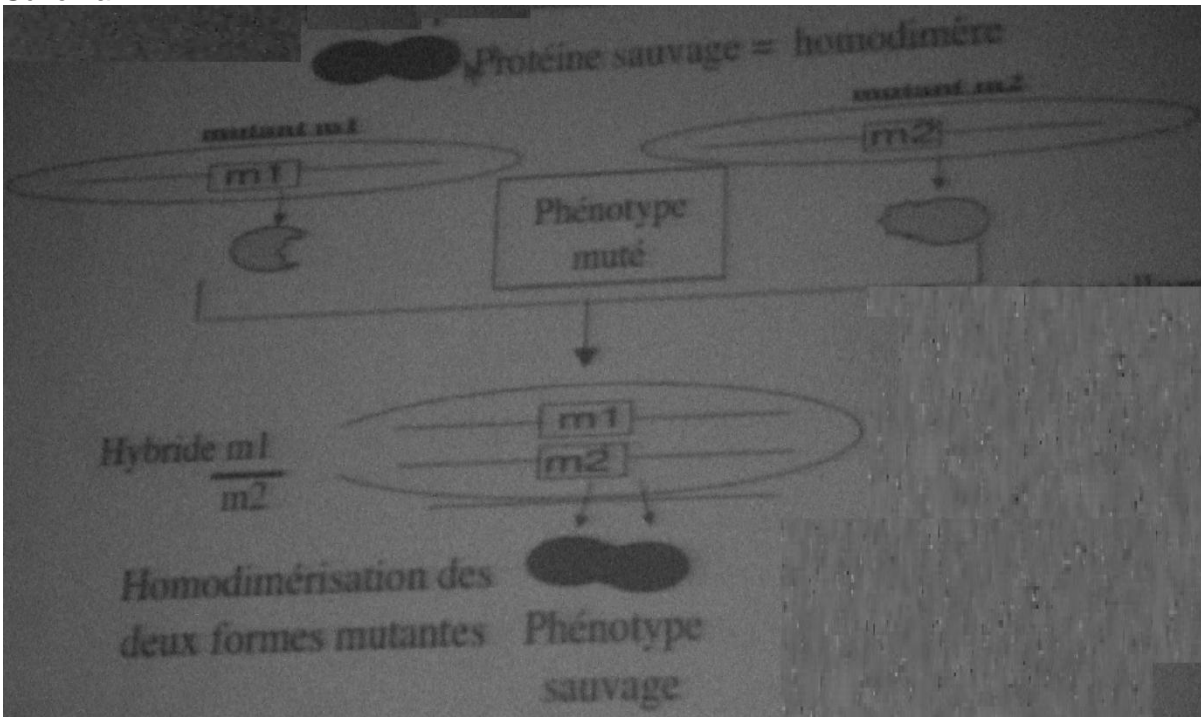


Schéma 5

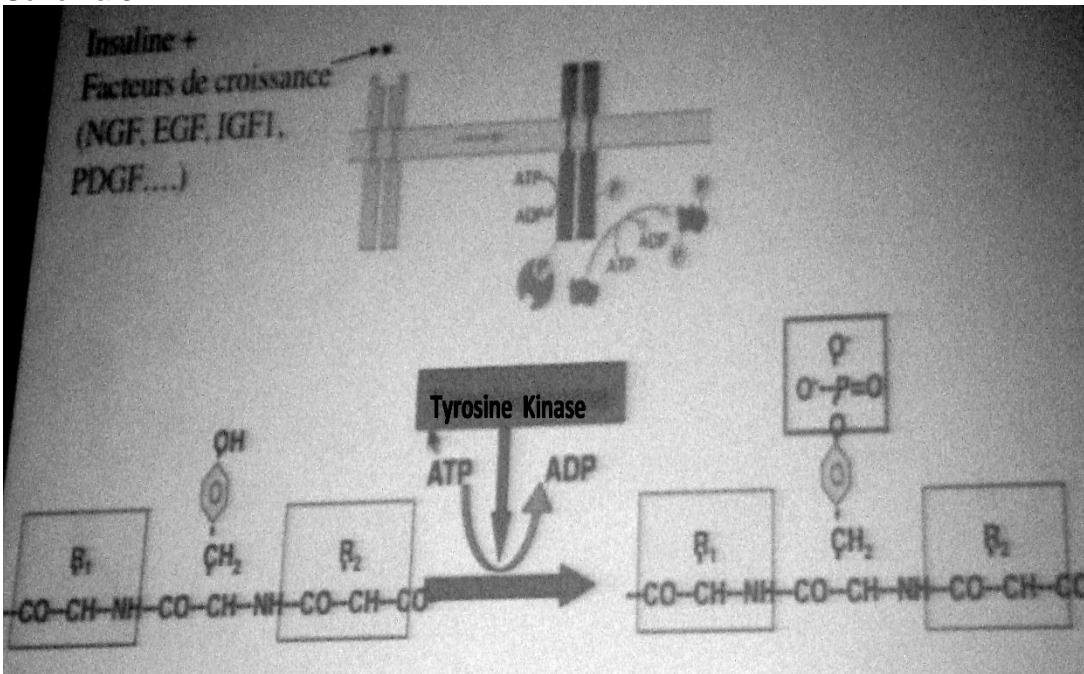


Schéma 6 :

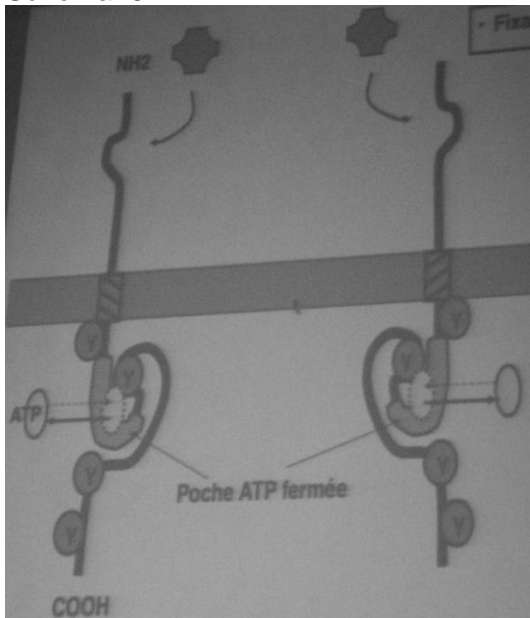


Schéma 7 :

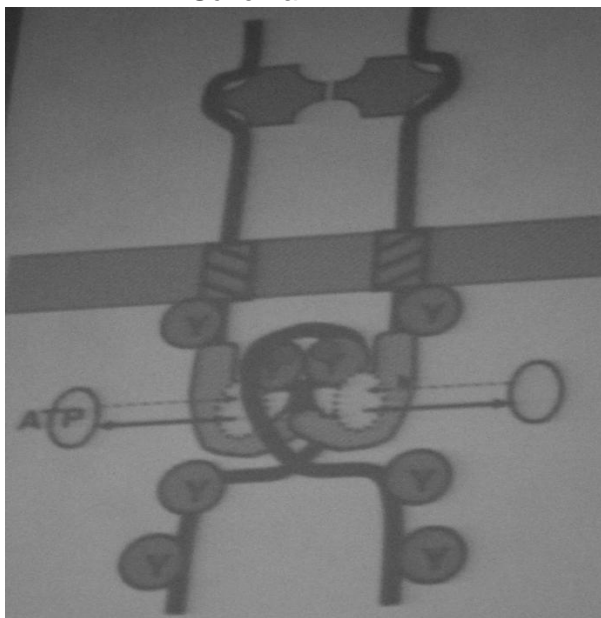


Schéma 8

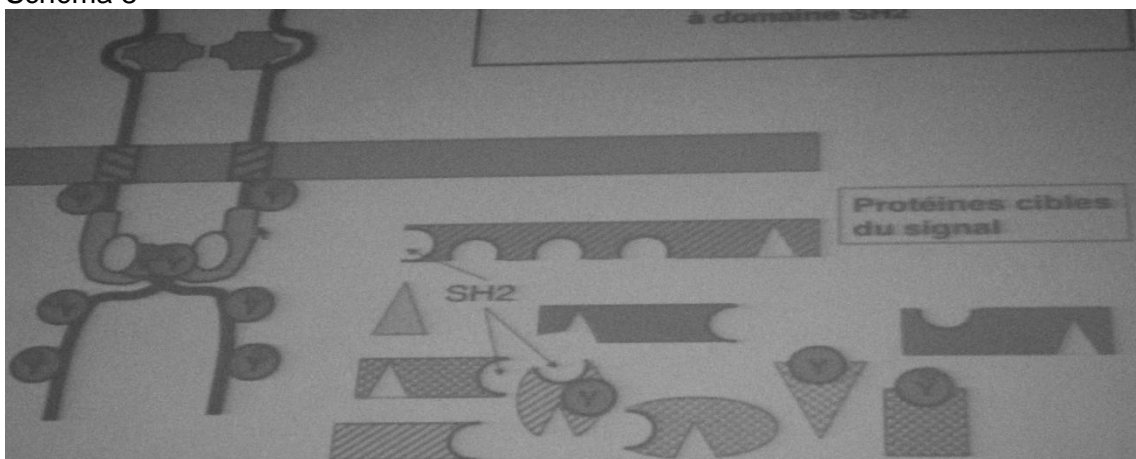


Schéma 9

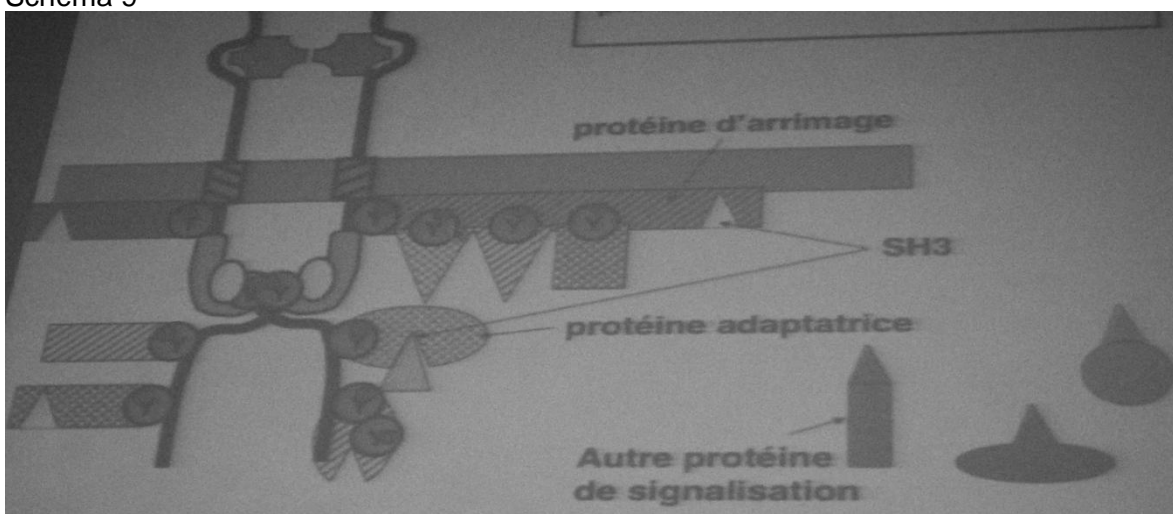


Schéma 10

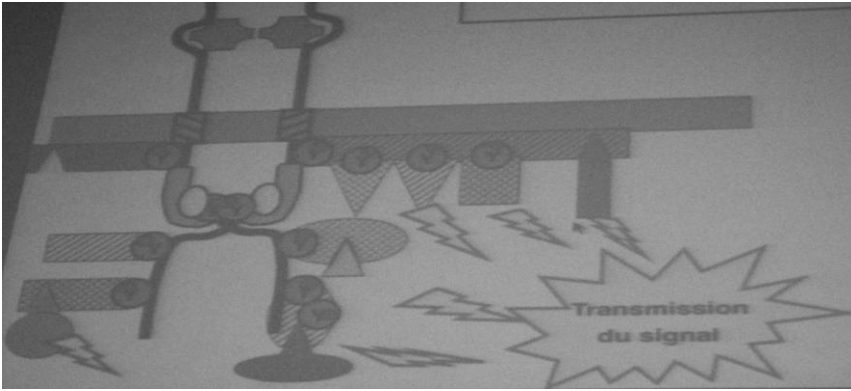


Schéma 11

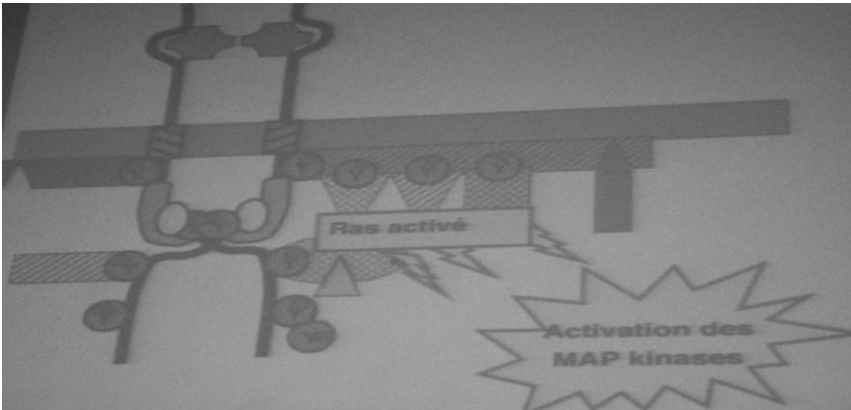


Schéma 12

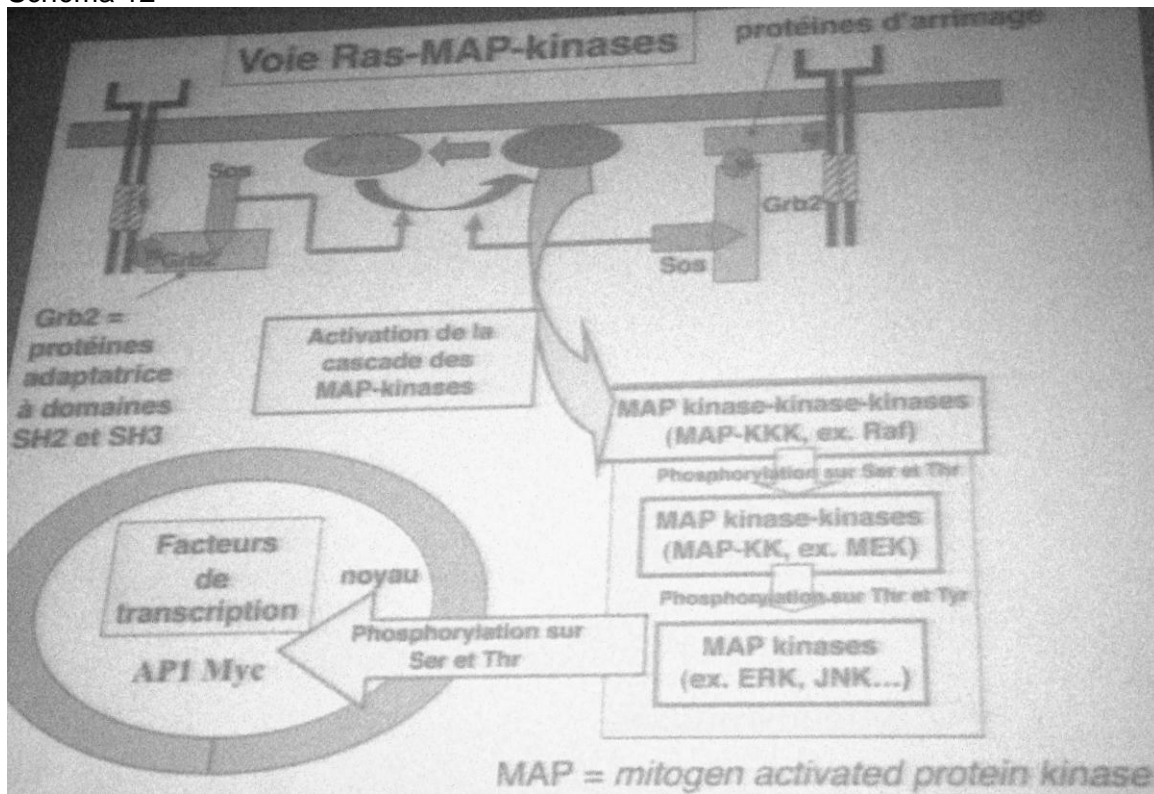


Schéma 13

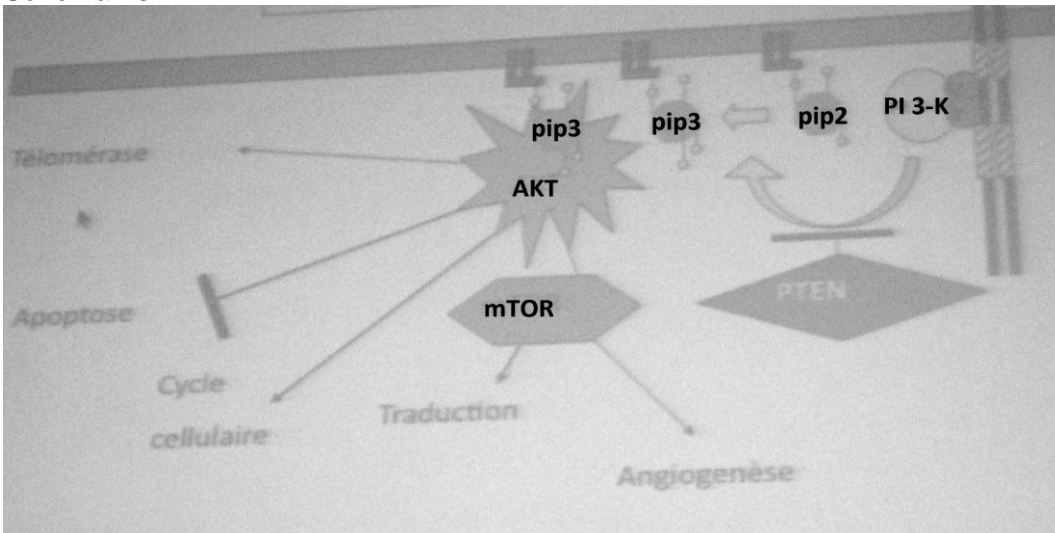


Schéma 14

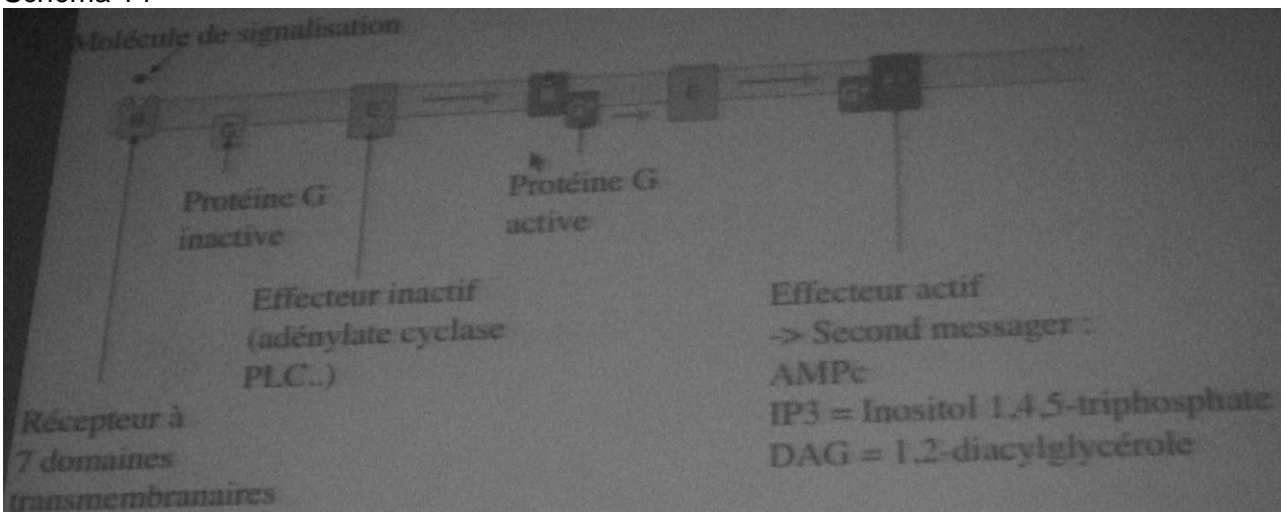


Schéma 15

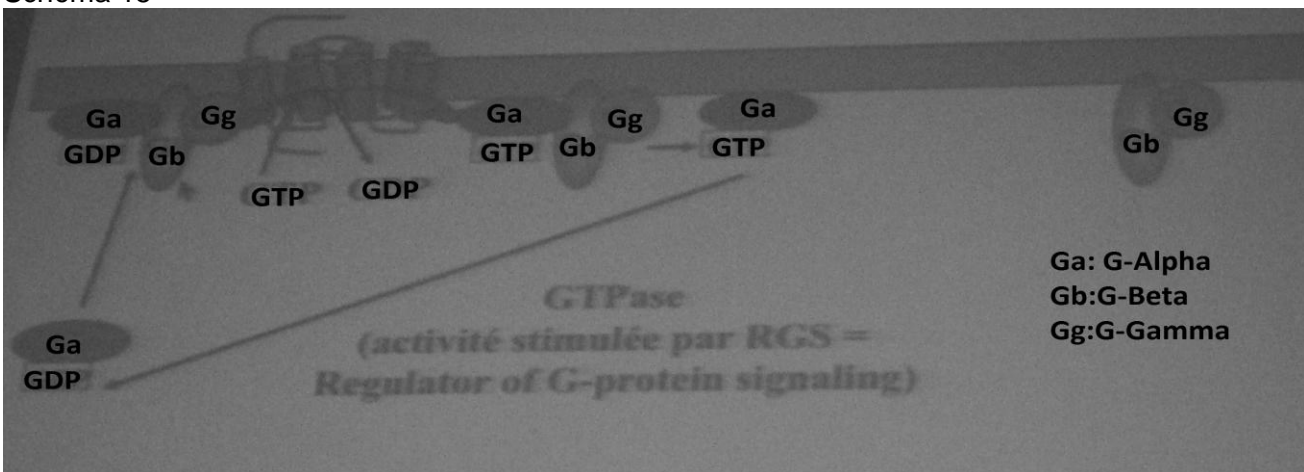


Schéma 16

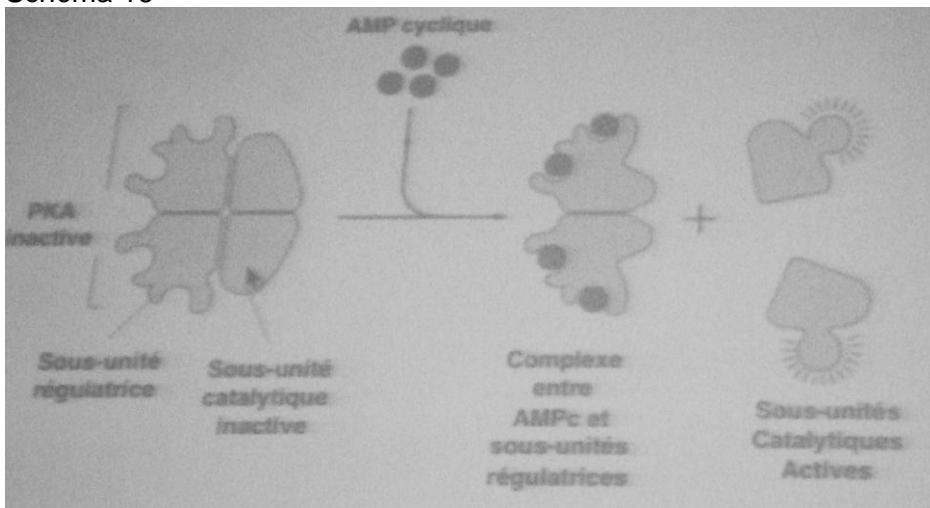


Schéma 17

