

AVANT PROPOS

Analyser et résoudre un problème de biologie cellulaire nécessite, tout d'abord, une bonne maîtrise des concepts généraux de cette science, ainsi qu'une claire compréhension de l'organisation cellulaire, de la structure et de la fonction des différents organites cellulaires. C'est afin de permettre aux étudiants de PACES/PASS, comme aux étudiants en 1^{er} et 2^{ème} cycle de sciences de la vie, d'acquérir et d'approfondir ces notions qu'a été proposé, dans un premier temps, un livre de cours intitulé « Biologie cellulaire et moléculaire de la cellule eucaryote », publié en 2007 chez Ellipses et dont une deuxième édition revue et augmentée, a été proposé en 2018. Ce livre a pour ambition de faire comprendre les fondements de la biologie cellulaire, en décrivant la vie d'une cellule complexe, la cellule eucaryote, par une approche à la fois descriptive et fonctionnelle, en s'appuyant sur la méthode expérimentale.

Dans ce livre d'exercices, une série de problèmes originaux, portant sur des expérimentations tirées de la littérature scientifique moderne, vous est maintenant proposée. Ces exercices couvrent des domaines variés de la biologie cellulaire, et permettront de mieux appréhender les mécanismes régulant le fonctionnement de la cellule eucaryote ainsi que l'implication des différents organites dans le métabolisme cellulaire.

La mise en place de la première année commune aux études de santé (PACES) avait déjà entraîné, dans les universités où le PCEM1 avait une forte dominante scientifique, une réduction du nombre d'heures de cours et de travaux dirigés dans les matières scientifiques, amenant au final, à une baisse du niveau de formation scientifique initiale. La nouvelle réforme des études de santé qui se met en place, avec, maintenant, une réduction drastique des heures d'enseignements scientifiques ne peut que conforter la nécessité d'un tel ouvrage dont l'objectif est de former les étudiants à une démarche scientifique et expérimentale.

Les exercices sont construits de manière à mettre l'étudiant dans une situation proche de celle de l'examen : Ils sont présentés sous forme de QCM, comme se présente l'examen de PASS/LAS, et sous forme de questions à caractère rédactionnel, encore utilisées dans de nombreux examens des filières scientifiques. Pour un «entraînement» efficace, nous encourageons l'étudiant en PASS/LAS à résoudre, dans un premier temps, l'exercice en répondant aux questions à caractère rédactionnel et seulement dans un deuxième temps, à répondre aux QCM.

Ces problèmes sont ensuite tous corrigés et commentés pour permettre à l'étudiant de bien appréhender le raisonnement et la démarche scientifique nécessaires à la résolution de l'exercice. En rappelant certaines limites méthodologiques, les réponses commentées attirent votre attention sur l'indispensable esprit critique qui doit accompagner l'analyse de données expérimentales.

L'objectif de cet ouvrage est de fournir à l'étudiant un outil lui permettant, en s'appuyant sur une démarche à la fois expérimentale et méthodologique, de vérifier l'acquisition et l'assimilation de ses connaissances en biologie cellulaire et de pouvoir ainsi aborder l'examen de façon plus sereine.

CC

JLL

Exercices - Enoncés

Exercice 1

- Echauffement -

Quelques exercices simples pour commencer avec des questions concernant principalement les méthodes d'étude.

On se propose d'étudier l'effet d'une nouvelle molécule récemment extraite d'une plante amazonienne, appelée provisoirement TF, sur les cellules HeLa.

QCM 1-1. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Les cellules HeLa sont :

- A/ des cellules sanguines
- B/ des cellules non adhérentes
- C/ des cellules cancéreuses
- D/ des cellules d'origine épithéliale
- E/ des cellules procaryotes

QCM 1-2. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Les cellules HeLa constituent :

- A/ Une lignée dérivée de rein de singe
- B/ Une culture primaire
- C/ Une culture secondaire
- D/ Une culture organotypique
- E/ Une lignée cellulaire immortelle

QCM 1-3. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
La culture cellulaire nécessite :

- A/ Du sérum animal embryonnaire
- B/ Un milieu de culture acide (pH 5,0)
- C/ L'ajout d'une importante quantité de glucose, les cellules HeLa provenant d'une malade diabétique
- D/ L'addition d'anticorps fluorescents
- E/ Des facteurs de croissance

I - L'effet éventuellement cytotoxique de TF est d'abord testé en exposant les cellules HeLa à des concentrations croissantes du TF, de 10 à 100 µg/ml,

pendant 24, 48 ou 72 heures et en mesurant la viabilité des cellules à l'aide d'une technique de coloration vitale.

La figure ci-dessous exprime la viabilité cellulaire en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (100%) aux trois temps de contact.

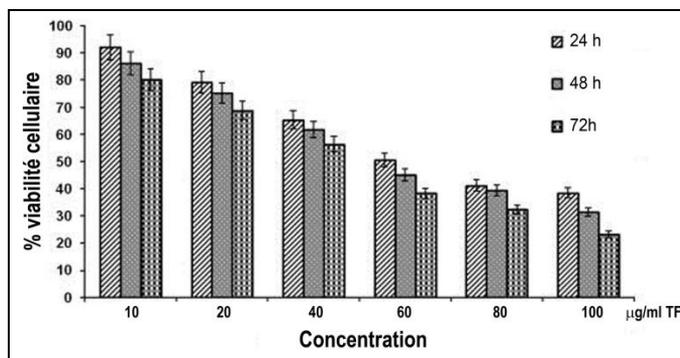


Figure 1.

**QCM 1-4. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Concernant ce diagramme de viabilité (Figure 1) :**

- A/ La viabilité des cellules HeLa varie selon les concentrations de TF
- B/ La concentration de TF correspondant à une mortalité cellulaire de 30% exactement à 48h est de 80 µg/ml
- C/ La viabilité cellulaire reste identique quelque soit le temps d'incubation avec la TF.
- D/ Après incubation avec un colorant vital, les cellules colorées sont les cellules mortes.
- E/ Une concentration de TF de 60 µg/ml réduit d'environ 50% la viabilité cellulaire à 24h

II - Afin de déterminer si TF est capable d'exercer une activité anti-proliférative des cellules HeLa, les cellules sont exposées pendant 24 heures à des concentrations de TF de 40, 60 ou 80 µg/ml, sont perméabilisées à l'aide d'un détergent doux puis, après marquage, analysées par cytométrie de flux en même temps que des cellules non traitées. Les courbes représentent les distributions d'intensité de fluorescence (abscisse) des cellules comptées (ordonnée).

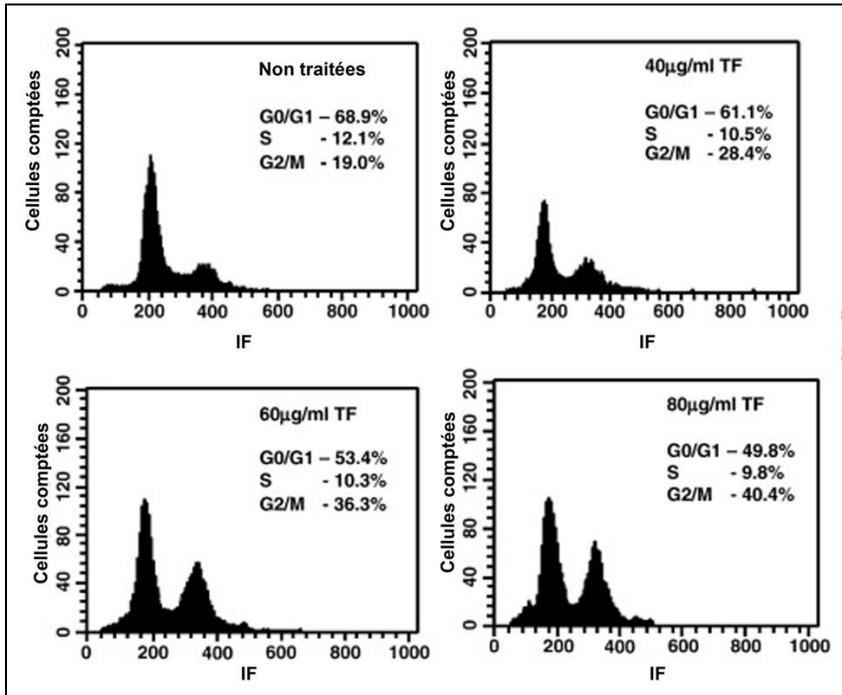


Figure 2.

QCM 1-5. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
La cytométrie de flux mise en oeuvre pour obtenir les graphes de la Figure 2,

- A/ Utilise comme marqueur de l'uracile radiomarqué au tritium
- B/ Permet ici une quantification relative de l'ADN cellulaire
- C/ Permet aussi le tri cellulaire
- D/ Utilise une technique de chimioluminescence
- E/ Ne fournit sur ces graphes aucune information sur la taille des cellules

QCM 1-6. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Quelle(s) technique(s) pourrai(en)t être mise en oeuvre pour étudier les variations quantitatives de l'ADN au cours du cycle cellulaire :

- A/ Microscopie à contraste de phase
- B/ Autoradiographie après incorporation de thymidine tritiée
- C/ Méthode TUNEL
- D/ Ultracentrifugation différentielle
- E / Microscopie électronique après cryofracture

**QCM 1-7. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Concernant le cycle cellulaire des cellules HeLa :**

- A/ Sa durée est comprise entre 48 et 72 heures
- B/ La Phase G1 est toujours inférieure à S
- C/ La phase S est plus courte que G2
- D/ La phase M dure environ 1 heure
- E/ La durée de la phase S est une constante de l'espèce

**QCM 1-8. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
D'après les résultats de la cytométrie de flux (Figure 2):**

- A/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en G0/G1
- B/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en phase S
- C/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en G2/M
- D/ L'effet de TF est dépendant de sa concentration
- E/ l'interprétation de l'effet de la TF sur le cycle cellulaire impose de tester la concentration 100µg/ml

QCM 1-9. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ Le complexe cycline D-Cdk2 constitue le MPF
- B/ Le complexe cycline B-Cdk1 phosphorylé sur Cdk1 au niveau de thr14, tyr15 et thr161 est inactif
- C/ L'écartement des centrioles observé en G1 est provoqué par le complexe cycline B-Cdk1.
- D/ L'entrée en phase S est uniquement dépendante de la concentration du complexe B-Cdk2 dans la cellule
- E/ Le 2^e point de contrôle du cycle cellulaire est dépendant de l'activité de la polo-kinase (Plk1)

III – Afin d'examiner certains acteurs du cycle cellulaire, les cellules exposées à 40, 60 et 80 µg/ml de TF pendant 24 heures sont lysées et les extraits protéiques ainsi obtenus sont analysés par Western blot en comparaison avec des extraits cellulaires non traités (-). Sont examinées plus spécifiquement les protéines Cdc25C, cycline B, p21 et l'actine. Les intensités relatives des bandes par rapport aux cellules non traitées sont représentées sous forme d'histogramme

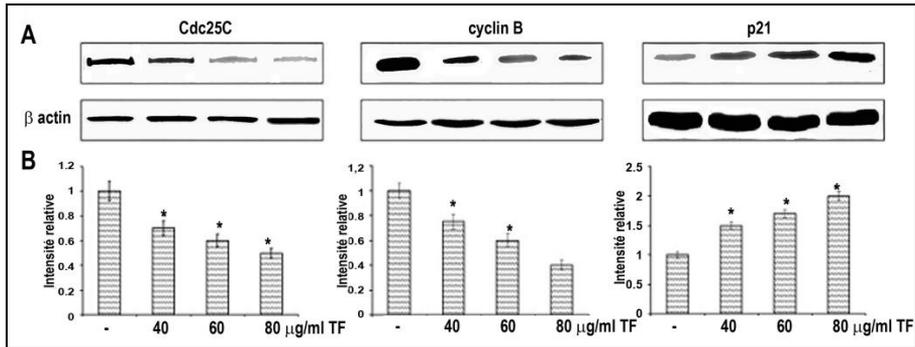


Figure 3. Western blot (de gauche à droite : non traitées (-) puis TF = 40, 60 ou 80 µg/ml)(A). Les histogrammes (B) représentant les mesures relatives des intensités des bandes du Western-blot situées immédiatement au-dessus pour Cdc 25C, cycline B et p21. L'intensité des bandes observées dans les cellules non traitées est considérée égale à 1, soit 100%. L'astérisque (*) signifie que la moyenne considérée est statistiquement différente de celle du témoin non traité (-).

QCM 1-10. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ Lors du Western blot, les protéines migrent sous l'effet d'un champ électrique à travers un gel de polyacrylamide puis sont transférées sur une membrane
- B/ Le Western blot est également une technique de séparation des acides nucléiques
- C/ Sous l'action du champ électrique et en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS), les protéines se déplacent vers l'anode
- D/ L'incubation de la membrane de transfert avec un anticorps spécifique de la protéine étudiée permet de visualiser sans étape ultérieure la protéine sous la forme d'une ou plusieurs bandes
- E/ La β -actine est usuellement utilisée comme témoin expérimental pour vérifier que la réalisation technique du western-blot s'est correctement déroulée

QCM 1-11. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ p21 est une protéine intervenant lors du 1^{er} et du 3^e point de contrôle du cycle cellulaire
- B/ p21 est une protéine qui inhibe l'activité enzymatique des kinases dépendantes des cyclines
- C/ p21 déclenche la transcription du gène codant p53
- D/ En cas de retard de la réplication, l'entrée dans le noyau de Cdc25C est bloquée par la protéine 14-3-3 qui se fixe sur la serine 216 phosphorylée de Cdc25C
- E/ p21 permet d'accélérer l'hydrolyse de ras-GTP en ras-GDP

**QCM 1-12. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :
Concernant les résultats présentés dans les figures 3A et 3B :**

- A/ La quantité de cycline B est plus faible dans les cellules exposées à 80 µg/ml de TF qu'à 40 µg/ml
- B/ La quantité de p21 augmente dans les cellules en présence de TF
- C/ Ces résultats favorisent l'hypothèse d'une activation du premier point de contrôle du cycle cellulaire
- D/ Ces résultats contredisent l'analyse en cytométrie de flux de la figure BC2
- E/ Ces résultats ne contredisent pas l'hypothèse d'un blocage du cycle cellulaire à la transition G2/M

IV - Des cellules HeLa incubées pendant 48 heures avec de la TF à des concentrations de 40, 60 ou 80 µg/ml, puis, pendant la dernière heure, avec du *Mito Tracker*. Le *MitoTracker* diffuse passivement à travers la membrane plasmique de la cellule et s'accumule spécifiquement dans les mitochondries dont la chaîne respiratoire est fonctionnelle. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux afin de mesurer leur intensité de fluorescence. Les courbes représentent les distributions d'intensité de fluorescence (abscisse) des cellules comptées (ordonnée) aux différentes concentrations de TF testées.

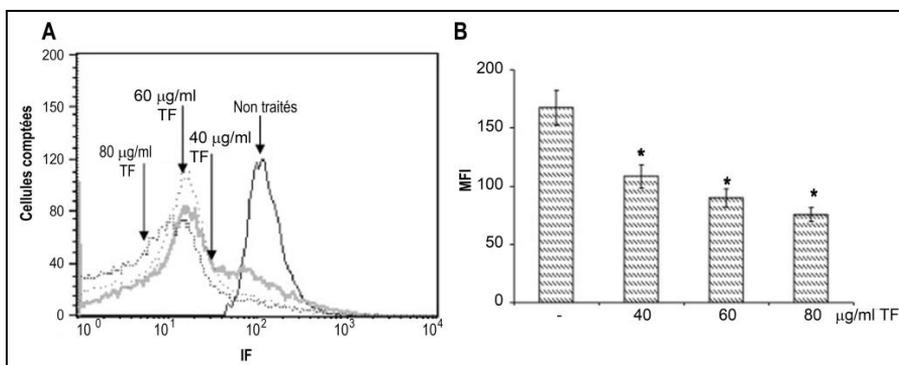


Figure 4. Intensité de fluorescence des échantillons cellulaires non traités ou traités avec la TF à 40, 60 ou 80 µg/ml (A). Représentation des intensités moyennes de fluorescence (MFI) sous forme d'histogramme (moyenne de cinq expériences indépendantes) (B). (*): Moyenne statistiquement différente de celle du témoin non traité (-).

**QCM 1-13. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :
Concernant les résultats présentés Figures 4A et 4B :**

- A/ Une proportion de cellules exposées à 40 µg/ml de TF a la même intensité de fluorescence que les cellules non traitées
- B/ La moitié environ des mitochondries n'est plus fonctionnelle à la concentration de TF de 80 µg/ml
- C/ L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une altération du fonctionnement mitochondrial uniquement avec la concentration de TF la plus élevée
- D/ L'ensemble de ces résultats permet de rejeter l'hypothèse d'une altération du fonctionnement mitochondrial causée par TF
- E/ L'ensemble de ces résultats est en faveur de l'hypothèse d'une altération du fonctionnement mitochondrial causée par TF

QCM 1-14. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/La réplication de l'ADN mitochondrial est synchronisée à celle de l'ADN nucléaire.
- B/ La chaîne respiratoire mitochondriale permet l'établissement d'un gradient de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice.
- C/ Le cytochrome C est situé dans l'espace intermembranaire.
- D/ Le cytochrome C est un transporteur d'électrons.
- E/ Le cytochrome C est requis pour l'activation de l'apoptosome.

V – Une analyse par Western blot des extraits protéiques des cellules traitées par le TF aux trois concentrations pendant 24 heures est entreprise pour la mise en évidence des protéines Bax, Bcl-2 et des caspase-3 et caspase-9 activées.

QCM 1-15. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ Bax est une protéine proapoptotique
- B/ Les caspases sont des cystéine protéases dégradant directement l'ADN
- C/ La voie Bax/Bad conduit à l'activation de l'apoptosome
- D/ La protéine P53 peut activer la transcription du gène Bax
- E/ L'apoptose ne provoque pas la libération des enzymes lysosomales dans le milieu extracellulaire

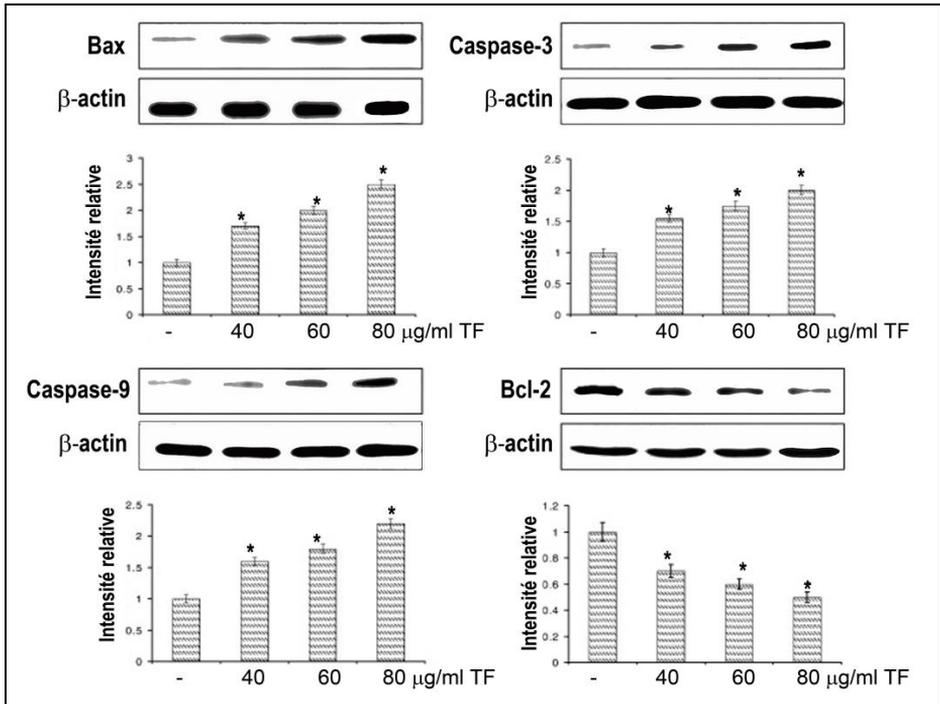


Figure 5 : Les histogrammes représentent les mesures relatives des intensités des bandes du Western blot situées immédiatement au-dessus pour les quatre protéines étudiées.

De gauche à droite : cellules non traitées (-) puis TF = 40, 60 ou 80 µg/ml.

L'intensité des bandes en ordonnée observées dans les cellules non traitées est considérée égale à 1, soit 100%. (*) : Moyenne considérée est statistiquement différente de celle du témoin non traité (-).

QCM 1-16. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

Concernant les résultats présentés dans la Figure 5,

- A- Ces résultats ne sont pas en faveur de l'induction de l'apoptose dans les cellules exposées au TF
- B- Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus après incubation des cellules avec le *MitoTracker*
- C- Ces résultats démontrent que le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est altéré.
- D – L'augmentation de Bax est une conséquence de l'augmentation de la caspase-3
- E- L'accumulation de caspase-9 suppose une activation préalable de l'apoptosome

VI- Les cellules après 24h d'incubation avec la TF à la concentration de 60 µg/ml sont perméabilisées à l'aide d'un détergent doux puis mises en contact

avec une solution d'iodure de propidium, une molécule fluorescente s'intercalant entre les bases de l'ADN.

**QCM 1-17. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :
Concernant l'observation des cellules ayant subi le traitement décrit ci-dessus,**

- A/ L'observation des cellules doit être réalisée avec un microscope à fond clair
- B/ Le nucléole apparaît seul fluorescent
- C/ La chromatine des cellules en interphase et en mitose est fluorescente
- D/ Des cellules présentent un noyau fragmenté
- E/ Il est possible de distinguer par l'observation microscopique les cellules en G1 des cellules en cours de phase S

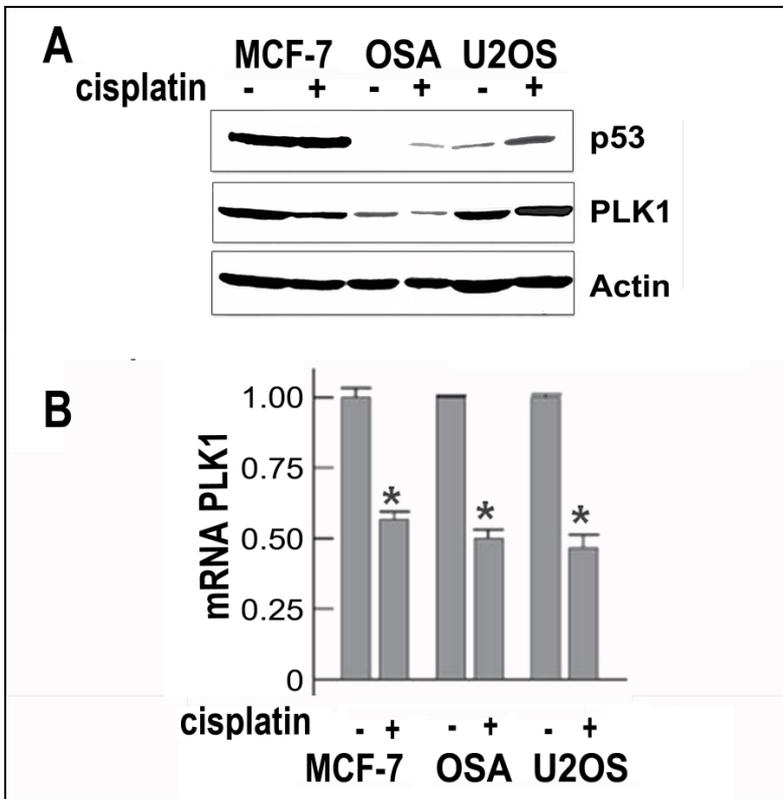
**QCM 1-18. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :
L'apoptose s'accompagne au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique :**

- A/ De l'externalisation d'un glycérophospholipide particulier
- B/ D'une internalisation de phosphatidyl-sérine
- C/ D'une externalisation de phosphatidyl-éthanolamine
- D/ D'une externalisation de phosphatidyl-sérine
- E/ D'aucun changement significatif de sa composition

Exercice 2 : Cycle cellulaire : rôle de la protéine p53

- Vas-y Polo ! -

La protéine Polo kinase 1 (PLK1) est un acteur clé du cycle cellulaire en participant à la maturation des centrosomes, l'entrée en mitose et la formation du fuseau mitotique. Dans de nombreux cancers, et en particulier dans les cancers du colon, PLK1 est surexprimée. Au contraire, la protéine p53 joue un rôle très important dans la prévention du développement tumoral. McKenzie et al. ont examiné s'il existait une relation fonctionnelle entre PLK1 et p53.



Figures 1A et B. Western blot (WB) d'extraits protéiques issus de 3 lignées cellulaires (MCF-7, OSA, U2OS) préalablement traitées ou non pendant 24h par un agent induisant des lésions de l'ADN (cisplatine). Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure. (A). Expression par PCR quantitative de l'ARNm PLK1 issu de 3 lignées cellulaires (MCF-7, OSA, U2OS) préalablement traitées ou non pendant 24h par du cisplatine. (B). (*) Différence significative par rapport aux cellules non traitées.

QCM 2-1. D'après vos connaissances, vous pouvez dire que :

- A/ PLK1 s'associe au complexe cycline B-Cdk1
- B/ PLK1 phosphoryle le MPF
- C/ CDC25C est un des substrats de PLK1
- D/ PLK1 contribue à la synthèse de l'ADN
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte



Question 1 : Commentez la figure 1

QCM 2-2. En utilisant des agents induisant des cassures de l'ADN, les auteurs peuvent explorer :

- A/ Le premier point de contrôle en fin de G1.
- B/ Le deuxième point de contrôle à la transition G2/M.
- C/ Le troisième point de contrôle pendant la mitose.
- D/ Le point de contrôle traductionnel.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

QCM 2-3. Pour obtenir les résultats présentés en figure 1B :

- A/ Les auteurs ont extrait l'ADN génomique des cellules.
- B/ Les auteurs ont utilisé une enzyme « reverse transcriptase ».
- C/ Les auteurs ont amplifié l'ADN intronique.
- D/ Les auteurs ont utilisé des amorces d'ARN.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

QCM 2-4. D'après les figures 1A et B, vous pouvez dire que :

- A/ L'expression basale de la protéine p53 est identique dans toutes les lignées cellulaires (MCF-7, OSA, U2OS).
- B/ Les lésions de l'ADN entraînent la surexpression de la protéine PLK1 alors que l'expression des transcrits *PLK1* est réprimée.
- C/ Les transcrits *PLK1* sont diminués en cas de traitement par le cisplatine.
- D/ L'actine sert de témoin de dépôt sur le WB.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

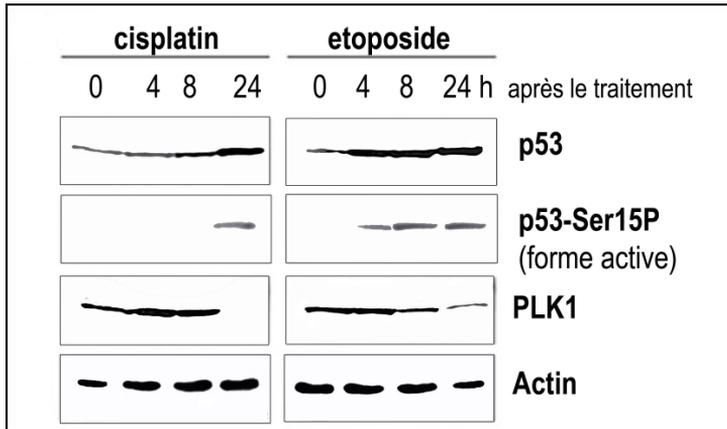


Figure 1 C. WB d'extraits protéiques issus des cellules U2OS préalablement traitées ou non pendant différents temps (4, 8 ou 24h) par des agents induisant des lésions de l'ADN (cisplatine ou étoposide). Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure.

QCM 2-5. D'après la figure 1C, vous pouvez dire que :

- A/ Le cisplatine induit la surexpression de la protéine p53 de façon dose-dépendante.
- B/ Le cisplatine et l'étoposide induisent l'activation de p53 au cours du temps (sous forme p53-Ser15P).
- C/ Au cours du temps, l'expression de p53 augmente sous l'effet de l'étoposide alors que l'on observe une diminution d'expression de PLK1.
- D/ D'après les résultats de la fig.1C, la surexpression de p53 est responsable de la plus faible expression de PLK1.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

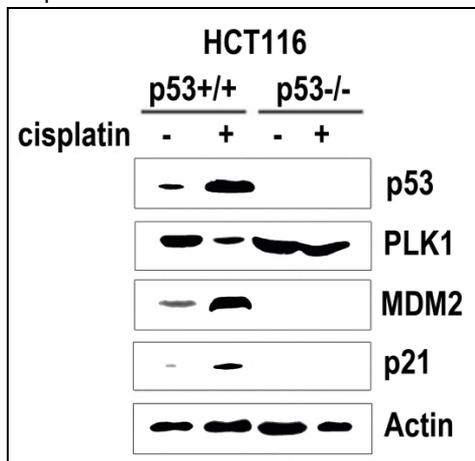


Figure 2. WB d'extraits protéiques issus des cellules HCT116 exprimant (p53+/+) ou non (p53-/-) la protéine p53. Ces deux lignées cellulaires ont été préalablement traitées 24h par du cisplatine. Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure.



Question 2 : Quelle relation existe-t-il entre PLK1 et p53 ?

QCM 2-6. D'après vos connaissances et d'après la figure 2, vous pouvez dire que :

- A/ p21 est un proto-oncogène qui active les complexes cyclines/Cdk.
- B/ L'expression de MDM2 et de p21 suggère que la voie d'activation de p53 est fonctionnelle dans les cellules HCT116 p53+/+.
- C/ La comparaison des lignées HCT116 p53+/+ et p53-/- suggère que la surexpression de p53 sous l'effet du cisplatine est responsable de la sous-expression de PLK1.
- D/ L'expression de MDM2 est contrôlée par p53.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

Pour conforter ces derniers résultats, les auteurs exploitent une seconde approche en utilisant la Nutlin-3, un agent induisant le blocage de l'interaction entre p53 et MDM2.

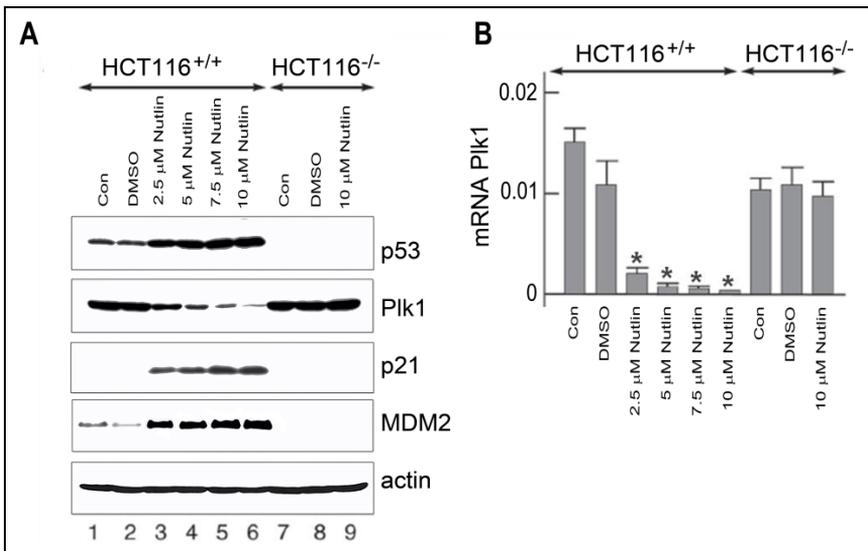


Figure 3 : WB d'extraits protéiques issus des cellules HCT116 exprimant (p53+/+) ou non (p53-/-) la protéine p53. Ces deux lignées cellulaires ont préalablement été traitées par du DMSO (témoin) ou par des doses croissantes d'un agent responsable du blocage de l'interaction entre p53 et MDM2 (Nutlin-3) (A). Le DMSO est le solvant dans lequel est diluée la Nutlin-3. Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure. Con : control. Expression de l'ARNm PLK1 issu des cellules HCT116 exprimant (p53+/+) ou non (p53-/-) la protéine p53. Les cellules ont préalablement été traitées par du DMSO (témoin) ou par des doses croissantes d'un agent responsable du blocage de l'interaction entre p53 et MDM2 (Nutlin-3)(B). Con : control. (*) : Différence significative par rapport aux échantillons non traités.



Question 3 : Quel effet à la Nutlin-3 sur l'expression de PLK1?

QCM 2-7. D'après vos connaissances et d'après les Figures 2 et 3, vous pouvez dire que :

- A/ MDM2 est une E2 ubiquitin ligase.
- B/ On observe un effet dose-réponse de la Nutlin-3 sur l'expression de p53 dans les cellules HTC116 p53+/+.
- C/ Ces résultats montrent que le traitement des cellules HTC116 p53+/+ par des doses croissantes de Nutlin-3 entraîne la dégradation de PLK1 par le protéasome.
- D/ Le blocage de l'interaction MDM2/p53 a les mêmes conséquences sur PLK1 que l'exposition à des agents induisant des lésions de l'ADN.
- E/Aucune de ces réponses n'est exacte.

Les auteurs émettent alors l'hypothèse que p21 pourrait être impliquée dans la baisse d'expression de PLK1.

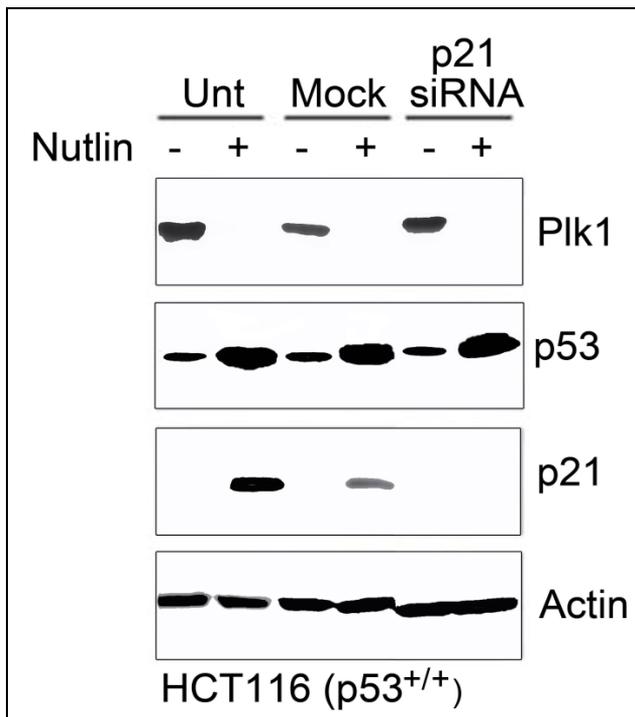


Figure 4. WB d'extraits protéiques issus des cellules HCT116 p53^{+/+} exprimant la protéine p53. Ces cellules ont été préalablement traitées ou non par de la Nutlin-3 ainsi que par des siRNA contrôle (Mock) ou par des siRNA dirigés contre p21. Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure. Unt : cellules non traitées.

➤ **Question 4 :** p21 est-elle impliquée dans la baisse d'expression de PLK1 ?

QCM 2-8. D'après vos connaissances, vous pouvez dire que :

- A/ Les siRNA sont des petits ADN complémentaires.
- B/ Les siRNA sont des ARN codants.
- C/ Les siRNA entraînent la dégradation des protéines cibles contre lesquelles ils sont dirigés.
- D/ Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

QCM 2-9. D'après vos connaissances et d'après la Figure 4, vous pouvez dire que :

- A/ Le siRNA p21 bloque totalement la transcription du gène codant p21.
- B/ L'exposition au siRNA p21 augmente l'expression de Plk1.
- C/ L'extinction du gène p21 est complète en présence de siRNA PLK1.
- D/ La diminution de l'expression de PLK1 observée est indépendante de p21.
- E/Aucune de ces réponses n'est exacte.

Dans le but de comprendre le mécanisme de régulation de l'expression de PLK1 par p53, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une régulation au niveau transcriptionnel. En effet, p53 pourrait réguler l'activité du promoteur du gène PLK1 en se fixant au niveau de deux séquences régulatrices appelées p53RE-1 et p53RE-2 selon le schéma ci-dessous (Fig. 5A).

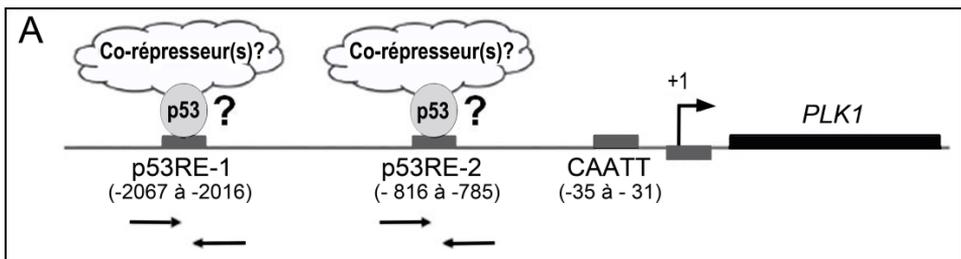


Figure 5A. Représentation schématique du promoteur de PLK1 et des deux régions régulatrices de p53 (les chiffres en parenthèses indiquent la position de ces sites). Les flèches représentent les deux couples d'amorces utilisées pour amplifier l'ADN de ces régions après une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine.

Afin de tester leur hypothèse, les auteurs ont réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dont les résultats sont présentés en Figures 5B à 5D.

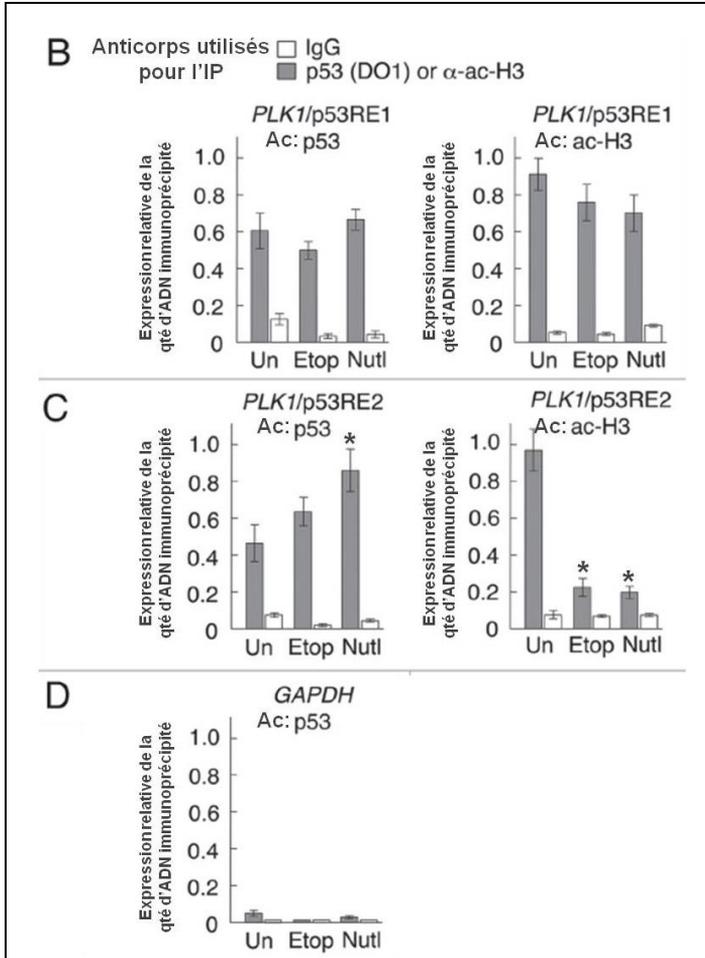


Figure 5B, C, D. Les cellules HTC116 p53^{+/+} ont été traitées ou non (« Un ») par de l'étoposide (Etop) ou de la Nutlin-3 (« Nutl ») pendant 8h. Les cellules ont été lysées, la chromatine et les protéines associées ont été extraites. L'ADN a ensuite été clivé puis mis en présence d'un anticorps (Ac IgG, Ac anti-p53 ou Ac anti-histone H3 acétylé) afin d'immunoprécipiter les protéines liées à la chromatine. Enfin, l'ADN immunoprécipité avec les protéines d'intérêt a été analysé par PCRq. (*): Différence significative par rapport aux échantillons non traités.

➤ **Question 5 :** p53 réalise-t-elle la régulation transcriptionnelle du gène de Plk1 et selon quelles modalités ?

Les auteurs ont tenté de confirmer les résultats précédents en exposant des cellules à un inhibiteur d'histone désacétylase, la trichostatine A (TSA).

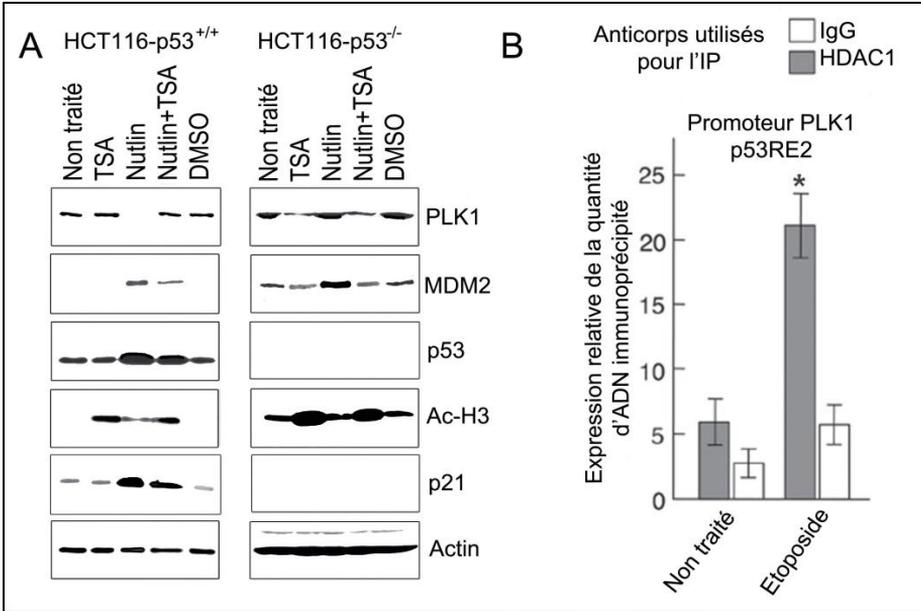


Figure 6. WB d'extraits protéiques issus des cellules HCT116 exprimant (p53^{+/+}) ou non (p53^{-/-}) la protéine p53. Ces 2 lignées cellulaires ont été préalablement traitées par du DMSO, de la trichostatin A (TSA : inhibiteur de HDAC) et/ou de la Nutlin-3 (A). Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure. Les cellules HCT116 p53^{+/+} ont été traitées ou non par de l'étoposide, l'ADN a ensuite été extrait et analysé par ChIP comme précédemment décrit (B). Anticorps utilisés : Ac IgG, Ac anti-HDAC1. * Différence significative par rapport aux cellules non traitées.

➤ **Question 6 :** A quel résultat aboutit l'exposition des cellules à la Nutlin-3 et à la trichostatine, et quelle conclusion peut-on en tirer ?

QCM 2-10. D'après la figure 5, vous pouvez affirmer que :

- A/ L'anticorps IgG est utilisé pour immunoprécipiter la chromatine car les auteurs émettent l'hypothèse que p53 est associée à des immunoglobulines dans un complexe de co-répression du promoteur *PLK1*.
- B/ p53 se fixe sur les deux régions p53RE-1 et p53RE-2 du promoteur *PLK1*.
- C/ Seule la fixation de p53 au niveau du site p53RE-2 induit un remodelage chromatinien du locus *PLK1*.
- D/ p53 est également impliquée dans la répression de GAPDH en présence d'étoposide.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

QCM 2-11. A partir des résultats de la Figure 6, vous pouvez dire que :

- A/ La TSA a bien l'effet attendu sur l'histone H3.
- B/ La TSA seule a un effet sur l'expression de Plk1.
- C/ Le traitement par de la Nutlin-3 suivie de TSA réverse l'effet de la Nutlin-3 seule sur la sous-expression de PLK1 dans les cellules HCT116 p53+/+.
- D/ Ces résultats suggèrent que la sous-expression de PLK1 suite à des lésions de l'ADN est liée à une répression de sa transcription médiée par HDAC1.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

Afin de déterminer si p53 pourrait réprimer directement le promoteur du gène *PLK1*, les auteurs ont utilisé un plasmide d'expression contenant le gène de la luciférase sous contrôle de la région promotrice de *PLK1*, transfecté dans des cellules cancéreuses d'osté sarcome SAOS-2 déficientes en p53 (Fig. 7).

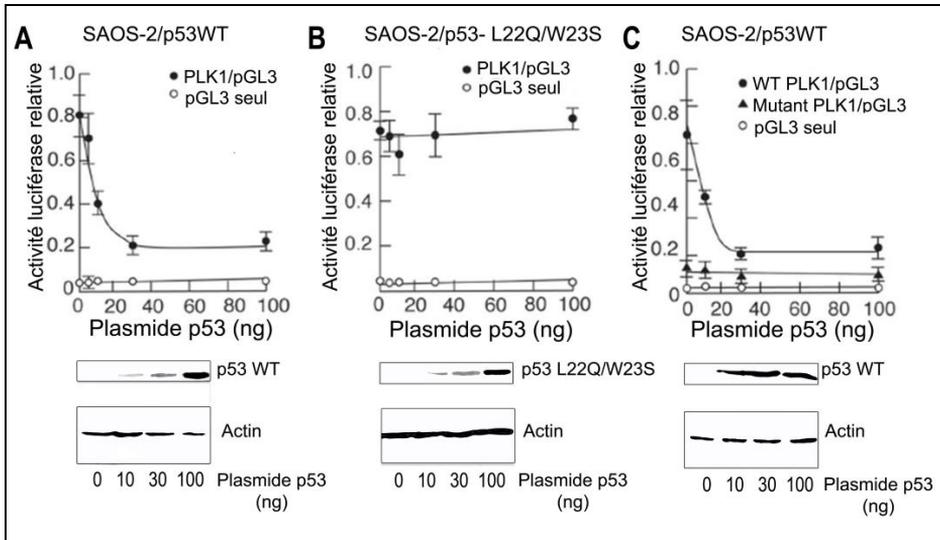


Figure 7. Des cellules SAOS-2 ont été co-transfectées par deux plasmides (pGL3). Le premier plasmide exprime la p53 sauvage (WT) ou mutée (L22Q/W23S) et le second plasmide exprime la luciférase sous le contrôle de la région promotrice de *PLK1* - sauvage (WT) ou mutée au niveau de sa séquence p53RE-2 (Mutant) - ou le plasmide sans promoteur en amont du gène luciférase (pGL3 seul). Les graphiques représentent l'intensité de luminescence de la luciférase en fonction de quantités croissantes de plasmide p53 transfecté.

QCM 2-12. Que vous permettent de dire les résultats de la Figure 7 ?

- A/ 30ng de plasmide exprimant p53 WT sont suffisants pour diminuer de 75% l'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur *PLK1*.
- B/ La protéine p53 portant les mutations L22Q/W23S permet l'inhibition de l'expression de la luciférase.
- C/ Ces résultats suggèrent que les acides-aminés, leucine (L) et tryptophane (W), respectivement aux positions 22 et 23 de la protéine p53, sont importants dans la liaison de p53 au promoteur de *PLK1*.
- D/ La région promotrice de *PLK1* mutée permet, en présence de p53, l'expression de la luciférase.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

PLK1 joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire ; ainsi, les auteurs ont voulu étudier dans leur modèle cellulaire les effets de la sous-expression de PLK1 sur la progression du cycle (Fig. 8).

➤ **Question 7 :** Quel est l'effet de la sous-expression de PLK1 sur le cycle cellulaire d'après la figure 8 ci-dessous et les conséquences à en tirer pour une éventuelle exploitation thérapeutique ?

QCM 2-13. D'après vos connaissances et d'après les résultats de la Figure 8, que pouvez-vous affirmer :

- A/ L'ajout de siRNA *PLK1* inhibe l'expression de p53.
- B/ Ces résultats suggèrent que la sous-expression de PLK1 s'accompagne de l'apoptose des cellules HTC116 p53+/+.
- C/ Le déclenchement de l'apoptose n'est pas dépendant de p53 dans cette expérience.
- D/ PARP est clivée par une caspase effectrice.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

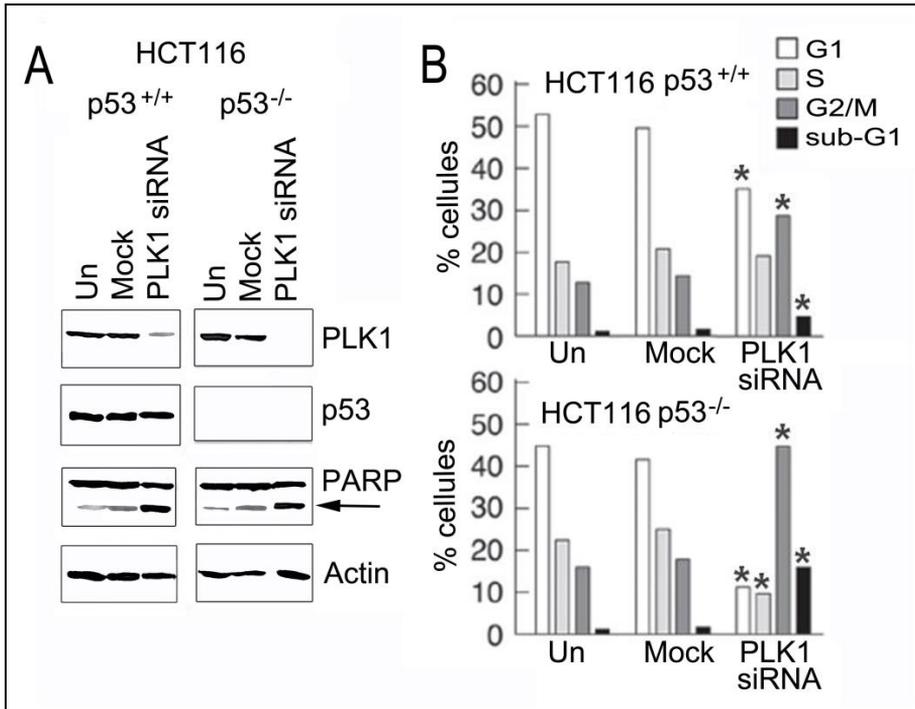


Figure 8. WB d'extraits protéiques issus des cellules HCT116 exprimant (p53^{+/+}) ou non (p53^{-/-}) la protéine p53. Ces deux lignées cellulaires ont été préalablement traitées par des siRNA contrôle (Mock) ou par des siRNA dirigés contre PLK1 (A). Les anticorps utilisés pour la révélation du WB sont indiqués à droite sur la figure. Un : cellules non traitées.

Des cellules HCT116 exprimant (p53^{+/+}) ou non (p53^{-/-}) la protéine p53 ont été traitées par des siRNA contrôle (Mock) ou par des siRNA dirigés contre PLK1, puis le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysé par cytométrie de flux après marquage par de l'iodure de propidium (B). Un : cellules non traitées. (*) : Différence significative par rapport aux cellules non traitées.

QCM 2-14. D'après vos connaissances et d'après les résultats de la Figure 8, que pouvez-vous affirmer :

- A/ L'iodure de propidium se fixe sur les histones associées à la chromatine.
- B/ L'iodure de propidium est une molécule radioactive servant au marquage métabolique.
- C/ Ces résultats suggèrent que la sous-expression de PLK1 entraîne la mise en jeu du premier point de contrôle.
- D/ L'ensemble de ces résultats suggèrent que PLK1 pourrait être une cible thérapeutique dans certains types de cancers s'accompagnant d'une perte de p53.
- E/ Aucune de ces réponses n'est exacte.

Inspiré de McKenzie et coll. 2010.