

## BIOLOGIE 2 (durée conseillée : 1h30)

### DIVERSITE DES TRANSCRIPTOMES ET LACTATION

« Selon les types cellulaires, en réponse à des signaux, à des variations d'activité ou à des modifications des conditions du milieu, l'expression du génotype varie et conduit à des phénotypes cellulaires variés. Les mécanismes permettant ces modulations portent essentiellement sur le contrôle de la transcription. La diversité des régulations de transcription explique en partie la diversité des transcriptomes. La protéine synthétisée subit ensuite des modifications de localisation avant de devenir fonctionnelle. Sa localisation cellulaire est déterminée par la présence d'une information de position. »

**L'objectif de ce sujet est de justifier et d'illustrer ces faits avec l'exemple de la physiologie moléculaire de la lactation. Il comporte 2 parties qui peuvent être traitées de manière indépendante.**

#### Partie 4 - (3,5 pts)

#### Des petits ARN régulateurs impliqués dans la lactation chez la vache

Les microARN (miR) sont des petits ARN intervenant dans le contrôle de l'expression de l'information génétique : l'appariement total ou partiel d'un miR avec sa séquence complémentaire, située sur un ARNm cible, conduit au blocage de la traduction ou à la dégradation de cet ARNm. Plusieurs centaines de gènes codant des microARN ont été identifiés dans le génome de la vache. De nouveaux microARN impliqués dans la physiologie de la glande mammaire et la lactation chez la vache allaitante pourraient être utilisés comme marqueurs moléculaires de diagnostic et de pronostic intégrés dans les schémas de sélection. L'objectif de cette partie 4 est de comparer les profils d'expression des microARN dans les glandes mammaires de vache entre les périodes de lactation et de non lactation (**document 10**), puis de rechercher les ARNm cibles de quelques microARN ainsi identifiés (**documents 11 et 12**).

microARN	Rapport d'expression normalisée (REN)
miR-141	REN = 19,09
miR-181a	REN = 0,85
miR-199b	REN = 0,12
miR-484	REN = 1,97
miR-500	REN = 2,98

**Document 10 : Quelques résultats obtenus par puces à ADN** quantifiés sous la forme de rapport d'expression normalisée (REN), qui correspond à la quantité du microARN dans les glandes mammaires en période de lactation divisée par la quantité de ce même microARN dans les glandes mammaires en dehors de la période de lactation. Les REN de ces miR sont tous significativement différents de 1.

#### **Question 10** Commenter très brièvement les résultats présentés dans le document 10.

Le micro-ARN miR-141 mis en évidence dans le **document 10** est purifié et séquencé. Par comparaison de séquences, son ARNm cible potentiel est recherché.

Séquence complète de **miR-141** : 5' UAACACUGUCUGGUAAGUGG 3'  
Court extrait de la séquence codante du **gène STAT5**  
Brin non transcrit, codant : 5' CCCAGTGTGC 3'  
Brin transcrit, non codant : 3' GGGTCACACG 5'

**Document 11** : Séquences de miR-141 et du gène *STAT5* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*).

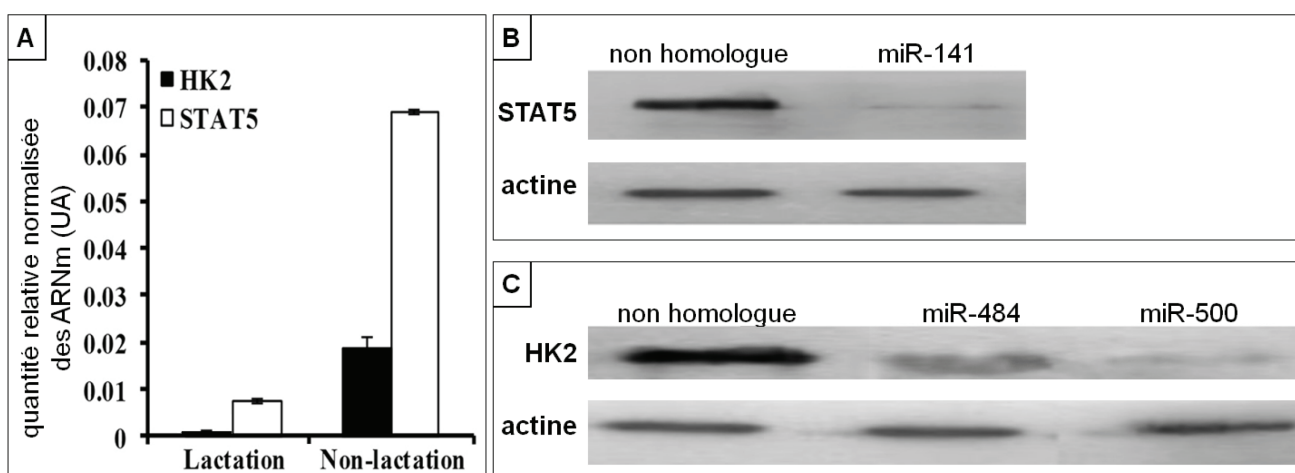
**Question 11a.** Représenter schématiquement la structure d'un ARN (détails des bases azotées non attendus).

**Question 11b.** Montrer, à l'aide d'un schéma, que l'on peut prévoir qu'un appariement (hybridation) d'au moins 5 nucléotides successifs est possible entre le microARN miR-141 et l'ARNm *STAT5*.

D'autres comparaisons de séquences prévoient qu'un appariement (hybridation) est possible entre les micro-ARN miR-484 et miR-500 et l'ARNm *HK2* (hexokinase 2). Afin de valider ces hypothèses, les protocoles suivants sont réalisés :

- les abondances des ARNm *HK2* et *STAT5* sont quantifiées dans glandes mammaires de vaches en période de lactation et de non-lactation. Les résultats sont présentés dans le **document 12-A**.

- des cellules d'épithélium mammaire de vache sont cultivées *in vitro*. Des transformations sont réalisées pour introduire dans les cellules un petit ARN : miR-141, miR-484, miR-500, ou un petit ARN non homologue dont la séquence est aléatoire. 24 heures après transfection, les protéines sont séparées par électrophorèse et transférées sur membrane. La révélation est faite à l'aide d'anticorps spécifiques de *STAT5*, de *HK2* ou de l'actine (Western-blot). Les résultats sont présentés dans les **documents 12-B et 12-C**.



**Document 12. A :** Abondance des ARNm *HK2* et *STAT5* dans les glandes mammaires de vache en période de lactation ou non normalisée par rapport au gène référence *GAPDH* (exprimé en unité arbitraire; UA).

**B et C :** Western-blot des protéines *STAT5* et *HK2* dans des cellules d'épithélium mammaire transfectées avec miR-141, miR-484, miR-500 ou un petit ARN aléatoire non homologue.

**Question 12a.** Interpréter l'ensemble des résultats présentés dans le document 12, en relation avec les données des documents 10 et 11. Proposer un mécanisme d'action des miR-141, 484 et 500.

**Question 12b.** Quelle est la réaction catalysée par l'hexokinase *HK2* ? Dans quelle voie métabolique est-elle impliquée ? En déduire un rôle à l'échelle des glandes mammaires pour miR-484 et miR-500 en période de lactation.

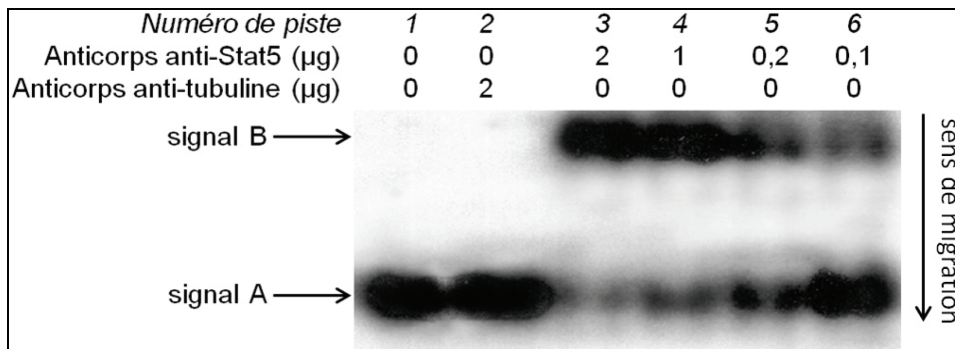
Malgré une faible abondance relative de *STAT5* durant la lactation (document 12-A), des ARNm *STAT5* sont néanmoins détectés pendant cette période. L'étude de la protéine *STAT5* et de ses rôles dans la lactation fait l'objet de la partie suivante.

**Partie 5 - (6,5 pts)**  
**L'activité du facteur de transcription STAT5 pendant la lactation**

La protéine STAT5 est un facteur de transcription connu pour contrôler la transcription de plusieurs gènes. La protéine STAT5 est capable de se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles, au niveau d'une séquence régulatrice spécifique et connue, de 21 paires de bases (pb). Cette séquence régulatrice a été identifiée dans le génome de la vache, dans le promoteur du gène codant la  $\beta$ -caséine, qui est la protéine majoritaire dans le lait.

Le protocole suivant est réalisé :

- les protéines nucléaires de cellules de glandes mammaires de vache en période de lactation sont purifiées et incubées avec un petit ADN double brin. Marqué radioactivement pour servir de sonde, cet ADN correspond à la séquence de 21 pb identifiée dans le promoteur du gène codant la  $\beta$ -caséine chez la vache
- des anticorps spécifiquement dirigés contre la protéine STAT5 (pistes 3 à 6 dans le document 13) ou contre la tubuline (piste 2) sont ajoutés au mélange d'incubation
- le mélange d'incubation est ensuite soumis à une électrophorèse en conditions natives
- chaque étape du protocole est réalisée en conditions natives, telles que tous les mélanges d'incubation et tampons préservent les interactions spécifiques ADN-protéine et protéine-protéine
- à la fin de l'électrophorèse, le gel est autoradiographié pour révéler la radioactivité ; les résultats sont présentés dans le **document 13**.



**Document 13 : Test de mobilité électrophorétique de STAT5.** Les mélanges d'incubation 1 à 6 sont indiqués dans le paragraphe précédent. Les espèces moléculaires révélées par la sonde ADN sont désignées par les signaux de radioactivité A et B. On rappelle que la sonde ADN (et non les anticorps utilisés lors de l'incubation) est marquée radioactivement dans cette expérience.

*Les réponses pourront être brèves, mais justifiées.*

**Question 13a.** Interpréter le profil de migration de la piste 1 ; à quelle association de molécules correspond le signal radioactif A ?

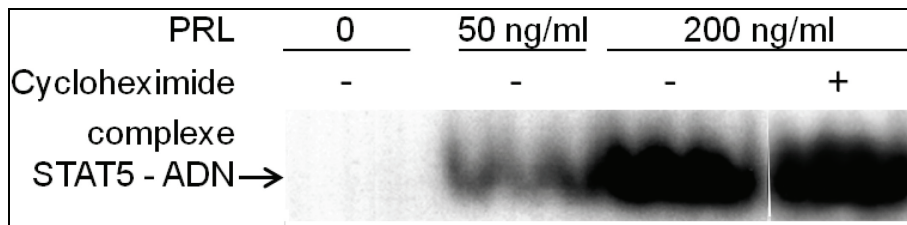
**Question 13b.** Interpréter le profil de migration de la piste 3 ; à quelle association de molécules correspond le signal radioactif B ?

**Question 13c.** Interpréter les autres profils de migration. En quoi les pistes 2, 3, 5 et 6 nous renseignent-elles sur la spécificité d'interaction avec STAT5 ?

**Question 13d.** Conclure sur le mode d'action de la protéine STAT5 *in vivo*.

La prolactine (PRL) est une hormone peptidique impliquée dans la lactation. Son influence sur l'activité de la protéine STAT5 est testée à l'aide du protocole suivant :

- des explants de glande mammaire de vache sont cultivés pendant 1 heure dans un milieu contenant ou non de la prolactine et de la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction.
- l'expérience précédente (dont les résultats ont été montrés dans le document 13) est ensuite reproduite en présence de prolactine.



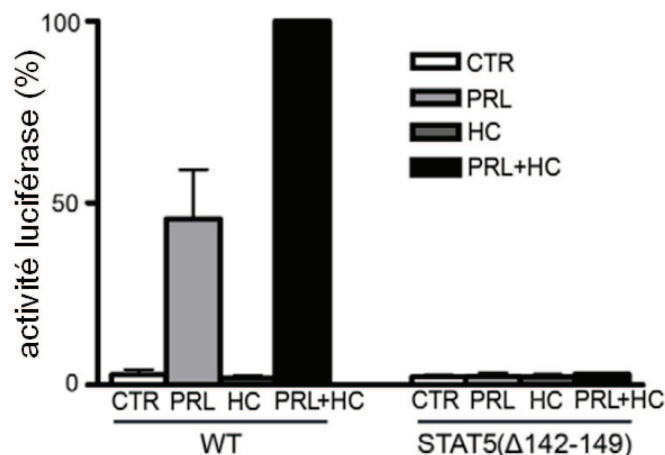
**Document 14** : Effet de la prolactine (PRL) sur le complexe STAT5-ADN.

**Question 14** : Interpréter les résultats présentés dans le document 14. Proposer alors une hypothèse explicative concernant le mode d'action de la prolactine. Qu'apportent les résultats concernant les explants incubés en présence de cycloheximide ?

La suite du travail est réalisée sur une lignée cellulaire humaine utilisée comme modèle d'étude de la physiologie de la lactation. Ces cellules sont co-transfectées avec les constructions génétiques suivantes :

- le gène codant STAT5 dans sa version sauvage (WT) ou conduisant à la synthèse de la protéine STAT5 $\Delta$ 142-149 tronquée, dépourvue du fragment peptidique compris entre les radicaux n°142 à 149.
- la séquence codante du gène de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur du gène humain codant la  $\beta$ -caséine : quand le promoteur est actif, la luciférase est synthétisée et émet des photons.

Ces cellules sont cultivées pendant 16 heures en présence de prolactine et/ou d'hydrocortisone, hormone liposoluble participant au contrôle de nombreux processus physiologiques dont la lactation. L'intensité du signal luciférase, proportionnelle à l'activité du promoteur du gène  $\beta$ -caséine, est ensuite quantifiée.



**Document 15** : Activité du promoteur du gène  $\beta$ -caséine dans des cellules humaines incubées dans un milieu contrôle (CTR) dépourvu d'hormone, ou en présence de prolactine (PRL) et/ou d'hydrocortisone (HC). L'activité luciférase est quantifiée sous forme normalisée en présence du gène STAT5 dans sa version sauvage ou mutée et sous les diverses stimulations hormonales effectuées.

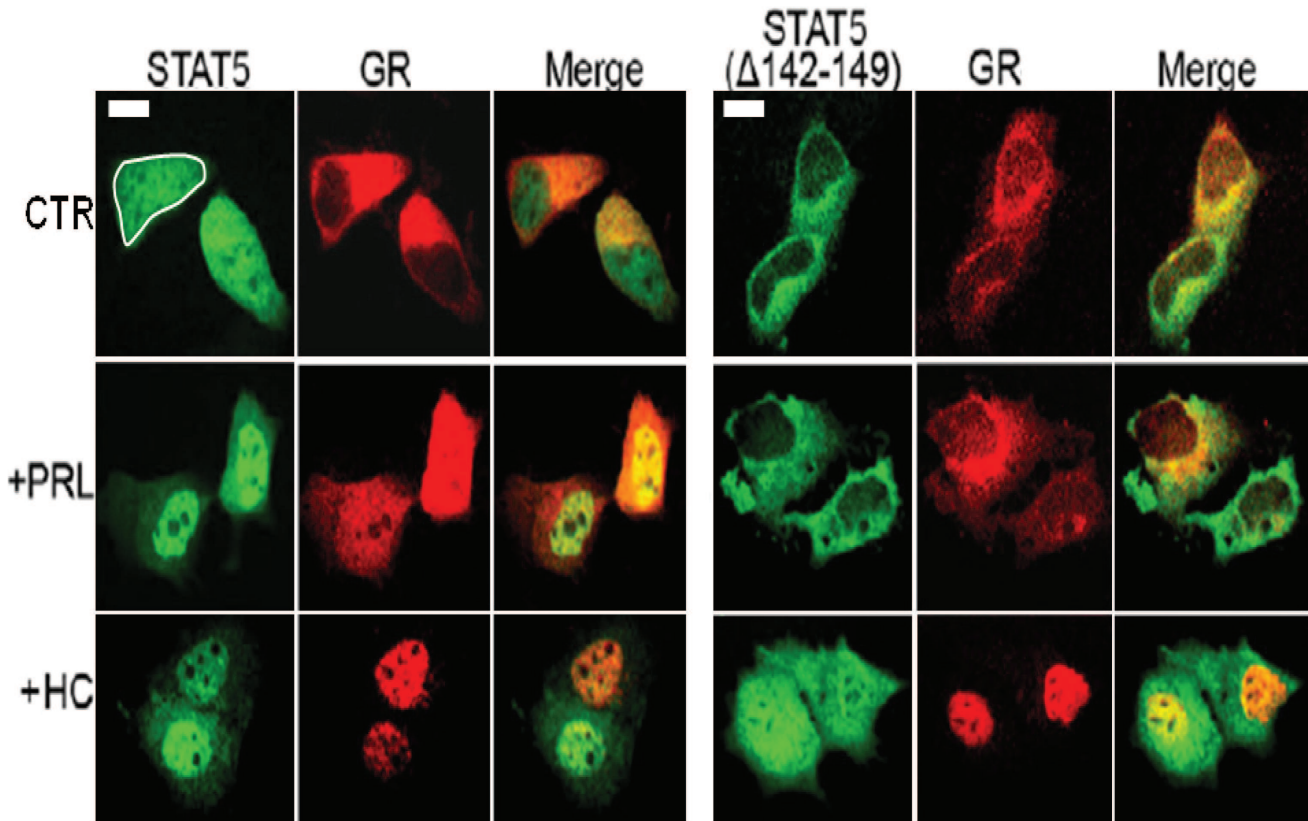
**Question 15** : Interpréter les résultats présentés dans le document 15.

Afin de localiser à l'échelle subcellulaire la protéine STAT5 et le récepteur GR à l'hydrocortisone, de nouvelles cellules de la lignée humaine modèle sont co-transfectées par :

- le gène codant la protéine STAT5 dans sa version sauvage (WT) ou tronquée (STAT5 $\Delta$ 142-149)
- le gène codant la protéine GR, qui est le récepteur à l'hydrocortisone.

Ces cellules sont cultivées pendant 1 heure dans un milieu contrôle (CTR) ou contenant l'hormone prolactine (PRL) ou hydrocortisone (HC). A l'aide d'anticorps fluorescents, la protéine STAT5 WT ou STAT5 $\Delta$ 142-149 est repérée par un signal vert et le récepteur GR par un signal rouge. Les résultats

obtenus au microscope à fluorescence, de ces expériences *in vitro*, sont présentés dans le document 16.



**Document 16 : Localisation subcellulaire des protéines STAT5 et GR sous diverses stimulations hormonales.** La protéine STAT5 sauvage ou tronquée ( $\Delta 142-149$ ) est repérée par un signal vert, le récepteur GR à l'hydrocortisone par un signal rouge. La superposition des deux signaux est présentée ("Merge"). Les images sont choisies pour être représentatives des résultats de l'expérience, dans un milieu contrôle sans stimulation (CTR), ou contenant l'hormone prolactine (PRL) ou hydrocortisone (HC). La membrane plasmique d'une cellule est repérée par un trait blanc dessiné dans la première image, barre d'échelle 5 $\mu$ m.

**Question 16a.** Quelle est l'influence des hormones prolactine et hydrocortisone sur la localisation de la protéine STAT5 ? Qu'apportent les résultats obtenus avec STAT5 $\Delta 142-149$  ?

**Question 16b.** Quelle est l'influence des hormones prolactine et hydrocortisone sur la localisation du récepteur GR à l'hydrocortisone ?

Chez les eucaryotes, une protéine synthétisée subit des modifications de localisation avant de devenir fonctionnelle. Sa localisation cellulaire est déterminée par la présence d'une information de position. On rappelle que l'hydrocortisone est une hormone stéroïde liposoluble.

**Question 16c.** En quoi consiste cette information de position pour la protéine STAT5 ? Et pour le récepteur GR à l'hydrocortisone ?

**Question 16d.** Mettre en relation l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* du document 16 avec ceux obtenus *in vivo* des documents 14 et 15. Pour cela, proposer des mécanismes de régulation post-traductionnelle de l'activité pour STAT5 et pour le récepteur GR.

## BIBLIOGRAPHIE

- (10) Li, Z. et al. 2012. *BMC Genomics* **13**:731-746.
- (11) Yang, J. et al. 2000. *Journal of Animal Science*. **78**:3114-3125.
- (12) Youn Shin, H. and Reich, N-C. 2013. *Journal of Cell Science*. **126**:3333-3343.