

Rapport : Travaux pratiques de « Messagerie intra et intercellulaire »

Introduction

Le facteur de croissance épidermique soit l'EGF (epidermal growth factor) est une hormone de type protéique aux multiples actions. Historiquement, cette hormone a été attachée au tissu épidermique. En réalité, elle s'applique à l'ensemble des tissus de l'organisme. La protéine étant soluble (illustration figure 1), elle est incapable de traverser la membrane plasmique hydrophobe. La transmission du signal de l'extérieur de la cellule à l'intérieur de la cellule se fera par fixation de l'EGF sur un récepteur spécifique en membrane, l'EGFR illustré en figure 2.

Figure 1 : Structure 3D de l'EGF. En vert : Feuilletts β . En Jaune : ponts disulfures.
(http://fr.wikipedia.org/wiki/Facteur_de_croissance_%C3%A9pidermique)

Le récepteur à l'EGF fait partie d'une famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Il régule l'une des plus grande voie de transduction du signal régulant la croissance, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules mammaliennes¹.

La fixation de l'EGF à son récepteur induit sa dimérisation puis son activation. Il y a alors trans- phosphorylation au niveau de certains résidus tyrosines du récepteur. Les tyrosines phosphorylées serviront alors de point d'ancrage à des protéines de domaine SH2, ayant un rôle de protéines adaptatrices ou enzymes cytoplasmiques. Celles-ci permettront l'interaction avec d'autres protéines. De nombreuses voies différentes de transduction du signal pourront alors être activées.

Nous nous intéresserons dans le présent rapport à l'activation de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).

Un grand nombre de signaux externes peuvent induire l'activation de la voie des MAPK et ainsi obtenir un large éventail de réponses différentes comme la croissance, la différenciation, l'inflammation, l'apoptose, ...

La voie des MAPK joue donc un rôle clé dans la régulation des gènes !

Chez les mammifères, il semble qu'il existerait trois voies : MAPK/ERK, SAPK/JNK et P38MAPK. Nous étudierons plus spécifiquement dans ce rapport ERK, étant impliqué dans la croissance cellulaire. Les deux autres voies seraient activées en réponse à des agents de stress tel que des cytokines et des phénomènes tels que l'inflammation et l'apoptose.

Tout au long du rapport, nous essayerons de vérifier expérimentalement le modèle décrit ci-dessus soit en suivant l'évolution au cours du temps de l'état de phosphorylation du récepteur à l'EGF ainsi que l'activation de la voie des MAPK/ERG dans des cellules stimulées ou non à l'EGF. Nous commencerons par dresser une brève description du matériel utilisé ainsi que l'ensemble de la procédure expérimentale. Après analyse de nos résultats, nous clôturerons notre rapport par une conclusion.

Figure 2 : Structure 3D du récepteur à l'EGF.
(http://en.wikipedia.org/wiki/Epidermal_growth_factor_receptor)

Matériel et Méthode

La séance de TP a été séparée en 3 parties : Stimulation de cellules par l'EGF et préparation des extraits protéiques, séparation des protéines par SDS-PAGE et transfert sur membrane, révélation de l'expression de I κ B et p65 par immunoblot.

Stimulation de cellules par l'EGF et préparation des extraits protéiques

Les cellules utilisées tout au long du tp seront des fibroblastes BJ. Ceux-ci ont été infectés à l'aide d'un rétrovirus par hTERT, une composante catalytique de la télomérase. Normalement, l'activité télomérase diminue avec le temps dans les cellules, empêchant aux cellules de vivre éternellement. L'infection des cellules par hTERT confère aux cellules une

durée de vie plus élevée tout en maintenant l'inhibition de contact.

La première partie de l'expérience abordée ici sera de réaliser des extraits protéiques à partir de cellules stimulées ou non durant des temps croissants (5 et 75 min). Chaque temps sera étudié sous trois conditions : cellules non stimulées (CTL), cellules stimulées par l'EGF (EGF) et les cellules stimulées à l'EGF mais pré incubées 40min en présence d'un inhibiteur de la voie des p42/p44 MAPK (EGF+). Deux contrôles négatifs ont également été réalisés : Temps 0 correspondant à une extraction protéique avant la stimulation et représentant l'état de départ des cellules, le temps 0+inhibiteur qui mettra en évidence un éventuel effet non désiré de l'inhibiteur sur nos cellules non stimulées. 8 boîtes ont ainsi été réalisées : temps T0, temps T0+inhibiteur, T5 contrôle, T5+EGF, T5+inhibiteur+EGF, T75contrôle, T75+EGF et T75+inhibiteur+EGF.

3 solutions ont été préparées pour chaque binôme : la solution de stimulation, la solution de rinçage (PBS) et la préparation du tampon de lyse 1x. Ceux-ci ont été élaborés suivant le protocole ci-dessous :

1. Solutions de stimulation. Pour chaque boîte «+ inhibiteur», nous avons réalisé une solution contenant 2ml de solution contenant l'inhibiteur. Cette solution a une concentration de 20 µl. Chaque binôme a réalisé cette solution avec une fraction de 5µl concentré à 40 mM et réalisée dans du milieu de culture DMEM préchauffé à 37°C.

2. La solution de rinçage. Un volume de 100ml de PBS (150mM NaCl, 10 mM PO4²⁻, pH7) a été préparé à partir d'un tampon phosphate (500mM, pH 7,4 et de NaCl). Les récipients ont été posés sur glace en attendant d'être utilisés.

3. Le tampon de lyse 1X a été préparé pour avoir un volume de 1ml composé de
-PIC (1x final –stock : 25x concentré)
-PIB (1x final –stock : 25x concentré)
-DTT(2mM final-stock: 1M)
Le tampon a été conservé sur glace.

Une fois les solutions préparées, les cellules ont été pré-incubées et stimulées. Le milieu de toutes les boîtes a été remplacé par 2ml de solution DMEM soit de solution DMEM + inhibiteur. Après 45min de pré incubation à 37°C, les boîtes sont décantées et les milieux remplacés par 2ml de DMEM contenant ou non de l'EGF en fonction des boîtes. Aucune

modification n'a été apportée aux boîtes temps 0 et temps 0+ inhibiteur. Enfin, les boîtes ont été mises en culture à 37°C durant exactement 5 ou 75 min.

Après l'incubation, nous avons récolté des lysats cellulaires. Les boîtes de cellules sortant de l'incubateur ont été déposées sur glace et la solution de stimulation a été retirée dans chaque boîte. Chaque boîtes a été rincée successivement deux fois avec du PBS afin de s'assurer qu'il ne reste plus de solution de stimulation. Nous avons ensuite déposé au fond de chaque boîte 120µl de tampon de lyse complet froid. Les cellules ont été raclées au fond de la boîte à l'aide d'un râtelier et transférées dans un tube eppendorf placé dans la glace.

Après avoir centrifugé 15min à 13000 rpm à 4°C, nous avons pu observer dans l'eppendorf un culot et un surnageant. Le culot contenant des débris du lysat cellulaire soit des déchets cellulaires, le surnageant étant constitué de molécules solubles. Notre protéine d'intérêt se trouvant dans le surnageant, nous avons transféré le surnageant dans un eppendorf et a été gardé sur glace le temps du dosage de protéines. Il est possible qu'il y ait la présence d'autres protéines que la protéine d'intérêt dans le surnageant.

L'étape suivante de notre protocole expérimental est le dosage des protéines par la méthode de Bradford. La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement de longueur d'onde d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec l'arginine et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Nous avons en effet actuellement une série de tube eppendorf contenant une concentration différente de protéine. Les étapes ci-dessous permettront de préparer pour les échantillons

d'intérêt 30µg d'extraits protéiques dans un volume total de 20 µl.

Chaque échantillon a été dosé en triple. 33 tubes ont été préparés avec 1ml de colorant (le colorant ayant été dilué 5x dans de l'eau et filtré préalablement). Chaque tube sera réalisé de minute en minute ainsi, on rajoutera dans 3 tubes constituant le blanc pour l'étalon 2,5µl d'eau distillée. Dans 3 tubes, on ajoutera 2,5 µl d'étalon BSA correspondant à 5µg de protéines. Dans 3 tubes, 2 µl de tampon de lyse sont ajoutés ce qui constitue un blanc pour les extraits cellulaires. Le tampon de lyse est utilisé pour faire le blanc puisque tous les échantillons possèdent tout du tampon de lyse. Dans tous les autres tubes, 1µl d'échantillon est ajouté. Chaque tube sera mélangé à l'aide d'un vortex et l'absorbance sera lue 10 minutes après l'ajout du colorant.

Chaque donnée de concentration sera calculée sur base de la formule suivante :

$$\frac{(M \text{ test} - M \text{ blanc tampon de lyse})}{(M \text{ étalon} - M \text{ blanc eau}) * (\text{cc étalon} * \text{vol étalon}) / \text{vol échantillon}}$$

M : moyenne
Cc : concentration
Vol : volume

Par la suite, 30 µg d'extraits protéiques dans un volume total de 20 µl sont calculés à partir des volumes d'extraits protéiques et de tampon de lyse complet. Ensuite une séparation des protéines sera réalisée sur base d'un gel SDS-PAGE.

Séparation des protéines par SDS-PAGE et transfert sur membrane

Dans un premier temps, le montage des plaques de verre sera réalisé. L'étanchéité du montage sera vérifié pour s'assurer de ne pas renverser de l'acrylamide (toxique).

Dans un deuxième temps, le running gel sera préparé, bien mélangé (afin de ne pas introduire des bulles d'air qui pourrait induire des problèmes de migration dans le gel) et aussi tôt coulé entre les 2 plaques de verre. Le running gel est composé de : 2,5 ml de tampon tris-HCl (1,5 M ; pH 8,8 ; SDS 0,4%), 4,0 ml d'acrylamide 30 % (Bisacrylamide 0,8%), 3,0 ml D'H₂O, 0,5 ml d'ammonium persulfate 1% et 10 µl de TEMED. Le TEMED est ajouté en dernier lieu puisque s'est cette substance

qui induit la polymérisation de l'acrylamide.

Le TEMED catalyse la décomposition des ions persulfates pour donner un radical libre R·. La polymérisation du polyacrylamide (A) se fait selon les réactions suivantes :

Figure 3 : Réaction de polymérisation de l'acrylamide (source : takween.com/techniques/05_Electrophorese.html)

Pour ne pas qu'il aie de contact avec l'air, une couche de 5mm de butanol sera ajoutée.

Après 45 min, le butanol sera retiré délicatement, et le stacking gel sera ajouté. Un peigne sera inséré afin de crée des puits pour facilité le dépôt des échantillons. Le stacking gel est composé de : 1,25 ml de tampon Tris-HCl (0,5 M ; pH6,8 ; SDS 0,4%), 0,5 ml d'acrylamide 30% (bisacrylamide 0,8%), 2,75 ml d' H₂O, 5 µl de TEMED et 0,5 ml d'ammonium persulfate 1%.

Pendant que le que les gels polymérisent, les échantillons sont préparés de façon à ce que les concentrations soient comparable une fois séparé sur le gel. Les échantillons ont été préparés avec du bleu de charge (10ml de tampon Tris-HCl 0,5 M ; pH6,8 ; SDS 0,4%, 10ml de SDS 20%, 5 ml de β-mercaptoéthanol, 10 ml de glycérol, 17,5 mg de bleu de bromophénol) de la façon suivante :

échantillon	[Cc]en µg/µl	vol contenant 30 µg prot (µl)	bleu de charge (µl)	tampon de lyse (µl)
0'	0,63	21,9	6,3	0
0' +inh	0,597	20,6	6,3	0
5' CTL	0,671	14,7	6,3	4
5' EGF	0,674	11,9	6,3	6,9
5' EGF + inh	0,68	11,6	6,3	7,1
75' CTL	0,662	19,4	6,3	0
75' EGF	0,681	15,6	6,3	3,2
75'EGF + inh	0,542	57,9	6,3	0

Durant 4 min, les microtubes, munis de capuchon ad hoc sont placés dans un bain marie, ce qui permet augmenter l'effet dénaturant β-mercaptoéthanol sur les protéines. Les microtubes sont centrifugés durant 30sec afin de que toute solution soit dans le fond du tube et qu'une partie de la solution n'adhère pas aux parois du tube.

Figure 4 : schéma du gel l'électrophorèse (source : http://takween.com/techniques/05_Electrophorese.html)

Après 20 min de polymérisation le stacking gel est près. Les plaques de verre fixés au support sont placées dans les cuves. Le tampon d'électrophorèse (pH 8,3-8,4) est ensuite ajouté. Le tampon d'électrophorèse (2l) est composé de : contenant du tampon Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM et SDS 0,1%.

La même quantité de chaque échantillon est déposée dans un puits à l'aide d'une micropipette. Ensuite le couvercle de la cuve est fermé et la tension est réglée sur 200V.

Une fois que le bleu de bromophénol a atteint le bord inférieur des plaques de verre, la migration est stoppée.

Figure 5 : cuve d'électrophorèse (source : <http://www.biologie.de/w/index.php?title=Gelelektrophorese&redirect=no>)

Une fois la migration terminée, le transfert peut commencer. Pour se faire, une membrane de cellulose (8cm x 6cm) est incubée pendant 1 minute dans du méthanol, puis pendant 15 min dans du tampon de transfert (Tris-HCl 20 mM ; de la glycine 145 mM). Il est important de manipuler les membranes avec des gants afin de ne pas la contaminer avec des protéines extérieures. Le bain de méthanol permet d'enlever le SDS des protéines et favorise l'adsorption des protéines sur la membrane chargée négativement. 4 papiers Whatman (9cm x 7 cm) sont imbibés de tampon de transfert.

Chaque gel est retiré de son support et des ses plaques de verre. Ensuite, le gel est placé sur le blotting entre des éponges de imbibés de tampon de transfert, des papiers Whatman et la membrane de transfert suivant le schéma suivant (western blot):

Figure 6 : schéma du western blot



Le courant est placé sur 30 mA et le transfert durera toute la nuit.

Révélation de l'expression de IκB et p65 par immunoblot

Une fois le transfert terminé, la membrane, les éponges, le gel et les papiers Whatman sont enlevés. Pour vérifier que le transfert à bien eu lieu, il faut observer que tout l'étalon a quitté le gel. La membrane est ensuite plongée dans du TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,6 ; NaCl 137mM ; Tween 0,1 %).

Il est important de bien visualiser ou se trouve le côté sur lequel se trouvent les protéines.

Après ce bain, la membrane est placée dans un biberon contenant ± 25 ml de TBS-T + lait pendant une heure sous agitateur.

Le milieu TBS + lait est vidé et 10 ml d'anticorps primaire (pour ERK phosphorylé) dilué dans du TBS-T + lait est ajouté dans le biberon contenant la membrane, et est agité.

Après une heure, la membrane est rincée à 3 reprises avec ± 25 ml de TBS-T + lait.

Ensuite, le milieu de rinçage est vidé. 10 ml d'anticorps secondaires (IgG anti-souris couplé à la peroxydase) dilué dans du TBS-T + lait est ajouté dans le biberon. La membrane est agitée pendant 35-45 min. A ce stade, le lait n'est plus nécessaire puisque celui-ci sert à évacuer le tout le surplus d'anticorps. La membrane est rincée 3 x 10 min dans ± 25 ml de TBS-T sans lait.

Durant le rinçage, un mélange de révélation est préparé (mélange de la solution A et B)

Après avoir vidé le milieu de rinçage, la membrane est placée sur la plaque en verre (côté protéines vers haut). Le mélange de révélation est versé délicatement et imbibe la membrane pendant 5 minutes.

La membrane est égouttée et placée entre les deux transparents dans le coin supérieur droit d'une cassette préparée précédemment.

Une fois dans une chambre noir, un premier film est placé dans la cassette pendant 1 min. Ensuite, le film est révélé à l'aide de 3 min dans un bain de révélateur, bref passage dans l'eau distillée et \pm 3 min dans un bain de fixateur.

Lorsque le film est sec, la membrane est placée sur le film pour repérer la position des marqueurs de poids moléculaire sur le film.

Résultats

De nombreuses erreurs expérimentales ont rendus nos résultats expérimentaux inutilisables. Dans un premier temps, nous essayerons de décrire nos résultats et émettrons des hypothèses sur les raisons possible d'un tel échec. Dans un second temps, nous présenterons les résultats obtenus lors de la préparation du labo illustrant les résultats que nous aurions du obtenir.

Observation des gels du groupe 1 annexe 1. Mise en évidence de ERK Total plus alpha tubuline.

Nous obtenons une bande dans chaque puits à un poids moléculaire d'un peu moins de 98kda dans un gel et un peu plus que 98kda dans l'autre gel.

Il nous est impossible de déterminer s'il s'agit d'alpha tubuline ou de ERK (sous sa forme phosphorylée ou non). Cependant, il serait plus probable que nous ayons fait une erreur avec les anticorps, ceux-ci étant utilisé en très petites quantités il est probable qu'aucun anti corps n'ait été ajouté. Cependant les bandes autour de 98kda ne correspondent pas non plus au poids moléculaire de l'alpha tubuline.

Le second groupe mettait en évidence également ERK total. Les résultats sont illustrés en annexe 2. On observe vers 50 kda une bande dans chaque puits. Ces bandes correspondent à l'alpha tubuline. Par endroits, il est possible d'observer une légère trace d'une bande vers un poids moléculaire de 45 kda environs. Il s'agit de ERK. Le faible signal empêche une exploitation des résultats. De plus un manque de stabilité du gel a entraîné des différences de migration des produits.

Le troisième groupe devait mettre en évidence la phosphorylation de ERK. Leurs résultats sont illustrés en annexes 3. Seul un des deux gels semble avoir mis en évidence des résultats exploitables (celui contenant deux puits). Nous

pouvons y voir distinctement la présence d'alpha tubuline vers 50 kda ainsi que ERK phosphorylé à un poids moléculaire de 45 kda. Nous ne sommes cependant pas en mesure de pouvoir analyser les résultats du deuxième gel. Nous n'y observons qu'une seule bande. Celle-ci se trouve à une position entre 45 et 50 kda. Il pourrait éventuellement s'agir de ERK phosphorylé. Dans ce cas, l'expérimentateur aurait peut être omis l'utilisation d'apha tubuline. Une deuxième hypothèse pencherait vers l'observation de l'alpha tubuline. Celle-ci ne serait pas en concentration identique dans chaque puits, par exemple suite à un mauvais remplissage des puits lors de leur chargement. Les anticorps auraient été oubliés ce qui expliquerait la non observation de phospho ERK.

Voici maintenant les résultats que nous aurions du avoir, les illustrations correspondent aux résultats obtenus lors de la mise en place du labo.

Le premier gel, annexe 4 met en évidence l'alpha tubuline dans chaque puits à un poids moléculaire légèrement supérieur à 50 kda. Remarquons ici que la photo du gel correspond à une exposition de 1 minute. Une exposition plus longue aurait donné un signal plus important. Lors de la préparation du TP, un projet avait pour but de mettre également en évidence la phosphorylation et l'évolution de la phosphorylation du récepteur à l'EGF au cours du temps. Celui-ci n'est pas apparu sur le gel avec une exposition d'une minute. Une exposition de 5 minutes a été effectuée pour voir si il s'agissait simplement d'un signal trop faible pour être détecté par une exposition d'une minute. Aucun signal supplémentaire n'a été détecté après 5 min. La mise en évidence du récepteur à l'EGF et de sa phosphorylation a donc été abandonnée. Le signal régulier correspondant à l'alpha tubuline à travers les différents puits constitue un contrôle de charge. Une même quantité d'alpha tubuline a bien été déposée dans chaque puits.

En comparant les bandes correspondant à la stimulation du récepteur à l'EGF à 0, 5, 30, 60 et 75 minutes, nous pouvons observer la variation de la phosphorylation de ERK à travers le temps.

Au temps 0, aucun signal n'apparaît. Ce résultat est normal, le récepteur vient seulement d'être stimulé. Il faut un certain temps avant que le récepteur soit phosphorylé

après fixation de l'EGF sur son récepteur. A 5min, la phosphorylation est maximale. Au cours du temps, 30, 60 et 75 min, nous pouvons observer une baisse du signal correspondant à la quantité de ERK phosphorylé.

Ce gel ne nous permet seulement de voir les résultats obtenu avec une stimulation ou non à l'EGF. Lors du laboratoire, nous avons rajouté à chaque temps un puits avec un inhibiteur : PD 98059.

Le deuxième gel a pour but de mettre en évidence ERK total soit sous forme phosphorylée et non phosphorylée ainsi que l'alpha tubuline. Nous observons de l'alpha tubuline dans chaque puits à environs un poids moléculaire de 50 kda. Chaque puits contient aussi la protéine ERK (sous sa forme phosphorylée ou non) vers un poids moléculaire de 45 kda. Remarquons ici qu'il n'est pas possible de différencier ERK sous sa forme phosphorylée et sous sa forme non phosphorylée. Les deux formes ne présente pas une assez grande différence de poids moléculaire pour être dissociée sur le gel.

Contrairement au premier gel ou nous pouvions observer une variation du marquage de ERK au cours du temps, chaque spots montre ici plus ou moins la même intensité. Ce résultat s'explique aisément par le fait que le gel révèle ici ERK sous sa forme phosphorylée et sous sa forme non phosphorylée. Il y a une variation au cours du temps de la quantité de protéine ERK phosphorylée mais ERK est toujours présente quelque soit la stimulation du récepteur sous sa forme non phosphorylée.

Conclusion

De nombreuses erreurs expérimentales ont rendu inexploitable nos résultats soit nos gels obtenu par immunoblot. Nous avons eu beaucoup de mal révéler la protéine ERK. Lors de la manipulation, il avait été assez délicat de prélever la quantité suffisante d'anticorps. De plus une erreur de manipulation avait conduit à l'enlèvement prématuré de la solution contenant les anticorps d'un des gels du groupe 1. Remarquons également les difficultés que nous avons eu à réaliser les gels d'une part pour le dispositif expérimental instable, la composition variable des gels et une variabilité de la stabilité de ceux-ci (affaissement lors de la migration ou gel cassant lors de l'extraction des plaques de verres) mais également des

variations du courant entre les électrodes lors de la migration.

Nous avons donc utilisé les résultats obtenus pour la préparation du labo. Ceux-ci montrent qu'il est possible de mettre en évidence par western blot la protéine ERK dans son état phosphorylé et son état non phosphorylé. L'utilisation de l'alpha tubuline a permis un contrôle de charge. Quelque soit l'exposition du film, il a été impossible de mettre en évidence le récepteur à l'EGF.

Grâce à la mise en évidence seule de la phosphorylation de ERK dans une des expérience, il est possible de montrer la cinétique de la phosphorylation de la protéine ERK au cours du temps suite à la stimulation du récepteur à l'EGF. L'état de phosphorylation maximal est obtenu 5min après la stimulation du récepteur à l'EGF. L'état de phosphorylation du récepteur n'est pas infini. Il y a une diminution de l'état de phosphorylation de ERK au cours du temps. Nous pouvons comprendre ce résultat par l'explication suivante : suite à la stimulation du récepteur par l'EGF, une cascade de phosphorylation est activée, donc celle des MAPK aboutissant entre autre à la phosphorylation de la protéine ERK. L'activation doit être rapide, ce qui explique que l'état de phosphorylation maximal est atteint après 5min. Une cellule ne peut répondre indéfiniment à un signal. C'est pourquoi la réponse de celui-ci va diminuer au cours du temps. Ceci explique la diminution de la quantité de protéine ERK sous la forme phosphorylée.

ⁱ A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling, Kanae Oda et al, Molecular Systems Biology, 2005