

84.01B

SESSION 2008

Filière BCPST

BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'épreuve comprend trois parties : un sujet de synthèse et deux sujets avec documents. Ces trois parties sont indépendantes, vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Les figures sont présentées dans un fascicule à part.

Les réponses et les schémas devront être clairs, précis et concis, les raisonnements rigoureux et les conclusions justifiées.

Le tableau ci-contre indique la durée conseillée pour chaque partie de l'épreuve.

Partie A : sujet de synthèse	page 2	1 h 30
Partie B : sujet avec documents	page 2	2 h 15
Partie C : sujet avec documents	page 8	2 h 15

84.01B

FIGURES

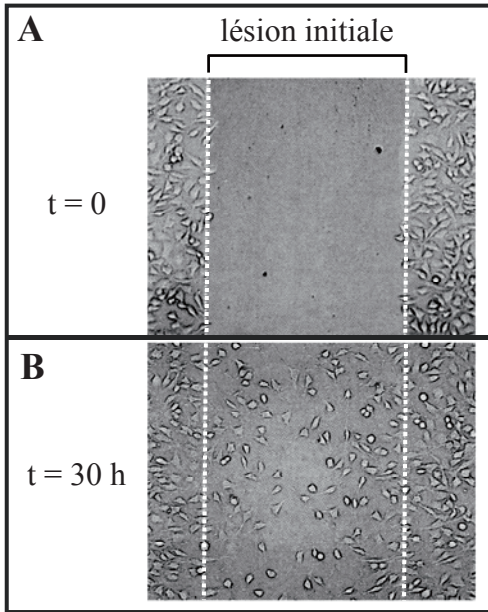


Figure 1. Observation des cellules humaines de sarcome au microscope optique en lumière blanche, au temps $t = 0$ (A), ou $t = 30$ h (B) après la création de la lésion. Les traits pointillés blancs marquent la position initiale des bords de la lésion.

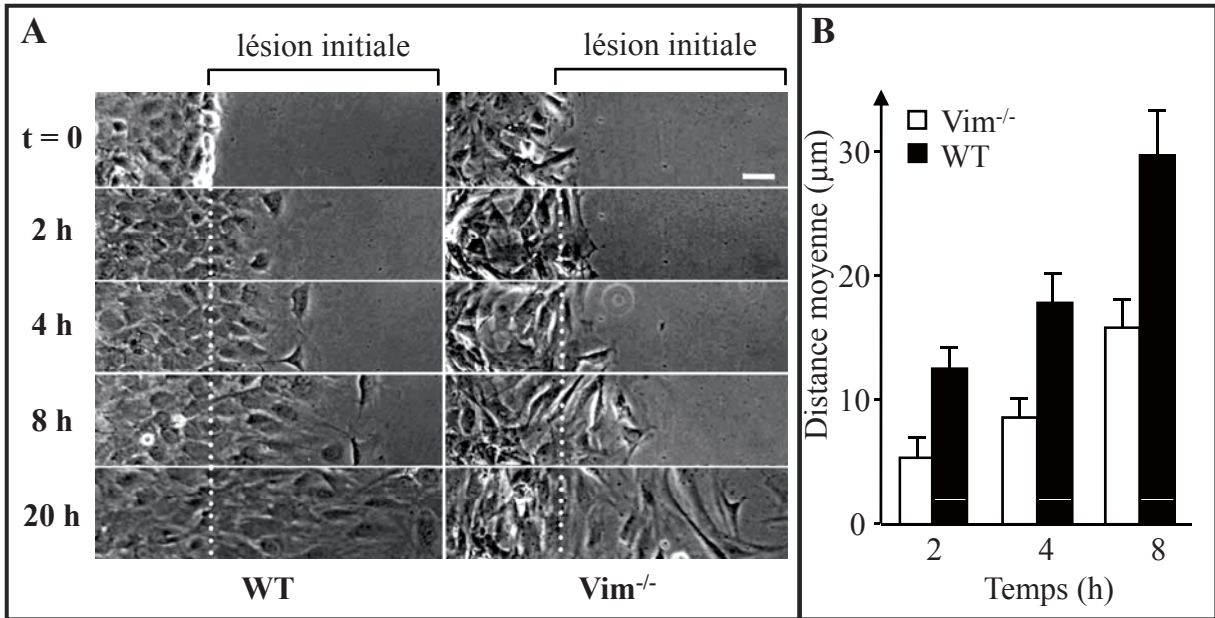


Figure 2. A) Observation des fibroblastes de souris WT (à gauche) et Vim^{-/-} (à droite) au microscope optique 0, 2, 4, 8 et 20 h après la création de la lésion. Barre : 5 µm. B) Distance moyenne entre la position initiale du bord de la lésion, marquée par un trait pointillé blanc en (A), et sa position aux temps $t = 2$ h, 4 h, 8 h dans les deux cultures (WT : barres noires ; Vim^{-/-} : barres blanches). La barre d'erreur correspond à l'écart-type.

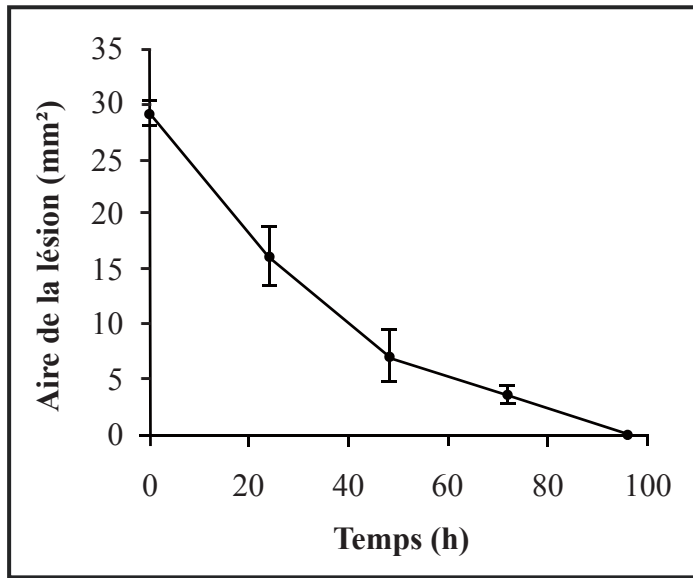


Figure 3. Aire de la lésion 0, 24, 48, 72 et 96 h après sa création dans la culture de cellules MCF10. L'expérience est réalisée quatre fois. La moyenne des valeurs obtenues à chaque temps dans les quatre expériences est reportée sur le graphe avec l'écart-type correspondant.

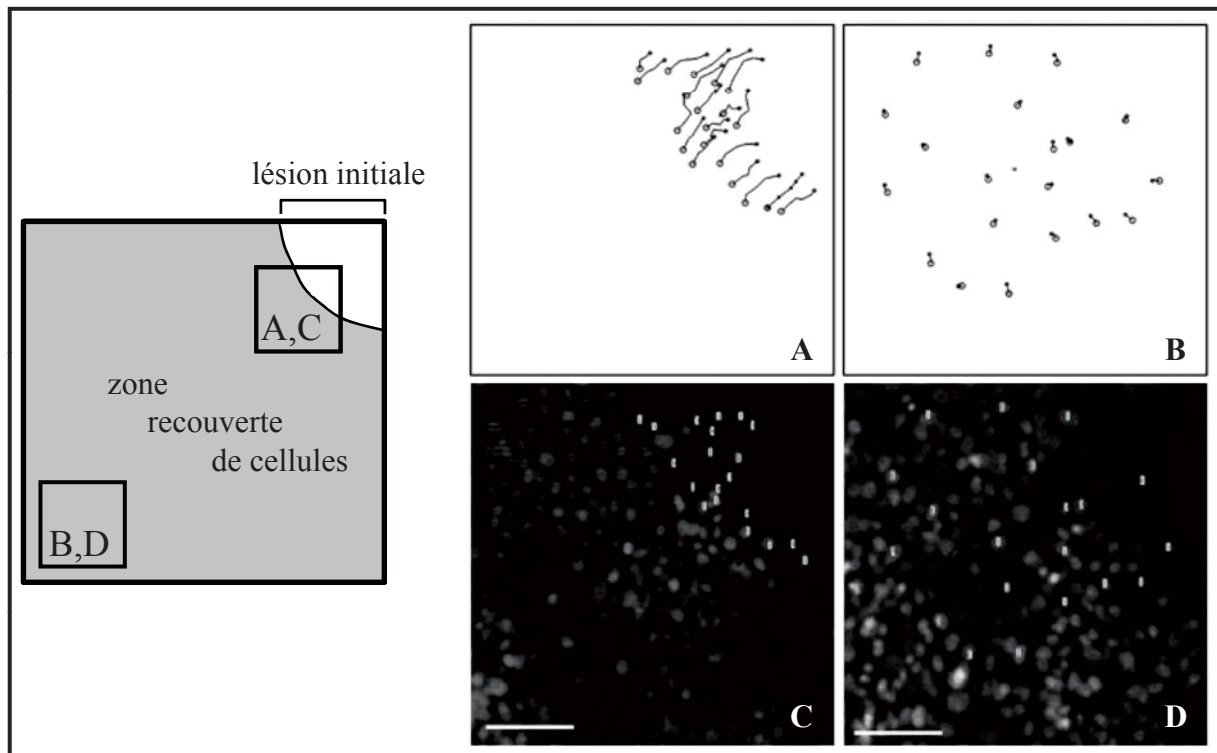


Figure 4. Etude par vidéomicroscopie des cellules MCF10 48 h après la création de la lésion. A, B) Enregistrement pendant 1 h de la position des 20 cellules analysées. C, D) Photographie des cellules à la fin de l'enregistrement. Les noyaux révélés par le colorant fluorescent apparaissent en gris sur fond noir. Les points blancs marquent les 20 cellules analysées. Barre : 80 μ m. Les cellules sont situées à proximité de la lésion (A, C) ou à distance du bord de la lésion (B, D) comme indiqué sur le schéma de gauche.

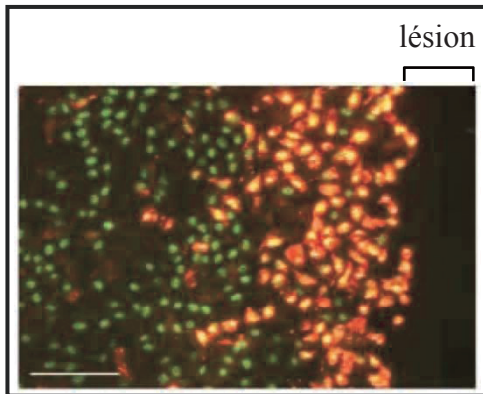


Figure 5. Marquage des cellules MCF10 incubées pendant 30 min en présence de BrdU 48 h après la création de la lésion. Barre : 80 μ m.

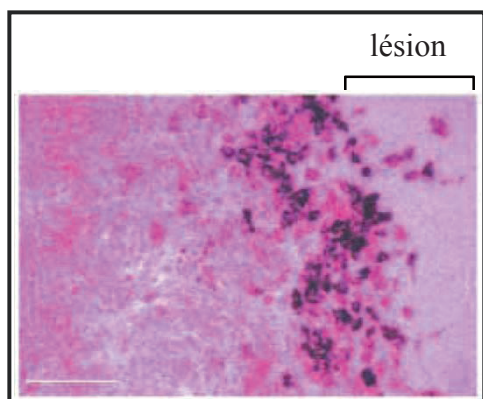


Figure 6. Expérience d'hybridation *in situ* réalisée sur des cellules MCF10 48 h après la création de la lésion, à l'aide d'une sonde complémentaire de l'ARNm de la vimentine. Les cellules apparaissent colorées en rose/mauve, les grains d'argent de l'émulsion photosensible en noir. Barre : 80 μ m.

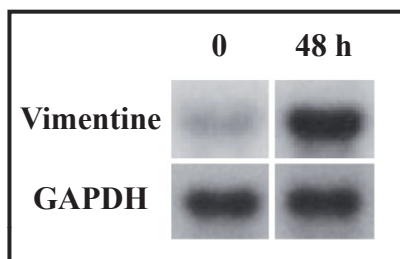


Figure 7. Expérience de *Northern blot* réalisée sur les ARN extraits des cellules MCF10 aux temps $t = 0$ (à gauche) et $t = 48$ h (à droite) après la création de la lésion, avec une sonde complémentaire de l'ARNm de la vimentine (en haut) ou complémentaire de l'ARNm de la GAPDH (en bas).

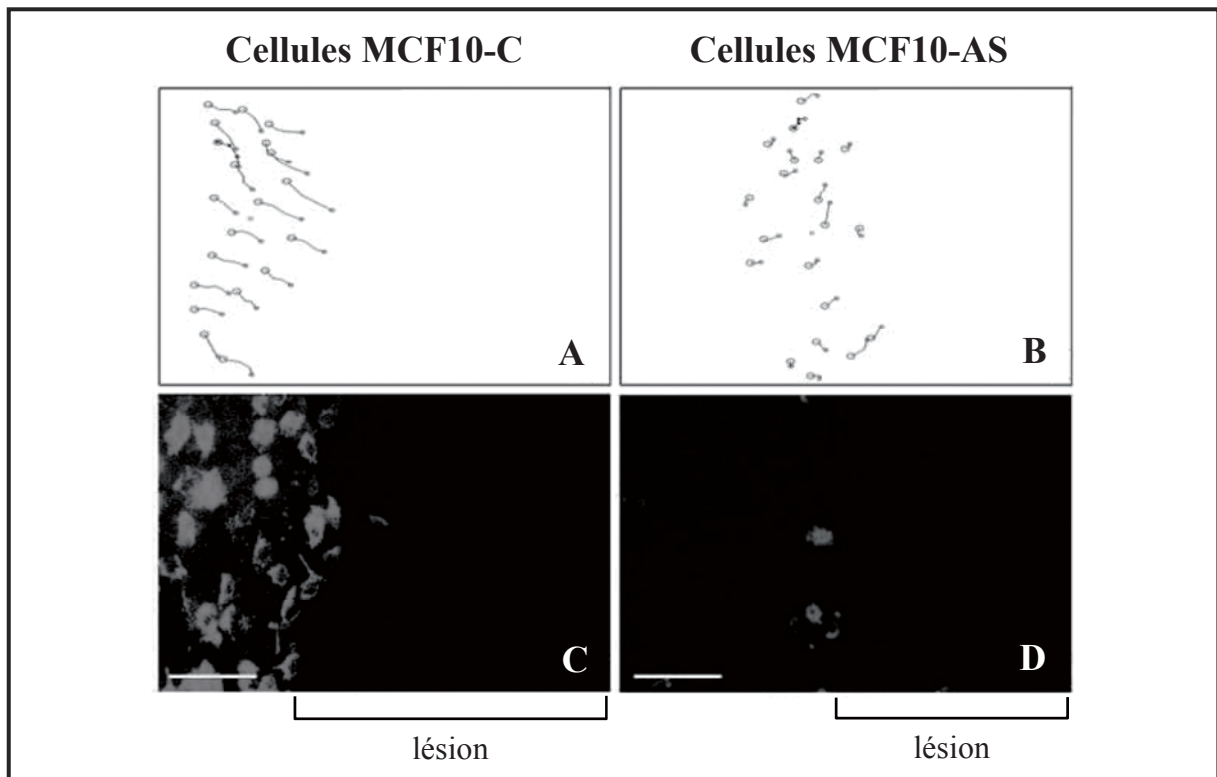


Figure 8. Etude par vidéomicroscopie des cellules MCF10-C (A, C) et MCF10-AS (B, D) 48 h après la création de la lésion. A, B) Enregistrement pendant 1 h de la position des 20 cellules analysées. C, D) Photographie des cellules à la fin de l'enregistrement. Le marquage par l'anticorps anti-vimentine apparaît en gris sur fond noir. Barre : 80 μ m.

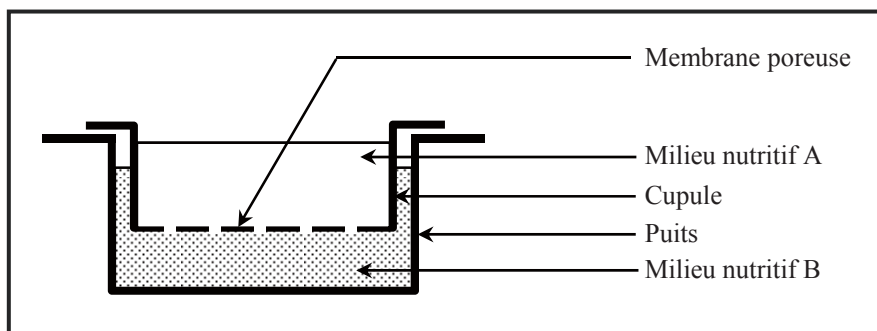


Figure 9. Schéma d'une chambre de Boyden. Le fond de la cupule est constitué d'une membrane poreuse représentée par des pointillés.

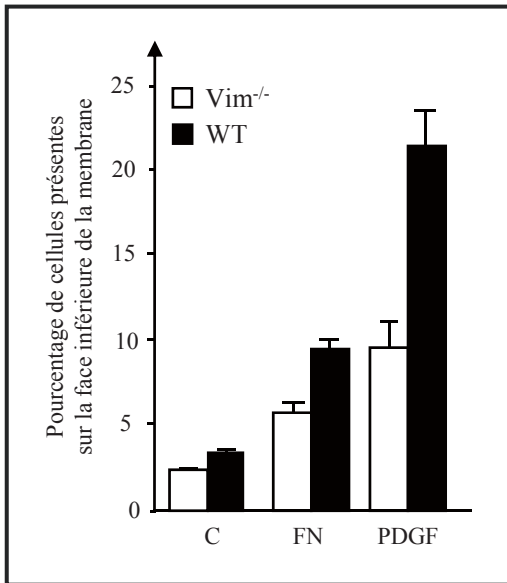


Figure 10. Culture de fibroblastes de souris sauvage (WT : barres noires) ou de souris transgénique (Vim^{-/-} : barres blanches) en chambre de Boyden. Le milieu B introduit dans les puits est constitué de milieu A seul (C, à gauche), ou de milieu A + FN (au centre), ou de milieu A + PDGF (à droite). Chaque barre du diagramme représente la moyenne des valeurs obtenues dans quatre expériences, avec l'écart-type correspondant.

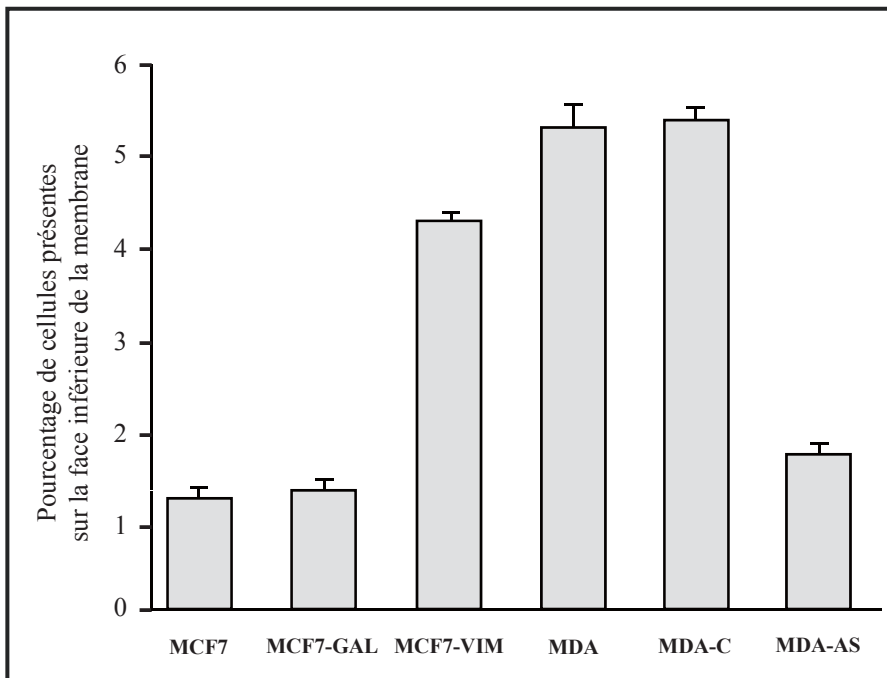


Figure 11. Culture de cellules humaines de cancer du sein en chambre de Boyden.

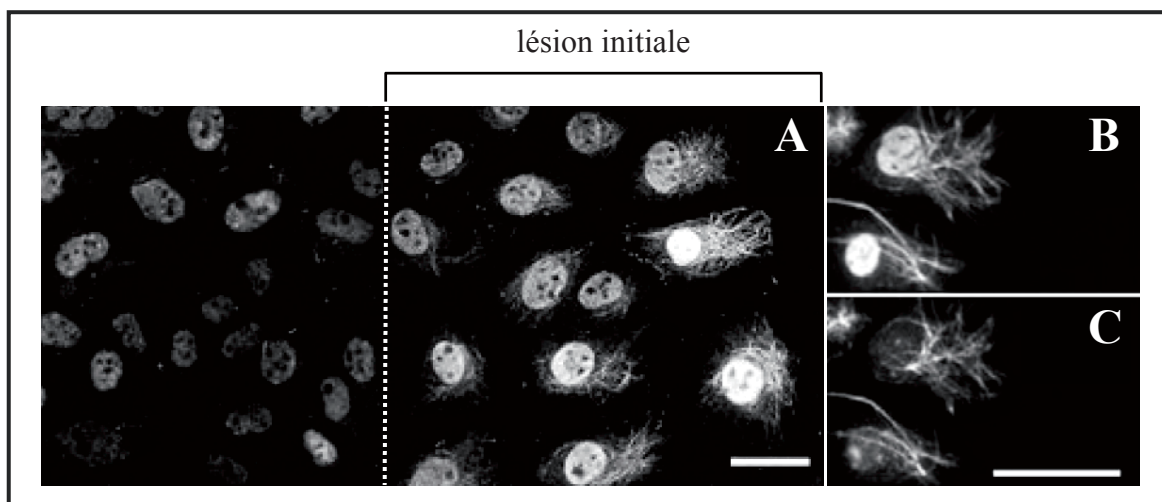


Figure 12. Marquage des cellules ARL 30 h après la création de la lésion à l'aide d'un anticorps anti-S1 (A, B), et d'un anticorps anti-vimentine (C). Le marquage apparaît en gris ou blanc sur fond noir. Le trait pointillé en A indique la position initiale du bord de la lésion. Un même champ est observé en B et C. Barre : 50 μm .

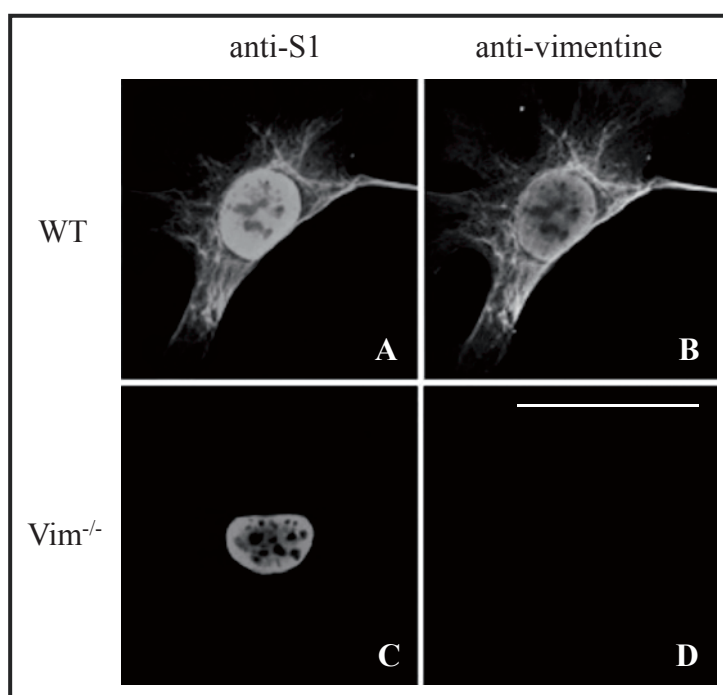


Figure 13. Détection, sur un fibroblaste de souris sauvage (WT, A et B) et sur un fibroblaste de souris transgénique $\text{Vim}^{-/-}$ (C et D), du marquage par un anticorps anti-S1 (A et C), ou par un anticorps anti-vimentine (B et D). Chaque cellule est représentative de l'ensemble de la culture analysée. Barre : 5 μm .

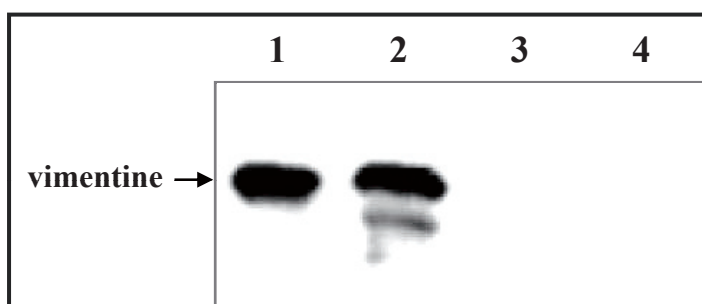


Figure 14. Immunodétection de la vimentine sur les préparations 1 à 4 de protéines de cellules ARL. Les numéros des pistes correspondent aux numéros des préparations.

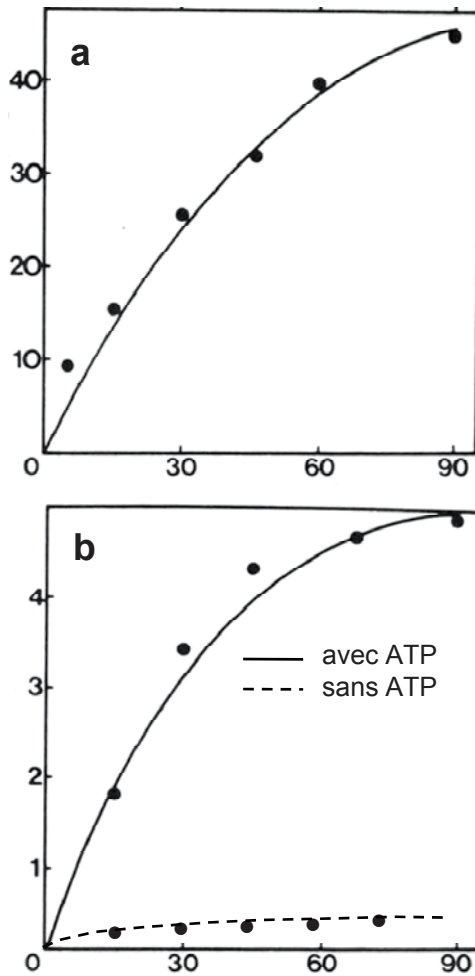


Figure 15. Cinétique de marquage en présence de tyrosine radioactive *in vivo* (a) et *in vitro* (b). En ordonnée : radioactivité retenue sur les filtres exprimée en cpm ($\times 10^{-3}$). En abscisse : temps en minutes.

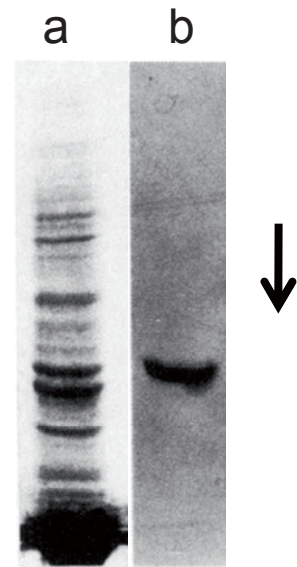


Figure 16. a) Coloration des protéines au bleu de Coomassie. b) Autoradiographie de la piste montrée en a). La flèche indique le sens de l'électrophorèse.

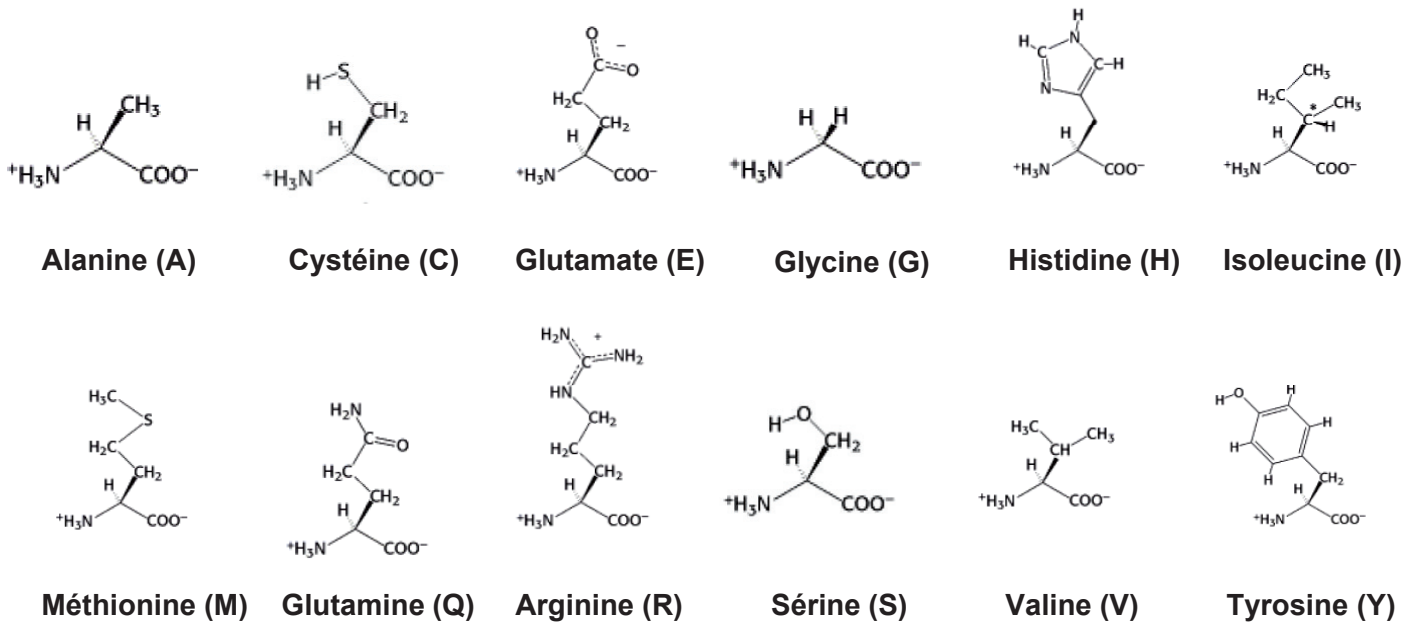


Figure 17. Formules de quelques acides aminés. Le code de chaque acide aminé dans la nomenclature à une lettre est précisé entre parenthèses. Les acides aminés sont présentés dans l'ordre alphabétique des codes.

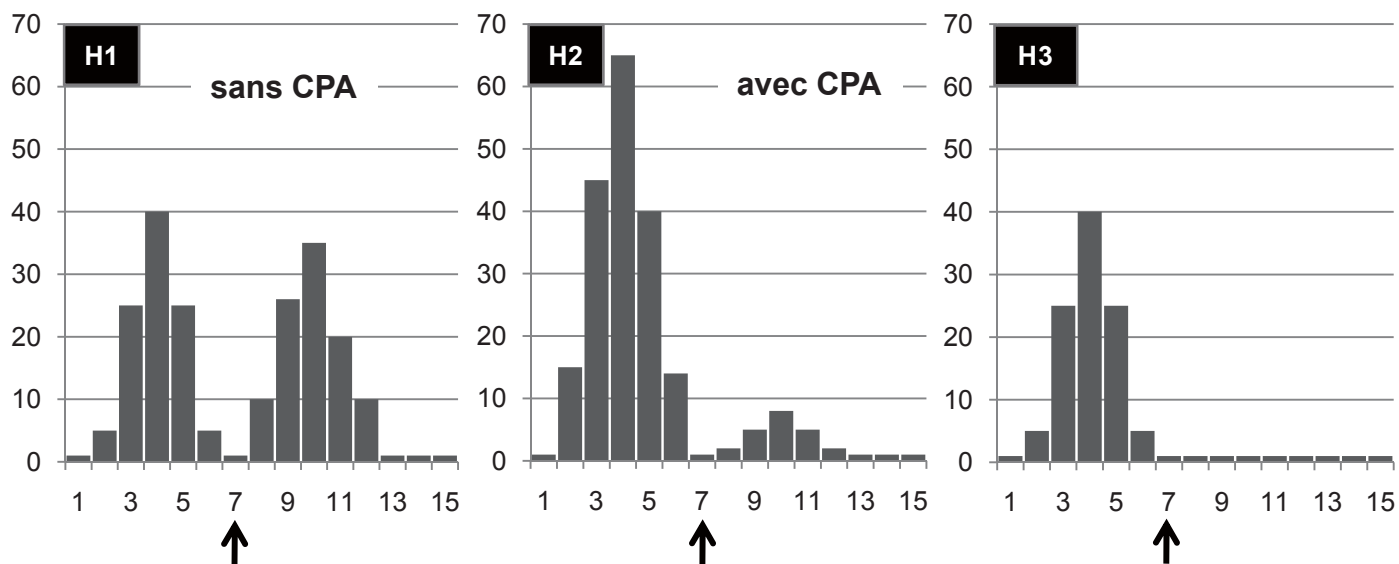


Figure 18. Pour chacun des histogrammes, l'abscisse correspond aux numéros de fractions et l'ordonnée aux concentrations protéiques (exprimées dans une unité arbitraire). Pour chaque expérience, la flèche indique la fraction à partir de laquelle la concentration en chlorure de potassium est supérieure à 100 mM.

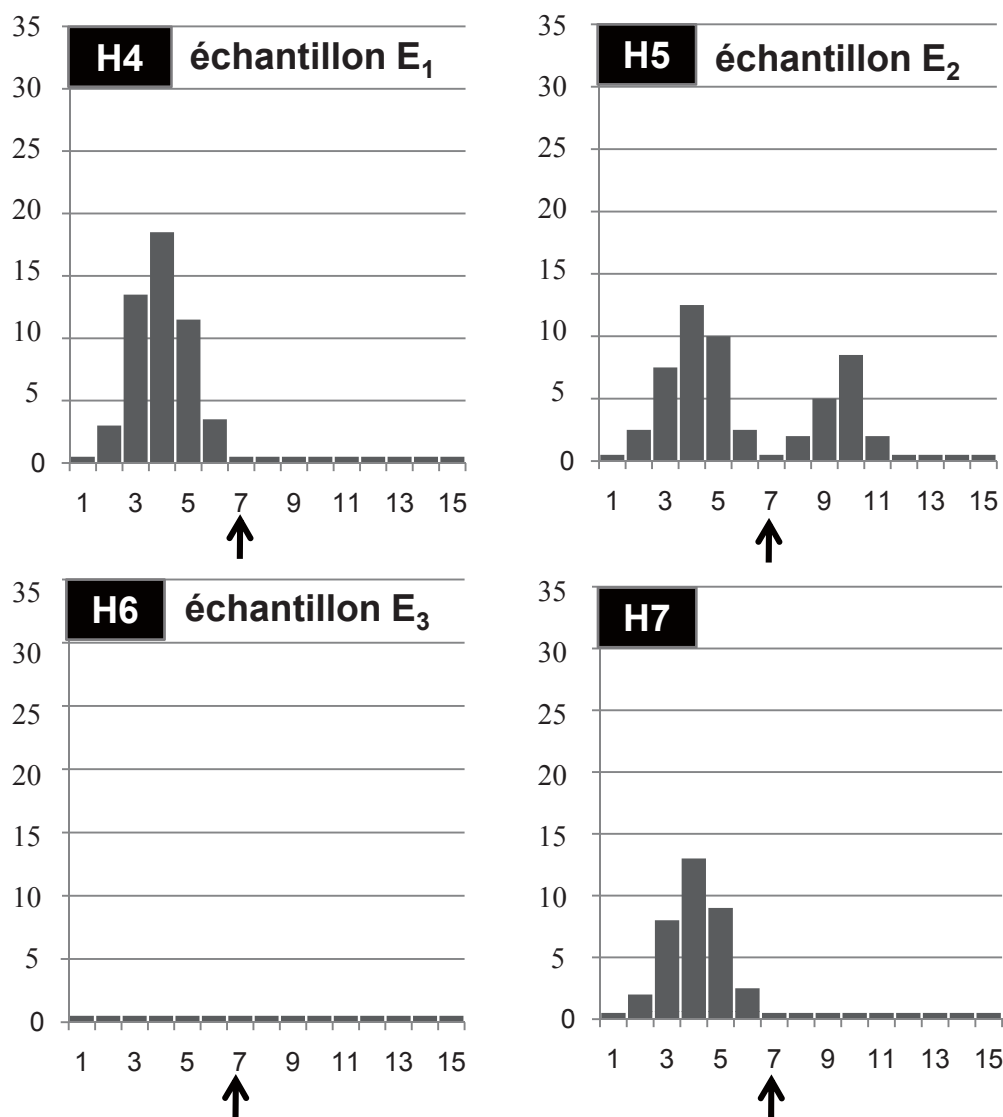


Figure 19. Pour chaque histogramme, l'abscisse correspond aux numéros de fractions et l'ordonnée aux concentrations protéiques (exprimées dans une unité arbitraire). Pour chaque expérience, la flèche indique la fraction à partir de laquelle la concentration en chlorure de potassium est supérieure à 100 mM.

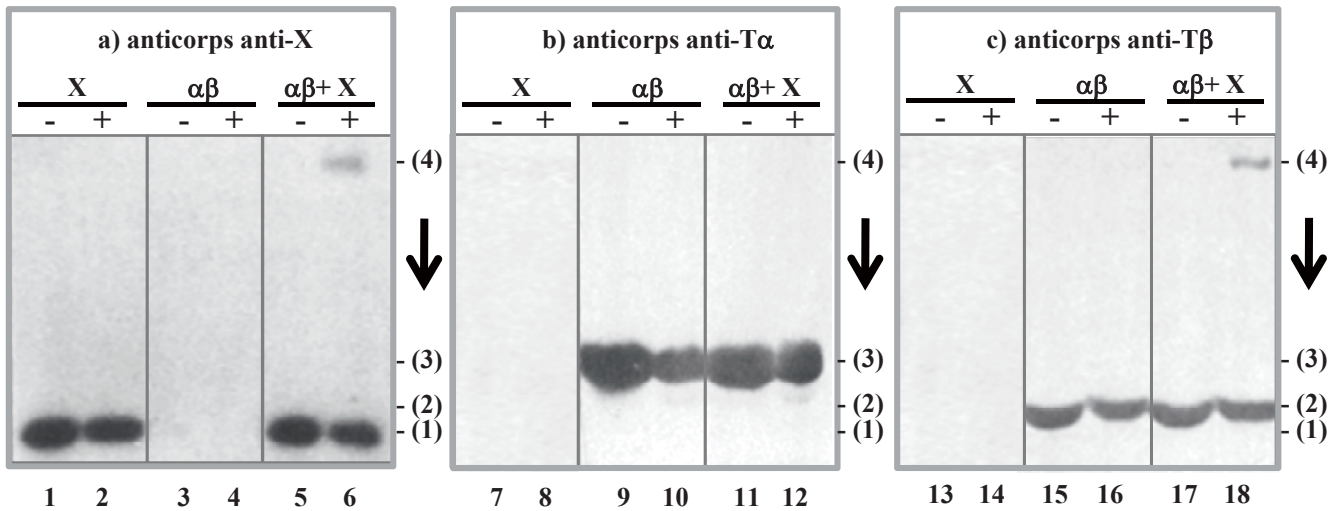


Figure 20. La protéine X seule (X), ou les dimères de tubulines seuls ($\alpha\beta$), ou un mélange des deux ($\alpha\beta+X$) sont incubés en présence (+) ou en l'absence (-) d'un agent pontant, le DMP. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse puis analysées par immunodétection sur membrane avec des anticorps dirigés soit contre X (a), soit contre $T\alpha$ (b), soit contre $T\beta$ (c). Les chiffres (1) à (4) sur le côté des images nomment les différentes bandes révélées. Le sens de migration des protéines est indiqué par une flèche. Les numéros de pistes (de 1 à 18) sont indiqués.

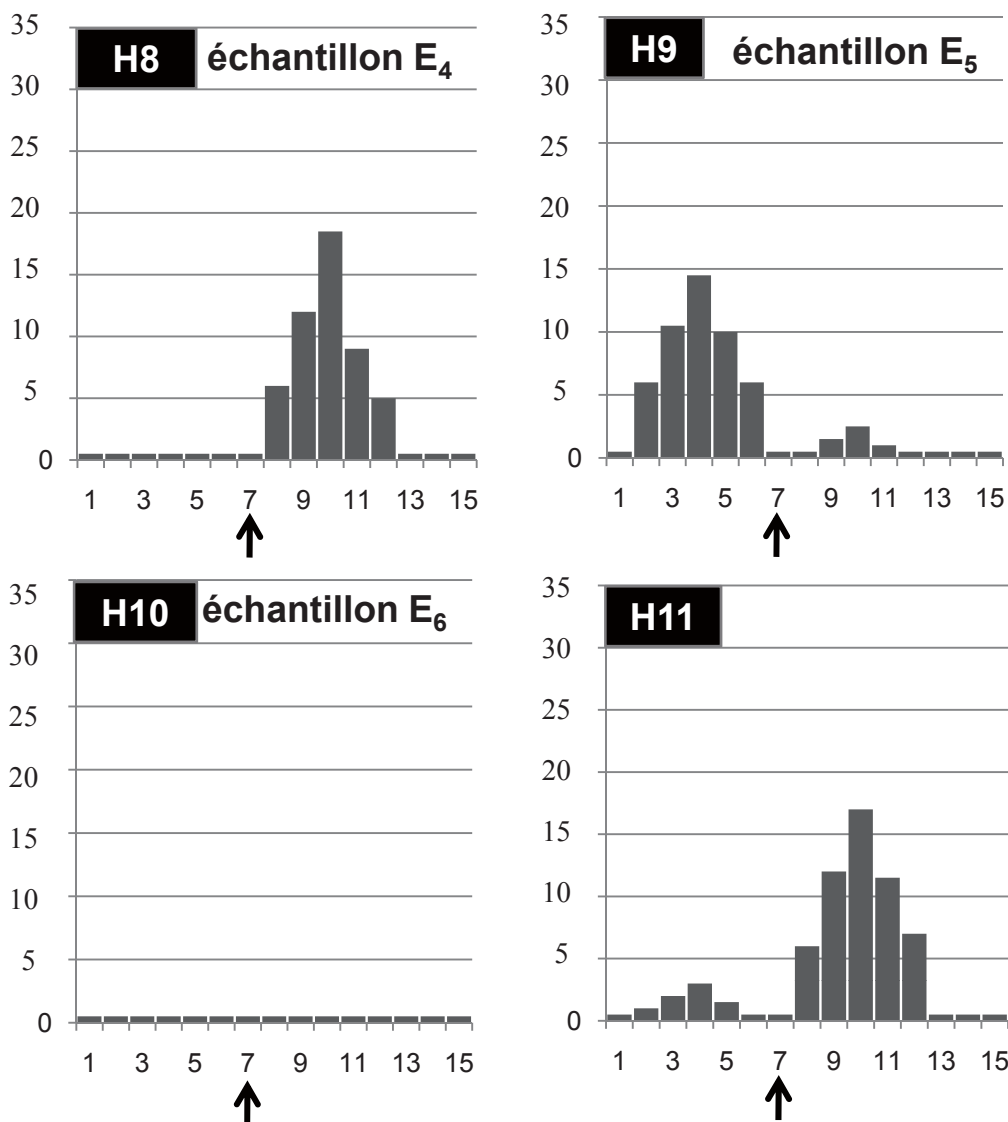


Figure 21. Pour chaque histogramme, l'abscisse correspond aux numéros de fractions et l'ordonnée aux concentrations protéiques (exprimées dans une unité arbitraire). Pour chaque expérience, la flèche indique la fraction à partir de laquelle la concentration en chlorure de potassium est supérieure à 100 mM.

```

1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk
1 mrecisihvg qagvqignac welyclehgi qpdgqmpsdk tigggddsfn tffsetgagk

61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkeda nnyarghyti gkeiidlvld
61 hvpravfvdl eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkeda nnyarghyti gkeiidlvld

121 rirkladqct glqgfsvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta
121 rirkladqct rlqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta

181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl igqivssita
181 vvepynsilt thttlehsdc afmvdneaiy dicrrnldie rptytnlnrl igqivssita

241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprahfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfepan
241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfepan

301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginypepp
301 qmvkcdpghg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkrt iqfvdwcptg fkvginypepp

361 tvvpggdlak vqravcmlsn ttaiaeawar ldhkfdlmya krafvhwyvg egmeegefse
361 tvvpggdlak vqravcmlsn ttaiaeawar ldhkfdlmya krafvhwyvg egmeegefse

421 aredmaalek dyeevgvdsv egegeeegee y
421 aredmaalek dyeevgvhsv egegeeegee y

```

Figure 22. Alignement des séquences des T α humaine (en bleu) et porcine (en noir). La séquence est donnée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les nombres indiquent la position des acides aminés situés à l'extrémité gauche de chacune des lignes. Les acides aminés qui diffèrent entre les deux séquences sont grisés.

Partie A : sujet de synthèse

Organisation et contraction des cellules musculaires striées.

Le métabolisme énergétique ne sera pas traité.

Partie B : premier sujet avec documents

Avec les microfilaments et les microtubules, les filaments intermédiaires entrent dans la constitution du cytosquelette des cellules des vertébrés. Selon les tissus, les protéines qui les composent sont de nature différente : ainsi, les filaments intermédiaires des cellules épithéliales sont constitués de kératine, tandis que ceux des cellules dérivées du mésenchyme telles que les fibroblastes sont constitués de vimentine.

Des cellules épithéliales, soumises à des conditions physiologiques ou pathologiques particulières, peuvent acquérir des capacités migratoires ou des propriétés invasives (par exemple, au cours de l'organogenèse, à l'occasion de la réparation d'une blessure, ou lors de la formation de métastases à partir d'une tumeur). Elles perdent alors certaines de leurs caractéristiques de cellules épithéliales pour acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses : on parle de transition épithélium-mésenchyme.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans la transition épithélium-mésenchyme peuvent être étudiés sur des modèles de réparation de blessure en culture cellulaire *in vitro*. Dans toutes les expériences présentées, les cellules sont cultivées *in vitro* à 37°C, sur un support solide auquel elles adhèrent, en présence de milieu nutritif complet.

B-1. Dans une première expérience de réparation de blessure en culture cellulaire *in vitro*, des cellules humaines issues d'un sarcome (une tumeur invasive dérivée du mésenchyme) sont déposées dans des puits de plastique, recouvertes de milieu nutritif complet et incubées à 37°C. Elles adhèrent au fond des puits et prolifèrent, jusqu'à en recouvrir toute la surface : on dit alors qu'elles forment un tapis cellulaire confluent. Au temps $t = 0$, une lésion est créée au sein du tapis cellulaire confluent en éliminant les cellules avec la pointe d'une pipette le long d'un diamètre du puits ; la culture présente alors une zone centrale dépourvue de cellules (figure 1A). La culture est replacée à 37°C. Au temps $t = 30$ heures, elle se présente comme le montre la figure 1B.

Question 1 : *Quels phénomènes cellulaires peuvent rendre compte de l'évolution de la culture entre le temps $t = 0$ et le temps $t = 30$ heures ?*

La même expérience est réalisée avec des fibroblastes normaux provenant d'une souris sauvage (WT) ou d'une souris transgénique chez laquelle les deux allèles du gène codant la vimentine ont été invalidés ($Vim^{-/-}$). La réparation de la lésion est suivie par observation microscopique à différents temps compris entre $t = 0$ et $t = 20$ heures (figure 2A). Pour chacune des cultures (WT et $Vim^{-/-}$), dans 16 champs optiques différents, on mesure la

distance entre la position du bord du tapis cellulaire au temps $t = 0$ et sa position aux temps $t = 2$ heures, $t = 4$ heures, $t = 8$ heures. Pour chaque temps, une distance moyenne est calculée. Elle est reportée sur le graphe de la figure 2B.

Question 2 : *Comparez l'évolution des deux cultures de fibroblastes (WT et Vim^{-/-}). Interprétez ces observations.*

B-2. Des expériences de réparation de blessure en culture cellulaire similaires à celles décrites dans le paragraphe B-1 sont menées sur des cellules épithéliales normales de glande mammaire humaine, les cellules MCF10. Les seules différences opératoires sont que : (i) les cellules sont cultivées sur une lame de verre dans une chambre thermostatée à 37°C installée sur la platine d'un microscope à fluorescence pour pouvoir être observées et photographiées à intervalles de temps réguliers (vidéomicroscopie), (ii) pour créer une lésion au sein du tapis cellulaire confluent, on procède par dépôt d'1 μ L de soude 1 mol/L et lavage immédiat dans du milieu de culture. La lésion prend donc ici la forme d'un disque, dont l'aire est mesurée au cours du temps et représentée sur le graphe de la figure 3.

Question 3 : *Schématisez à l'échelle l'aspect de la culture cellulaire aux temps $t = 0$, $t = 48$ heures, $t = 96$ heures.*

La même expérience de réparation de blessure en culture cellulaire que celle correspondant à la figure 3 est réalisée, mais les noyaux des cellules sont marqués par un colorant fluorescent qui pénètre dans les cellules vivantes. 48 heures après la création de la lésion, les cellules sont étudiées par vidéomicroscopie sur une période d'une heure, un logiciel de traitement des images permettant de repérer et de suivre au cours du temps la position de 20 cellules réparties de manière aléatoire, soit dans une région qui borde la lésion (figure 4, A et C), soit dans une région éloignée du bord de la lésion (figure 4, B et D).

Question 4 : *Après avoir précisé ce que représentent les cercles, les points et les traits qui apparaissent sur les schémas A et B de la figure 4, interprétez les résultats présentés sur les figures 3 et 4.*

Dans une expérience de réparation de blessure en culture cellulaire telle que celle correspondant à la figure 3, 48 heures après la création de la lésion, les cellules sont incubées 30 minutes en présence de bromodésoxyuridine (BrdU), qui s'incorpore dans l'ADN en cours de réplication. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées et incubées en présence de deux anticorps fluorescents, l'un dirigé contre la BrdU et couplé à la fluorescéine (permettant d'observer un marquage vert), l'autre dirigé contre la vimentine et couplé à la rhodamine (marquage rouge). L'image obtenue après observation des cellules au microscope à fluorescence est présentée sur la figure 5. L'apparition d'une coloration jaune résulte de la superposition d'un marquage vert et d'un marquage rouge. Aucune coloration rouge ou jaune n'est observée si les cellules sont incubées 30 minutes en présence de BrdU immédiatement après la création de la lésion ou 120 heures plus tard (résultats non montrés).

Question 5 : *Quel est le but de l'incubation des cellules en présence de BrdU ? Analysez et interprétez l'image de la figure 5 puis confrontez ces résultats à ceux présentés sur la figure 4.*

La même expérience de réparation de blessure en culture cellulaire que celle correspondant à la figure 3 est réalisée. 48 heures après la création de la lésion, les cellules sont fixées, perméabilisées et incubées en présence d'une sonde nucléotidique radioactive complémentaire de l'ARNm de la vimentine (expérience d'hybridation *in situ*). La préparation est lavée, placée à l'obscurité et recouverte d'une émulsion photosensible. Après 15 jours de contact, la

préparation est révélée, fixée et observée au microscope optique. L'image obtenue est présentée sur la figure 6.

Question 6 : Analysez l'image présentée sur la figure 6. Au vu de ces résultats, quelles hypothèses pouvez-vous émettre concernant l'ARNm de la vimentine ? Quel lien faites-vous entre ces résultats et ceux présentés sur la figure 5 ? Quel témoin pourrait être ajouté pour compléter cette expérience ?

La même expérience que celle présentée sur la figure 3 est réalisée dans deux puits. Dans l'un des puits, les cellules sont récoltées au temps zéro de l'expérience (au moment où la lésion est créée au sein du tapis cellulaire confluent), lysées et les ARN en sont extraits. L'autre puits est incubé à 37°C pendant 48 heures à partir de la création de la lésion, puis les cellules sont récoltées, lysées et les ARN en sont extraits. Chacune des deux préparations d'ARN (respectivement A et B) est séparée en deux fractions équivalentes (A en A1 et A2, B en B1 et B2) qui sont soumises à une électrophorèse en gel d'agarose en conditions dénaturantes. Les ARN sont ensuite transférés du gel sur une membrane de nylon (*Northern blot*). La membrane est coupée en deux. La partie 1, correspondant aux fractions A1 et B1, est incubée en présence d'une sonde nucléotidique radioactive complémentaire de l'ARNm de la vimentine. La partie 2, correspondant aux fractions A2 et B2, est incubée en présence d'une sonde nucléotidique radioactive complémentaire de l'ARNm de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, synthétisée de façon constante dans les cellules, quelles que soient les conditions de culture). Les deux membranes sont lavées et autoradiographiées. Les résultats sont présentés sur la figure 7.

Question 7 : Analysez et interprétez ces résultats. Qu'apporte cette expérience par rapport à la précédente (figure 6) ?

La même expérience de réparation de blessure en culture cellulaire que celle présentée sur la figure 4 est réalisée sur des cellules MCF10 dans lesquelles ont été introduites de courtes molécules d'ADN antisens qui inhibent spécifiquement la traduction de l'ARNm de la vimentine (MCF10-AS ; figure 8, B et D). Une expérience de contrôle est réalisée avec des cellules MCF10 dans lesquelles ont été introduites de courtes molécules d'ADN de séquences aléatoires (MCF10-C ; figure 8, A et C). La position de 20 cellules situées au bord de la lésion est enregistrée pendant 1 heure (A, B). A la fin de l'enregistrement, les cellules sont fixées ; les champs analysés en A et B sont observés au microscope à fluorescence après marquage des cellules à l'aide d'un anticorps fluorescent dirigé contre la vimentine et couplé à la rhodamine (C, D).

Question 8 : Comparez les résultats obtenus avec les cellules MCF10-C et avec les cellules MCF10-AS. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

B-3. La réparation d'une blessure au sein d'un organisme fait intervenir des phénomènes de chimiotactisme. L'influence de différents facteurs sur le comportement des cellules au cours de ce processus est étudiée *in vitro* grâce à un système de culture cellulaire particulier appelé chambre de Boyden, schématisé sur la figure 9, et dont le principe d'utilisation est décrit ci-après.

Dans l'expérience témoin, 10^5 cellules en suspension dans du milieu nutritif A sont déposées dans une cupule dont le fond est constitué d'une membrane de polycarbonate non poreuse. La cupule est placée dans un puits de plastique contenant du milieu nutritif B (le puits ne contient pas de cellules). L'ensemble est incubé 6 heures à 37°C, puis les cellules qui adhèrent à la face supérieure de la membrane sont récupérées et dénombrées. Leur nombre est assimilé à la valeur 100%.

Dans l'expérience test, 10^5 cellules en suspension dans du milieu nutritif A sont déposées à l'intérieur d'une cupule dont le fond est constitué d'une membrane de polycarbonate poreuse (diamètre des pores $10\ \mu\text{m}$). La cupule est placée dans un puits contenant du milieu nutritif B (le puits ne contient pas de cellules). L'ensemble est incubé 6 heures à 37°C , puis les cellules qui adhèrent à la face supérieure de la membrane sont éliminées, tandis que celles qui adhèrent à la face inférieure de la membrane sont dénombrées. Leur nombre est exprimé en pourcentage du nombre total de cellules qui adhèrent à la membrane à la fin de l'expérience test.

N. B. (i) Dans l'expérience test, afin de rendre possible l'observation et le dénombrement des cellules qui adhèrent à la face inférieure de la membrane, il est nécessaire de procéder à l'élimination des cellules présentes sur sa face supérieure, ce qui est incompatible avec le dénombrement de la totalité des cellules.

(ii) Pendant la durée de l'expérience test, certains facteurs peuvent diffuser à travers la membrane entre les milieux A et B, sans toutefois que les milieux s'homogénéisent complètement.

Question 9 : Pourquoi trouve-t-on des cellules sur la face inférieure de la membrane de la cupule à l'issue de l'expérience test ? Pourquoi choisit-on, comme référence 100%, le nombre de cellules obtenu à l'issue de l'expérience témoin et non le nombre de cellules déposées dans la cupule au début de l'expérience test ?

On étudie le comportement en chambre de Boyden de fibroblastes provenant d'une souris sauvage (WT) ou d'une souris transgénique chez laquelle les deux allèles du gène de la vimentine ont été invalidés ($\text{Vim}^{-/-}$). L'expérience témoin et l'expérience test sont effectuées sur chacun des deux types cellulaires dans trois conditions différentes : [1] milieu B = milieu A (contrôle) ; [2] milieu B = milieu A + fibronectine (FN) ; [3] milieu B = milieu A + facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, *platelet-derived growth factor*).

L'expérience témoin est également réalisée dans les mêmes conditions. On constate que la présence de fibronectine ou de PDGF n'a aucune influence sur le nombre de cellules obtenu à l'issue de l'expérience témoin. Le pourcentage de cellules retrouvées sur la face inférieure de la membrane de la cupule dans chaque expérience test est indiqué sur le graphe de la figure 10.

Question 10 : Interprétez ces résultats, en précisant les effets respectifs de la fibronectine, du PDGF et de l'invalidation du gène de la vimentine sur le comportement des fibroblastes en chambre de Boyden.

Les cellules humaines de cancer du sein MCF7, issues d'une tumeur peu agressive, et MDA, issues d'une tumeur hautement agressive, sont étudiées. Les deux types cellulaires possèdent des filaments intermédiaires constitués de kératine, mais les cellules MDA expriment également la vimentine.

Des cellules MCF7 ou MDA sont introduites en quantités identiques dans les cupules de chambres de Boyden déposées dans des puits. Le même milieu nutritif est placé dans les deux compartiments. Les cellules présentes sur la face inférieure de la membrane poreuse après 6 heures d'incubation à 37°C sont dénombrées. Les valeurs obtenues sont exprimées en pourcentage du nombre total de cellules déterminé dans une expérience témoin comme décrit précédemment. Les résultats obtenus sont consignés sur le graphe de la figure 11 (MCF7, MDA). Dans les mêmes conditions sont analysées des cellules MCF7 dans lesquelles a été introduit un plasmide permettant l'expression constitutive de la vimentine (MCF7-VIM), avec comme contrôle des cellules MCF7 dans lesquelles a été introduit un plasmide similaire, mais permettant l'expression constitutive de la β -galactosidase (MCF7-GAL).

Question 11 : Comparez le comportement en chambre de Boyden des cellules MCF7, MDA, MCF7-GAL et MCF7-VIM. Que pouvez-vous en déduire concernant la vimentine ?

L'expérience est complétée par l'analyse du comportement en chambre de Boyden, dans les mêmes conditions, de cellules MDA dans lesquelles ont été introduites de courtes molécules d'ADN antisens qui inhibent spécifiquement la traduction de l'ARNm de la vimentine (figure 11 ; cellules MDA-AS). Une expérience de contrôle est réalisée avec des cellules MDA dans lesquelles ont été introduites de courtes molécules d'ADN de séquences aléatoires (cellules MDA-C).

Question 12 : Comparez le comportement des cellules MCF7, MDA, MDA-C et MDA-AS. Qu'apporte cette expérience par rapport à la précédente ?

B-4. Dans le noyau des cellules eucaryotes, les précurseurs des ARNm s'associent à diverses protéines – parmi lesquelles figure la protéine S1 étudiée ci-après – pour former des particules ribonucléoprotéiques (RNP, *ribonucleoprotein particle*). Après maturation, ces ARNm sont transportés dans le cytoplasme, toujours sous la forme de RNP. Certaines des protéines présentes dans les RNP nucléaires restent associées à l'ARN lors de son passage dans le cytoplasme, d'autres s'en dissocient et restent dans le noyau. Enfin, des protéines dont la localisation est exclusivement cytoplasmique se lient à l'ARNm à sa sortie du noyau.

Une expérience de réparation de blessure en culture cellulaire *in vitro* telle que celles décrites au paragraphe B-1 est réalisée sur des cellules épithéliales ARL de foie de rat. 30 heures après la création d'une lésion dans le tapis cellulaire, les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées à l'aide de deux anticorps fluorescents, l'un dirigé contre la protéine S1 et couplé à la fluorescéine, l'autre dirigé contre la vimentine et couplé à la rhodamine. Les cellules situées à proximité de la position initiale du bord de la lésion sont observées au microscope à fluorescence à l'aide de filtres qui permettent de détecter soit la fluorescéine (figure 12, A, B), soit la rhodamine (figure 12, C).

Question 13 : Comparez le marquage des cellules au sein du tapis cellulaire confluent et au sein de la lésion en cours de réparation. En vous aidant des conclusions que vous avez tirées des expériences précédentes, que pouvez-vous en déduire concernant la localisation subcellulaire de la protéine S1 ?

Afin de préciser les observations faites sur les cellules ARL, un double marquage, par l'anticorps anti-S1 couplé à la fluorescéine et par l'anticorps anti-vimentine couplé à la rhodamine, est effectué sur des fibroblastes de souris sauvage (WT ; figure 13, A et B) et sur des fibroblastes provenant d'une souris transgénique chez laquelle les deux allèles du gène de la vimentine ont été invalidés ($Vim^{-/-}$; figure 13, C et D). Les cellules sont observées au microscope à fluorescence à l'aide de filtres permettant de détecter soit la fluorescéine (figure 13, A et C), soit la rhodamine (figure 13, B et D).

Question 14 : Décrivez les observations faites sur les fibroblastes de souris. Quelles précisions permettent-elles d'apporter aux conclusions tirées de l'expérience sur les cellules ARL ?

Une expérience de réparation de blessure en culture cellulaire telle que celles décrites au paragraphe B-1 est réalisée sur des cellules ARL. 30 heures après la création de la lésion, la totalité des cellules est récoltée et les protéines totales en sont extraites. Celles-ci sont ensuite dosées et réparties en quatre fractions identiques.

La première fraction est incubée en présence d'un anticorps de souris qui reconnaît spécifiquement la vimentine et fixé de façon covalente à la surface de microbilles d'agarose.

Les microbilles sont séparées du mélange par centrifugation, lavées, et les protéines qui leur sont associées sont éluées. Ces protéines constituent la préparation n°1.

La deuxième fraction est traitée de façon similaire, mais l'anticorps anti-vimentine est remplacé par un anticorps de souris qui reconnaît spécifiquement la protéine S1 (préparation n°2).

La troisième fraction est traitée comme la première, mais l'anticorps anti-vimentine est remplacé par un anticorps de souris témoin ne reconnaissant ni S1 ni la vimentine (préparation n°3).

La quatrième fraction est traitée comme la première, mais l'incubation s'effectue avec des microbilles d'agarose sans anticorps (préparation n°4).

Les protéines des quatre préparations sont dénaturées puis soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les protéines présentes dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après saturation, la membrane est incubée en présence d'un anticorps de lapin dirigé contre la vimentine, puis lavée. Elle est ensuite incubée en présence d'un anticorps reconnaissant les immunoglobulines de lapin couplé à la phosphatase alcaline. Après lavage, la membrane est incubée en présence d'un substrat de la phosphatase alcaline. Le produit de la réaction enzymatique se décompose en émettant de la lumière que l'on détecte à la surface de la membrane par exposition au contact d'un film photosensible. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 14.

Question 15 : Faites un schéma qui récapitule les traitements subis par la deuxième fraction protéique, puis analysez et interprétez les résultats de l'immunodétection présentés sur la figure 14.

Question 16 : Quel rôle la protéine S1 pourrait-elle jouer dans le contrôle de la traduction des ARNm lors de la réparation d'une blessure en culture cellulaire in vitro (on considérera que, dans le cytoplasme des cellules, la protéine S1 n'existe pas sous forme libre mais qu'elle est exclusivement localisée au sein de RNP) ?

Question 17 : Qu'apporte l'ensemble de cette étude (questions 1 à 16) à la compréhension des mécanismes impliqués dans la transition épithélium-mésenchyme ?

Partie C : deuxième sujet avec documents

N. B. Les parties C-1 et C-2 peuvent être traitées indépendamment l'une de l'autre.

C-1. Une suspension de globules rouges est divisée en trois lots identiques maintenus à 37°C dans du milieu de culture. On admettra que la concentration cellulaire ne varie pas au cours de l'expérience.

Au temps $t = 0$, de la tyrosine radioactive ($[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$) est ajoutée au premier lot et une quantité équivalente de tyrosine non marquée est ajoutée au deuxième lot. **Au temps $t = 1$ heure,** les trois lots de cellules sont placés sur la glace, et la même quantité de $[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$ que précédemment est ajoutée au troisième lot. Les cellules des trois lots sont immédiatement lavées par du milieu de culture froid sans tyrosine puis lysées par traitement aux ultrasons. Les extraits acellulaires sont aspirés au travers de filtres retenant de manière spécifique les protéines (les acides aminés libres ne sont pas retenus). La radioactivité associée à chacun des filtres est comptée (tableau 1).

lot de cellules n°	1	2	3
filtre n°	1	2	3
radioactivité mesurée	94230	102	193

Question 18 : Expliquez à quoi correspond, pour chacun des filtres, la radioactivité mesurée. Interprétez les résultats obtenus et formulez des hypothèses.

Une suspension de globules rouges, maintenus à 37°C dans du milieu de culture, est préalablement incubée pendant 30 minutes en présence de cycloheximide, une molécule capable de pénétrer dans les cellules et d'inhiber la traduction ; la cycloheximide est maintenue ensuite pendant toute la durée de l'expérience.

Au temps $t = 0$, de la tyrosine radioactive ($[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$) est ajoutée aux globules rouges, et à différents temps, des fractions de la suspension cellulaire (de volume constant) sont prélevées et placées immédiatement dans la glace. A partir de chacune des fractions, un extrait acellulaire est préparé et filtré comme précédemment. L'évolution de la radioactivité en fonction du temps est représentée sur la figure 15a.

Question 19 : Interprétez les résultats obtenus et concluez.

Des globules rouges sont lysés comme précédemment ; après centrifugation différentielle, le surnageant, correspondant à un extrait protéique noté Ep, est collecté et réparti en deux fractions identiques (notées Ep1 et Ep2) qui sont incubées à 37°C et traitées en parallèle.

Au temps $t = 0$, de la tyrosine radioactive ($[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$) est ajoutée à Ep1 ; la même quantité de $[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$ et de l'adénosine triphosphate (ATP) sont ajoutées à Ep2. A différents temps, des fractions (de volume constant) sont prélevées et immédiatement filtrées comme précédemment. L'évolution de la radioactivité en fonction du temps est représentée sur la figure 15b.

Question 20 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

Un nouvel extrait protéique Ep est préparé comme indiqué précédemment. Il est incubé pendant 60 minutes à 37°C en présence de $[^{14}\text{C}]\text{Tyr}$ et d'ATP, puis les protéines qu'il contient

sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. L'image obtenue après révélation du gel au bleu de Coomassie, un colorant présentant une très forte affinité pour les protéines, est présentée sur la figure 16a. L'image obtenue après autoradiographie du même gel est présentée sur la figure 16b.

Question 21 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

C-2. Deux anticorps dirigés contre la tubuline α ($T\alpha$) ont été obtenus :

- AC_1 est dirigé contre l'oligopeptide MRECISIHVGQA correspondant aux 12 résidus N-terminaux de la $T\alpha$ porcine ;
- AC_2 est dirigé contre l'oligopeptide VEGEGEEEGEEY correspondant aux 12 résidus C-terminaux de la $T\alpha$ porcine.

La figure 17 rappelle les formules semi-développées des acides aminés correspondants.

L'anticorps AC_1 est utilisé pour purifier $T\alpha$. Un extrait protéique, préparé à partir de cerveau de porc, est mis en contact avec une résine constituée de billes d'agarose couplées de manière covalente à AC_1 . La résine est tout d'abord lavée par un tampon dont la concentration en chlorure de potassium est modérée (100 mM). Les protéines retenues sur la résine sont ensuite éluées par un tampon contenant une forte concentration en chlorure de potassium (800 mM). Les fractions d'éluion contenant une concentration protéique élevée sont rassemblées puis dialysées extensivement contre un tampon dont la concentration en chlorure de potassium est égale à 100 mM ; on appelle « $FT\alpha$ » la fraction ainsi obtenue. L'analyse du contenu protéique de $FT\alpha$ par électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'une coloration au bleu de Coomassie révèle une bande unique ; la masse de la protéine correspondante est celle attendue pour $T\alpha$.

Question 22 : Expliquez le principe d'une dialyse.

La carboxypeptidase A (CPA) est une protéase pancréatique hydrolysant la dernière liaison peptidique d'une protéine (considérée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale), si et seulement si le résidu C-terminal est aromatique.

La fraction $FT\alpha$, traitée ou non par la CPA, est déposée sur une colonne chromatographique remplie de billes de résine couplées de manière covalente à AC_2 (qu'on appellera dans la suite du texte « colonne d' AC_2 »). La colonne est lavée par un tampon dont la concentration saline est modérée (100 mM KCl), de manière à récolter les protéines non retenues ; elle est ensuite perfusée par un tampon comportant une forte concentration saline (800 mM KCl), de manière à éluer les protéines retenues.

Dès le dépôt de $FT\alpha$ à l'entrée de la colonne, des fractions de volume constant sont collectées en sortie de colonne ; la concentration protéique de chaque fraction est ensuite déterminée. Le résultat des dosages, présenté sous la forme d'histogrammes, est donné sur la figure 18 (histogrammes H1 et H2).

Question 23 : Indiquez quel est l'intérêt de l'étape de dialyse ; précisez le contenu des différentes fractions d'éluion correspondant à l'histogramme H1.

Question 24 : Quelle information cette expérience apporte-t-elle sur la spécificité de l'anticorps AC_2 ?

Question 25 : Quelles hypothèses pouvez-vous avancer pour expliquer la présence de protéines dans les fractions 2 à 6 de l'histogramme H1 ?

Les fractions 2 à 6 collectées lors de la chromatographie de FT α (sans traitement préalable par la CPA, cf. histogramme H1) sont rassemblées ; elles sont à nouveau analysées par chromatographie sur une colonne d'AC₂, dans les mêmes conditions que précédemment (figure 18, histogramme H3).

Question 26 : Quelle conclusion pouvez-vous tirer de cette expérience ?

Les fractions 2 à 6 collectées lors de la chromatographie précédente (cf. histogramme H3) sont rassemblées, additionnées d'ATP et de tyrosine puis divisées en deux échantillons identiques (E₁ et E₂) ; une protéine X purifiée est ajoutée à E₂. Un troisième échantillon (E₃) contenant la protéine X, l'ATP et la tyrosine (aux mêmes concentrations que dans E₂) est également préparé. Les trois échantillons sont incubés pendant 1 heure à 37°C puis les protéines qu'ils contiennent sont analysées, comme précédemment, par chromatographie sur colonne d'AC₂ (figure 19, histogrammes H4, H5 et H6).

Question 27 : Analysez les histogrammes obtenus ; quelle propriété de la protéine X pouvez-vous en déduire ?

Même lorsque les concentrations en ATP, protéine X et tyrosine sont augmentées de manière significative, la quantité de protéines collectées dans les fractions 2 à 6 (cf. histogramme H5) n'est pas modifiée.

Question 28 : Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour rendre compte de cette observation ?

Les fractions 2 à 6 collectées après traitement par la protéine X (cf. histogramme H5) sont rassemblées ; après une nouvelle incubation en présence du mélange (X + ATP + tyrosine), les protéines sont analysées par chromatographie sur colonne d'AC₂ (figure 19, histogramme H7).

Question 29 : Quelle conclusion pouvez-vous tirer de cette expérience ?

La protéine X et les dimères formés par la tubuline α et la tubuline β (T β) ont été purifiés à partir de cerveau de porc. Afin de caractériser le mécanisme d'action de la protéine X, on analyse les contacts établis, en l'absence d'ATP, entre X et les protéines T α et T β . Pour cela, on incube les protéines (dans différentes combinaisons précisées dans la légende de la figure 20) en l'absence ou en présence de diméthylpimélimidate (DMP), un réactif bifonctionnel capable d'établir un lien covalent entre deux chaînes latérales de résidus lysines en contact l'un avec l'autre (c'est-à-dire distants de moins de 1 nm). Dans les conditions expérimentales utilisées, il n'est pas possible d'établir de lien covalent entre T α et T β .

Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse, dans des conditions dénaturantes qui préservent les ponts covalents ; la mobilité électrophorétique est d'autant plus faible que la taille des protéines est élevée. Les protéines présentes dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose, puis révélées par incubations successives avec différents anticorps (comme indiqué dans la légende de la figure 20).

La figure 20a présente le résultat obtenu lorsqu'on utilise pour la révélation un anticorps dirigé contre la protéine X.

Question 30 : Analysez et interprétez les résultats présentés sur la figure 20a. Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour expliquer la présence de la bande (4) ?

Les figures 20b et 20c présentent les résultats obtenus lorsque la même membrane est ensuite analysée par des anticorps dirigés contre T α puis par des anticorps dirigés contre T β .

Question 31 : Quelle est l'identité de la protéine présente dans la bande (4) ?

Question 32 : Quelle conclusion pouvez-vous en tirer concernant l'interaction de la protéine X avec les dimères T α -T β ? Illustrez votre réponse à l'aide d'un schéma.

Les fractions 8 à 12 obtenues lors de la première chromatographie de FT α sur colonne d'AC₂ (cf. histogramme H1) sont rassemblées, dialysées extensivement contre un tampon contenant du chlorure de potassium en concentration modérée (100 mM), puis divisées en deux échantillons identiques (E₄ et E₅) ; une protéine Z purifiée est ajoutée à E₅. Un troisième échantillon (E₆) contenant la protéine Z, à la même concentration que dans E₅, est également préparé. Les trois échantillons sont incubés pendant 1 heure à 37°C puis les protéines qu'ils contiennent sont analysées, comme précédemment, par chromatographie sur colonne d'AC₂ (figure 21, histogrammes H8, H9 et H10).

Question 33 : Analysez les histogrammes H8 à H10. Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour expliquer l'effet exercé par la protéine Z ?

Les fractions 2 à 6 collectées lors de l'expérience précédente (cf. histogramme H9) sont rassemblées, incubées en présence de tyrosine, d'ATP et de protéine X, puis analysées par chromatographie sur colonne d'AC₂ (figure 21, histogramme H11).

Question 34 : Quelle conclusion pouvez-vous tirer de cette expérience ?

Question 35 : Résumez vos conclusions en indiquant précisément quelles sont les différentes formes de T α mises en évidence ; à l'aide d'un schéma, précisez leurs devenir et origines possibles.

Question 36 : A la lumière de ces données, comment pourriez-vous expliquer le résultat présenté dans la figure 16 ? Proposez une expérience simple permettant de vérifier votre hypothèse.

Les gènes codant les T α humaine et porcine ont été isolés et leurs séquences nucléotidiques ont été déterminées ; les séquences protéiques déduites sont présentées sur la figure 22.

Question 37 : Comparez ces deux protéines ; quelle hypothèse pouvez-vous émettre quant aux propriétés de la T α humaine ?

Question 38 : Selon vous, les anticorps utilisés lors de cette étude pourraient-ils être des outils d'analyse de la T α humaine ? Quelle démarche expérimentale pourriez-vous imaginer pour étudier chez l'Homme les phénomènes révélés par la présente étude ?

Des cellules tumorales ont été prélevées sur 134 patientes atteintes d'un cancer du sein. Les analyses effectuées sont présentées dans le tableau 2 page 12.

Préalablement à la biopsie, la taille de la tumeur a été déterminée puis le pronostic de gravité a été estimé par le calcul de l'indice SBR (Scarf Bloom Richardson). Ce paramètre, dont le mode de calcul ne sera pas explicité, prend notamment en compte l'indice mitotique et l'état de différenciation des cellules. Les indices SBR1, SBR2 et SBR3 indiquent respectivement un pronostic favorable, un mauvais pronostic, et un pronostic léthal.

Pour chaque tumeur, on a également déterminé l'intensité de marquage des cellules à l'aide de deux anticorps (AC₃ et AC₄). AC₃ reconnaît T α complète, mais pas T α dépourvue de tyrosine C-terminale ; inversement, AC₄ reconnaît T α dépourvue de tyrosine C-terminale, mais pas T α complète. Des cellules non tumorales sont fortement marquées par l'anticorps AC₃ et très faiblement marquées par l'anticorps AC₄.

Les tumeurs ont été classées en trois catégories (comme indiqué dans le tableau 2, troisième ligne) :

- la catégorie A correspond à des cellules fortement marquées (+++) par l'anticorps AC₃ et très faiblement marquées (-) par l'anticorps AC₄ ;
- la catégorie B correspond à des cellules moyennement marquées (+) par l'anticorps AC₃ et moyennement marquées (+) par l'anticorps AC₄ ;
- la catégorie C correspond à des cellules très faiblement marquées (-) par l'anticorps AC₃ et fortement marquées (+++) par l'anticorps AC₄.

Tableau 2. Les nombres entiers indiquent le nombre de patientes, les nombres décimaux entre parenthèses indiquent le pourcentage de tumeurs de types A, B ou C dans chacune des populations considérées.				
catégorie de tumeur :		A	B	C
marquage des cellules	par AC₃ :	+++	+	-
	par AC₄ :	-	+	+++
ensemble des patientes :		63 (47,0)	45 (33,6)	26 (19,4)
âge	< 45 ans :	13 (46,4)	11 (39,3)	4 (14,3)
	> 45 ans :	50 (47,2)	34 (32,1)	22 (20,7)
taille de la tumeur	< 40 mm :	35 (52,2)	20 (29,9)	12 (17,9)
	> 40 mm :	28 (41,8)	25 (37,3)	14 (20,9)
indice SBR	SBR1 :	11 (68,8)	4 (25,0)	1 (6,2)
	SBR2 :	37 (56,0)	21 (31,9)	8 (12,1)
	SBR3 :	15 (28,8)	20 (38,5)	17 (32,7)

Question 39 : *Quelle forme de Tα prédomine dans les cellules correspondant à chaque catégorie de tumeur A, B et C ? En considérant le schéma élaboré à la question 35, imaginez quelles dérégulations pourraient conduire à l'apparition des cellules des catégories B et C.*

Question 40 : *Analysez et interprétez les résultats obtenus en considérant successivement l'âge de la personne, la taille de la tumeur et l'indice de pronostic.*

Question 41 : *D'après vous, le pronostic d'un cancer du sein pourrait-il être évalué par l'analyse de la Tα des cellules tumorales ?*