

Sélection Internationale ENS Ulm 2012, Biologie cellulaire

S'il vous plaît lisez l'ensemble du sujet avant de commencer. Les questions 1-8 et 12-14 sont des questions de biologie générale. Dans les questions 9, 10, 11 et 15, nous vous demandons d'interpréter les données des figures qui l'accompagnent.

Partie 1. La différenciation cellulaire en général (mammifères)

Au cours des stades très précoces de l'embryogenèse, les cellules totipotentes donnent lieu à trois couches de tissus primaires (aussi appelés feuillets embryonnaires primaires) qui vont se développer et former tous les tissus et organes du corps. **Q1, Q2**

À des stades ultérieurs du développement, les cellules progénitrices pluripotentes peuvent se différencier en un nombre limité de lignées cellulaires. Si ces cellules progénitrices sont isolées à partir de l'embryon et cultivées in vitro dans le laboratoire, dans des conditions spécifiques les différentes étapes de la différenciation peuvent être récapitulées expérimentalement. Pour induire expérimentalement la différenciation de cellules progénitrices dans des lignées cellulaires définies, des facteurs de croissance spécifiques et diffusibles ont été largement utilisés dans les cultures cellulaires in vitro. Toutefois, d'autres éléments environnementaux pourraient également être impliqués dans le processus de différenciation. Pour cette raison, le rôle de la matrice extracellulaire et la nature du support sur lequel les cellules sont cultivées ont été explorées. **Q3, Q4**

Les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire via des protéines trans-membranaires "récepteur" situées sur la surface de la cellule et nommées intégrines. **Q5.** Les intégrines servent de médiateurs des signaux entrants dans les cellules, et les voies de signalisation par elles activées produiront une réponse adaptative de la cellule. Le résultat final sont des variations des forces d'adhésion de la cellule à la matrice.

La paxilline est une protéine intracellulaire qui s'associe avec l'intégrine dans des complexes sousmembranaires appelés adhésions focales. Dans l'expérience suivante, la paxilline a été détectée par l'utilisation d'un anticorps spécifique. Elle a ensuite été révélée par un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente verte, nommée FITC. **Q6, Q7** La paxilline a été détectée par cette technique dans trois conditions différentes de culture cellulaire (Figure.1, A, B, C). L'utilisation de l'agent intercalant DAPI dans cette procédure permet l'identification des noyaux des cellules en bleu. Le support sur lequel les cellules ont été

cultivées est incolore (et apparaît comme un fond noir). Toutes les images ont été prises avec le même grossissement et les mêmes conditions d'exposition. **Q8, Q9**

Partie 2. La différenciation cellulaire, le rôle de la rigidité de la matrice

(Adapté de Engler et al., 2006)

Une façon d'explorer le rôle de la matrice extracellulaire sur la différenciation est de modifier la rigidité du support sur lequel les cellules progénitrices sont cultivées. Dans un article publié par Engler et ses collègues en 2006 dans la revue *Cell*, les auteurs ont imité l'élasticité de la matrice in vitro avec des gels inertes de polyacrylamide. Dans ces gels, la réticulation est donnée par la concentration de bis-acrylamide et définit l'élasticité (réticulation légère = matrice flexible; réticulation dense = matrice rigide). Les propriétés adhésives de la matrice sont données par le revêtement des gels avec du collagène (tous les gels, quelle que soit leur élasticité).

Ainsi, des boîtes de Pétri ont été préparés avec des gels d'élasticité différente, recouverts de collagène et les cellules souches pluripotentes mésenchymateuses (CSM) ont été isolés à partir d'embryons jeunes et cultivées pendant plusieurs jours dans ces boîtes. La figure 2 représente le dispositif expérimental et les résultats obtenus dans trois gammes d'élasticité de la matrice testée. **Q10**

Afin d'identifier les types cellulaires, la détection de protéines spécifiques de chaque type cellulaire par des anticorps a été effectuée. Les anticorps primaires ont été révélés avec un anticorps secondaire couplé au FITC (figure 3). Trois protéines ont été étudiées: la tubuline b3, MyoD et CBFa1. Dans cette figure, les images dans les deuxième et troisième lignes ont été prises avec le même grossissement, mais les images de la ligne 1 ont été prises à un grossissement beaucoup plus faible (voir barres d'échelle). **Q11**

Les mêmes anticorps primaires ont été utilisés pour détecter les protéines dans des Western Blot obtenus à partir des cultures aux conditions d'élasticité différentes (figure 4). La condition GL correspond à «verre», c'est à dire, des cellules cultivées sur du verre recouvert de collagène. **Q12, Q13, Q14**

Le tableau 1 montre les niveaux relatifs d'un certain nombre de protéines (autres que la tubuline b3, MyoD et CBFa1) étudiées dans les différentes conditions expérimentales par Western Blot. **Q15**

QUESTIONS

Question 1: qu'est-ce qu'une cellule totipotente?

Question 2: quels sont les noms des trois couches primaires de tissus?

Question 3: Qu'est-ce que «in vitro» signifie? Même question pour «in vivo», «in silico», «in situ» et «in utero.».

Question 4: qu'est-ce que la matrice extracellulaire? Citez 4 de ses composantes majeures.

Question 5: représentez schématiquement le trafic intracellulaire d'une protéine telle que l'intégrine, entre le moment où elle a été traduite, et le moment où elle atteint son emplacement final.

Question 6: s'il vous plaît faites un dessin de la procédure expérimentale. Quel est le nom de cette technique?

Question 7: citez des protéines fluorescentes qui peuvent être utilisés comme marqueurs en biologie moléculaire

Question 8: qu'est-ce qu'un agent intercalant, comme le DAPI?

Question 9: quelles sont les différences dans l'intensité de la fluorescence? Quelle est votre conclusion concernant A, B et C?

Question 10: qu'est-ce que vous observez? Que pouvez-vous conclure de cette expérience, au point de 96 heures?

Question 11: interprétez la figure 3.

Question 12: décrivez brièvement la technique de Western Blot.

Question 13: qu'est-ce que l'actine (en une phrase)? Pourquoi mesurer l'actine dans cette expérience?

Question 14: que pouvons-nous apprendre de la condition GL?

Question 15: Considérant les figures de 1 à 4, le tableau 1 et vos connaissances scientifiques, faites une hypothèse sur la nature des trois types cellulaires qui ont été caractérisés.

figures

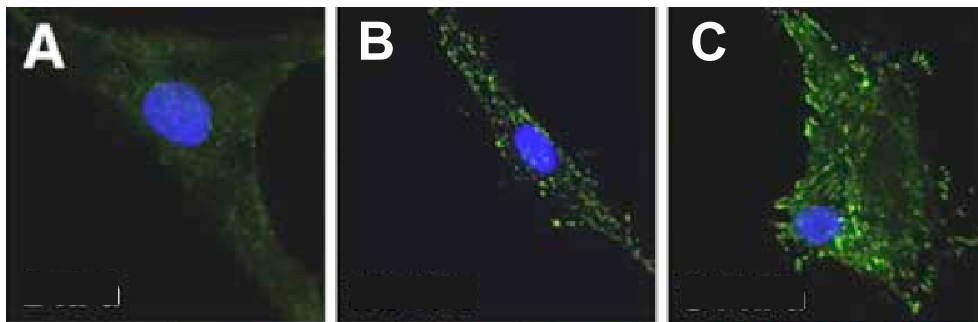


Figure 1

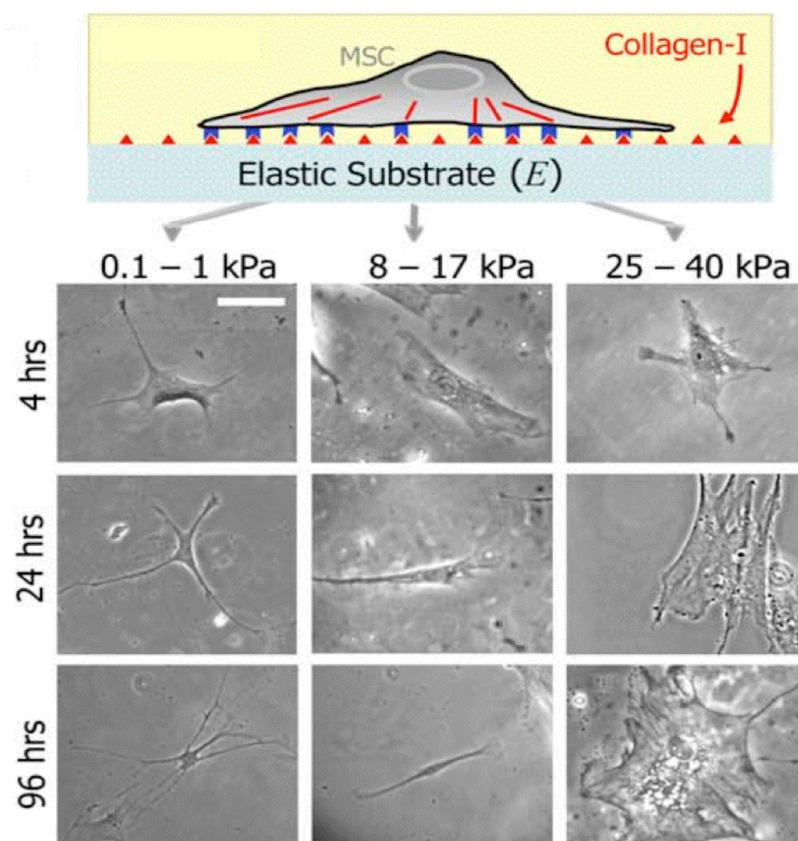


Figure 2

Barre d'échelle = 20 μm

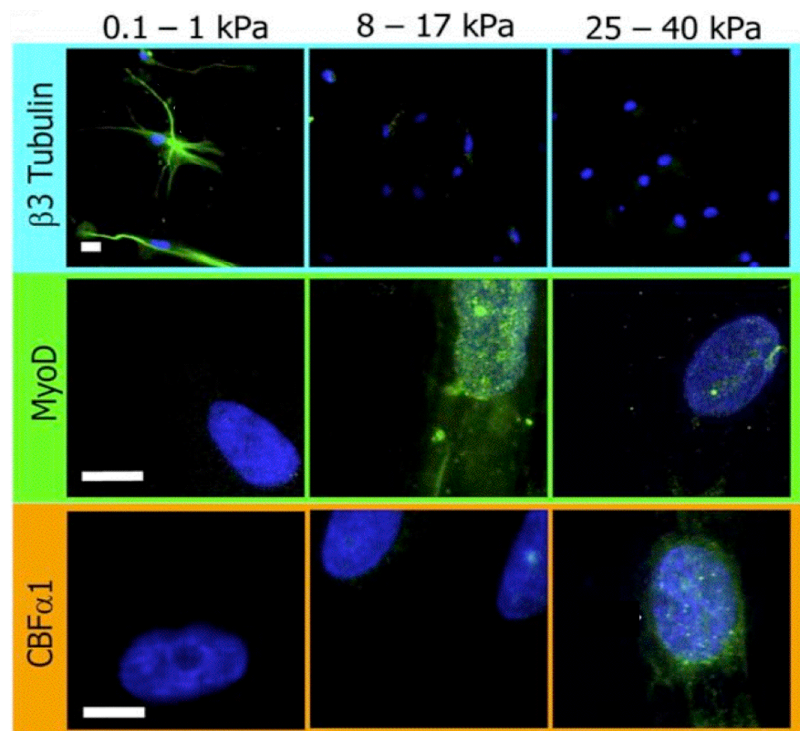


Figure 3

Barre d'échelle = 5 μm

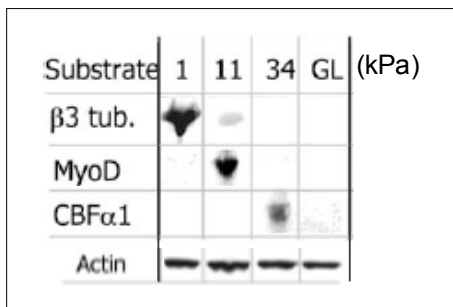


Figure 4

Gene Description	Symbol	0.1 kPa MSC	1 kPa MSC	11 kPa MSC	34 kPa MSC
Microtubule-Assoc Prot. Tau	MAPT	5.56	7.63	3.70	1.51
Nerve Growth Factor Beta	NGF	4.48	4.46	2.33	1.75
Neuregulin 1	NRG1	4.38	4.67	2.97	1.58
Neural CAM 1	NCAM1	7.57	4.55	2.58	2.45
Twist Homolog 2	TWIST2	1.95	1.96	4.94	5.53
Osteopontin	SPP1	1.25	0.83	1.91	2.61
SMAD, Mothers Against DPP 1	SMAD1	1.74	2.39	3.26	7.23
Myogenic Factor 6	MYF6	2.26	3.50	7.02	2.33
Mvostatin	GDF8	3.94	3.21	6.09	2.02
Desmin	DES	2.18	2.34	5.13	2.03

Table I