

PACES - 2010/2011

U.E. 2

***Faculté de Médecine
Lyon-Est***

Jeudi 16 Décembre 2010

Epreuve de

BIOLOGIE CELLULAIRE

Durée : 45 min

RECOMMANDATIONS

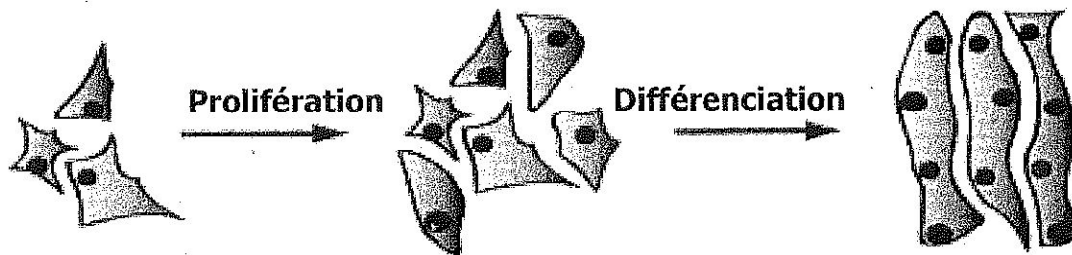
**Vous vérifiez que a) votre nom figure sur la grille de réponses et
b) votre livret contient les questions numérotées
de 1 à 9 et comporte 7 Figures.**

RAPPELS

- 1- Vous répondez aux questions en cochant de 0 à 5 cases sur la grille de réponse.**
- 2- L'usage de la machine à calculer est formellement interdit.**

Les lignées cellulaires issues respectivement de muscle de souris (lignée C2) et de rat (lignée L6) sont les modèles *in vitro* les plus utilisés pour l'étude de la myogenèse. Les travaux fondés sur ces cellules ont apporté de très nombreuses informations sur le déroulement de la myogenèse et le rôle des facteurs de transcription myogéniques (FTM) tels que MyoD, Myf-5, Myogénine et Mrf4 dans ce processus.

Les cellules L6 sont des cellules myoblastiques ; en prolifération, elles ressemblent à des fibroblastes. Dans certaines conditions de culture, les cellules L6 sont capables de se différencier en cellules musculaires ; elles fusionnent et forment des myotubes.



Avant d'entreprendre des expériences visant à analyser les mécanismes de contrôle de la différenciation myogénique, vous faites le point sur votre savoir sur les cellules musculaires.

QUESTION 1 : Avec laquelle ou lesquelles des propositions suivantes, êtes-vous d'accord ?

- A- Les cellules musculaires sont des syncytia.**
- B- Dans les cellules musculaires squelettiques, les microfilaments ont une longueur d'environ 5 μm .**
- C- Le phénomène de contraction musculaire est dépendant du déplacement de la Myosine de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des filaments d'Actine.**
- D- La formation des filaments de Myosine à double polarité requiert la déphosphorylation des chaînes lourdes de la Myosine.**
- E- La tropomyosine est un exemple de protéine de réticulation des microfilaments.**

EXPERIENCE 1

Des cellules L6 sontensemencées à raison de 5 000 cellules/cm² ; elles adhèrent très rapidement (en moins d'une heure) à la boîte de culture. Elles sont mises en culture dans un milieu complet (Milieu de prolifération ou **MP**), riche en glucose (4500 mg/l) et contenant 10%

de sérum de veau foetal. On procède à des passages (subcultures) tous les 4 jours, lorsque les cellules sont à confluence (80 000 cellules/cm²).

Pour obtenir la différenciation en myotubes, les cellules L6 cultivées en MP et arrivant à 80% de la confluence, sont lavées et ensuite cultivées dans le même milieu mais en absence de sérum (Milieu de différenciation ou **MD**) pendant des temps variables (1 à 10 jours).

Phase 1- Après 3 jours de culture en MP (Figure 1- A et C) ou 5 jours en MD (Figure 1- B et D), les cellules L6 sont soumises aux traitements nécessaires pour une coloration histologique des noyaux (Figure 1- A et B) ou pour réaliser les étapes d'immunomarquage avec des anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de Myosine (MHC) (Figure 1- C et D)

Phase 2- Des cellules L6 sont cultivées en **MP** en normoxie (20% O₂) ou hypoxie (1% O₂) pendant 48hr entre le Jour 1 et le Jour 3 de culture et des cellules L6 cultivées en **MD** en normoxie pendant 3 jours sont collectées par traitement ménagé à la trypsine et fixées avec du formaldéhyde. Après incubation avec de l'iodure de Propidium, les cellules sont soumises à des analyses du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Les résultats sont rapportés sur la Figure 2- A. Ils représentent la moyenne et l'écart type des mesures effectuées sur 5 cultures distinctes.

Phase 3- Des cellules L6 cultivées en **MD** en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 4 jours sont observées par microscopie à contraste de phase (Figure 2-B) et sont ensuite collectées pour être lysées. Le lysat cellulaire est analysé par Western Blot avec des Anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de Myosine (MHC) ou contre MyoD ou contre la tubuline. Le lysat de cellules cultivées en **MP** en normoxie pendant 3 jours est analysé en même temps.

QUESTION 2 : A propos des conditions expérimentales utilisées dans l'expérience 1, identifiez la ou les proposition(s) juste(s), s'il y en a ?

- A- Le milieu de culture contient du glucose à une concentration de 10mM.**
- B- Les cellules L6 présentées dans la Figure 1 (C et D) ont été perméabilisées.**
- C- Les cellules L6 ont un temps de doublement de population de plus de 48 hr.**
- D- Dans les cellules L6 en MD, MyoD devrait avoir une localisation nucléaire.**
- E- Les cellules L6 sont cultivées dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.**

QUESTION 3 : Vous analysez les données des Figures 1 et 2, vous déduisez que :

- A- Les cellules L6 en cours de prolifération ne contiennent pas de Myosine.**
- B- Les cellules L6 expriment le gène MyoD qu'elles soient cultivées en MP ou MD.**
- C- L'hypoxie active la multiplication des cellules L6.**
- D- Les cellules L6 en cours de différenciation sont en phase G1 du cycle cellulaire.**
- E- La différenciation des cellules L6 est bloquée par l'hypoxie.**

On vous demande d'analyser les effets régulateurs d'une molécule de signalisation récemment identifiée : la Myostatine ou GDF8 qui est apparentée au TGF β .

Vous interrogez des banques de données; vous en tirez les informations de la Figure 3. Le gène *Myostatine* est composé de 3 exons ; l'ARNm mature a une taille de 3,1kb. La protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 375 acides aminés qui subit la coupure protéolytique du peptide signal de 23 résidus et une deuxième coupure après un doublet RR appartenant à la séquence RSRR pour générer la partie fonctionnelle C- terminale.

QUESTION 4 : Parmi les propositions suivantes, identifiez celle(s) qui est (sont) fausse(s) ?

- A- l'ARNm mature codant la Myostatine a une taille supérieure à celle de l'ensemble des régions introniques du gène *Myostatine*.**
- B- La Myostatine est constituée d'une chaîne polypeptidique d'environ 12 000Da.**
- C- Le précurseur protéique de la Myostatine doit être glycosylé sur l'A.A. 47.**
- D- Un polypeptide de 26-28 kDa devrait être co-sécrété avec la Myostatine.**
- E- La structure de la Myostatine pourrait mettre en jeu des pont(s) S-S.**

EXPERIENCE 2

Des cellules L6 sont cultivées en condition **MP** pendant 3 jours en absence (Témoin) ou en présence de Myostatine et sont traitées comme dans la phase 2 de l'expérience 1 pour analyse par cytométrie en flux (Figure 4A) ou sont collectées pour des études de leur contenu en protéines par Western Blot avec des anticorps dirigés contre MyoD, Myf-5, myogénine, MHC et tubuline (Figure 4C). Des cellules L6 sont cultivées en condition **MD** pendant 5 jours en absence (Témoin) ou en présence de Myostatine et sont soumises à une coloration pour observation morphologique (Figure 4B) ou sont collectées pour des études de leur contenu en protéines par Western Blot avec les anticorps mentionnés ci-dessus (Figure 4C).

QUESTION 5 : Vous analysez les résultats de la Figure 4 et vous en déduisez que :

- A- La Myostatine induit l'apoptose des cellules L6.**
- B- La fusion des myoblastes est bloquée par la Myostatine.**
- C- La Myostatine régule négativement l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des myoblastes**
- D- La différenciation myogénique est associée à l'expression de la Myogénine.**
- E- Le facteur de transcription Myf-5 ne paraît pas avoir de rôle actif dans la différenciation myogénique.**

Vous vous interrogez sur la nature du signal ou des signaux qui en condition de culture MD déclenchent les phénomènes tout à fait exceptionnels aboutissant à la génération de cellules musculaires. Après discussion avec des spécialistes de la physiopathologie musculaire, vous tentez d'identifier des molécules de type facteurs de croissance ou cytokines qui pourraient être produites par les cellules myoblastiques placées en milieu sans sérum. En consultant la littérature scientifique pertinente, différents candidats se dégagent et parmi ceux-ci : les neurégulines (NRG), polypeptides d'environ 20kDa. Vous décidez de tester l'hypothèse en essayant de savoir si les cellules L6 expriment des récepteurs aux NRG et si des NRG sont présentes dans le milieu de culture (MD) des cellules L6.

EXPERIENCE 3

Phase 1- Des cellules L6 cultivées en MP ou en MD depuis 2 jours sont incubées pendant 4 h en condition standard (Témoin) ou en présence de Neuréguline 1 (NRG1) ou Neuréguline 2 (NRG2). Les cellules sont collectées, lysées et les lysats cellulaires sont soumis à un procédé d'immunoprécipitation par des anticorps dirigés contre le récepteur des NRG ou R (NRG). Le matériel immunoprécipité est analysé par Western Blot avec des anticorps dirigés contre le motif phospho-Tyrosine (p-Tyr) ou des anticorps anti-R(NRG). Les résultats sont rapportés sur la Figure 5A.

Phase 2- Des cellules L6 sont cultivées pendant 3 jours en condition MD. On rajoute dans le milieu de culture soit rien (Témoin) soit des Ig de lapin normal (non immunisé) (NRIg) soit des Ig de lapin appelées Ab2 ou Ab5 qui sont dirigées contre la partie commune aux différentes NRG. Au terme de la culture, les cellules sont, pour partie, collectées et utilisées pour déterminer leur état de différenciation par analyse de l'expression de la Myosine (MHC) par Western Blot (Figure 5B) et, pour partie, fixées et colorées pour déterminer la proportion de cellules qui a donné naissance à des myotubes (Figure 5C).

QUESTION 6 : Les données de la littérature et les données expérimentales (Figure 5A) indiquent que :

- A- Les récepteurs aux NRG sont des récepteurs membranaires.**
- B- Les cellules L6 cultivées en MP n'expriment pas de R (NRG).**
- C- Les R(NRG) sont déphosphorylés en réponse à la fixation du ligand.**
- D- En MD, les R(NRG) sont activés par NRG 1 et NRG 2.**
- E- Des molécules de type NRG pourraient être produites par les cellules L6 en MD**

QUESTION 7 : Vous analysez les résultats de l'expérience 3; ils montrent que :

- A- Les variations de synthèse de MHC sont en accord avec les variations du taux de fusion cellulaire.**
- B- Les anticorps Ab2 et Ab5 agissent vraisemblablement en bloquant l'activité fonctionnelle de NRG.**
- C- Des molécules de type NRG sont produites par les cellules L6 en cours de différenciation.**
- D- Les NRIg activent la différenciation des cellules L6.**
- E- La différenciation des cellules L6 en myotubes pourrait dépendre d'un phénomène de régulation autocrine.**

EXPERIENCE 4

Les milieux résultant de 4 ou 5 jours de culture de cellules L6 en MD, sont stockés afin de constituer une source de matériel pour extraire et purifier des molécules de type neurégulines, qui sont actives dans le processus de différenciation myogénique.

A partir du matériel en réserve, vous mettez en place un protocole de purification à plusieurs étapes comprenant la chromatographie d'échanges d'anions et la chromatographie d'exclusion-diffusion. Sur la base des données de l'expérience 3, vous mettez en place un test pour la détection et la mesure de l'activité biologique (activation de la fusion des myoblastes) des molécules à extraire, activité exprimée en unité arbitraire (U). Les résultats des mesures de quantité de protéines et d'activité biologique effectuées sur le matériel de départ et le matériel obtenu après les étapes 1 et 2, sont rapportés sur la Figure 6.

QUESTION 8 : Parmi les remarques ou conclusions suivantes, laquelle ou lesquelles vous paraissent justes ou appropriées ?

- A- Les molécules à purifier sont des protéines acides.**
- B- L'activité spécifique des molécules ciblées diminue au cours des étapes de purification.**
- C- En terme de purification, l'étape 1 est plus efficace que l'étape 2.**
- D- Après les 2 étapes, le rendement de la purification est inférieur à 50%.**
- E- Le degré de pureté des protéines issues des deux étapes de purification peut être estimé par western blot avec des anticorps anti-NRG**

Vous êtes satisfait du résultat; cependant, des étapes complémentaires s'imposent pour isoler et caractériser complètement les molécules actives.

Au cours des très nombreuses étapes de culture de cellules L6, vous avez observé des changements phénotypiques dans une série de boîtes. Vous générez de nouveaux clones de cellules L6 à partir de ces cellules et l'un d'entre eux (clone 12) présente des propriétés myogéniques particulières. Vous cherchez maintenant à caractériser ce clone en étudiant ses réponses à différentes molécules de signalisation dont un nonapeptide : l'arginine-vasopressine ou AVP.

EXPERIENCE 5

Phase 1. Des cellules L6-Cl12 sont cultivées en **MD**, dans les mêmes conditions que les cellules parentales (voir Expérience 1), en absence (Témoin) ou en présence d'AVP (1nM), TPA (10 μ M), Di-Butyryl-AMPc ou DB-AMPc (analogue de l'AMPc capable de pénétrer dans les cellules) (1mM), Rolipram ou Ro (inhibiteur de la phosphodiesterase de l'AMPc) (1 μ M) seul ou en combinaison comme indiqué au bas de la Figure 7A. Les cellules sont ensuite soumises aux traitements nécessaires pour une coloration histologique des noyaux afin d'estimer le proportion des cellules formant des myotubes. Les résultats sont rapportés sur la Figure 7A.

Phase 2. Des cellules L6-Cl12 cultivées en **MD** depuis 2 jours sont utilisées pour des mesures de concentration intracellulaire de Ca²⁺ en réponse à différentes conditions : addition de Ca²⁺ (pour obtenir la concentration finale indiquée), addition d'AVP, addition d'EGTA (un chélateur qui piège les ions Ca²⁺). Pour cela, les cellules sont lavées, pré-incubées dans un milieu sans sérum en présence d'une sonde « Calcium » fluorescente pendant 15 min et incubées dans les conditions rapportées sur la Figure 7B qui rapportent les variations de concentration intracellulaire de Ca²⁺ au cours du temps.

QUESTION 9 : D'après les données présentées sur la Figure 7, vous déduisez que :

- A- L'AVP doit stimuler la formation des myotubes via une protéine Gq.**
- B- L'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMPc se traduit par une augmentation de la fusion des myoblastes.**
- C- La différenciation des cellules L6Cl12 est activable via la protéine kinase C.**
- D- L'augmentation de la concentration de Ca intracellulaire en réponse à l'AVP dépend de l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique.**
- E- La cascade des phosphoinositides et la cascade de l'AMPc exercent des actions régulatrices opposées sur la différenciation myogénique.**

Figure 1

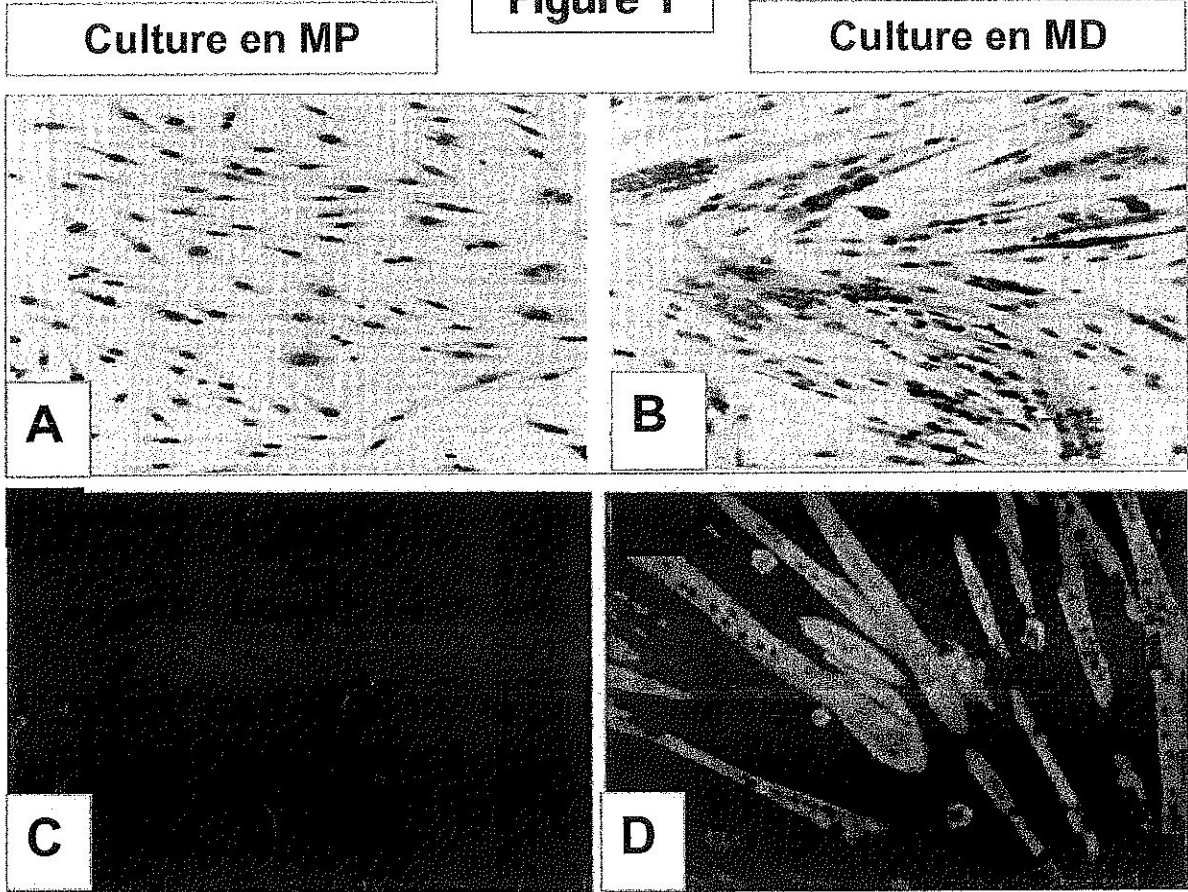


Figure 2

<i>Conditions</i>		<i>G1</i>	<i>S</i>	<i>G2/M</i>
A	MP normoxie	54 +/- 4	31 +/- 3	11 +/- 3
	MP hypoxie	70 +/- 5	19 +/- 3	9 +/- 2
	MD normoxie	88 +/- 4	4 +/- 3	7 +/- 3

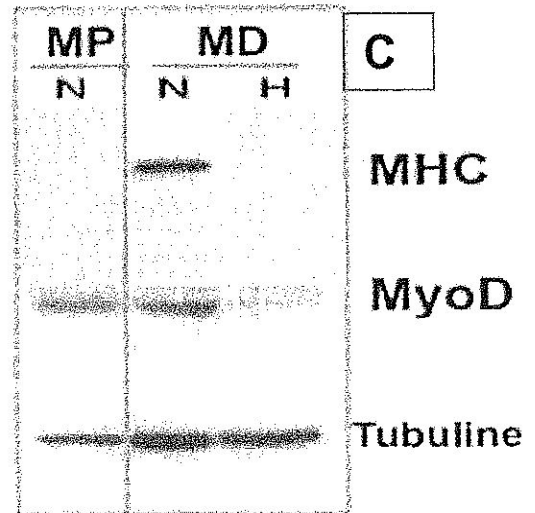
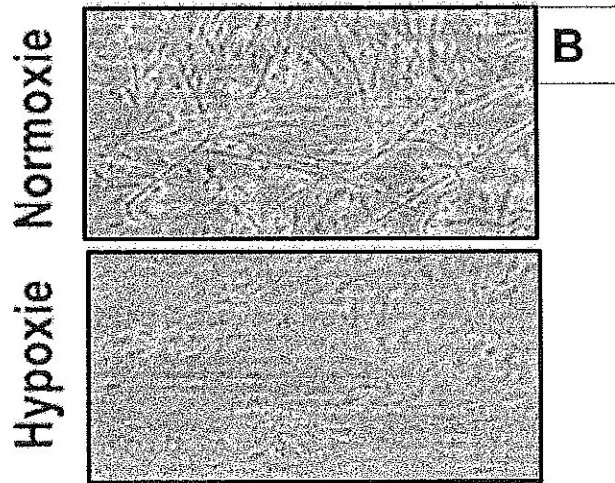
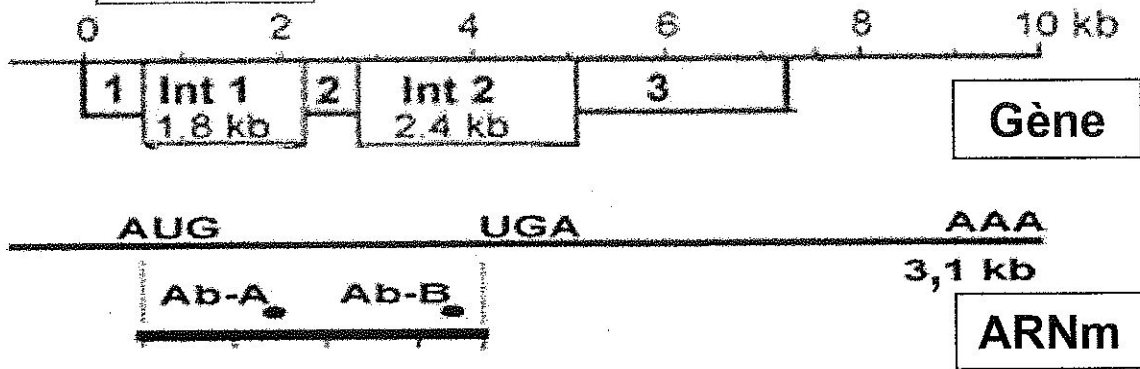


Figure 3



```

001 MQKLQLCVYI YLFMLIVAGP VDLNENSEQK ENVEKEGLCN ACTWRQNTKS
051 SRIEAIKIQI LSKLRLETAP NISKDVIRQL LPKAPPLREL IDQYDVQRDD
101 SSDGSLEDDD YHATTETIIT MPTESDFLMQ VDGKPKCCFF KFSSKIQYNK
151 VVKAQLWIYL RPYETPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMPNGT
201 GIWQSIDVKT VLQNWVKQPE SNLGIKIKAL DENGHD LAVT FPGPGEDGLN
251 PFLEVKVTDT PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA
301 PKRYKANYCS GECEFVFLQK YPHTHLVHQA NPRGSAGPCC TPTKMSPINM
351 LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS
    
```

Préproprotéine

Figure 4

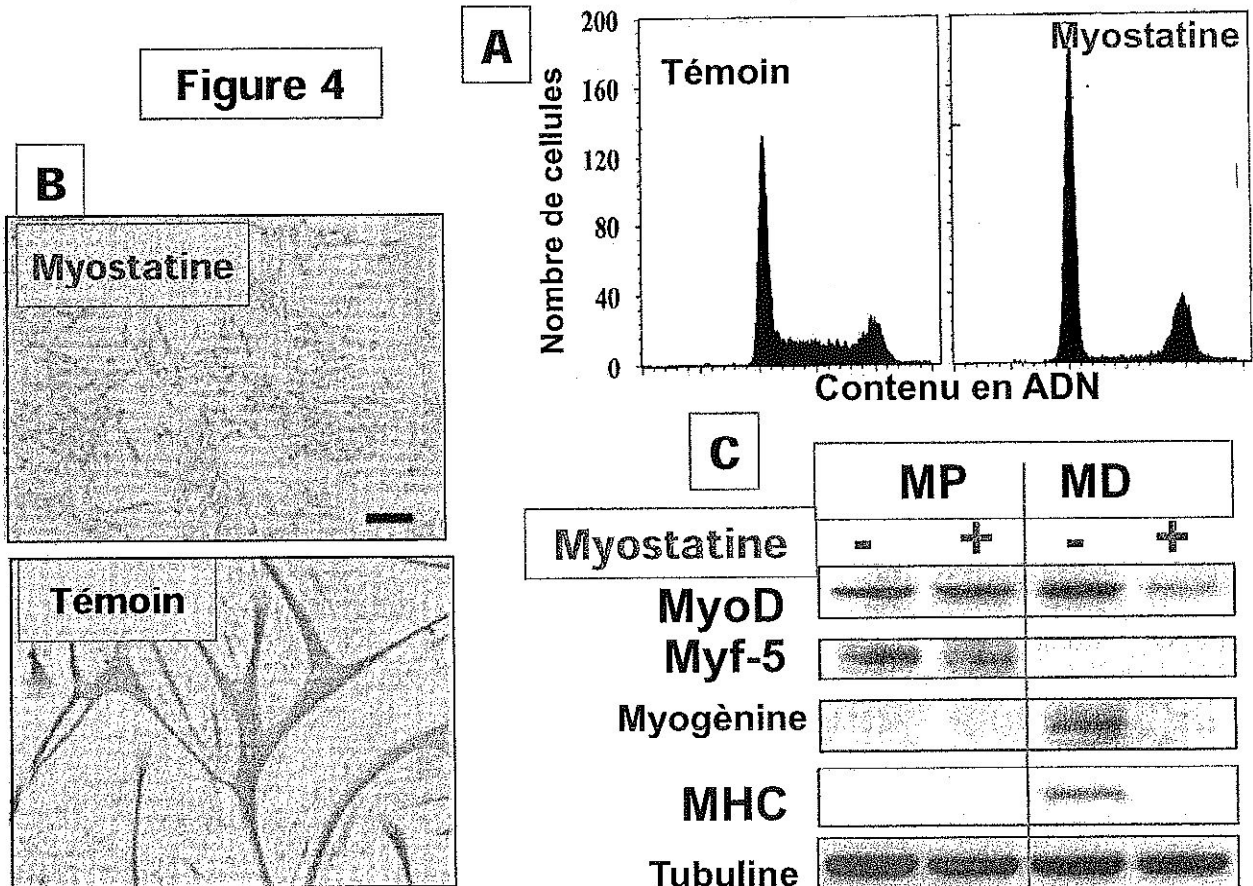


Figure 5

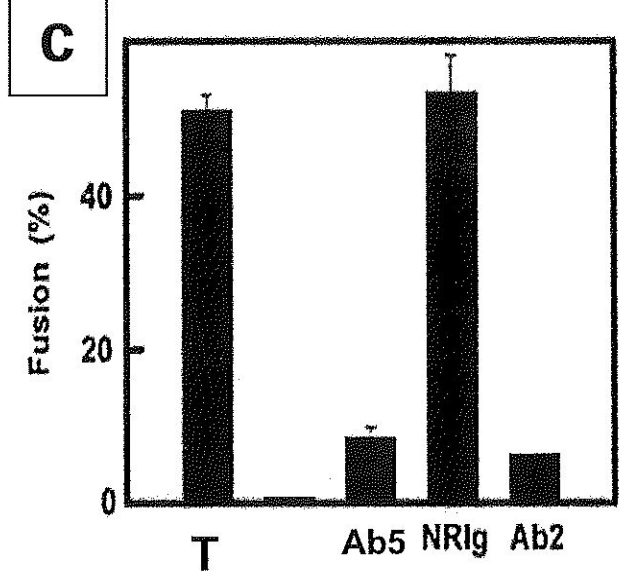
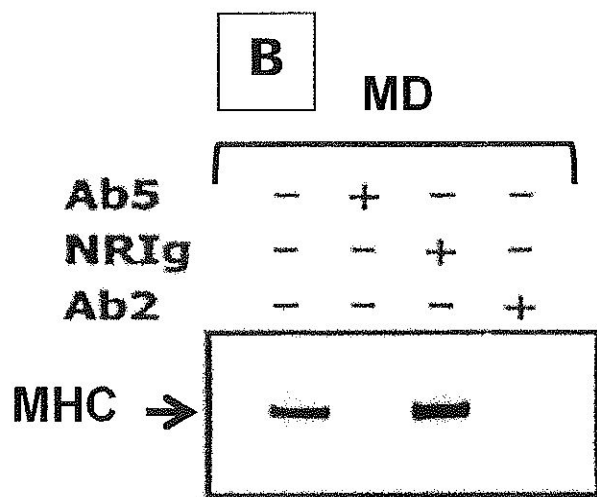
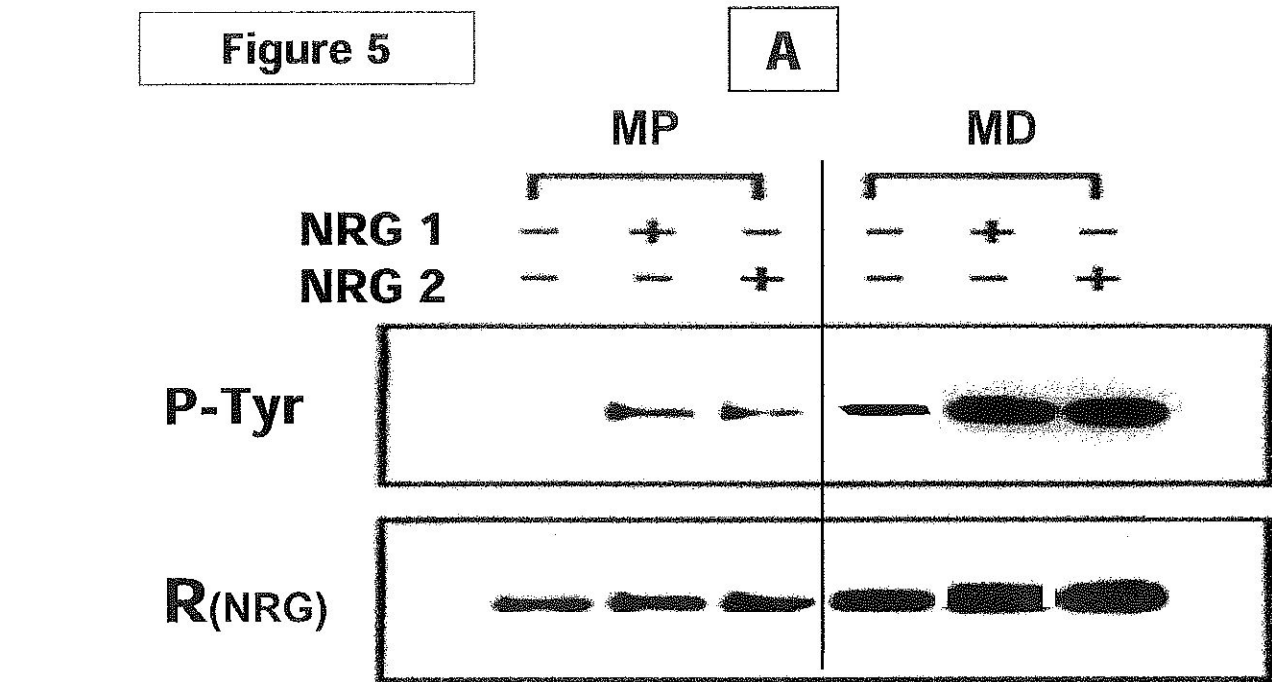


Figure 6

Etapes	Activité (U)	Quantité de protéines (mg)
Milieu de départ	780	260
Chromat. Ech. anions	640	20
Chromat. Excl- Diff.	490	0,70

Figure 7

