

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2023

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve.

Thème : les contacts cellulaires

Organisation de l'épreuve

L'épreuve est constituée de deux parties, qui peuvent être abordées dans l'ordre de votre choix mais doivent toutes deux être traitées. Pour ce faire, le temps à y consacrer est conseillé ci-dessous.

| Partie | Thème | Pages | Durée conseillée |
|--|-------------------------------------|-------|------------------|
| Partie I – Sujet de synthèse | Les contacts entre les cellules | 2 | 45min |
| Partie II – Sujet sur documents | Contact et prolifération cellulaire | 3 - 9 | 2h15 |

Les expériences présentées ont été reproduites plusieurs fois : les graphiques montrent la moyenne des résultats ainsi que l'écart-type sous forme de barres d'erreur. Les images et données brutes sont représentatives de l'ensemble des résultats obtenus.

Lors de l'évaluation, une importance particulière sera attachée à :

- la justification des raisonnements
- la clarté et la concision des réponses
- la qualité et la précision des illustrations
- l'orthographe, la grammaire et la présentation

Partie I – Sujet de synthèse

(45 min)

Les contacts entre les cellules.

Il est attendu un exposé structuré et illustré présentant la diversité structurale et fonctionnelle des contacts entre cellules, qui doivent être compris comme impliquant une interaction physique directe entre les composants des membranes cellulaires des deux cellules partenaires. Les concepts présentés devront autant que possible être introduits par des observations ou des mises en évidence expérimentales. La synthèse, d'une longueur maximum de 4 pages, comprendra une introduction et une conclusion.

Partie II – Sujet sur documents

(2h15 min)

La prolifération cellulaire et son contrôle jouent un rôle déterminant dans de multiples étapes de la physiologie d'un organisme animal (développement, renouvellement cellulaire, cicatrisation), et son dérèglement peut être impliqué dans le développement tumoral. On s'intéresse ici à quelques aspects de ce contrôle en liaison avec les contacts cellulaires.

A. Mise en évidence initiale

La culture de certaines cellules animales peut être réalisée sur le fond d'une boîte de Pétri, en présence d'un milieu nutritif liquide (figure 1). Lorsque de la désoxythymidine triphosphate (dTTP) tritiée (portant un hydrogène radioactif) est ajoutée au milieu de culture, les mesures suivantes peuvent être réalisées (figure 2) :

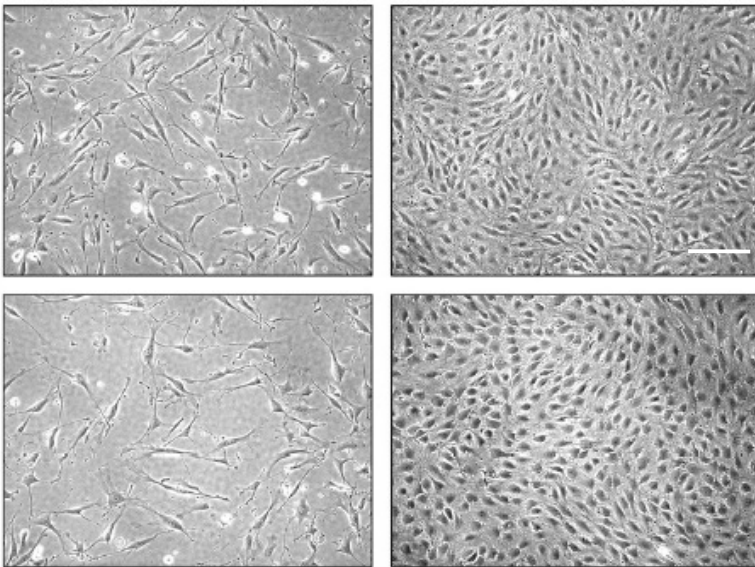


Figure 1 : observation de cellules animales en culture au microscope. En haut : cellules de peau de souris, en bas : cellules pulmonaires de souris. A gauche : après 2 jours de culture, à droite : après 7 jours de culture. La barre d'échelle, identique pour tous les panneaux, représente 50 μ m.

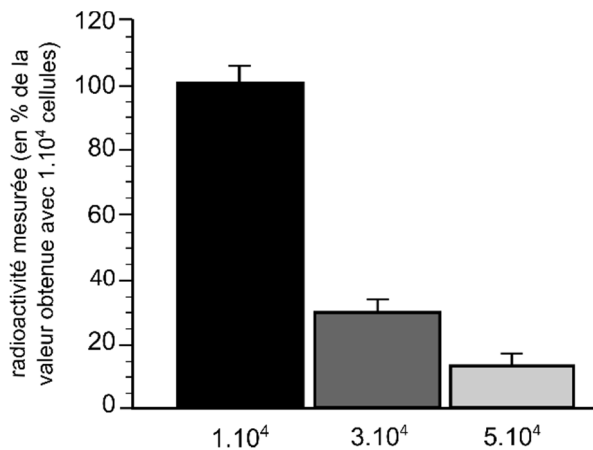


Figure 2 : mesure d'incorporation de désoxythymidine tritiée par des cellules en culture. Des fibroblastes issus de peau de souris (nombre de cellules par boîte indiqué en bas des histogrammes) ont étéensemencés dans de petites boîtes de culture et placés dans un milieu liquide contenant de la dTTP tritiée pendant 24h. Les cellules ont ensuite été lavées, récoltées, lysées et la radioactivité a été dosée. Le résultat de la mesure est exprimé en % de celle réalisée avec un ensemencement initial de 10⁴ cellules par boîte.

Question 1:

- Que permet de mesurer l'incorporation de désoxythymidine tritiée ?
- Décrivez les figures 1 et 2 et analysez les résultats présentés dans la figure 2. Quel phénomène est mis en évidence dans cette figure ? Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour l'expliquer ?
- Quelle image vous attendez-vous à observer si la culture présentée dans la figure 1 est maintenue pendant encore quelques jours, avec un renouvellement du milieu de culture ?

B. Rôle de la protéine YAP

Des chercheurs se sont intéressés à la protéine YAP (Yes-Associated Protein), cherchant à déterminer son rôle dans le mécanisme mis en évidence précédemment. Pour cela ils utilisent la technique d'immunofluorescence : des anticorps couplés à un fluorochrome (molécule fluorescente) permettent de détecter spécifiquement la protéine YAP dans des cellules en culture. Les images suivantes ont été obtenues :

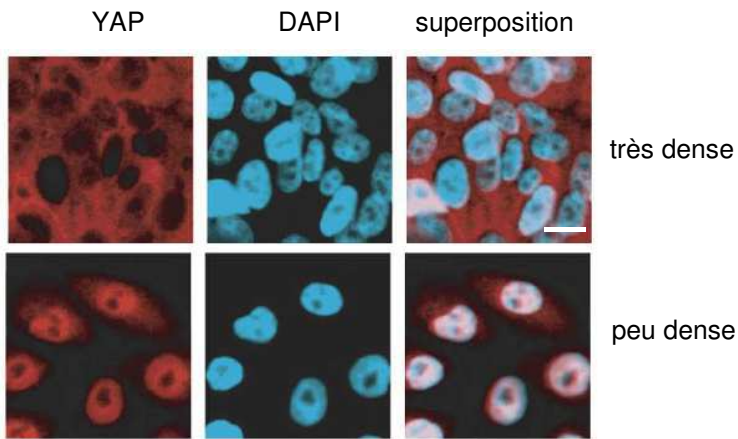


Figure 3 : détection de la protéine YAP dans des cellules en culture très dense et peu dense. La protéine YAP est détectée par immunofluorescence (signal rouge, panneaux de gauche) dans des cellules épithéliales mammaires de souris en culture. Un marquage de l'ADN total (DAPI, signal bleu, panneaux du milieu) et une superposition des deux signaux (à droite) sont également réalisés. La culture est soit très dense (panneaux du haut) soit peu dense (panneaux du bas). La barre d'échelle, identique pour tous les panneaux, représente 10µm.

Question 2 :

a- Décrivez et interprétez les résultats de la figure 3.

b- En vous rappelant dans quel compartiment cellulaire les protéines sont synthétisées, analysez le comportement de la protéine YAP en culture très dense puis en culture peu dense. Proposez une ou des hypothèse(s) pour l'expliquer. Connaissez-vous d'autres molécules capables de faire la même chose ?

Parallèlement à l'analyse en immunofluorescence, les chercheurs ont également extrait les protéines des cellules, les ont éventuellement traitées avec une protéine phosphatase (enzyme éliminant les groupements phosphate) et les ont fait migrer sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Ils ont ensuite réalisé un western-blot à l'aide d'un anticorps capable de détecter spécifiquement la protéine YAP. Les résultats suivants ont été obtenus :

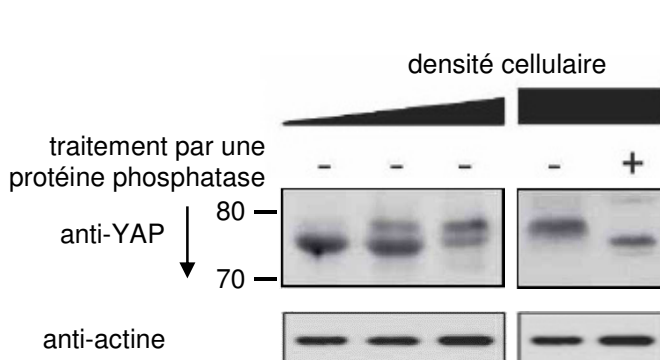


Figure 4 : analyse de la protéine YAP par western-blot en fonction de la densité cellulaire. Des cellules en culture à différentes densités (indiquées en haut de la figure) ont été récoltées et un extrait de leurs protéines totales a été réalisé. Cet extrait a été traité (+) ou non (-) par une protéine phosphatase, puis les protéines ont été mises à migrer sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Les protéines YAP (panneaux du haut) et actine (panneaux du bas) ont été détectées par western-blot. Pour les panneaux du haut, le sens de migration est indiqué par une flèche et les chiffres représentent les masses moléculaires de référence en kiloDaltons (kDa).

Question 3 :

Analysez les résultats présentés sur la figure 4.

Pour aller plus loin, les chercheurs ont mis la protéine YAP en présence d'une protéine kinase (enzyme pouvant rajouter des groupements phosphate sur les molécules), Lats2, connue pour faire partie d'une cascade de transduction de signaux intracellulaires (la voie Hippo). La protéine Lats2 sauvage ou présentant une déficience d'activité enzymatique (Lats-in) ont été purifiées, mises en contact avec la protéine YAP, puis le tout a été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. Les protéines YAP et Lats2 ont été détectées par western-blot comme dans la figure 4. Les résultats suivants ont été obtenus :

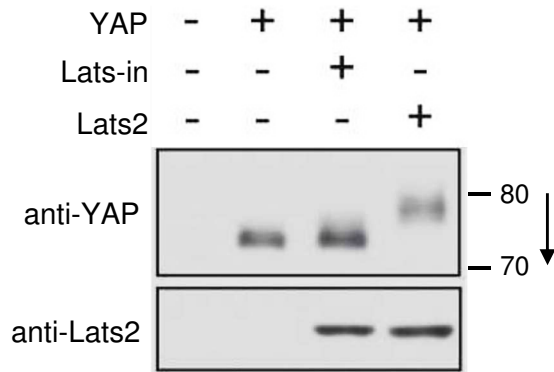


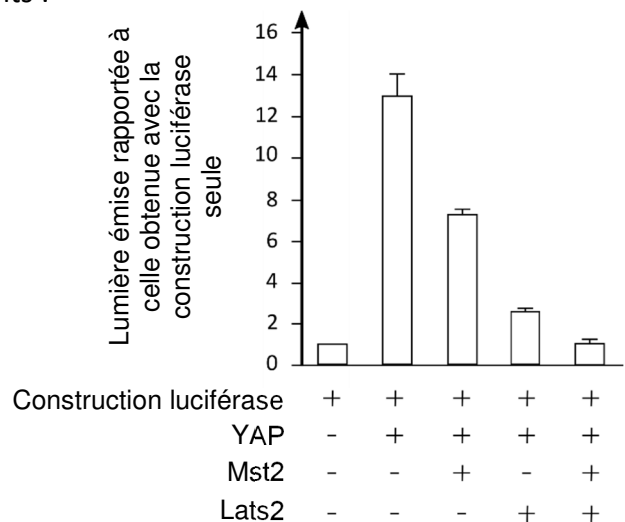
Figure 5 : effet de la protéine kinase Lats2 sur la protéine YAP. La protéine YAP a été incubée avec la protéine Last2 ou Last-in dans un tampon contenant de l'ATP, puis l'ensemble a été analysé par western-blot à l'aide d'anticorps anti-YAP et anti-Lats2. La présence ou l'absence des protéines utilisées est indiquée par un + ou un - en haut de chaque piste. Pour le panneau du haut, le sens de migration est indiqué par une flèche et les chiffres représentent les masses moléculaires de référence en kiloDaltons (kDa). Les anticorps utilisés sont indiqués sur la gauche de la figure.

Question 4 :

Analysez les résultats présentés dans la figure 5.

La voie Hippo implique, en plus de Lats2, une autre protéine kinase, Mst2. Cette voie est connue pour contrôler l'expression de certains gènes, dont le promoteur contient une séquence particulière. Cette séquence a été placée en 5' d'un gène codant pour la luciférase, protéine dont l'activité conduit à une émission de lumière. Cette construction a alors été introduite dans des cellules en culture peu dense, en même temps que d'autres constructions ADN permettant une expression abondante de YAP et/ou Mst2 et/ou Lats2. Le dosage de la lumière émise dans les différentes conditions montre les résultats suivants :

Figure 6 : émission de lumière par des cellules en culture dans différentes conditions. Les constructions ADN indiquées en bas à gauche de la figure ont été introduites (+) ou non (-) dans des cellules en culture. L'émission de lumière a été mesurée dans chaque condition dans un extrait de cellules après leur lyse. Les valeurs obtenues ont alors été divisées par celle mesurée en présence de la seule construction luciférase.

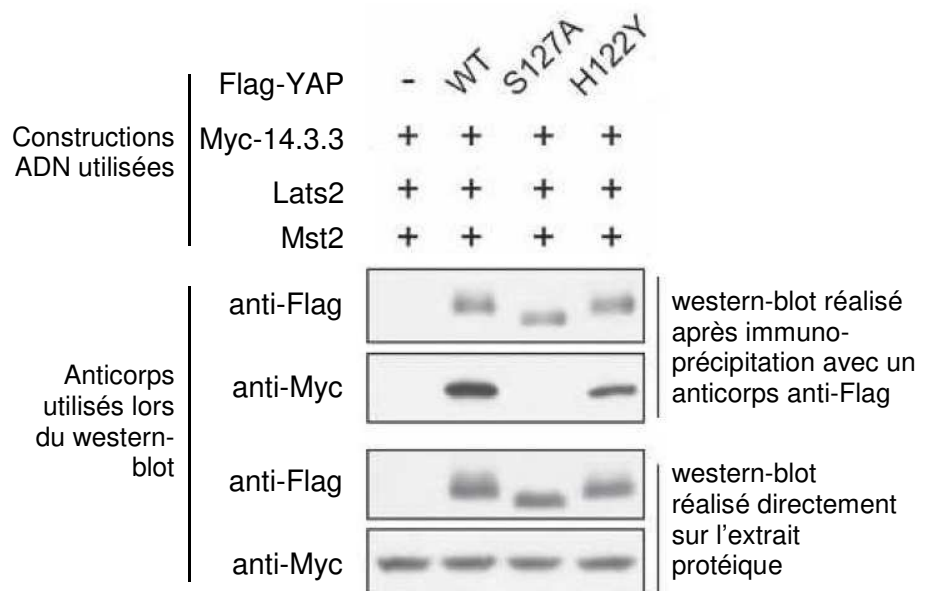


Question 5 :

- Représentez le protocole utilisé sur une figure. Comment peut-on qualifier ce type de construction ADN conduisant à l'émission de lumière ?
- D'après les données précédentes, quel(s) type(s) de gène(s) pourraient être contrôlés par la voie Hippo ?
- Analyser les résultats obtenus dans la figure 6.
- Pouvez-vous connaître les places respectives de Mst2 et de Lats2 dans cette voie de signalisation ? Proposez une expérience qui pourrait permettre de les déterminer.

Les chercheurs se sont ensuite intéressés à la protéine 14.3.3, une protéine cytosolique connue pour être impliquée dans diverses voies de transduction des signaux intracellulaires. Ils ont introduit dans des cellules en culture des constructions ADN permettant une expression de différentes protéines, éventuellement fusionnées à des peptides « étiquettes » (Flag- ou Myc-) leur permettant d'être distinguées des protéines endogènes et détectées par western-blot. Par ailleurs, ils utilisent trois sortes de protéines YAP : la protéine sauvage (WT) et deux protéines portant des acides aminés modifiés après mutation : S127A présente une alanine à la place de la sérine en position 127, et H122Y présente une tyrosine à la place de l'histidine en position 122. 48h après introduction des constructions ADN, les cellules ont atteint une densité élevée, elles sont alors lysées et les protéines sont extraites. Une partie de cet extrait est déposée sur gel pour réaliser un western-blot (figure 7, panneaux du bas), et une autre partie est utilisée pour réaliser une immuno-précipitation avec un anticorps spécifique de l'étiquette « Flag ». Cela consiste à incuber les protéines avec cet anticorps, puis à le faire précipiter, dans un tampon permettant de conserver les interactions moléculaires. Après lavage du précipité obtenu celui-ci est remis en solution et déposé sur gel pour réaliser un western-blot en conditions dénaturantes. Les résultats suivants ont été obtenus :

Figure 7 : analyse des relations entre YAP et d'autres protéines. Des constructions ADN permettant l'expression des protéines indiquées en haut à gauche de la figure ont été introduites dans des cellules en culture. Les extraits protéiques de ces cellules ont été soumis à des western-blot à l'aide des anticorps indiqués en bas à gauche de la figure avant (2 panneaux du bas) ou après (2 panneaux du haut) immuno-précipitation avec un anticorps anti-Flag.



Question 6 :

- Quelles pourraient être les conséquences théoriques des mutations utilisées ?
- Représentez sur une figure les grandes étapes du protocole utilisé dans cette expérience.
- Analysez les résultats obtenus dans la figure 7. Quel semble être l'effet de la mutation S127A ?
- En reprenant l'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici, commencez à représenter sur une figure les événements mis en évidence lors du phénomène étudié. Vous pourrez compléter cette figure par la suite (pensez à laisser de la place autour de votre figure dans ce but).

C. Effet de la cadhérine E

Des chercheurs ont fixé artificiellement différentes protéines à la surface de microbilles de polystyrène (de diamètre $<1\mu\text{m}$) : des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines membranaires HLA (impliquées dans la réponse immunitaire), ou la région extracellulaire de la cadhérine E (cadE-EC).

Une lignée cellulaire épithéliale, exprimant la cadhérine E, a été mise en culture à très faible densité, de façon à éviter tout contact entre les cellules. La culture a ensuite été entièrement

recouverte de microbilles de différents types. L'incorporation de BrdU, un analogue de la désoxythymidine pouvant être détecté grâce à un anticorps fluorescent, a été mesurée. Les résultats suivants ont été obtenus :

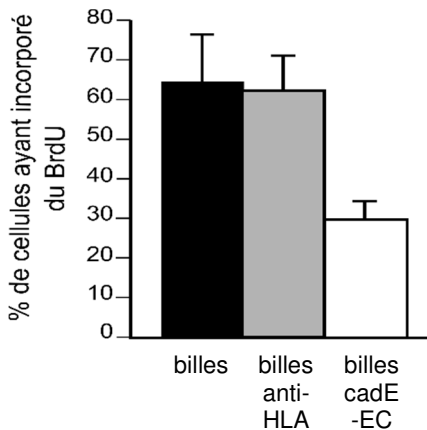


Figure 8 : incorporation de BrdU dans des cellules épithéliales en culture en présence de microbilles. Des microbilles seules (billes, barre noire) ou portant les protéines indiquées en bas des histogrammes (anticorps anti-HLA : barre grise ou le domaine extracellulaire de la cadhérine E, cadE-EC : barre blanche) ont été ajoutées à des cellules en culture peu dense pendant 48h. Le BrdU a alors été rajouté pendant 16h, puis les cellules ont été fixées et le BrdU détecté. Le pourcentage de cellules présentant un marquage au BrdU est indiqué.

Question 7 :

a- Que connaissez-vous des cadhérines ?

b- Interprétez les résultats présentés dans la figure 8. Avec quelle autre figure pouvez-vous les relier ?

Les chercheurs ont ensuite réutilisé le même protocole, mais en introduisant au préalable dans les cellules des constructions ADN permettant la production d'ARN interférents (siRNA), dirigés contre les ARNm de Lats2 ou de la β -caténine. En parallèle, ces constructions ont été introduites dans des cultures de différentes densités, et la localisation de la protéine YAP a été détectée par immunofluorescence. Les résultats suivants ont été obtenus :

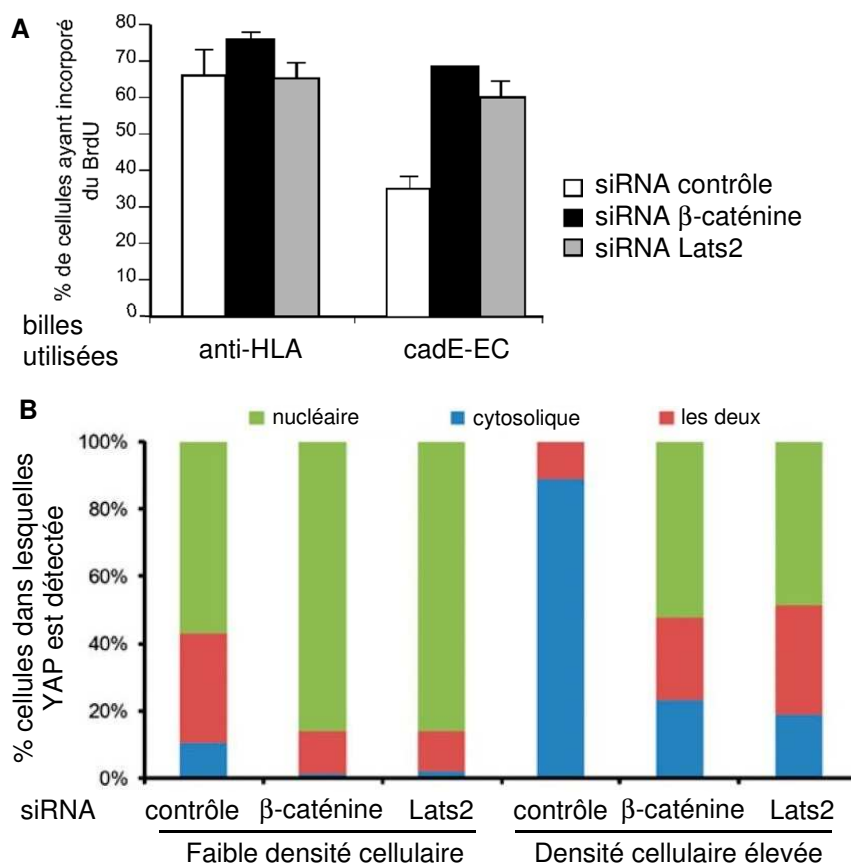


Figure 9 : effet de l'expression de siRNA sur l'incorporation de BrdU et la localisation de la protéine YAP :

A. La même expérience que celle décrite dans la figure 8 est réalisée, mais les cellules ont été traitées de façon à exprimer des siRNA dirigés contre un ARNm contrôle (barres blanches), celui de la β -caténine (barres noires) ou celui de Lats2 (barres grises).

B. Les mêmes constructions permettant l'expression des différents siRNA indiqués en bas de la figure ont été introduites dans les cellules qui ont ensuite été ensemencées à faible densité (partie gauche) ou à densité élevée (partie droite). La localisation de la protéine YAP a été détectée par immunofluorescence et est indiquée par les barres de couleur.

Question 8 :

a- Rappelez le principe de la technique d'interférence à ARN.

b- Sachant que la β -caténine est une protéine capable d'interagir avec le domaine intracellulaire des cadhérines et qui intervient dans les voies de transduction des signaux intracellulaires, interprétez les résultats présentés dans la figure 9.

D. Aspects mécaniques

Des chercheurs se sont demandé si d'autres facteurs pouvaient être impliqués dans le phénomène étudié. Pour cela ils ont construit un système permettant d'étirer des cellules épithéliales en culture dense (figure 10A), et utilisé ce dispositif pour effectuer différentes observations en immunofluorescence (figure 10B et 10C). Les résultats suivants ont été obtenus :

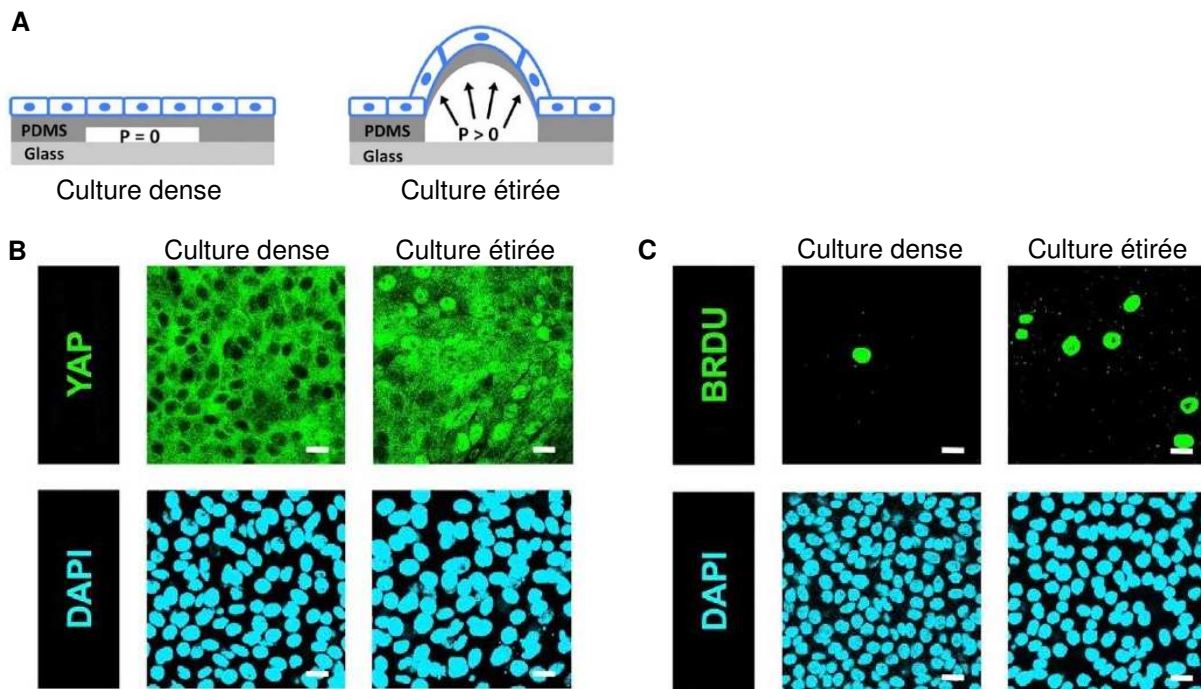


Figure 10 : effets des contraintes mécaniques sur une culture dense de cellules épithéliales.

A. Représentation schématique du dispositif utilisé. Des cellules épithéliales sont mises en culture à une densité élevée sur une lamelle de verre (« glass ») recouverte d'une membrane en silicone (« PDMS ») pouvant être étirée par insufflation contrôlée d'une solution saline (« P>0 ») sous la membrane. La membrane est préalablement couverte d'une protéine permettant une bonne adhésion des cellules.

B. Visualisation de la protéine YAP par immunofluorescence (en haut) et coloration de l'ADN (DAPI, en bas) dans des cellules denses non étirées (à gauche) et étirées (à droite). La barre d'échelle représente 20 μ m.

C. Visualisation de l'incorporation de BrdU (en haut) et coloration de l'ADN (DAPI, en bas) dans des cellules denses non étirées (à gauche) et étirées (à droite). La barre d'échelle représente 20 μ m.

Question 9 :

a- Quel(s) point(s) commun(s) et quelle(s) différence(s) voyez-vous entre ce modèle expérimental et celui développé dans la figure 8 ?

b- Quelle question se sont posée ces chercheurs et en quoi ce nouveau modèle pourrait-il leur donner une réponse ?

c- Quels sont les composants cellulaires qui pourraient répondre aux contraintes mécaniques exercées dans le dispositif décrit ?

d- Analysez les résultats présentés dans les panneaux 10B et C.

L'équipe de scientifiques s'est alors demandé si certaines protéines du cytosquelette pouvaient jouer un rôle dans le phénomène étudié. Pour cela, ils ont utilisé une stratégie

d'interférence à ARN dirigée contre trois d'entre elles, appartenant à la même famille fonctionnelle : CapZ, Cofiline et Gelsoline.

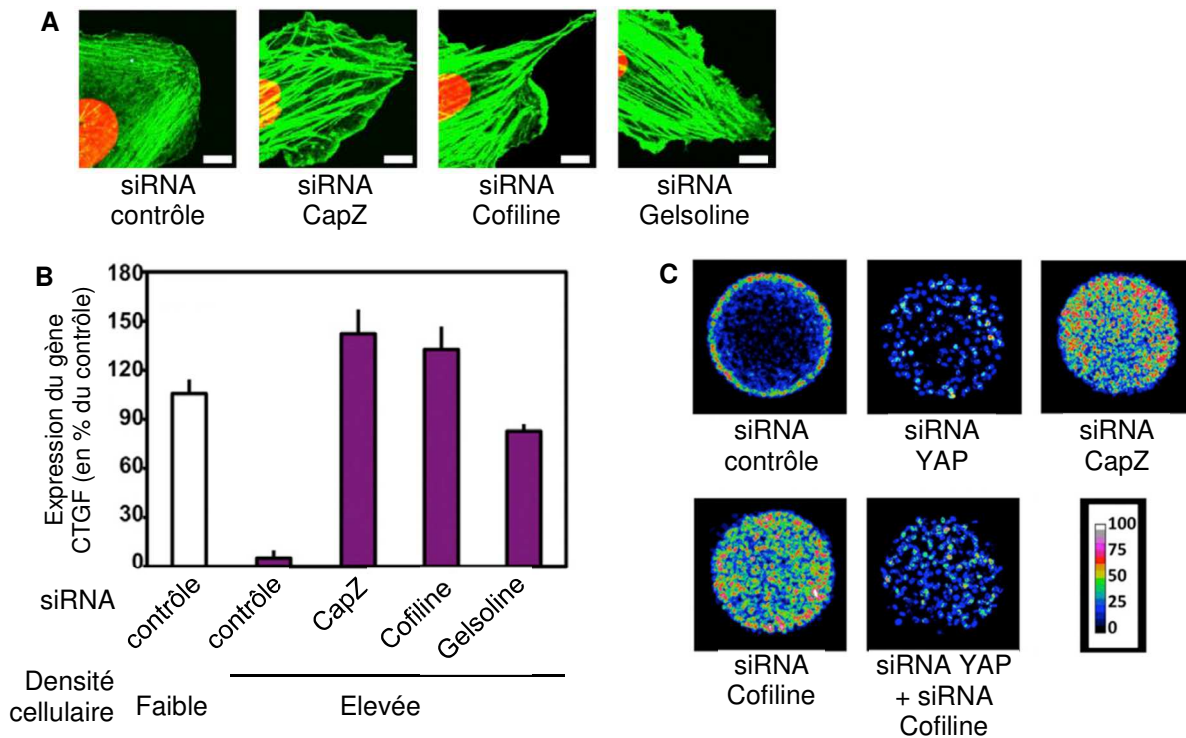


Figure 11 : effets d'ARN interférents dirigés contre les ARNm des protéines CapZ, Cofiline et Gelsoline.

A. Visualisation en immunofluorescence d'une cellule épithéliale isolée, dans laquelle ont été introduites des constructions ADN permettant l'expression de siRNA dirigés contre les ARNm des protéines CapZ, Cofiline et Gelsoline. Les filaments d'actine sont marqués en vert, et le noyau en rouge. La barre d'échelle représente 2µm.

B. Dosage de l'expression du gène CTGF, un gène cible de la voie Hippo, dans des cellules épithéliales en culture peu dense (barre blanche), et très dense (barres violettes), exprimant les différents siRNA indiqués en bas du panneau. Le taux d'expression est exprimé en % du niveau contrôle à faible densité.

C. Visualisation de l'incorporation de BrdU dans des colonies discoïdales (diamètre : 350µm) de cellules épithéliales exprimant les siRNA indiqués en-dessous de chaque panneau. Ces colonies sont obtenues en rendant le fond de la boîte de Pétri apte à la fixation des cellules uniquement sur une zone restreinte (un « îlot »), en forme de disque. Le niveau d'incorporation du BrdU est représenté en unités arbitraires selon une échelle de couleurs présentée en bas à droite du panneau.

Question 10 :

- En analysant la figure 11A, proposer un mode d'action pour les protéines CapZ, Cofiline et Gelsoline.
- Analysez les résultats présentés dans les panneaux 11B et 11C.

Question 11 :

En reprenant l'ensemble des résultats présentés, complétez la figure proposée dans la réponse à la question 6d en précisant le modèle représentant le phénomène étudié. Vous pourrez signaler les incertitudes par des « ? ».

Bibliographie :

Pour construire cet exercice, les auteurs se sont librement inspirés des références suivantes :

- Zhao et al., *Genes & Dev.* (2007), 21:2747–61
 Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011), 108 (29) : 11930-35
 Aragona et al., *Cell* (2013), 154 : 1047-59
 Perrais et al., *Mol. Biol. Cell.* (2007), 18 : 2013-25