

**ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES
ÉCOLE DES MINES DE PARIS
ÉCOLES CENTRALE**

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2026

**FILIÈRE BCPST
COMPOSITION DE BIOLOGIE**

Épreuve commune aux ENS de Lyon, Paris, Paris-Saclay, à l'ENPC, aux Écoles centrale et aux Mines Paris

Durée : 6 heures

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

Le sujet comporte 21 pages numérotées de 1 à 21.

Thème :

Les épithéliums

Organisation de l'épreuve

L'épreuve est constituée de **trois parties indépendantes**.

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

Partie	Thème		Durée conseillée
Partie A - Synthèse	<i>Les tissus épithéliaux des Métazoaires</i>	p3	2h
Partie B – Etude de documents	<i>Renouvellement de l'épithélium intestinal</i>	p4-12	2h15
Partie C – Etude de documents	<i>L'extravasation des cellules immunitaires</i>	p13-21	1h45

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

Lors de l'évaluation, les correctrices et les correcteurs attacheront une importance particulière 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 A – Synthèse

Les tissus épithéliaux des Métazoaires et leurs rôles au sein de l'organisme

NB : les endothéliums seront considérés comme des tissus épithéliaux particuliers.

Études de documents

Partie B - Renouvellement de l'épithélium intestinal

Parmi tous les épithéliums des Métazoaires, l'épithélium intestinal est celui qui est intégralement renouvelé le plus rapidement : tous les 3 à 5 jours pour l'intestin grêle, tous les 5 à 7 jours pour le côlon chez la souris. On réalise des coupes histologiques de l'intestin (figure 1).

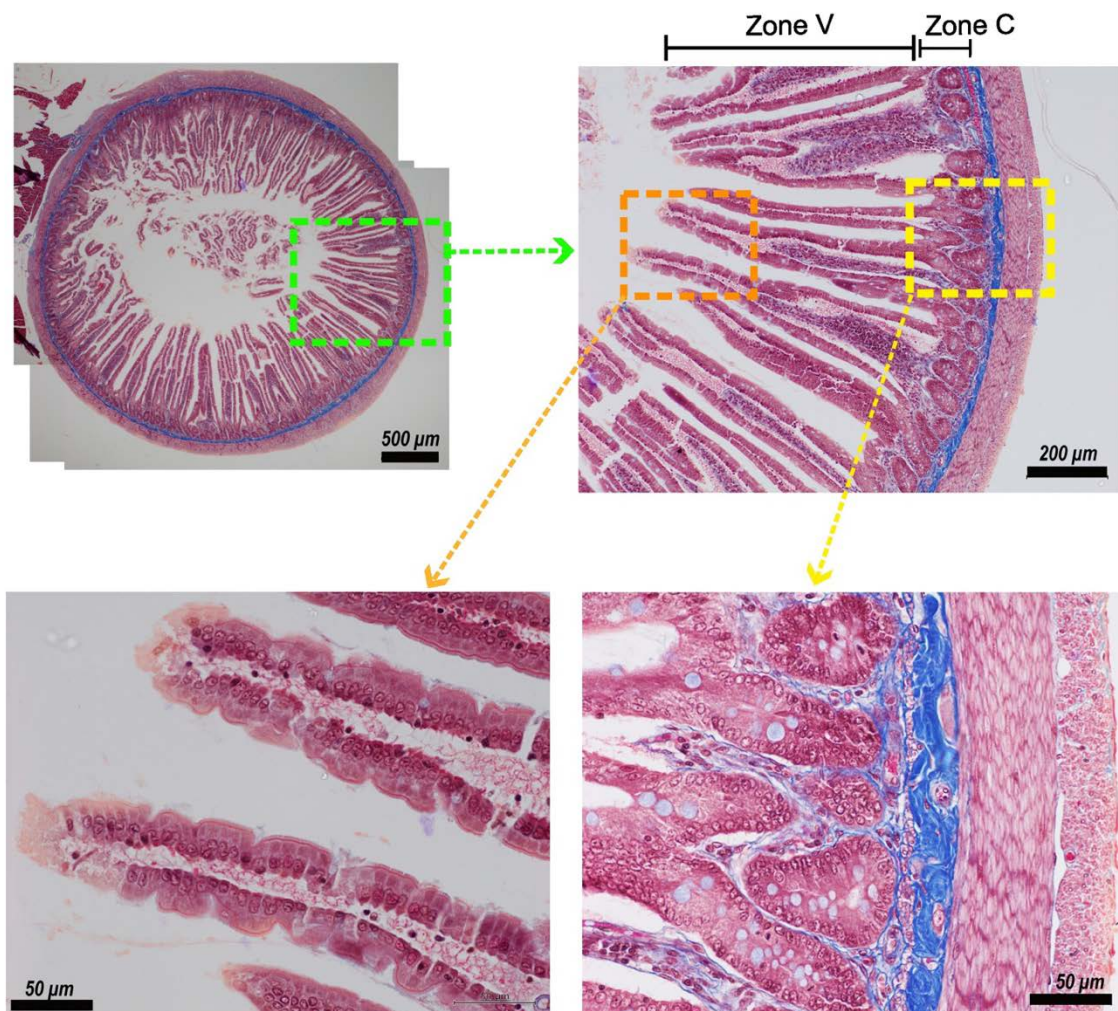


Figure 1. Coupes histologiques d'intestin grêle de Mammifère, en coupes transversales, colorées au Trichrome de Masson, qui colore les noyaux en rouge foncé/violet, les cytoplasmes en rose/rouge, et le tissu conjonctif en bleu. Différents grossissements sont présentés.

Question 1 :

A partir de la figure 1, réalisez un schéma d'interprétation légendé permettant de dégager l'organisation structurale de la paroi intestinale.

1. Production de nouvelles cellules épithéliales

On injecte à des souris du 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) fluorescent, un analogue fonctionnel de la thymidine. Il diffuse rapidement dans toutes les cellules de l'organisme (en moins de 2 minutes). L'EdU libre est rapidement éliminé de l'organisme (temps de résidence moyen dans l'organisme chez la souris : 25 min).

Deux heures après l'injection d'EdU, les intestins sont récupérés, coupés, et on réalise un marquage avec des anticorps anti-E-cadhérines (cadhérines épithéliales) fluorescents et avec du DAPI, un marqueur fluorescent de l'ADN (figure 2).

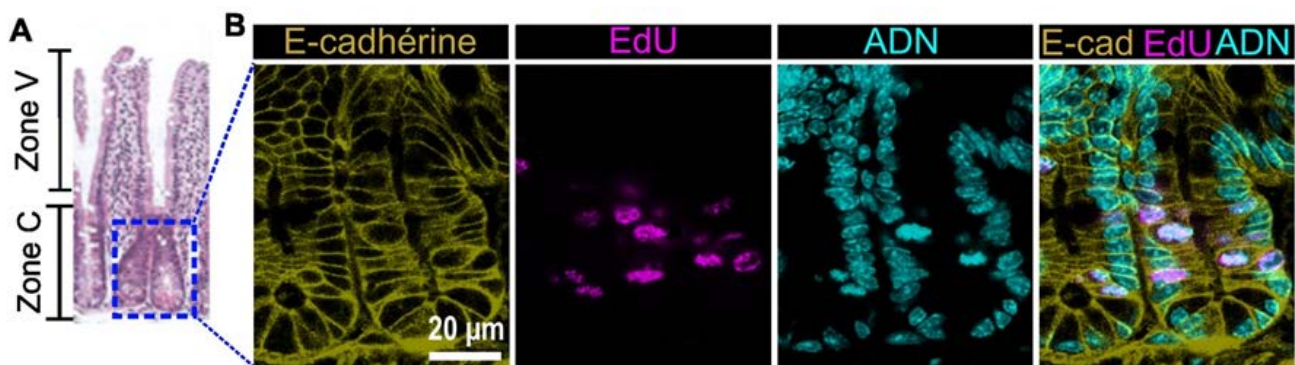


Figure 2. *A. Coupe histologique d'intestin grêle colorée à l'hématoxyline-éosine. B. Zooms sur la zone C (encadré en pointillés bleus) observée par microscopie à fluorescence 2 h après injection d'EdU fluorescent et après différents marquages (E-cadhérine, EdU, ADN). Aucun signal d'EdU fluorescent n'est détecté dans les structures de la zone V.*

Question 2 :

- Quelles sont les étapes de préparation et de marquage d'un tissu pour une observation en immuno-fluorescence ?**
- Que permet de détecter l'EdU ?**
- Analysez les images de la figure 2B. Concluez.**
- Quelles questions sont soulevées par ces observations ?**

On injecte de l'EdU fluorescent comme précédemment et on prélève les intestins à différents temps après injection : 18, 24, 48 ou 54 h (figure 3).

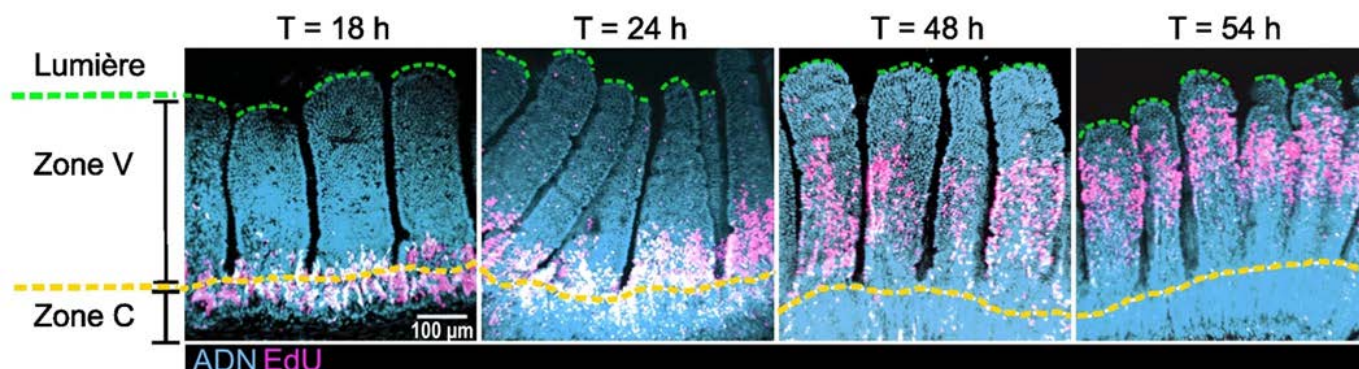


Figure 3. Coupes d'épithélium intestinal aux différents temps après injection d'EdU fluorescent (en magenta) et marquage de l'ADN (en bleu), observées par microscopie à fluorescence.

Question 3 :

- Quel est l'objectif de cette expérience ?
- A partir de la figure 3, réalisez un graphique permettant de répondre de manière quantitative à l'objectif de l'expérience. Explicitez brièvement la démarche de construction de votre graphique. **NB1 : Une normalisation peut permettre de s'affranchir des variations de longueur des structures observées dans la zone V. NB2 : Les valeurs chiffrées pourront être arrondies.**
- Interprétez les résultats de l'expérience et concluez.

2. Mécanismes de déplacement des cellules

On évalue la contribution des mitoses au déplacement cellulaire. Pour cela, après injection de l'EdU fluorescent, on inhibe la réplication avec de l'hydroxy-urée (HU). Dans une première expérience, on injecte ou non l'HU avec l'EdU, et on prélève les intestins 6 h après injection d'EdU +/- HU (figures 4A et 4B). Dans une seconde expérience, on injecte l'HU 18 h ou 48 h après l'EdU, et on prélève les intestins des souris contrôles et traitées 6 h après ajout d'HU (c'est-à-dire 24 ou 54 h post-injection de l'EdU respectivement) puis on marque les coupes d'intestin comme précédemment (figure 4C).

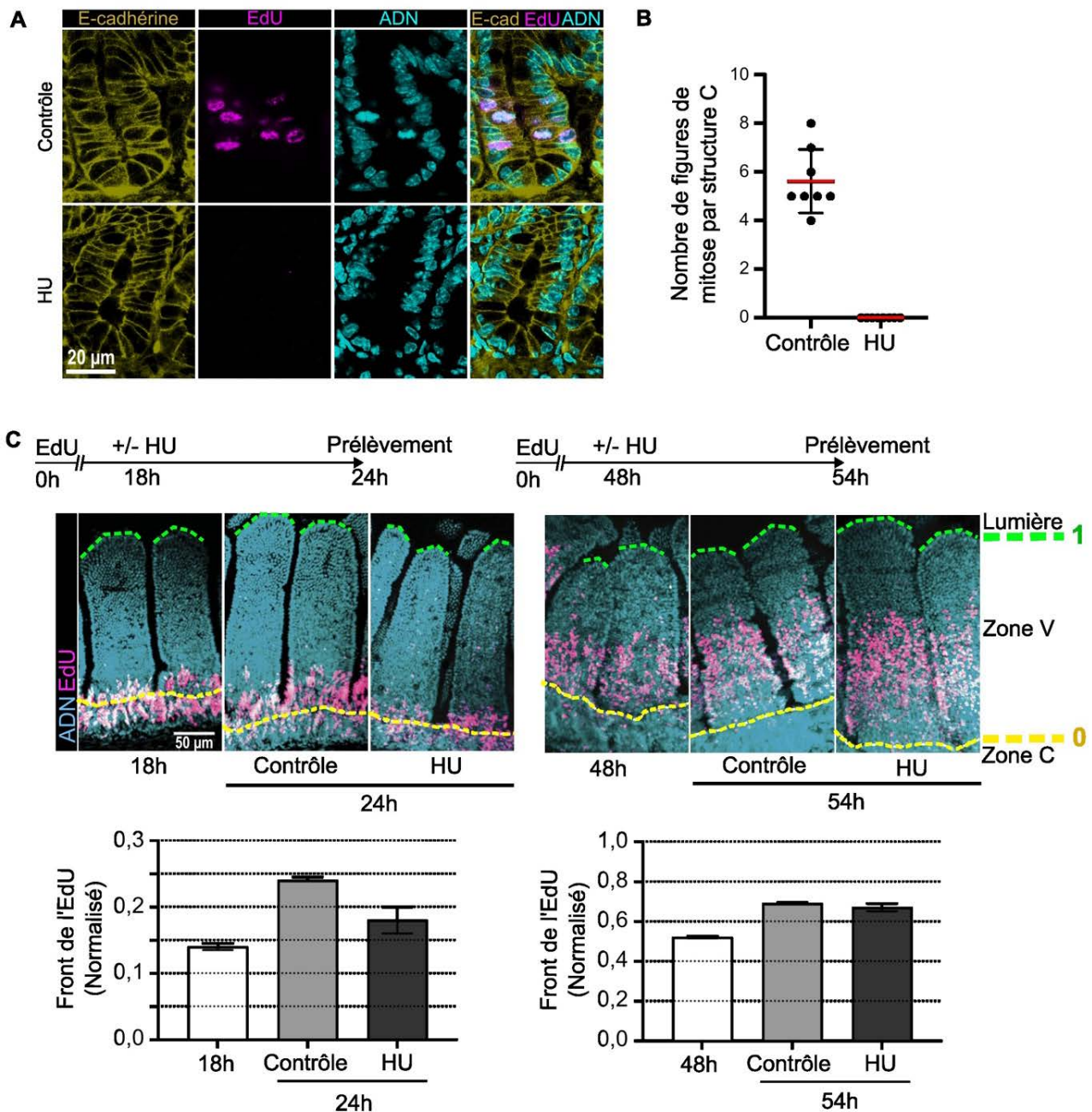


Figure 4. **A.** Zooms sur la zone C de l'épithélium intestinal observé en microscopie à fluorescence avec de l'EdU fluorescent, marquage des E-cadhérines et de l'ADN, en condition contrôle ou après traitement à l'HU. **B.** Quantification d'images telles que celles présentées sur la figure A. 1 point = 1 mesure ; barre rouge = moyenne ; barres noires = écart-type. **C.** Exemple de zone V de l'épithélium intestinal d'une souris observé en microscopie à fluorescence après injection d'EdU fluorescent et marquage de l'ADN. Les graphiques quantifient le marquage aux différents temps expérimentaux sur au minimum 10 structures de la zone V par souris, chez 6 souris contrôle et 6 souris traitées à l'HU. Les lignes pointillées sur l'image font référence à l'axe des ordonnées des graphiques.

Question 4 :

- Analysez et interprétez les figures 4A et 4B.
- Analysez et interprétez la figure 4C.
- Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer ces résultats ?

Pour tester l'implication du cytosquelette dans le phénomène observé, on réalise deux expériences. Dans la première, on marque l'actine des cellules épithéliales, ainsi que le Nidogène-1 (une protéine de la lame basale) et l'ADN (figure 5A). Dans la seconde, on inhibe la polymérisation de l'actine 18 h ou 48 h après injection de l'EdU fluorescent comme dans l'expérience précédente. On quantifie le front de l'EdU 6 h après le traitement avec l'inhibiteur (soit à 24 ou 54 h, figure 5B).

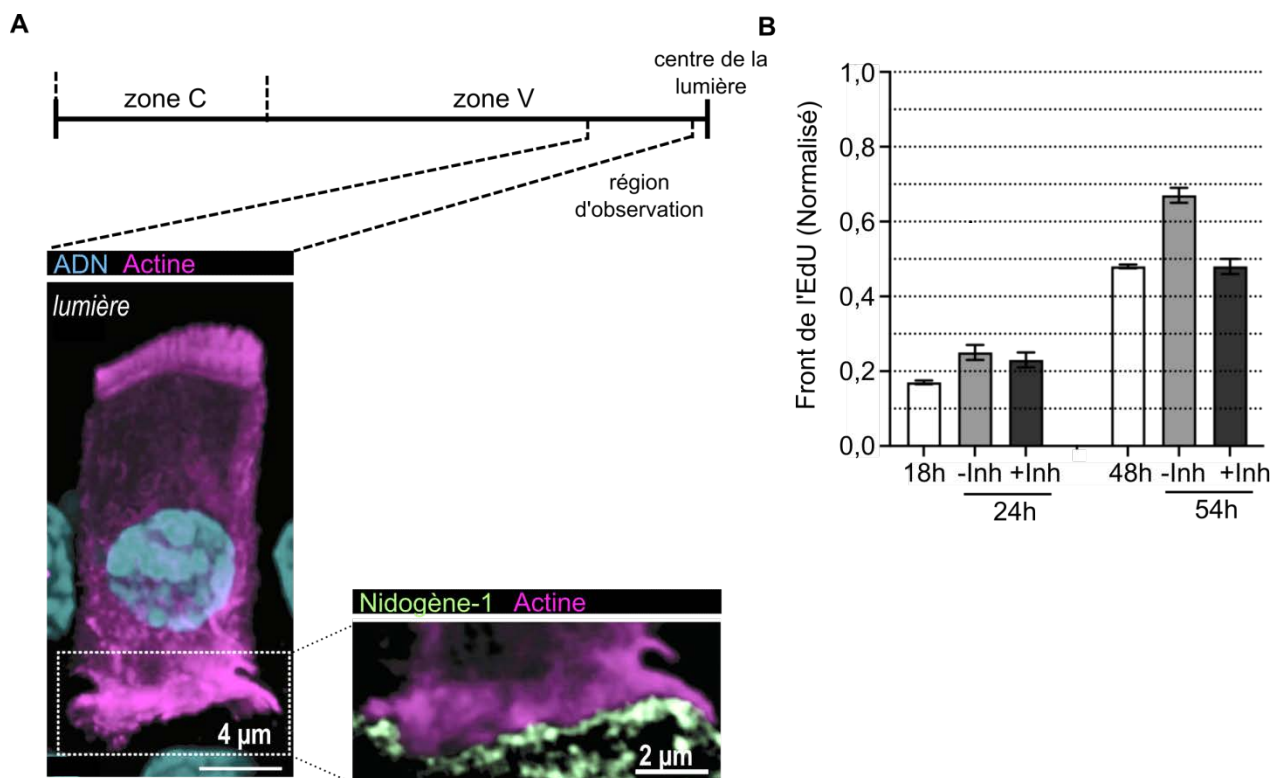


Figure 5. **A.** Gauche : Cellule du tiers supérieur d'une structure de la zone V de l'épithélium intestinal dont l'actine (magenta) et l'ADN (cyan) sont marqués. Droite : Agrandissement de la zone encadrée sur l'image de gauche, montrant les marquages Nidogène-1 (vert pâle) et Actine (magenta). Les images ont été obtenues par microscopie à fluorescence. **B.** Des images similaires à la figure 4C sont obtenues à différents temps expérimentaux, en présence (+Inh) ou en absence (-Inh) d'un inhibiteur de polymérisation de l'actine. Le graphique présente leur quantification.

Question 5 :

- Analysez et interprétez les images de la figure 5A.
- Analysez et interprétez le graphique de la figure 5B.
- Proposez un mécanisme pour le déplacement des cellules épithéliales le long des structures de la zone V.

On cherche maintenant à mieux caractériser la zone V. On quantifie tout d'abord la longueur des structures intestinales de la zone V chez des souris contrôles âgées de 4 ou 21 mois (figure 6A). Sur une coupe histologique, on marque les E-cadhérines (cadhérines épithéliales) et l'ADN et on quantifie la densité cellulaire dans différentes régions le long de l'épithélium (figures 6B et C).

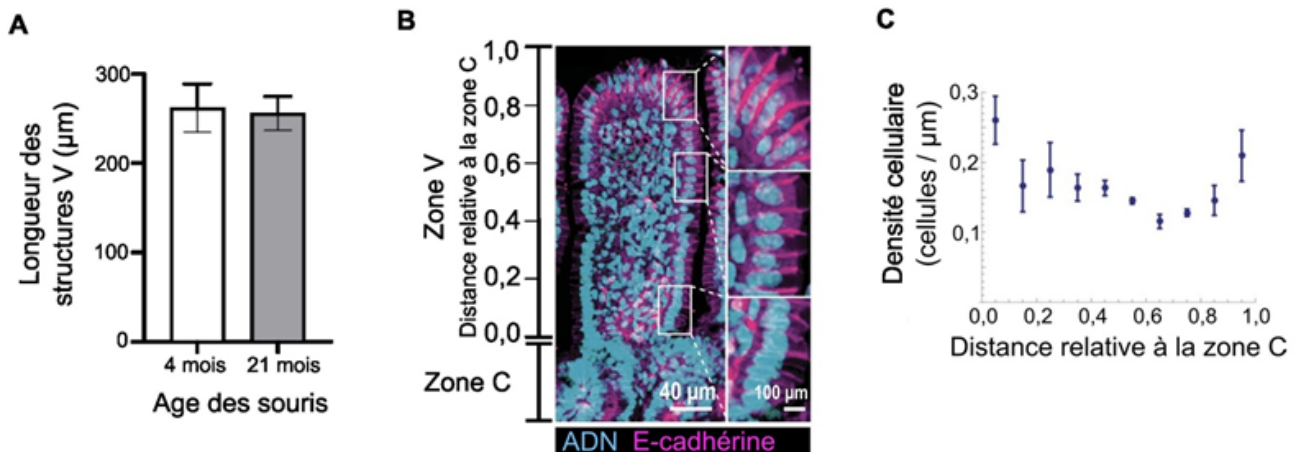


Figure 6. **A.** Longueur des structures de la zone V de l'épithélium intestinal de souris contrôle à différents âges. **B.** Coupe histologique d'intestin avec marquage de la E-cadhérine (magenta) et de l'ADN (cyan), et agrandissements dans 3 régions le long de la zone V. **C.** Quantification de la densité cellulaire épithéliale en 10 points régulièrement espacés le long de structures de la zone V (point : moyenne ; barres verticales : écart-type).

Question 6 :

- Analysez le graphique 6A et faites le lien avec vos observations précédentes.
- Analysez les figures 6B et 6C. Conclure.
- Émettez une hypothèse permettant d'interpréter vos conclusions.
- Proposez une expérience pour tester votre hypothèse.

Question 7 :

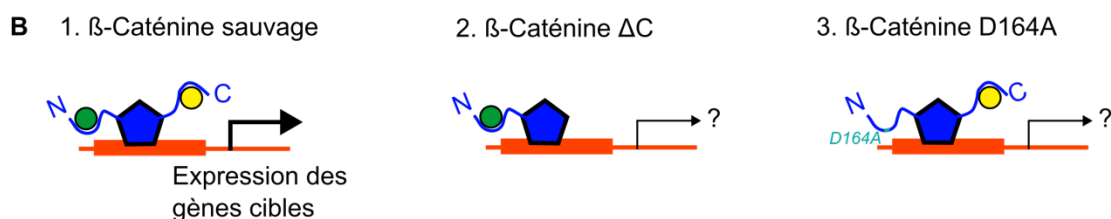
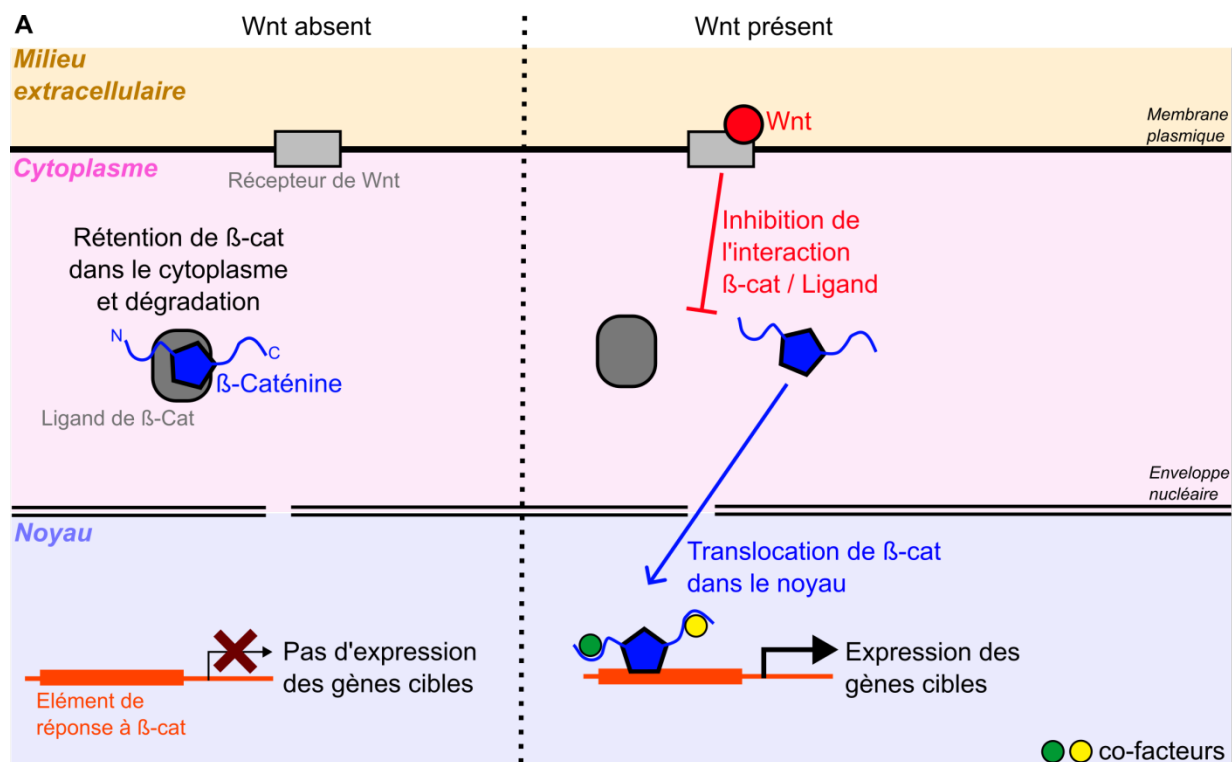
En vous appuyant sur vos réponses aux questions 1 à 6, construisez un schéma bilan du renouvellement de l'épithélium intestinal.

3. Conséquences d'une dérégulation du renouvellement de l'épithélium intestinal

Dans un système de culture cellulaire *in vitro*, on s'intéresse désormais au maintien des cellules prolifératives de la zone C, appelées cellules souches intestinales épithéliales. Ces cellules souches peuvent se différencier en 2 types de cellules : des cellules épithéliales absorbantes ou des cellules épithéliales sécrétrices.

La voie de signalisation des facteurs protéiques Wnt/ β -caténine (figure 7A) est indispensable au maintien de ces cellules. On cherche à comprendre plus précisément comment elle agit. On dispose pour cela de modèles génétiques permettant d'empêcher sélectivement le recrutement des co-facteurs de la protéine β -caténine (β -Cat) soit en C-terminal (Condition Δ C), soit en N-terminal (Condition D164A) (figure 7B). On mesure la prolifération des cellules dans les structures de la zone C ainsi que l'expression d'*Axin2* (gène caractéristique de l'état « cellule souche »), de *LyzC* et

Mucine2 (gènes caractéristiques de cellules épithéliales sécrétrices) à différents temps (2-4 jours) après mise en culture en présence de Wnt dans le milieu (figure 7C).



C

	Jour 2			Jour 4		
	Prolifération cellulaire	Expression d' <i>Axin2</i>	Expression de <i>LyzC</i> et <i>Mucine2</i>	Prolifération cellulaire	Expression d' <i>Axin2</i>	Expression de <i>LyzC</i> et <i>Mucine2</i>
1. β-Cat sauvage	+	+	-	+	+	+
2. β-Cat ΔC	-	-	+	Mort des cellules	Non mesurable	Non mesurable
3. β-Cat D164A	++	++	-	-	-	++

Figure 7. A. Voie de signalisation simplifiée Wnt-β-caténine. **B.** Schéma des modèles génétiques utilisés. **C.** Quantification des cellules en prolifération et de l'expression de différents gènes d'intérêt au jour 2 et au jour 4. -: expression ou prolifération nulles, +: expression ou prolifération faibles, ++: expression ou prolifération fortes. β-cat : β-caténine.

Question 8 :

- Comment peut-on détecter l'expression d'un gène ?
- Analysez et interprétez les données au jour 2. Concluez.
- Analysez et interprétez les données au jour 4. Concluez.

On souhaite évaluer la contribution de l'environnement dans le processus de différenciation des cellules épithéliales sécrétrices de l'intestin grêle. Pour cela, on traite ou non les souris par des antibiotiques à large spectre et on réalise en parallèle l'expérience sur des souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal). Dans les cellules épithéliales de la zone C on quantifie la translocation de la β -caténine dans le noyau (figure 8A), ainsi que l'expression de différents gènes caractéristiques (figures 8B et 8C).

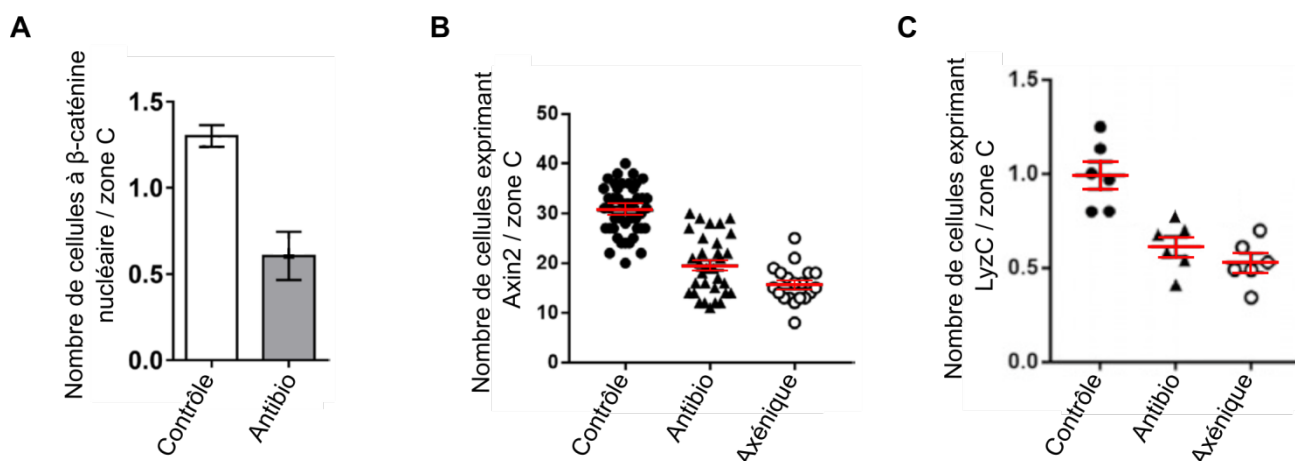


Figure 8. **A.** Quantification de la localisation nucléaire de la β -caténine, dans les cellules épithéliales de la zone C de souris contrôles ou traitées par des antibiotiques à large spectre (Antibio). (Cette mesure n'a pas été réalisée dans les souris axéniques.) **B-C.** Quantification de l'expression de gènes caractéristiques (présentés figure 7) dans les cellules épithéliales de la zone C en condition contrôle, ou après traitement par des antibiotiques à large spectre (Antibio), ou chez des souris axéniques. Chaque point représente la moyenne des mesures pour une souris. La barre horizontale centrale est la moyenne, les barres supérieures et inférieures représentent l'écart-type.

Question 9

- Que teste-t-on en administrant des antibiotiques ? En utilisant des souris axéniques ?
- Analysez et interprétez la figure 8.
- Quelles conditions expérimentales permettraient de compléter cette analyse ?

On s'intéresse maintenant au renouvellement de l'épithélium intestinal dans le cas de cancers intestinaux (au niveau du côlon). Dans une première expérience, on réalise un marquage de Wnt sur une coupe d'intestin sain, et sur une coupe de tumeur intestinale (figure 9A). Dans une seconde expérience, chez des souris présentant une tumeur intestinale, on inhibe la sécrétion de Wnt par les cellules épithéliales, puis on quantifie différents paramètres au sein de la tumeur : (1) la mort cellulaire, (2) la différenciation en cellules sécrétrices (expression de *Mucine2*) et (3) la prolifération (figure 9B). On note par ailleurs une diminution globale de l'expression d'*Axin2* dans les tumeurs des souris où la sécrétion de Wnt est inhibée.

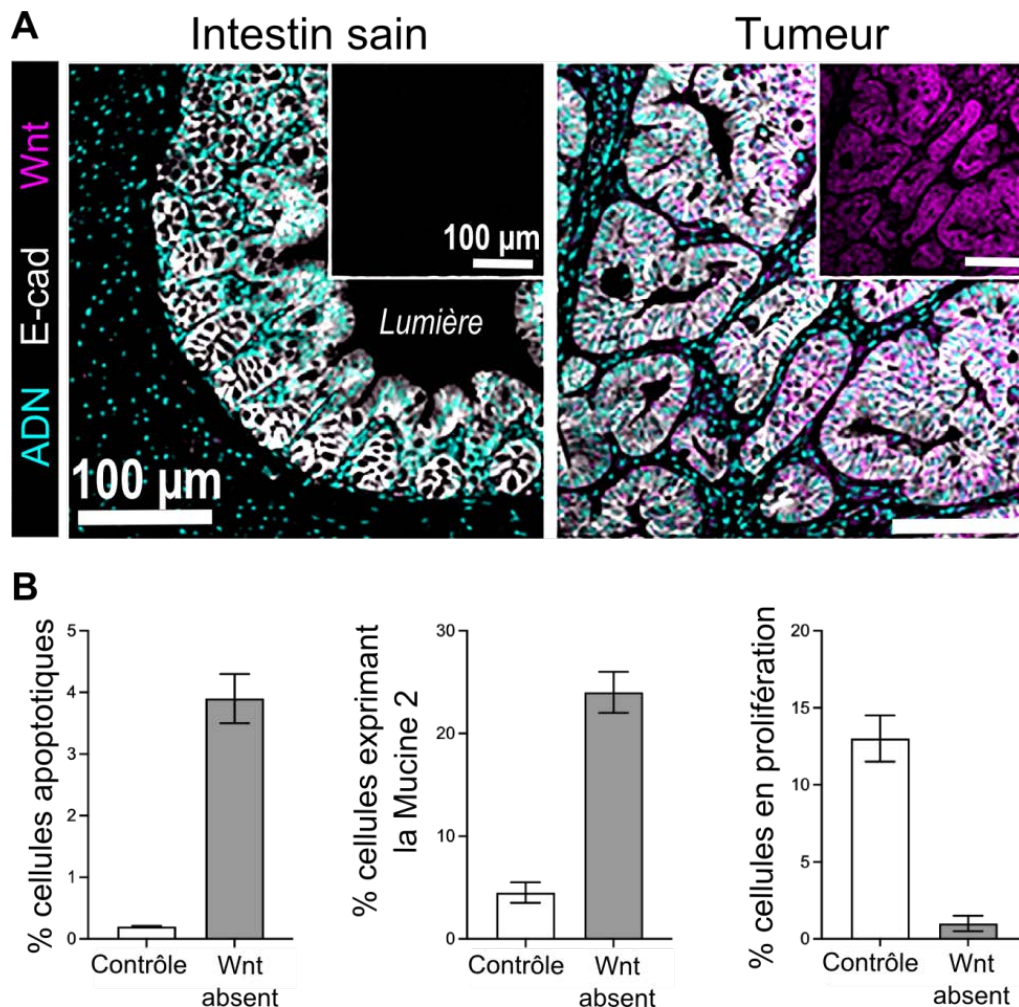


Figure 9. **A.** Epithélium intestinal de côlon sain et tumoral murin observé par microscopie à fluorescence. L'encadré montre le marquage Wnt seul pour l'ensemble de l'image. **B.** Quantification de la proportion de cellules épithéliales tumorales en apoptose (mort cellulaire), en prolifération, ou exprimant Mucine2, avec (« Wnt absent ») ou sans inhibition (« Contrôle ») de la sécrétion de Wnt.

Question 10

- Que concluez-vous du marquage présenté sur la figure 9A ?
- Quelle hypothèse teste-t-on dans la seconde expérience ?
- Analysez et interprétez les résultats présentés sur la figure 9B.

Question 11 :

A partir de vos réponses aux questions 8 à 10, construisez un schéma du contrôle de la prolifération des cellules souches de l'épithélium intestinal en précisant les conséquences d'une dérégulation de la voie Wnt.

Partie C - L'extravasation des cellules immunitaires

Certaines populations de cellules immunitaires circulent dans les vaisseaux sanguins en situation physiologique et en sortent en cas d'inflammation ou d'infection locale. La sortie des vaisseaux (extravasation) s'effectue en 3 phases successives représentées sur le schéma ci-dessous (figure 1) : (1) roulement sur l'endothélium sanguin, (2) arrêt et (3) transmigration. Toutes ces phases mettent en jeu des interactions intercellulaires.

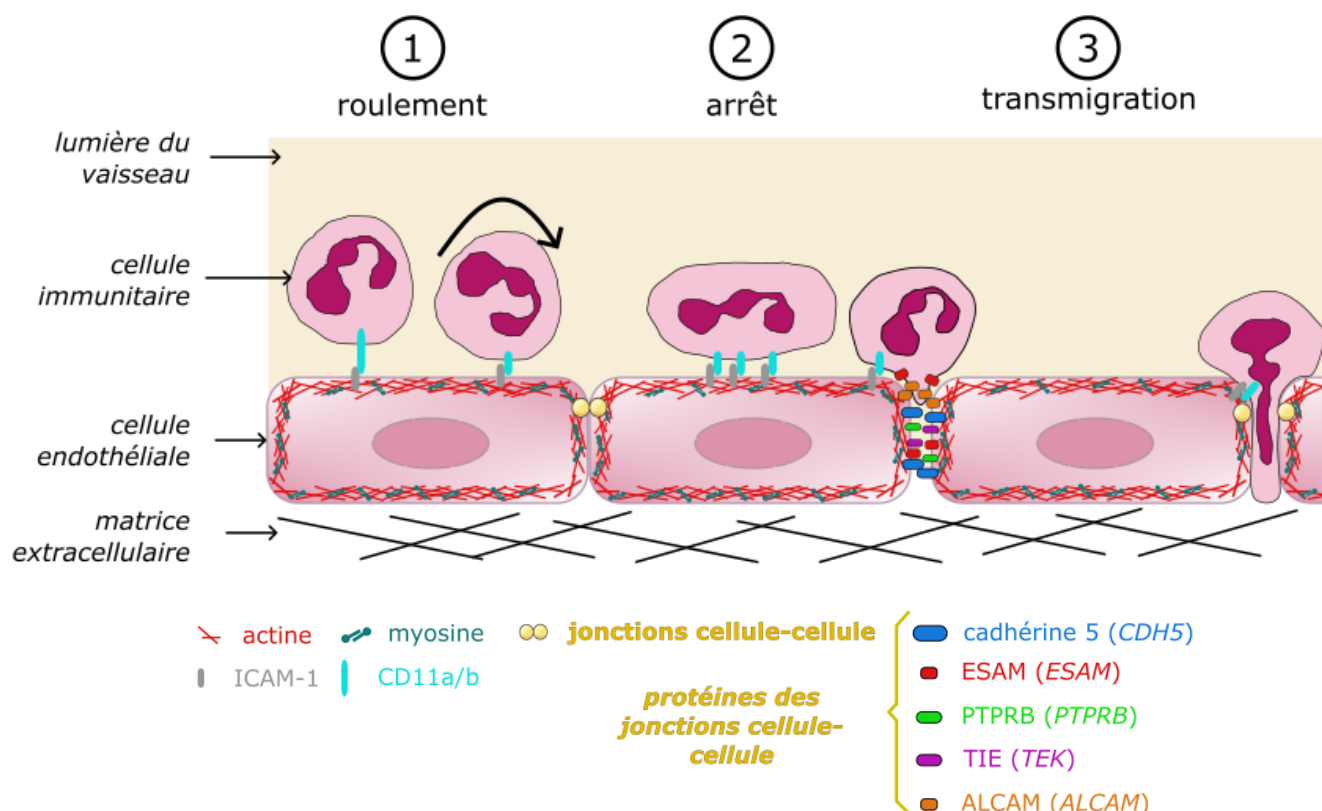


Figure 1. Les acteurs moléculaires connus des 3 phases de l'extravasation des cellules immunitaires : (1) roulement sur l'endothélium sanguin, (2) arrêt et (3) transmigration.

Afin d'étudier plus finement le processus d'extravasation, on réalise un crible par ARN interférents (siARN) pour identifier les gènes impliqués. On utilise un dispositif de transmigration *in vitro*, représenté dans la figure 2A, appelé système à double cuve dans la suite. Une monocouche continue de cellules endothéliales ayant reçu un siARN est cultivée sur le fond de la cuve supérieure qui est percé de micropores. Les cellules endothéliales sont traitées avec une molécule pro-inflammatoire. Des cellules immunitaires sont déposées dans la cuve supérieure et on dénombre ensuite les cellules immunitaires retrouvées dans la cuve inférieure (figure 2B).

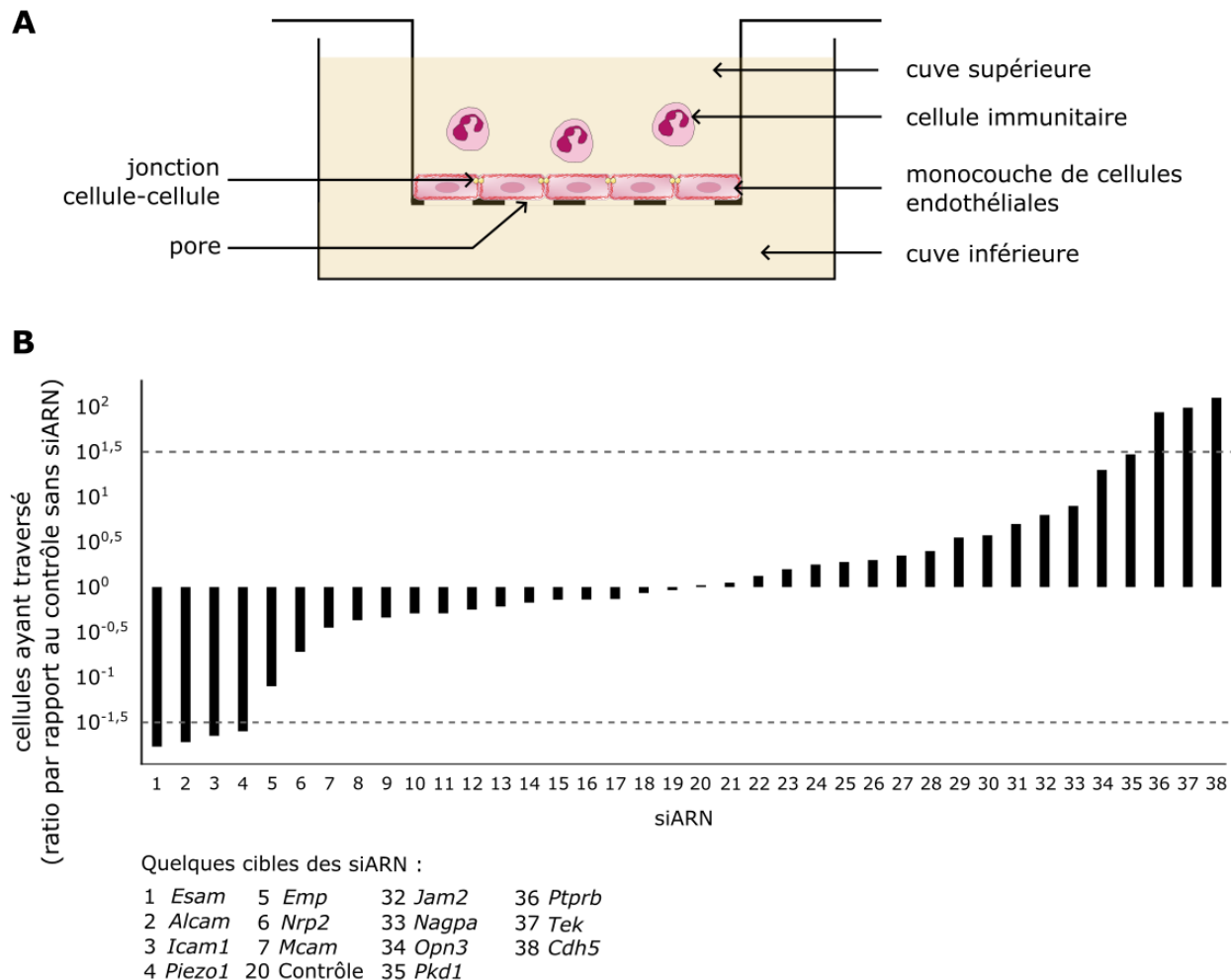


Figure 2. A. Représentation du dispositif expérimental, dit système à double cuve, permettant l'étude *in vitro* de l'extravasation. **B.** Ratio de cellules ayant traversé par rapport au contrôle dans l'expérience de crible par siARN. La limite de significativité est définie à un ratio supérieur à $10^{1,5}$ ou inférieur à $10^{-1,5}$ (ligne pointillée). Le contrôle correspond à un siARN ne ciblant aucun gène du génome. Les gènes ciblés sont indiqués en légende des abscisses et partiellement explicités dans la figure 1.

Question 1 :

- Quel contexte physiologique le protocole utilisé permet-il de reproduire ?
- Analysez les résultats présentés figure 2B.
- Commentez les résultats en les confrontant à la figure 1.

1. Phénotype du mutant *Piezo1*

Pour préciser le rôle de la protéine PIEZO1 *in vivo* et *in vitro*, on utilise :

- un modèle *in vivo* avec des souris contrôle et des souris présentant une délétion du gène *Piezo1* spécifiquement dans les cellules endothéliales (souris *Piezo1*-KO)
- un modèle *in vitro* de cellules endothéliales traitées avec un siARN contrôle ou si*Piezo1*.

On réalise un western blot contre PIEZO1 sur des cellules endothéliales siCtrl et si*Piezo1*, ainsi que sur des extraits de cellules endothéliales des souris contrôle et *Piezo1*-KO (figure 3A). D'autre part,

on induit une inflammation localisée dans des tissus de souris contrôle ou dont les cellules endothéliales sont Piezo1-KO, et on réalise une immunofluorescence permettant de distinguer les cellules immunitaires et les cellules endothéliales (figure 3B).

En parallèle, on analyse plus précisément *in vitro* la dynamique d'extravasation par les cellules immunitaires en traitant les cellules endothéliales siContrôle (siCtrl) ou siPiezo1 avec une molécule pro-inflammatoire. On mesure alors la proportion de cellules immunitaires en phase 1, 2 ou 3 de l'extravasation (figure 3C).

Enfin, dans une expérience indépendante et en absence de cellules immunitaires, on ajoute du dextran fluorescent dans la cuve supérieure du système à double cuve et on mesure l'intensité de fluorescence dans la cuve inférieure après 1 h ou 2 h d'incubation (figure 3D). Le dextran est un polymère de glucose qui ne pénètre pas dans les cellules endothéliales.

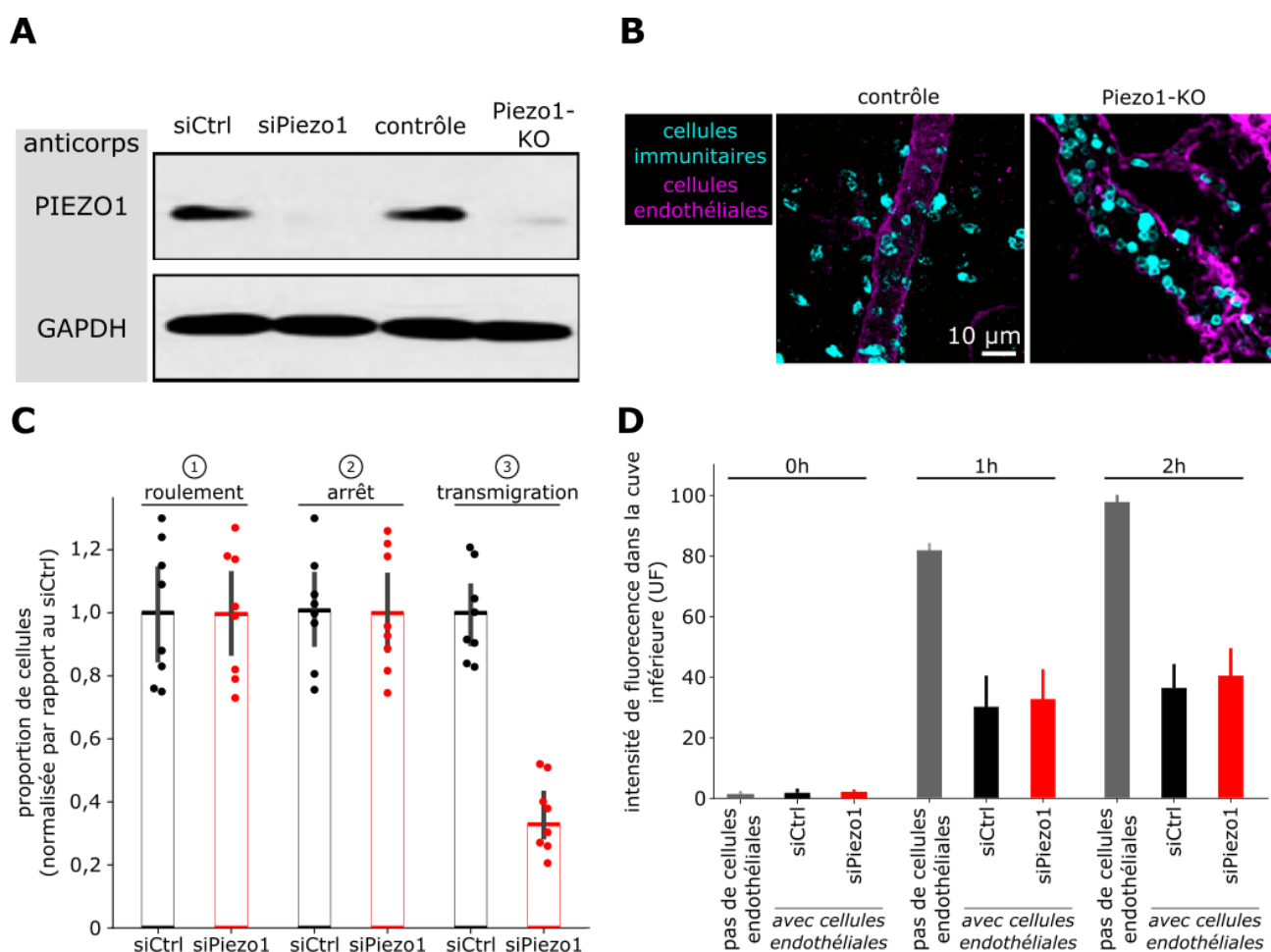


Figure 3. A. Résultats du western blot réalisé à partir d'extraits de cellules endothéliales traitées avec un siContrôle ou un siPiezo1, ou de cellules endothéliales de souris contrôle ou Piezo1-KO. Les protéines contre lesquelles sont dirigés les anticorps utilisés sont indiquées à gauche. GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (enzyme de la glycolyse) **B.** Immunofluorescence dans une oreille de souris contrôle ou Piezo1-KO après induction d'une inflammation (magenta : cellules endothéliales, cyan : cellules immunitaires). **C.** Proportion de cellules immunitaires dans les différentes phases de l'extravasation, normalisée par la condition siContrôle (siCtrl). Chaque point représente le résultat d'une expérience. La barre horizontale représente la moyenne de toutes les expériences et la barre verticale l'écart-type. **D.** Intensité de fluorescence dans la cuve inférieure 0 h, 1 h ou 2 h après addition de dextran fluorescent dans la cuve supérieure en absence ou présence de cellules endothéliales traitées avec un siARN siCtrl ou siPiezo1.

Question 2 :

- a. Analysez et interprétez la figure 3A.
- b. Analysez la figure 3B. Proposez une hypothèse pour expliquer la localisation des cellules immunitaires.
- c. Analysez et interprétez la figure 3C.
- d. Quelle(s) hypothèse(s) l'expérience de la figure 3D teste-t-elle ? Analysez et interprétez la figure 3D.

2. Caractérisation de la protéine PIEZO1

Afin de localiser la protéine PIEZO1, on réalise une immunofluorescence dirigée contre PIEZO1 dans une lignée de cellules endothéliales en présence d'un marqueur de la membrane plasmique (figure 4A).

En parallèle, on souhaite étudier la protéine PIEZO1 isolée. On introduit la protéine PIEZO1 purifiée dans une bicouche lipidique artificielle sphérique (liposome), et on mesure les courants générés en réponse à une différence de potentiel transmembranaire imposée par un dispositif de patch-clamp en fixant les concentrations ioniques extérieures (figures 4B et 4C).

Enfin, dans des cellules endothéliales siCtrl et siPiezo1, on mesure en patch clamp les courants entrant ou sortant en réponse à 2 types de stimuli : un stimulus chimique, ajout d'histamine dans la cuve d'enregistrement, et un stimulus mécanique, pression exercée par une pointe de verre sur la membrane cellulaire (figure 4D). L'histamine est une molécule à laquelle les cellules endothéliales sont sensibles et connue pour augmenter la perméabilité de l'endothélium vasculaire aux cellules immunitaires en contexte inflammatoire. La pression mécanique exercée par la pointe génère une déformation membranaire quantifiable (en μm) et corrélativement étire localement la membrane plasmique sur 1 ou 2 μm .

Question 3 :

- a. Analysez et interprétez la figure 4A (ci-contre).
- b. Proposez une expérience pour préciser la localisation subcellulaire de PIEZO1.
- c. Analysez et interprétez la figure 4B puis la figure 4C.
- d. Analysez et interprétez la figure 4D.

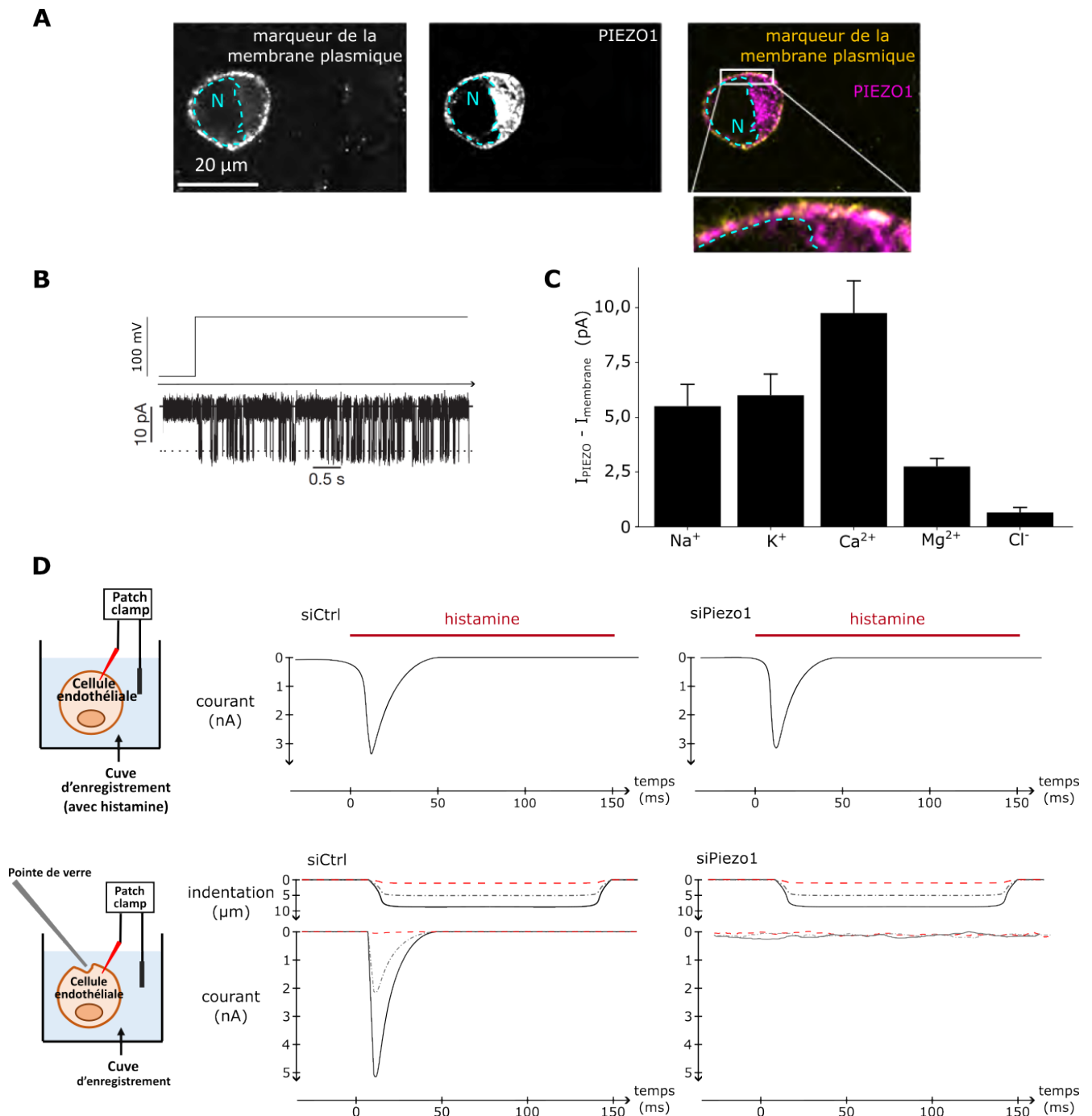


Figure 4. **A.** Immunofluorescence dirigée contre PIEZO1 (magenta sur l'image composite) avec un marqueur de la membrane plasmique (jaune-orangé sur l'image composite) observée en microscopie à fluorescence. La zone N délimitée en pointillés correspond au noyau. **B.** Courant transmembranaire mesuré en voltage imposé (patch clamp) sur un liposome contenant la protéine PIEZO1 purifiée et une solution électrolytique semblable au milieu intracellulaire. **C.** Courant mesuré dans les mêmes conditions que B et une solution électrolytique extra-liposome composée de différents ions en concentration équivalente, comparé au courant obtenu pour un liposome sans PIEZO1 ($I_{membrane}$). **D.** Courant mesuré dans des cellules endothéliales en présence d'un siARN contrôle (siCtrl) ou ciblant Piezo1 (siPiezo1) en réponse à un stimulus chimique - ajout d'histamine - dans la cuve d'enregistrement ou mécanique - déformation de la membrane créée par une pointe de verre -.

Question 4 :

A partir des résultats des figures 3 et 4, réalisez un schéma montrant la localisation et le fonctionnement de la protéine PIEZO1.

3. Rôle de PIEZO1 dans l'extravasation

On utilise le système expérimental représenté figure 5A, qui permet le déclenchement ou l'arrêt d'un flux liquidien de composition contrôlée (milieu de culture, milieu de culture + cellules immunitaires, etc) sur une monocouche de cellules endothéliales, qu'on appellera système avec pompe dans la suite. On mesure alors la concentration en calcium intracellulaire des cellules endothéliales sauvages, siCtrl ou siPiezo1, soumises à différentes conditions (figures 5B et 5C).

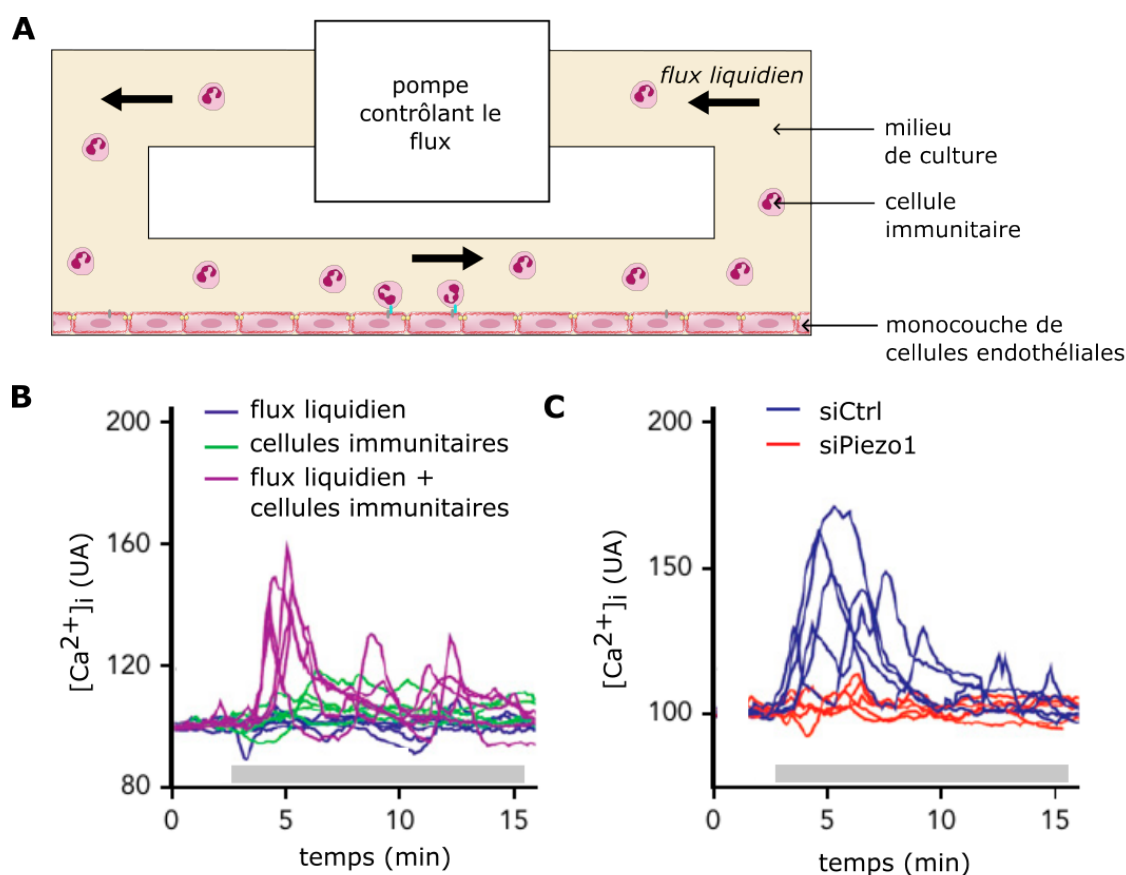


Figure 5. A. Système expérimental dit système avec pompe, utilisé dans l'expérience. B. Concentration en Ca^{2+} dans les cellules endothéliales avec ou sans flux liquidien et/ou cellules immunitaires. C. Concentration en Ca^{2+} dans les cellules endothéliales siContrôle (siCtrl) ou siPiezo1 avec flux liquidien et en présence de cellules immunitaires (UA : unité arbitraire). Les conditions sont imposées durant la période marquée par le trait horizontal gris. Chaque tracé coloré correspond à une expérience indépendante.

Question 5 :

- Que permet de reproduire ce système expérimental avec pompe (figure 5A) ?
- Analysez et interprétez les figures 5B et 5C. En lien avec les documents précédents, quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous proposer pour expliquer ces résultats ?

Pour préciser la voie de transduction du signal, en utilisant le même système avec pompe (figure 5A), on remplace les cellules immunitaires par des billes de 5 μm de diamètre, recouvertes d'anticorps mimant les protéines CD11a/b (figure 1) qui interagissent avec ICAM1 (appelés anticorps anti-ICAM1 par la suite). On mesure la concentration en Ca^{2+} intracellulaire en présence de flux liquidien et des billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1 (figure 6A). On mesure ensuite l'étirement de la membrane plasmique grâce à un marqueur fluorescent en présence ou absence de flux liquidien et/ou de billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1 (figure 6B). Enfin, on répète la même expérience en présence de cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation de l'actine) (figure 6C).

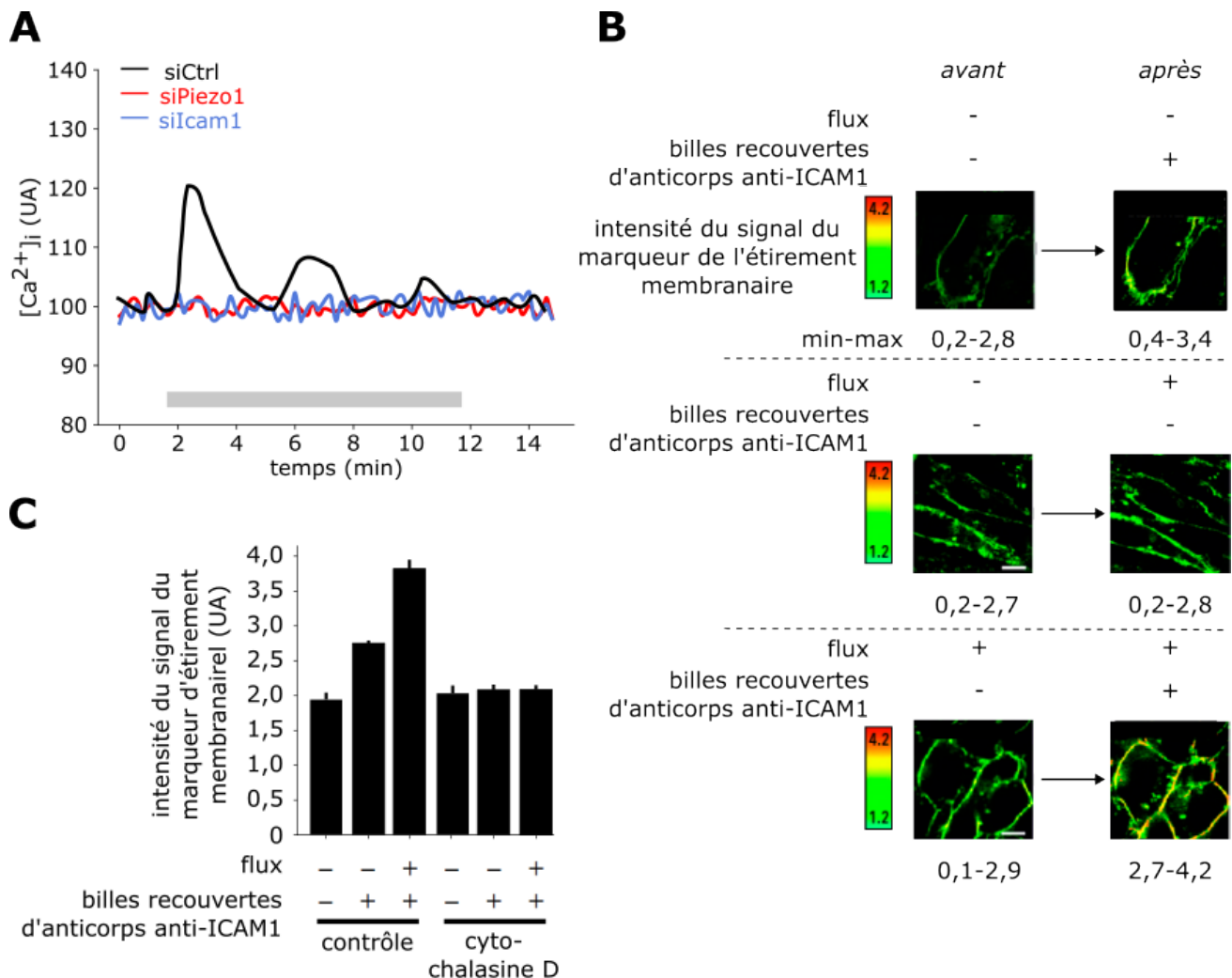


Figure 6. A. Concentration en Ca^{2+} dans les cellules endothéliales traitées avec un siARN contrôle (siCtrl), un siPiezo1 ou siIcam1. Un flux liquidien en présence de billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1 est appliqué sur la période marquée par le trait gris. **B.** Intensité du signal du marqueur de tension de membrane avec ou sans flux liquidien et avec ou sans billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1, avec indication des valeurs minimales et maximales d'intensité obtenues en unités arbitraires (UA). L'image de droite correspond à la même cellule que l'image de gauche après application des conditions expérimentales. **C.** Intensité du signal du marqueur de l'étirement de la membrane de cellules endothéliales contrôle ou traitées avec des doses faibles de cytochalasine D en conditions avec ou sans flux liquidien et/ou de billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1. L'histogramme représente la moyenne et la barre verticale l'écart-type de 30 cellules par condition.

Question 6 :

- a. Analysez et interprétez les résultats de la figure 6A.
- b. Analysez et interprétez les figures 6B et 6C.
- c. Proposez un mécanisme moléculaire pour expliquer ces résultats.

Le calcium intracellulaire étant connu pour moduler la dynamique du cytosquelette, on se concentre sur l'étude de la myosine non-musculaire (voir encart). On soumet des cellules endothéliales siCtrl, siPiezo1 ou silcam1 au protocole présenté figure 7 et on analyse différentes protéines, dont un composant de la myosine non-musculaire, MLC, par western blot (figure 7A). L'anticorps anti-MLC détecte les formes phosphorylée et non-phosphorylée de MLC.

Myosine non-musculaire

Composée de 2 chaînes lourdes, ainsi que de **2 chaînes légères (MLC)** qui peuvent être phosphorylées par une kinase.

La phosphorylation des MLC permet à la myosine d'interagir avec les microfilaments d'actine du réseau sous-membranaire.

On répète la même expérience en traitant au préalable les cellules avec de la cytochalasine D ou de la blebbistatine, un inhibiteur de la phosphorylation de MLC. On mesure l'intensité de la bande pMLC (MLC phosphorylée) sur un western blot (figure 7B).

Enfin, on analyse l'effet de la phosphorylation de MLC en utilisant une lignée de cellules endothéliales dont MLC est constitutivement phosphorylée (pMLC constitutif) dans un système à double cuve (figure 2A) et en ajoutant dans la cuve supérieure du dextran fluorescent (figure 7C), comme dans la figure 3D.

Question 7 :

- a. Analysez la figure 7A (ci-contre), sachant que la bande correspondant à pMLC est très faible dans la condition siCtrl en présence de flux liquidien et de billes lorsque l'on traite les cellules avec un chélateur du calcium.
- b. Analysez et interprétez la figure 7B.
- c. Analysez et interprétez la figure 7C.

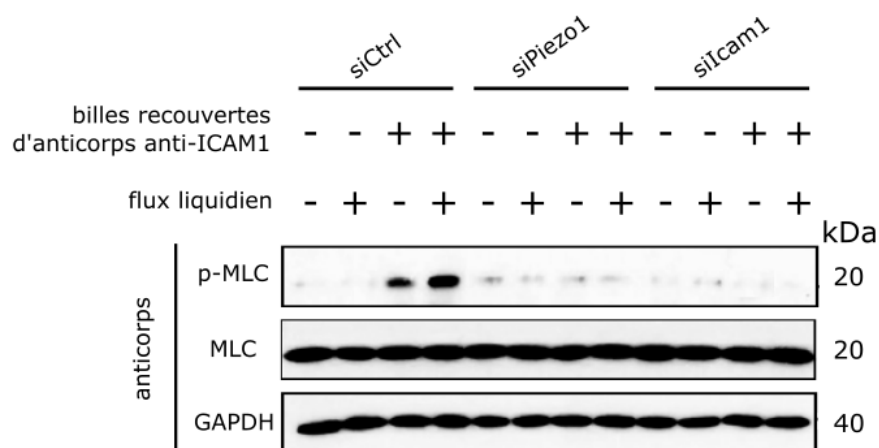
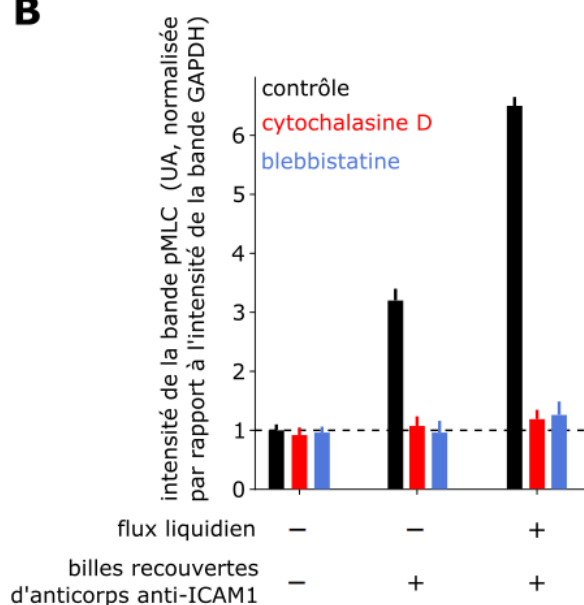
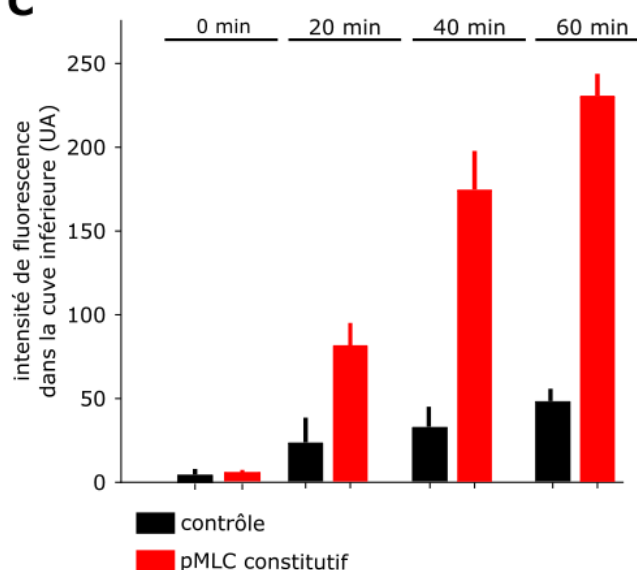
A**B****C**

Figure 7. A. Western blot sur des extraits de cellules endothéliales siCtrl, siPiezo1 et siICAM1, en présence ou absence de billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1 et/ou d'un flux liquidien. Les protéines contre lesquelles sont dirigés les anticorps utilisés sont indiquées à gauche. (kDa, masse moléculaire en kiloDaltons) **B.** Intensité de la bande pMLC normalisée par rapport à la bande GAPDH dans des western blots réalisés sur des extraits de cellules endothéliales en présence ou non de flux liquidien et de billes recouvertes d'anticorps anti-ICAM1, en condition contrôle ou p-MLC constitutif. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences et la barre verticale l'écart-type. (UA : Unité arbitraire). **C.** Intensité de fluorescence dans la cuve inférieure après addition d'une même concentration en dextran fluorescent dans la cuve supérieure en présence d'une monocouche de cellules endothéliales contrôle ou exprimant une MLC phosphorylée de manière constitutive (pMLC constitutif). (UA : unité arbitraire).

Question 8 :

En utilisant les résultats de l'ensemble des figures 2 à 7, proposez un schéma bilan montrant le rôle et l'importance de PIEZO1 dans l'extravasation des cellules immunitaires des vaisseaux vers les tissus. Justifiez brièvement l'enchaînement de chacune des étapes, hypothétiques ou démontrées, au niveau moléculaire.

FIN DE L'ÉPREUVE

