

Annales L2

Biologie S4

Sommaire

- Sujet session 1, 2018-2019 : page 3
Correction session 1, 2018-2019 : page 19

- Sujet session 1, Eval1, 2019-2020 : page 35
Correction session 1, Eval1, 2019-2020 : page 41

- Sujet session 1, Eval2, 2019-2020 : page 47
Correction session 1, Eval2, 2019-2020 : page 51

- Sujet session 1, 2021-2022 : page 56
Correction session 1, 2021-2022 : page 69



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2018-2019

Session 1 – S4
Sujet

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



L2

Année 2018-2019

Deuxième Semestre

Première session

UE 4-02

ÉPREUVE DE
Bases Cellulaires et Moléculaires du
Développement

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Au cours de l'embryogenèse, les protéines de la famille Nodal jouent un rôle important dans la mise en place des feuillets embryonnaires et de la gastrulation. L'objectif de cette étude est de préciser leur fonction chez le xénope.

Question 1. D'après les connaissances acquises en cours, chez le xénope, que pouvez-vous dire des protéines de la famille Nodal ? : A quelle famille appartiennent-elles ? Quels sont leurs profils et domaine d'expression au cours de l'embryogenèse ? Quel est leur rôle et comment a-t-il été mis en évidence ? (2)

Dans une première expérience, les embryons au stade 4 cellules, au stade 7 (avant la transition blastuléenne) ou au stade 9 (2h avant le début de la gastrulation (stade 10)), sont traités par un inhibiteur pharmacologique des récepteurs aux protéines Nodal, nommé SB-505124 (SB), ou injectés par la protéine recombinante Lefty, un antagoniste des protéines Nodal mais pas de l'activine. Les embryons sont ensuite analysés au début de la gastrulation pour l'expression de *sox17 α* , un marqueur de l'endoderme, pour *foxl1e*, un marqueur ectodermique, et pour *Xbra* et *goosecoid*, par hybridation in situ (**Figure BC1A**) et par RT-qPCR (**Figure BC1B**)

Question BC2. Quelles informations vous amènent les résultats de la Figure BC1 sur l'implication de l'inhibition de la voie de signalisation Nodal au cours de l'embryogenèse, sur l'expression des gènes ectodermique, mésodermiques et endodermique analysés ? (2)

Suite →

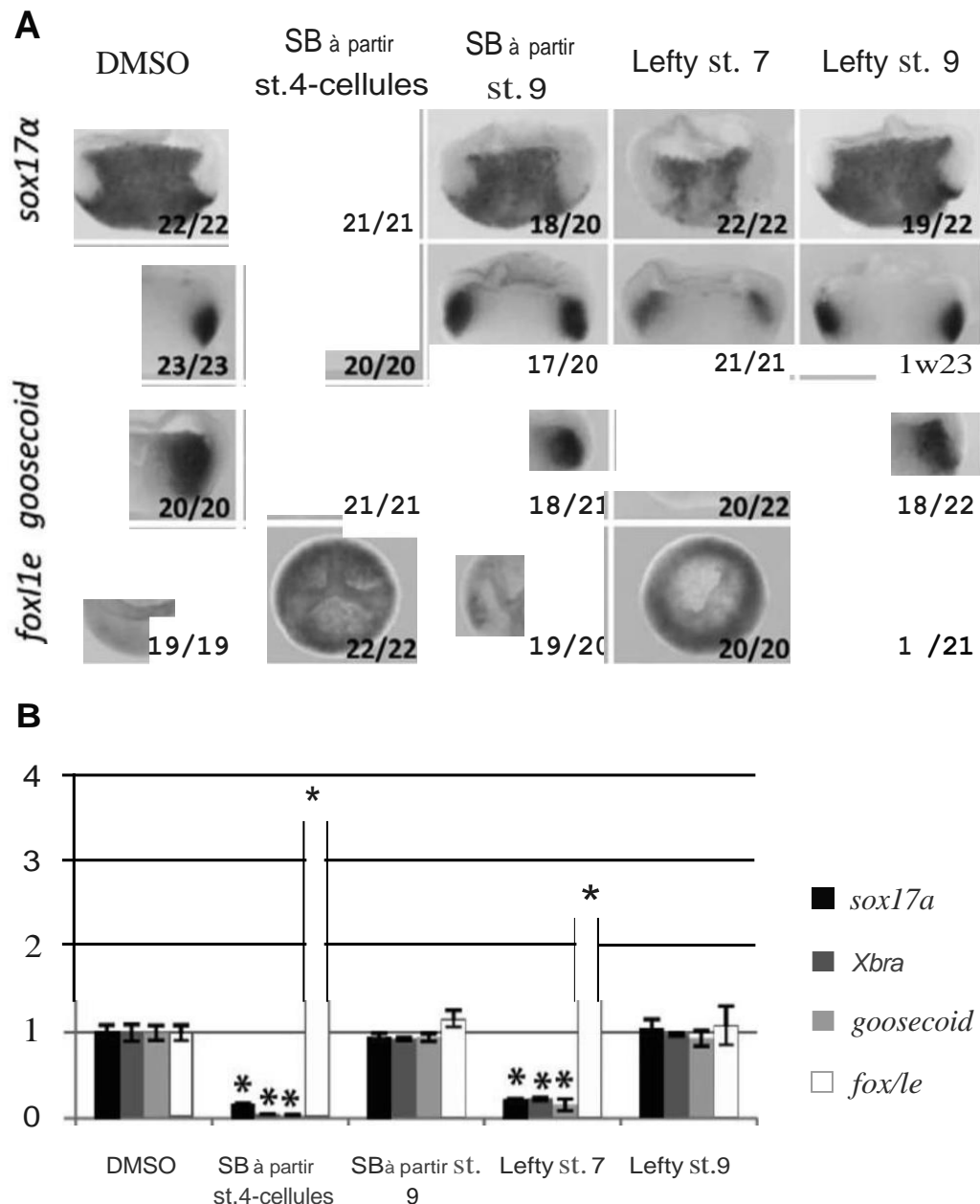


Figure BC1. Des embryons au stade 4 cellules, au stade 7 ou au stade 9, sont traités par SB (SB), ou injectés par Lefty. Les embryons sont ensuite analysés au début de la gastrulation pour l'expression de *sox17a*, *Xbra*, *goosecoid* et *foxl1e*, par hybridation in situ (BC1A) et par RT-qPCR (BC1B). (DMSO): Embryon témoin en début de gastrulation. Les chiffres indiquent le nombre d'animaux ayant le phénotype montré sur la figure/nombre d'animaux expérimentaux total. (*) : Significativement différent du témoin.

Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour étudier l'accumulation de *smad2* et de *smad2* phosphorylé (P-*smad2*) (Figure BC 2).

Question BC3. Les résultats de la Figure BC2 eVous suggèrent fortement une information nouvelle (par rapport aux connaissances acquises en cours) pour vous, laquelle? A partir de ces résultats, pouvez-vous conclure sur la période où la signalisation Nodal serait nécessaire à la mise en place du mésendoderme (endoderme+mésoderme) ? Dans le cas affirmatif, précisez cette période.(2)

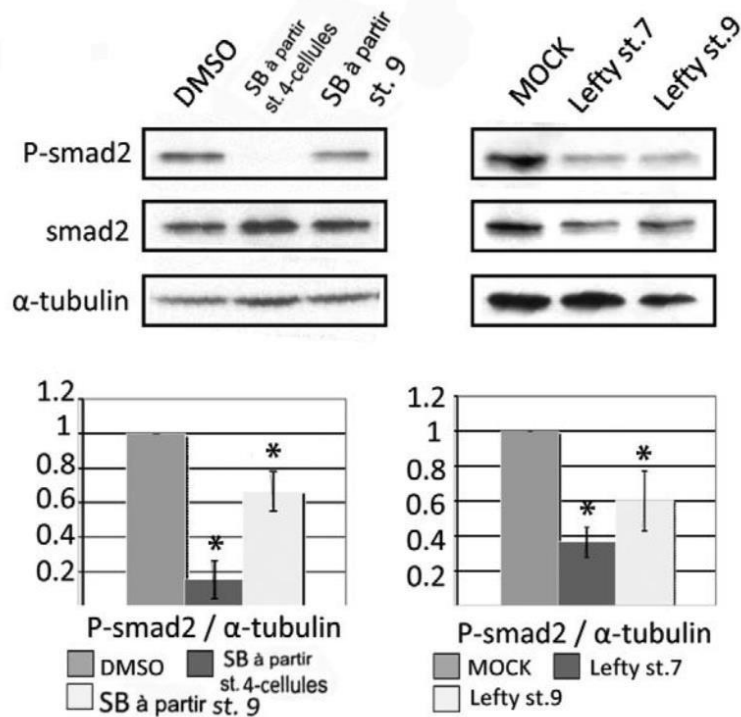


Figure BC2. Les mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC1** sont soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2). Des données semi-quantitatives sont présentées sous les Western blots. (α -tubulin) :Témoin d'homogénéité. (DMSO et MOCK) : Embryon témoin. . (*) : Significativement différent du témoin.

Les embryons sont maintenant traités par SB à partir du stade 9, du stade 10 ou du stade 11 (gastrula moyenne). Ces embryons sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade jeune neurula pour l'expression de Xbra, goosecoid (à ce stade, goosecoid marque le mésoderme préchordal) et de Xnot-2, un marqueur du chordomésoderme (**Figure BC3 A**). Au stade gastrula âgée (stade 12) les embryons sont sectionnés et l'accumulation des transcrits Xlim-1 (un marqueur du chordomésoderme) et de sox2 (un marqueur du tissu nerveux) est analysée par hybridation in situ (**Figure BC3 B**). Au stade bourgeon caudal tardif les embryons sont analysés par immunohistochimie avec l'anticorps 12.101, qui reconnaît le muscle squelettique différencié, et l'anticorps MZ15, qui reconnaît la corde (**Figure BC3 C**).

Question BC4. Quelles informations vous amènent les résultats de la Figure BC3 en termes de mouvements de la gastrulation, formation de la corde, du tissu musculaire et du neurectoderme? (1)



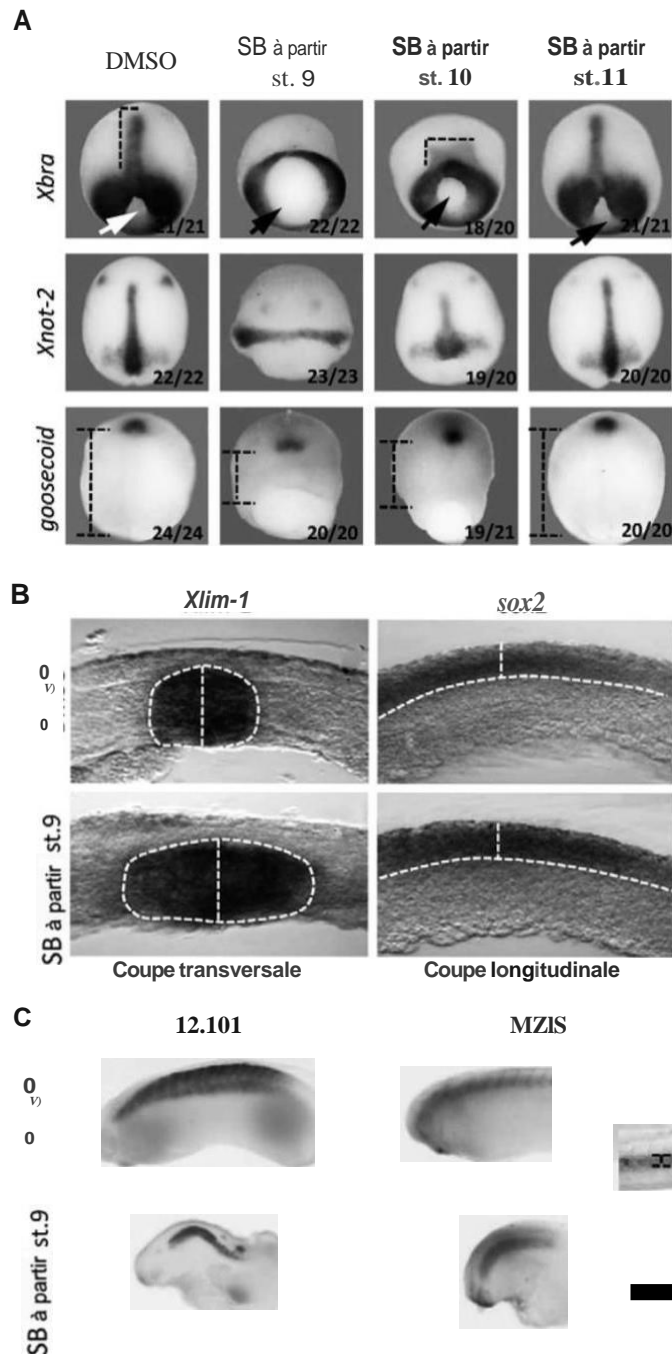


Figure BC3. Embryons traités par SB à partir du stade 9, du stade 10 ou du stade 11 puis analysés par hybridation in situ au stade jeune neurula pour l'expression de *Xbra*, *goosecoid* et de *Xnot-2*. Les flèches indiquent le bouchon vitellin. Les chiffres indiquent le nombre d'animaux ayant le phénotype montré sur la figure/nombre d'animaux expérimentaux total (**BC3 A**). Au stade gastrula âgée (stade 12) les embryons sont sectionnés et l'accumulation des transcrits *Xlim-1* et de *sox2* sont analysés par hybridation in situ (**BC3 B**). Au stade bourgeon caudal tardif, les embryons sont analysés par immunohistochimie avec l'anticorps 12.101 et l'anticorps MZ15. Une vue de détail pour le marquage avec MZ15 est indiqué dans l'encart (**BC3 C**). Les pointillés permettent de visualiser d'éventuelles modifications de dimension concernant certaines structures embryonnaires. (DMSO) : Embryon témoin.

Question BC5. L'ensemble de ces premiers résultats montent clairement des rôles séquentiels et indépendants de la signalisation Nodal au cours de l'embryogenèse : lesquels ? Expliquez de manière précise. (2)

Pour mieux comprendre l'implication de la signalisation Nodal dans la gastrulation, des embryons au stade 16 cellules sont injectés par 2,5 ng de rhodamine lysine dextran (RLDx) dans un blastomère animal dorsal. Les embryons sont ensuite traités par SB ou par du DMSO (témoin) à partir du stade 10. Les embryons sont ensuite photographiés au stade 10 et au stade 15 (neurula moyenne) pour visualiser l'évolution de la fluorescence (**Figure BC4 A gauche**). Le mésoderme axial des embryons précédents au stade 15 est prélevé et analysé au microscope à fluorescence pour bien visualiser le mouvement des cellules dérivant du blastomère injecté (**Figure BC4 A droite**). Des coupes sagittales sont ensuite réalisées au stade 12 (gastrula âgée), sur des embryons ayant subi le même traitement au SB que précédemment et ces coupes sont traitées à la phalloïdine marquée à la rhodamine (pout visualiser les microfilaments d'actine) puis analysées au microscope à fluorescence (**Figure BC4 B**). La taille des cellules mésodermiques axiales et ectodermiques est également mesurée (**Figure BC4 B**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) d'embryons au stade 10 sont ensuite mises en culture pendant 12h en présence de SB ou de la protéine Lefty et leur longueur mesurée (**Figure BC4 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine en présence ou non de SB, pendant 30 minutes ou 3h. La surface de l'explant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC4 D**).

Question BC6. En utilisant vos connaissances: 1/Pourquoi injecter de la rhodamine lysine dextran (RLDx) dans un blastomère animal dorsal ? Expliquez ; 2/Pourquoi les boîte de pétri sont recouvertes de fibronectine avant la mise en culture du mésoderme céphalique ? Expliquez. (2)

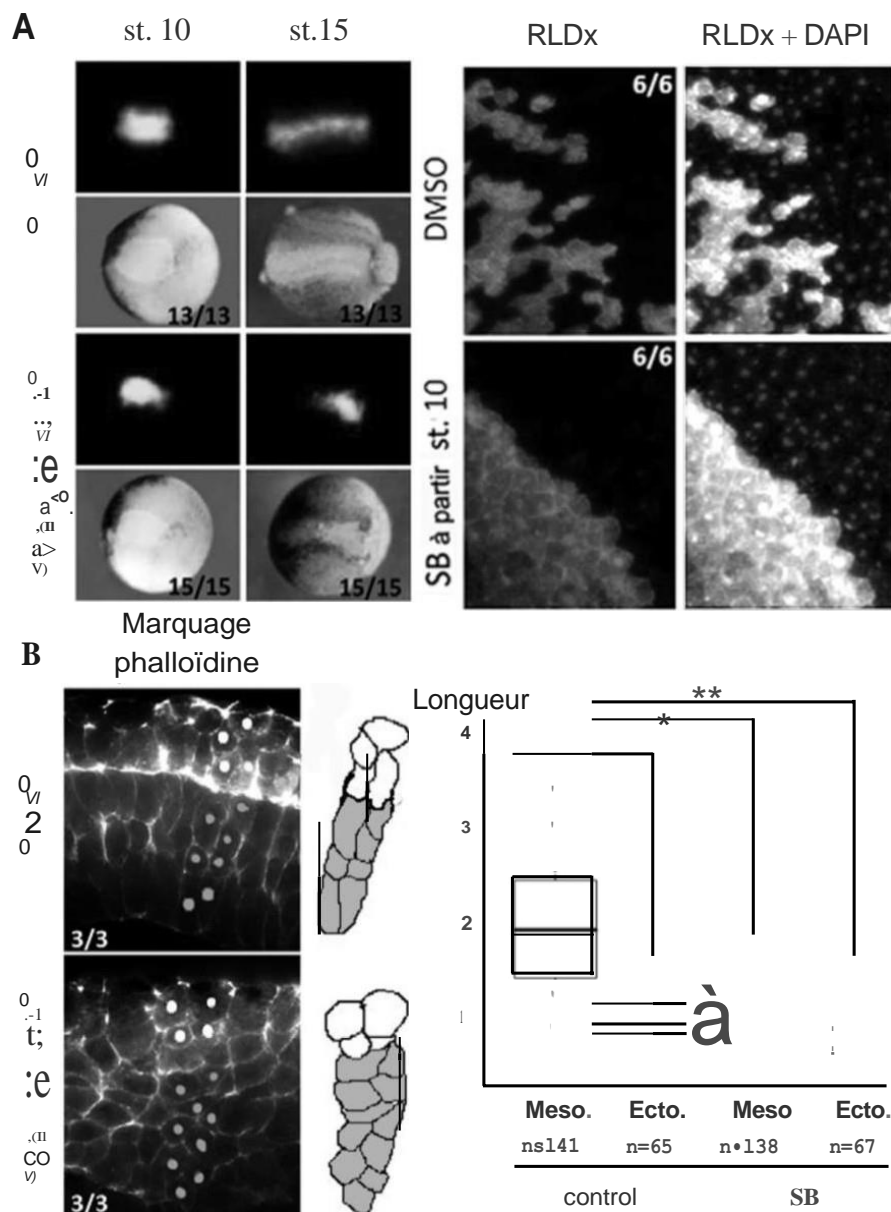


Figure BC4. Embryons au stade 16 cellules injectés par 2,5 ng de RLDx dans un blastomère animal dorsal. Les embryons sont traités par SB ou par du DMSO (témoin) à partir du stade 10. Les embryons sont ensuite photographiés en vue dorsale au stade 10 et au stade 15 pour visualiser l'évolution de la fluorescence : pour chaque stade, une image est prise en fond clair (bas) et une seconde permettant de visualiser la fluorescence (haut) (**BC4 A gauche**). Le mésoderme axial des embryons précédents au stade 15 est prélevé et analysé au microscope à fluorescence pour bien visualiser le mouvement des cellules dérivant du blastomère injecté (**BC4 A droite**). Des coupes sagittales sont ensuite réalisées au stade 12, sur des embryons ayant subi le même traitement au SB que précédemment et ces coupes sont traitées à la phalloïdine marquée à la rhodamine puis analysées au microscope à fluorescence. Les cellules mésodermiques axiales sont indiquées en gris et les cellules ectodermiques en blanc. Les points clairs dans les cellules permettent de bien visualiser les cellules schématisées à côté (**BC4 B**). La taille des cellules mésodermiques axiales (Meso.) et ectodermiques (Ecto.) est également mesurée (**BC4 B**). (**): Significativement différent du témoin (control). (n): nombre d'échantillons mesurés.

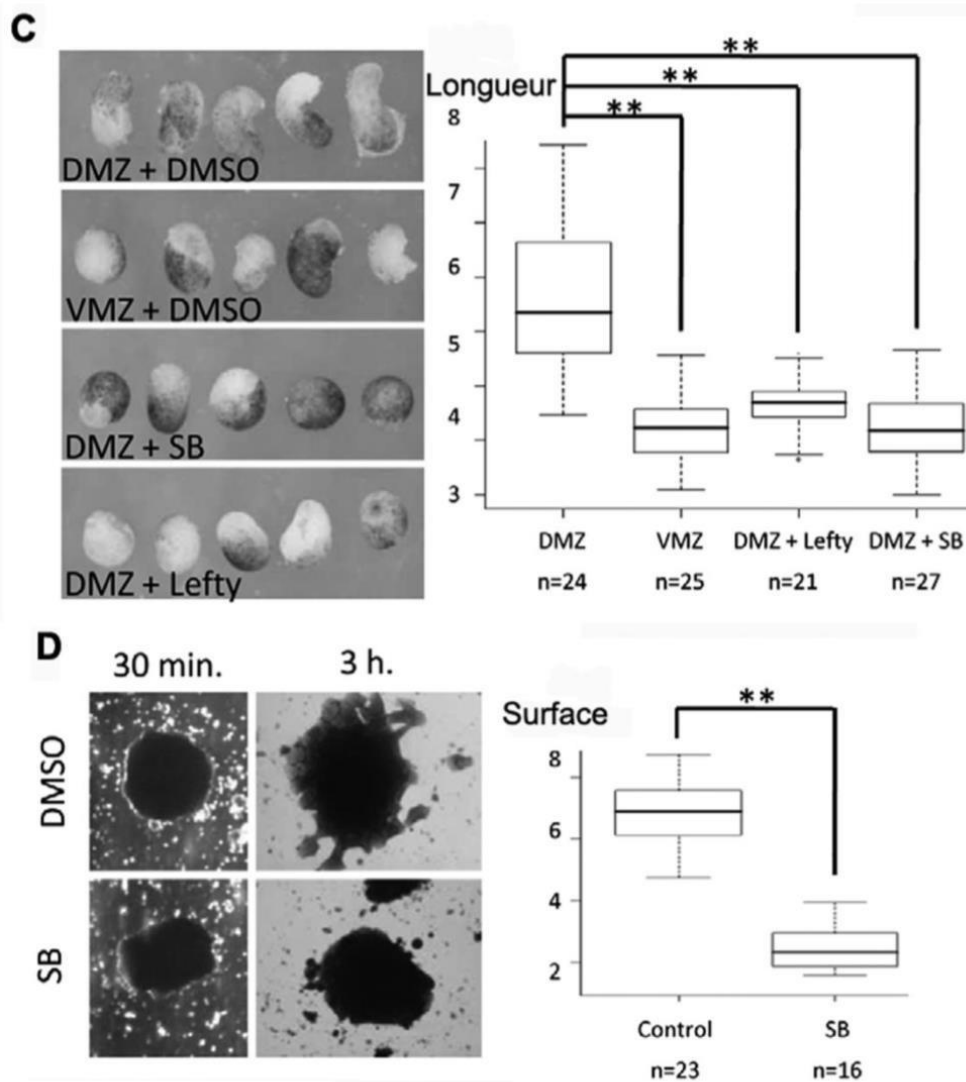


Figure BC4. Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) d'embryons au stade 10 sont ensuite mises en culture pendant 12h en présence de SB ou de la protéine Lefty et leur longueur mesurée (**BC4 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine en présence ou non de SB, pendant 30 minutes ou 3h. La surface de l'explant est mesurée après 3h de culture (**BC4 D**). (**): Significativement différent. (n) : nombre d'échantillons mesurés.

Question BC7. En vous basant sur vos connaissances des mouvements de la gastrulation et des résultats de la Figure BC4, que pouvez-vous conclure concernant l'implication de la signalisation Nodal dans ces mouvements ? : (2)

Au cours de l'embryogenèse du xénope, des analyses par RT-qPCR ont montré que Xnr5 et Xnr6, deux membres de la famille Nodal, commencent à s'exprimer juste avant la transition blastuléenne alors que Xnr1 et Xnr2 commencent à s'accumuler un peu plus tard, juste après la transition blastuénne et ont une expression maximale au stade 10 alors que l'accumulation de Xnr5 et Xnr6 disparaît à la gastrulation.

Des stratégies antisens avec des oligomorpholigos sont alors utilisées pour étudier la fonction précise de Xnr5 et Xnr6 lors de l'embryogenèse précoce. Des oligomorpholinos antisens Xnr5 (Xnr5 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr6 (Xnr6 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au stade 10 sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes (**Figure BC5 A**). Dans cette expérience, l'injection concomitante de Xnr5+6 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi réalisée. Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2) (**Figure BC5 B**).

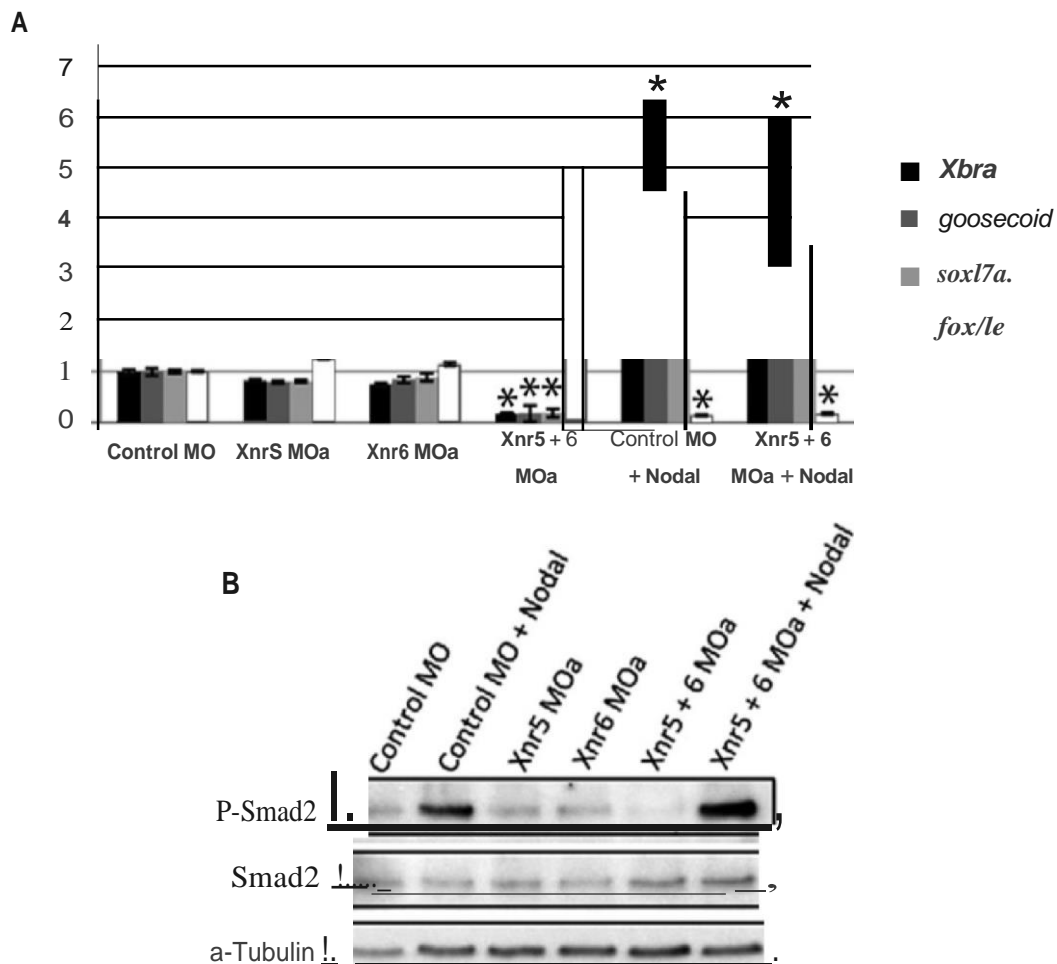


Figure BCS. Des oligomorpholinos antisens XnrS (XnrS MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr6 (Xnr6 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. L'injection concomitante de Xnr5 MOa+Xnr6 MOa (Xnr5+6 MOa) avec un cocktail de protéines Nodal est aussi réalisée. Les embryons au stade 10 sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes (**BCS A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2) (**BCS B**). (Contra MO): Témoin. (a-tubulin) : Témoin d'homogénéité. (*): Significativement différent du témoin.

Question BC8. D'après les connaissances acquises en cours, définissez et expliquez le mode de fonctionnement d'un oligomorpholinos antisens dans ce type d'expériences: (1)



Question BC9. A partir des résultats de la Figure BC5, que pouvez-vous dire sur le rôle de Xnr5 et Xnr6 ? (2)



Des stratégies antisens avec des oligomorpholinos sont également utilisées pour étudier la fonction précise de Xnr1 et Xnr2 lors de l'embryogenèse précoce. Des oligomorpholinos antisens Xnr1 (Xnr1 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr2 (Xnr2 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes du mésendoderme (**Figure BC6 A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade 15 pour l'expression de Xbra, goosecoïd et de Xnot-2 (**Figure BC6 B**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) des mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC 6A** au stade 10, sont ensuite mises en culture pendant 12h et leur longueur mesurée (**Figure BC6 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 de ces mêmes embryons expérimentaux et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine, pendant 3h. La surface de l'explant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC6 D**). L'injection concomitante de Xnr1+2 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté dans les **Figures BC6 C-D**.

Suite →

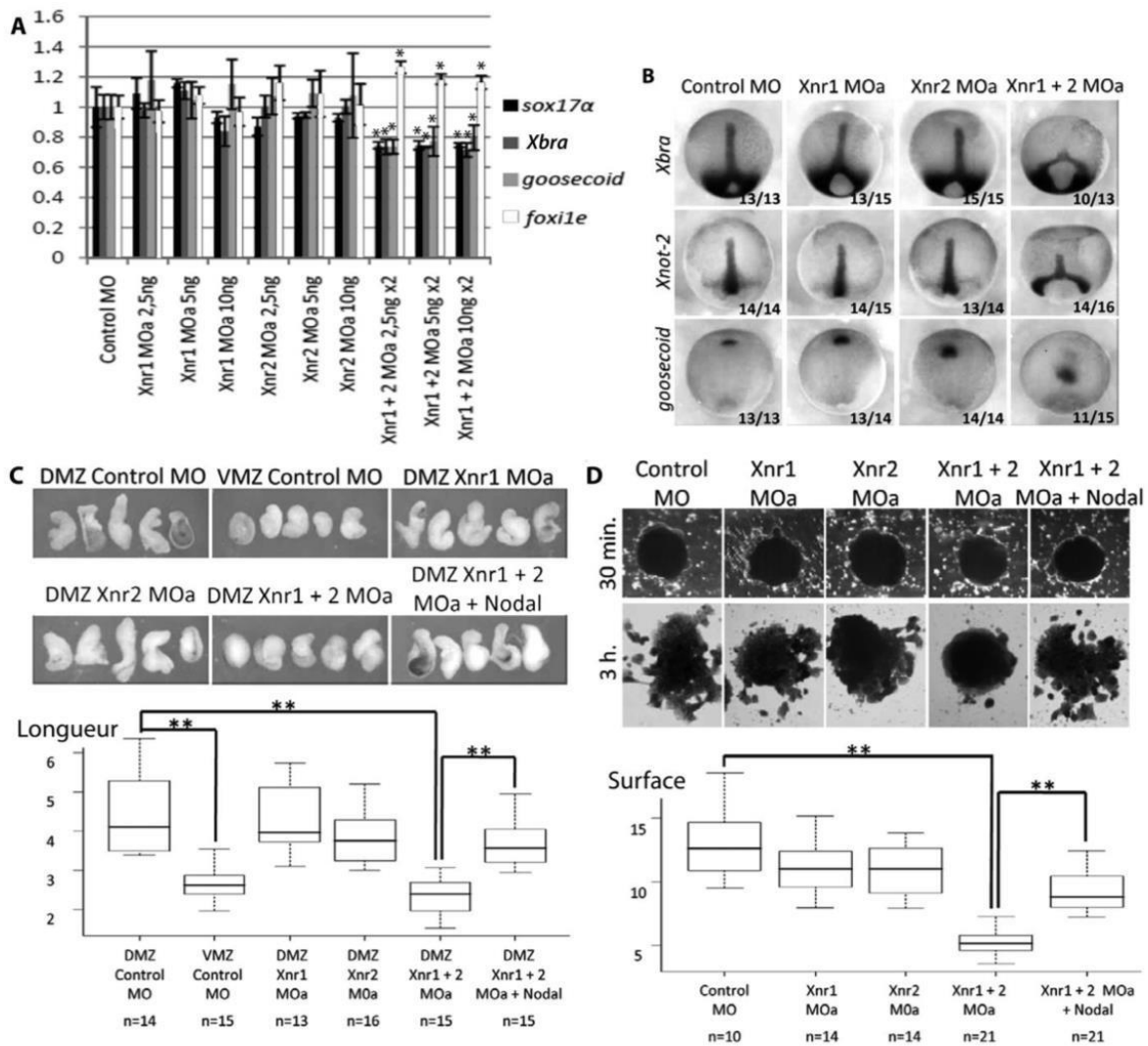


Figure BC6. Des oligomorpholinos antisens Xnr1 (Xnr1 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr2 (Xnr2 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes du mésendoderme (**Figure BC6 A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade 15 pour l'expression de *Xbra*, *goosecoid* et de *Xnot-2* (**Figure BC6 B**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) des mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC 6A** au stade 10, sont ensuite mises en culture pendant 12h et leur longueur mesurée (**Figure BC6 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 de ces mêmes embryons expérimentaux et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine, pendant 3h. La surface de l'explant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC6 D**). L'injection concomitante de Xnr1+2 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté dans les **Figures BC6 C-D** (Xnr1+2 MOa +Nodal). (Control MO): Témoin. (**): Significativement différent. (n) : nombre d'échantillons mesurés.

Question BC10. A partir des résultats de la **Figure BC6**, que pouvez-vous dire sur le rôle de Xnr1 et Xnr2 ? Le rôle de Xnr1 et Xnr2 est-il le même que celui de Xnr5 et Xnr6 au cours de l'embryogenèse du xénope ? Expliquez. (2)



L'expression de gènes (*rnd1*, *has2*, *papc*, *camello* et *pdgfra*) impliqués dans les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation est maintenant étudiée. Tous ces gènes sont exprimés dans le mésendoderme en cours d'invagination et sont plus fortement exprimés dans la région dorsale au début de la gastrulation. Les embryons sont injectés par la protéine recombinante Lefty au stade 9 et analysés au stade 12 pour l'expression de ces gènes par hybridation in situ (**Figure BC7 A**). Des combinaisons différentes des oligomorpholinos antisens *Xnr1* (*Xnr1* MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens *Xnr2* (*Xnr2* MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression des gènes ci-dessus (**Figure BC7 B**). Dans une dernière expérience, des calottes animales de blastula sont prélevées et mises en culture en présence de cycloheximide, de Nodal ou de cycloheximide+Nodal, et des analyses par RT-qPCR sont réalisées (**Figure BC7 C**).

Question BC11. Quelles informations amènent les résultats de la figure BC7 quand à l'implication de *Xnr1* et *Xnr2* dans l'expression des gènes étudiés ? (1)



Question BC12. A partir de l'ensemble de ces travaux, résumez de manière synthétique et précise le rôle des différents membres de la famille Nodal analysés, lors de l'embryogenèse du xénope. (1)

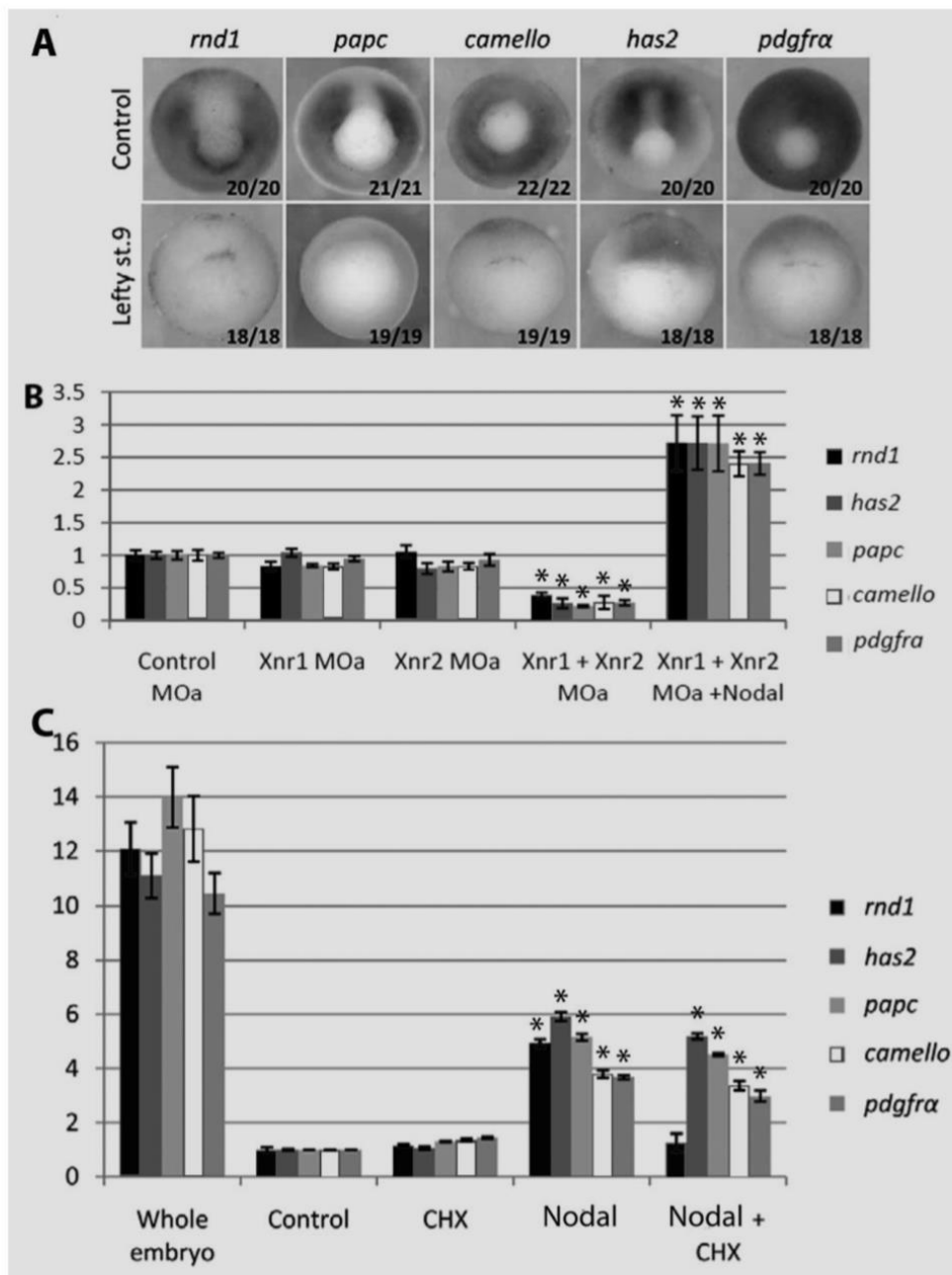


Figure BC7. Etude de l'expression de gènes (*rnd1*, *has2*, *papc*, *camello* et *pdgfra*) impliqués dans les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation. Les embryons sont injectés par la protéine recombinante Lefty au stade 9 et analysés au stade 12 pour l'expression de ces gènes par hybridation in situ (**BC7 A**). (Control): Embryon témoin (**BC7 A**). Des combinaisons différentes des oligomorpholinos antisens Xnr1 (Xnr1 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr2 (Xnr2 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression des gènes ci-dessus (**BC7 B**). L'injection concomitante de Xnr1+2 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté (**BC7 B**). (Control MOa) : Embryon témoin (**BC7 B**). Des calottes animales de blastula sont prélevées et mises en culture

en présence de cycloheximide (CHX), de Nodal ou de cycloheximide+Nodal, et des analyses par RT-qPCR sont réalisées **(BC7 C)**. (Whole embryo): Embryon témoin. (Contra): Calotte animale témoin. (*) : Significativement différent par rapport au (Contra).

FIN



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2018-2019

Session 1 – S4
Correction

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

UE 4-02

ÉPREUVE DE
Bases Cellulaires et Moléculaires du
Développement

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Au cours de l'embryogenèse, les protéines de la famille Nodal jouent un rôle important dans la mise en place des feuillets embryonnaires et de la gastrulation. L'objectif de cette étude est de préciser leur fonction chez le xénope.

Question 1. D'après les connaissances acquises en cours, chez le xénope, que pouvez-vous dire des protéines de la famille Nodal ? : A quelle famille appartiennent-elles ? Quels sont leurs profils et domaine d'expression au cours de l'embryogenèse ? Quel est leur rôle et comment a-t-il été mis en évidence ? (2)

Les protéines de la famille Nodal (Xnrs) font partie de la superfamille des TGF/3. Chez le xénope, leur expression est zygotique: ils s'expriment après la TB, suivant un gradient croissant ventro-dorsal dans l'hémisphère végétatif (endoderme). Ils sont nécessaires et suffisants à l'induction du mésoderme au niveau de la zone marginale. Dans des expériences de sandwich, si un œuf est injecté par cerberus-short et que l'endoderme de la blastula est associé à de l'ectoderme témoin, il n'y a pas d'induction de mésoderme

Dans une première expérience, les embryons au stade 4 cellules, au stade 7 (avant la transition blastuléenne) ou au stade 9 (2h avant le début de la gastrulation (stade 10)), sont traités par un inhibiteur pharmacologique des récepteurs aux protéines Nodal, nommé SB-505124 (SB), ou injectés par la protéine recombinante Letty, un antagoniste des protéines Nodal mais pas de l'activine. Les embryons sont ensuite analysés au début de la gastrulation pour l'expression de sox17a, un marqueur de l'endoderme, pour foxl1e, un marqueur ectodermique, et pour Xbra et goosecoid, par hybridation in situ (**Figure BC1A**) et par RT-qPCR (**Figure BC1B**)

Question BC2. Quelles informations vous amènent les résultats de la Figure BC1 sur l'implication de l'inhibition de la voie de signalisation Nodal au cours de l'embryogenèse, sur l'expression des gènes ectodermique, mésodermiques et endodermique analysés ? (2)

L'inhibition de de la voie de signalisation Nodal aux stades précoces de la segmentation (avant le stade 9) entraîne une chute de l'expression des marqueurs endodermiques et mésodermiques étudiés et une surexpression du marqueur ectodermique

Suite

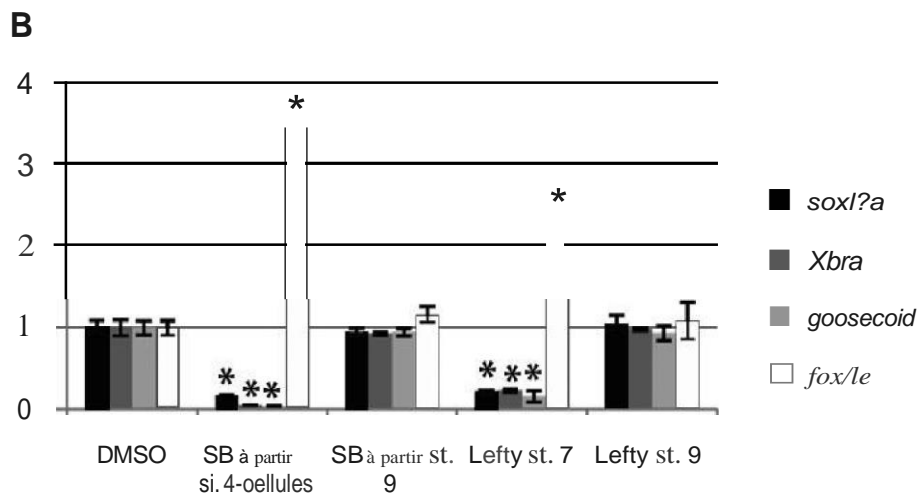
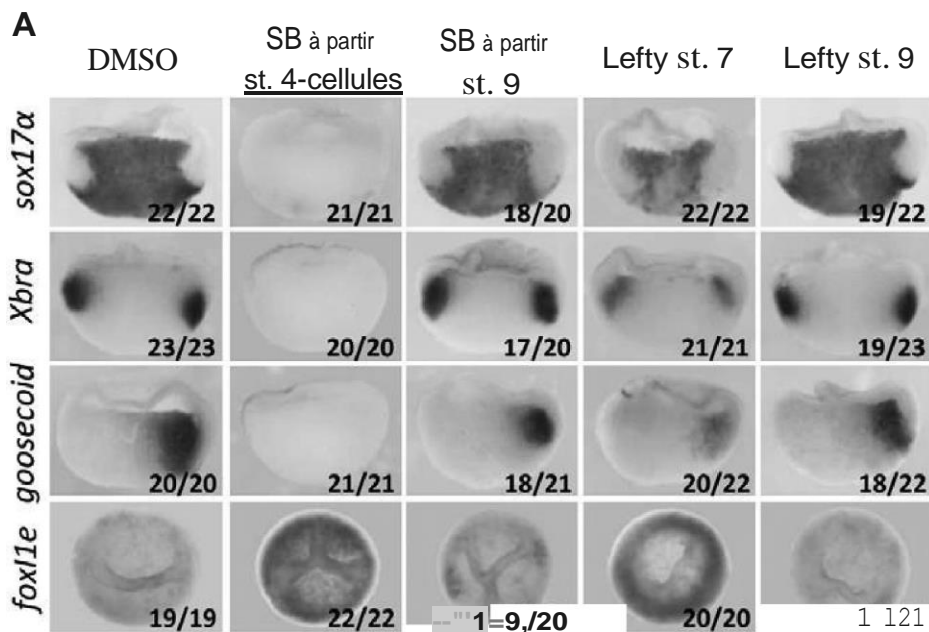


Figure BC1. Des embryons au stade 4 cellules, au stade 7 ou au stade 9, sont traités par SB (SB), ou injectés par Lefty. Les embryons sont ensuite analysés au début de la gastrulation pour l'expression de *sox17a*, *Xbra*, *goosecoid* et *foxl1e*, par hybridation in situ (**BC1A**) et par RT-qPCR (**BC1B**). (DMSO): Embryon témoin en début de gastrulation. Les chiffres indiquent le nombre d'animaux ayant le phénotype montré sur la figure/nombre d'animaux expérimentaux total. (*) : Significativement différent du témoin.

Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour étudier l'accumulation de *smad2* et de *smad2* phosphorylé (P-*smad2*) (**Figure BC 2**).

Question BC3. Les résultats de la Figure BC2 et vous la comparaison de ces résultats avec ceux de la Figure BC1, vous donnent-ils suggèrent fortement une information nouvelle (par rapport aux connaissances acquises en cours) pour vous, laquelle? A partir de ces résultats, pouvez-vous conclure sur la période où la signalisation Nodal serait nécessaire à la mise en place du mésendoderme (endoderme+mésoderme) ? Dans le cas affirmatif, précisez cette période.(2)

La signalisation Nodal pourrait être active avant la transition blastulienne comme le suggère la chute de P-smad2 après traitement par SB au stade 4.
 La période où la signalisation Nodal est nécessaire à la mise en place du mésendoderme se termine environ 2 heures avant le début de la gastrulation

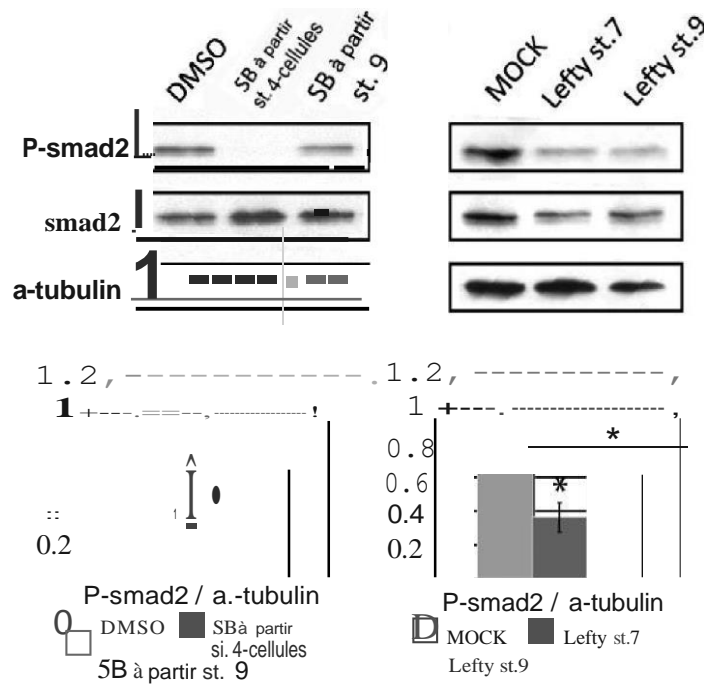


Figure BC2. Les mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC1** sont soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2). Des données semi-quantitatives sont présentées sous les Western blots. (a-tubulin) :Témoin d'homogénéité. (DMSO et MOCK) : Embryon témoin.. (*) : Significativement différent du témoin.

Les embryons sont maintenant traités par SB à partir du stade 9, du stade 10 ou du stade 11 (gastrula moyenne). Ces embryons sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade jeune neurula pour l'expression de Xbra, goosecoid (à ce stade, goosecoid marque le mésoderme préchordal) et de Xnot-2, un marqueur du chordomésoderme (**Figure BC3 A**). Au stade gastrula âgée (stade 12) les embryons sont sectionnés et l'accumulation des transcrits Xlim-1 (un marqueur du chordomésoderme) et de sox2 (un marqueur du tissu nerveux) est analysée par hybridation in situ (**Figure BC3 B**). Au stade bourgeon caudal tardif les embryons sont analysés par immunohistochimie avec l'anticorps 12.101, qui reconnaît le muscle squelettique différencié, et l'anticorps MZ15, qui reconnaît la corde (**Figure BC3 C**).

Question BC4. Quelles informations vous amènent les résultats de la Figure BC3 en termes de mouvements de la gastrulation, formation de la corde, du tissu musculaire et du neurectoderme? (1)

Les embryons expérimentaux montrent un défaut de fermeture du blastopore au stade jeune neurula après traitement par SB aux stades 9 et 10 (mais pas 11) : ce traitement entraîne une corde plus courte et plus large suggérant une perturbation des mouvements de migration et d'extension/convergence. La mise en place du tissu neural n'est pas affectée par l'inhibition de la voie Nodal. De même, cette inhibition n'empêche pas la formation du tissu musculaire

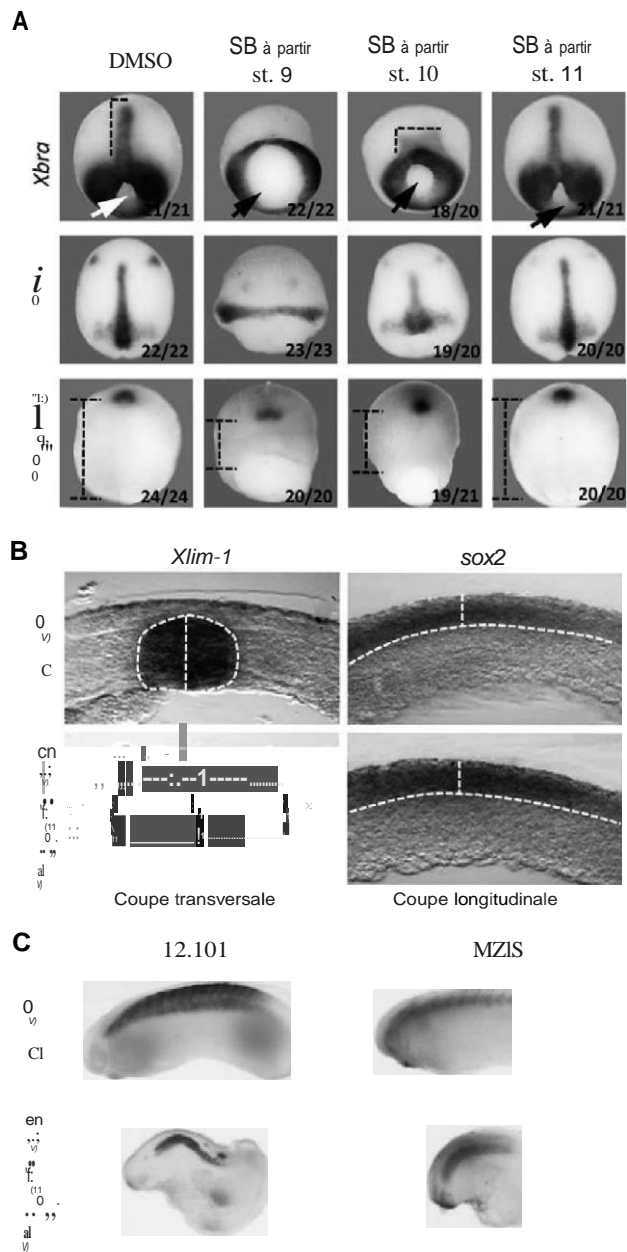


Figure BC3. Embryons traités par SB à partir du stade 9, du stade 10 ou du stade 11 puis analysés par hybridation in situ au stade jeune neurula pour l'expression de *Xbra*, *goosecoid* et de *Xnot-2*. Les flèches indiquent le bouchon vitellin. Les chiffres indiquent le nombre d'animaux ayant le phénotype montré sur la figure/nombre d'animaux expérimentaux total (**BC3 A**). Au stade gastrula âgée (stade 12) les embryons sont sectionnés et l'accumulation des transcrits *Xlim-1* et de *sox2* sont analysés par hybridation in situ (**BC3 B**). Au stade bourgeon caudal tardif, les embryons sont analysés par immunohistochimie avec l'anticorps 12.101 et l'anticorps MZ15. Une vue de détail pour le marquage avec MZ15 est indiqué dans l'encart (**BC3 C**). Les pointillés permettent de visualiser d'éventuelles modifications de dimension concernant certaines structures embryonnaires. (DMSO) : Embryon témoin.

Question BCS. L'ensemble de ces premiers résultats montrent clairement des rôles séquentiels et indépendants de la signalisation Nodal au cours de l'embryogenèse : lesquels ? Expliquez de manière précise. (2)

La signalisation Nodal est nécessaire à la gastrulation indépendamment de son implication précoce dans l'induction du mésendoderme : elle pourrait réguler les mouvements d'extension-convergence du chordomésoderme au cours de la gastrulation

Pour mieux comprendre l'implication de la signalisation Nodal dans la gastrulation, des embryons au stade 16 cellules sont injectés par 2,5 ng de rhodamine lysine dextran (RLDx) dans un blastomère animal dorsal. Les embryons sont ensuite traités par SB ou par du DMSO (témoin) à partir du stade 10. Les embryons sont ensuite photographiés au stade 10 et au stade 15 (neurula moyenne) pour visualiser l'évolution de la fluorescence (**Figure BC4 A gauche**). Le mésoderme axial des embryons précédents au stade 15 est prélevé et analysé au microscope à fluorescence pour bien visualiser le mouvement des cellules dérivant du blastomère injecté (**Figure BC4 A droite**). Des coupes sagittales sont ensuite réalisées au stade 12 (gastrula âgée), sur des embryons ayant subi le même traitement au SB que précédemment et ces coupes sont traitées à la phalloïdine marquée à la rhodamine (pour visualiser les microfilaments d'actine) puis analysées au microscope à fluorescence (**Figure BC4 B**). La taille des cellules mésodermiques axiales et ectodermiques est également mesurée (**Figure BC4 B**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) d'embryons au stade 10 sont ensuite mises en culture pendant 12h en présence de SB ou de la protéine Lefty et leur longueur mesurée (**Figure BC4 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine en présence ou non de SB, pendant 30 minutes ou 3h. La surface de l'expiant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC4 D**).

Question BC6. En utilisant vos connaissances: 1/Pourquoi injecter de la rhodamine lysine dextran (RLDx) dans un blastomère animal dorsal ? Expliquez ; 2/Pourquoi les boîtes de pétri sont recouvertes de fibronectine avant la mise en culture du mésoderme céphalique ? Expliquez. (2)

L'injection de la rhodamine lysine dextran (RLDx) dans un blastomère animal dorsal permet de suivre le devenir de ce blastomère car le dextran ne sort pas de la cellule où il est injecté : on peut donc visualiser les blastomères dérivant du blastomère injecté, qui sont fluorescents.

La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire qui favorise l'adhésion des cellules mises en culture dans la boîte de pétri.

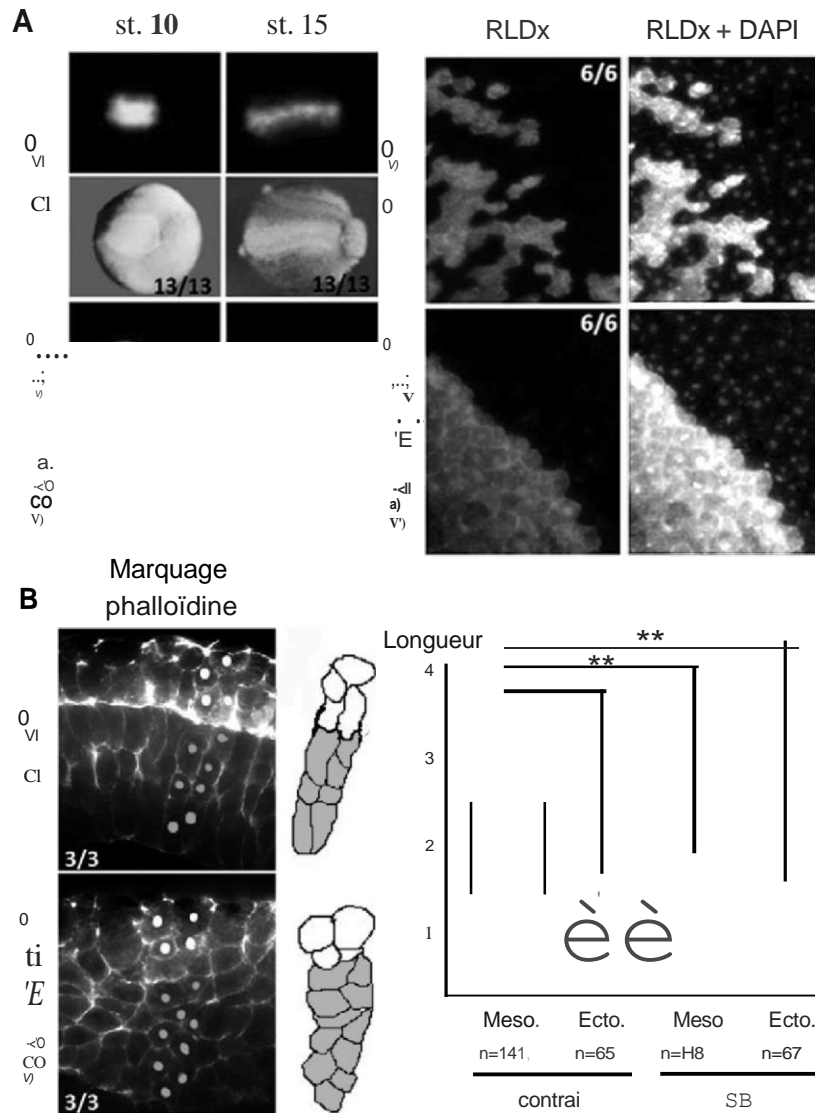


Figure BC4. Embryons au stade 16 cellules injectées par 2,5 ng de RLDx dans un blastomère animal dorsal. Les embryons sont traités par SB ou par du DMSO (témoin) à partir du stade 10. Les embryons sont ensuite photographiés en vue dorsale au stade 10 et au stade 15 pour visualiser l'évolution de la fluorescence : pour chaque stade, une image est prise en fond clair (bas) et une seconde permettant de visualiser la fluorescence (haut) (**BC4 A gauche**). Le mésoderme axial des embryons précédents au stade 15 est prélevé et analysé au microscope à fluorescence pour bien visualiser le mouvement des cellules dérivant du blastomère injecté (**BC4 A droite**). Des coupes sagittales sont ensuite réalisées au stade 12, sur des embryons ayant subi le même traitement au SB que précédemment et ces coupes sont traitées à la phalloïdine marquée à la rhodamine puis analysées au microscope à fluorescence. Les cellules mésodermiques axiales sont indiquées en gris et les cellules ectodermiques en blanc. Les points clairs dans les cellules permettent de bien visualiser les cellules schématisées à côté (**BC4 B**). La taille des cellules mésodermiques axiales (Meso.) et ectodermiques (Ecto.) est également mesurée (**BC4 B**). (**): Significativement différent du témoin (contrai). (n) : nombre d'échantillons mesurés.

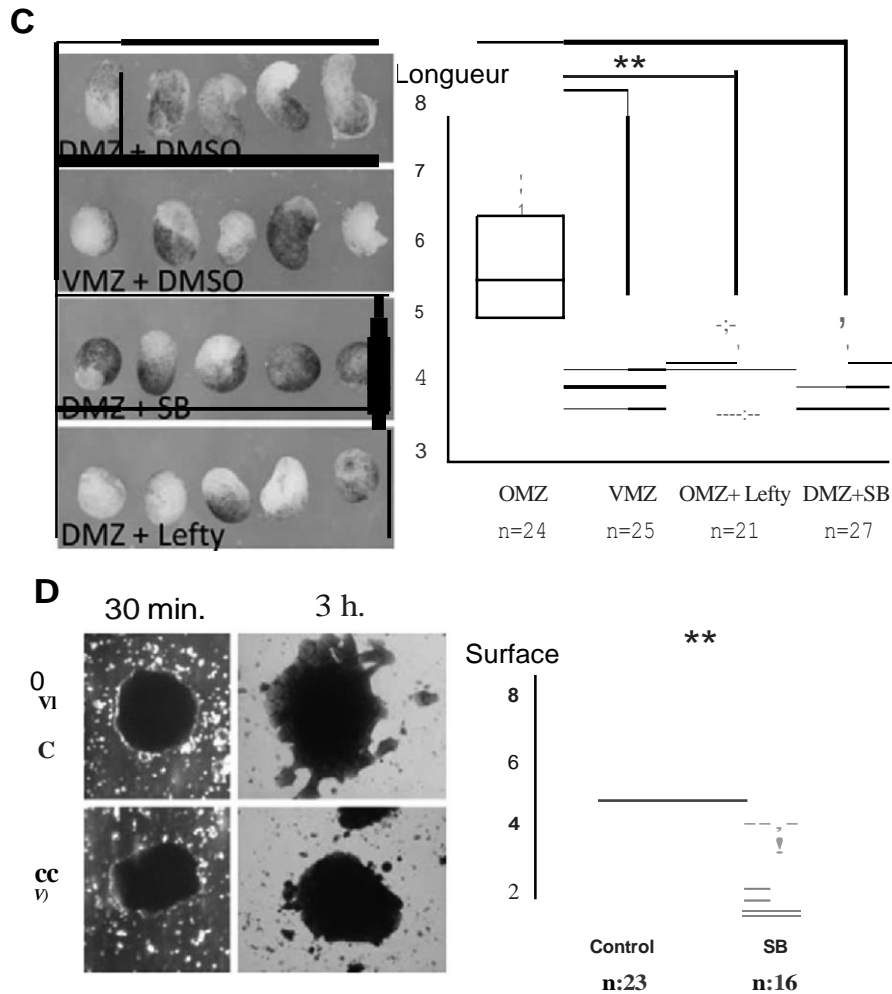


Figure BC4. Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) d'embryons au stade 10 sont ensuite mises en culture pendant 12h en présence de SB ou de la protéine Lefty et leur longueur mesurée (**BC4 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine en présence ou non de SB, pendant 30 minutes ou 3h. La surface de l'expiant est mesurée après 3h de culture (**BC4 D**). (**): Significativement différent. (n) : nombre d'échantillons mesurés.

Question BC7. En vous basant sur vos connaissances des mouvements de la gastrulation et des résultats de la Figure BC4, que pouvez-vous conclure concernant l'implication de la signalisation Nodal dans ces mouvements ? : (2)

La signalisation Nodal est nécessaire à l'élongation rostro-caudale du mésoderme axial au cours de la gastrulation et nécessaire aux mouvements d'extension/convergence au cours de la gastrulation

Au cours de l'embryogenèse du xénope, des analyses par RT-qPCR ont montré que Xnr5 et Xnr6, deux membres de la famille Nodal, commencent à s'exprimer juste avant la transition blastulienne alors que Xnr1 et Xnr2 commencent à s'accumuler un peu plus tard, juste après la transition blastulienne et ont une expression maximale au stade 10 alors que l'accumulation de Xnr5 et Xnr6 disparaît à la gastrulation.

Des stratégies antisens avec des oligomorpholigos sont alors utilisées pour étudier la fonction précise de Xnr5 et Xnr6 lors de l'embryogenèse précoce. Des oligomorpholinos antisens Xnr5 (Xnr5 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr6 (Xnr6 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au stade 10 sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes (**Figure BC5 A**). Dans cette expérience, l'injection concomitante de Xnr5+6 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi réalisée. Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2) (**Figure BC5 B**).

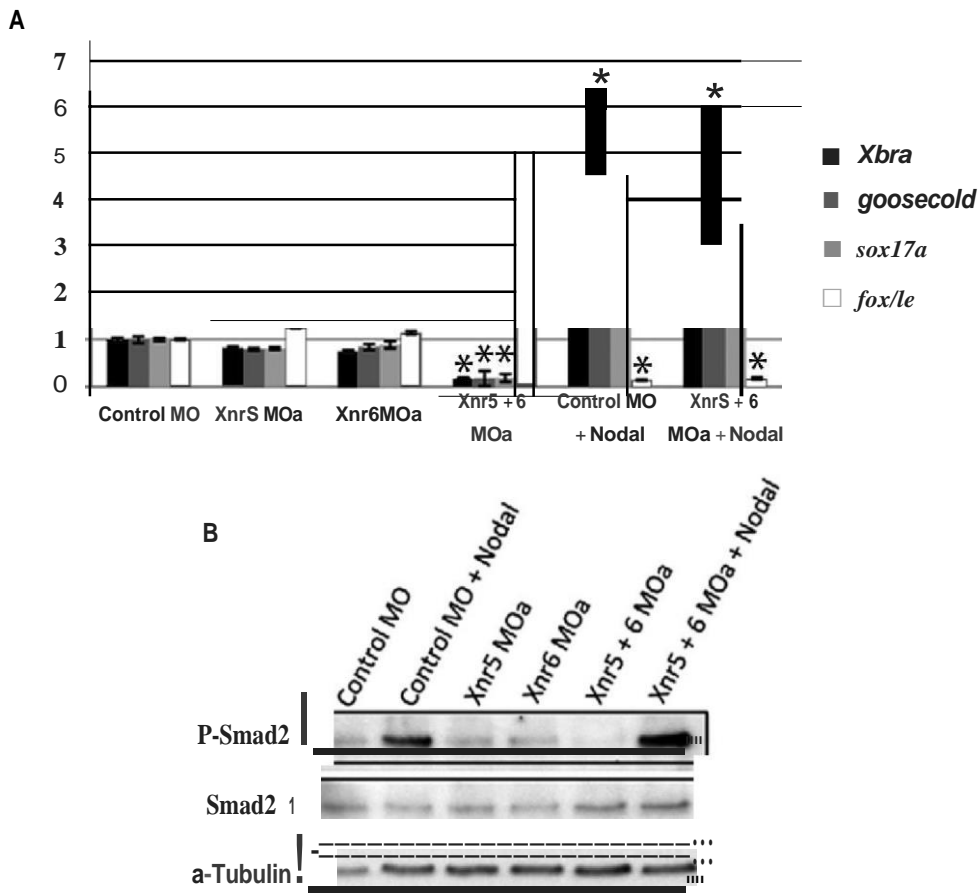


Figure BC5. Des oligomorpholinos antisens Xnr5 (Xnr5 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr6 (Xnr6 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. L'injection concomitante de Xnr5 MOa+Xnr6 MOa (Xnr5+6 MOa) avec un cocktail de protéines Nodal est aussi réalisée. Les embryons au stade 10 sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes (**BC5 A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite soumis à une analyse en Western blot pour l'accumulation de smad2 et de smad2 phosphorylé (P-smad2) (**BC5 B**). (Contra MO): Témoin. (a-tubulin) : Témoin d'homogénéité. (*) : Significativement différent du témoin.

Question BC8. D'après les connaissances acquises en cours, définissez et expliquez le mode de fonctionnement d'un oligomorpholinos antisens dans ce type d'expériences: (1)

L'oligomorpholino antisens est une séquence nucléotidique chimiquement modifiée pour être très stable: injecté, il se fixe à l'ARNm dont il est complémentaire et bloque la traduction : on peut donc étudier le développement embryonnaire sans la protéine: c'est une stratégie de perte de fonction.

Question BC9. A partir des résultats de la Figure BCS, que pouvez-vous dire sur le rôle de Xnr5 et Xnr6 ? (2)

L'induction des gènes mésendodermiques étudiés est dépendantes des fonctions redondantes de Xnr5 et Xnr6. La surexpression de Nodal est capable de contrecarrer l'action de Xnr5=Xnr6 MO

Des stratégies antisens avec des oligomorpholinos sont également utilisées pour étudier la fonction précise de Xnr1 et Xnr2 lors de l'embryogenèse précoce. Des oligomorpholinos antisens Xnr1 (Xnr1 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr2 (Xnr2 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes du mésendoderme (**Figure BC6 A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade 15 pour l'expression de Xbra, goosecoid et de Xnot-2 (**Figure BC6 8**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) des mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC 6A** au stade 10, sont ensuite mises en culture pendant 12h et leur longueur mesurée (**Figure BC6 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 de ces mêmes embryons expérimentaux et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine, pendant 3h. La surface de l'expiant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC6 D**). L'injection concomitante de Xnr1+2 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté dans les **Figures BC6 C-D**.

Suite

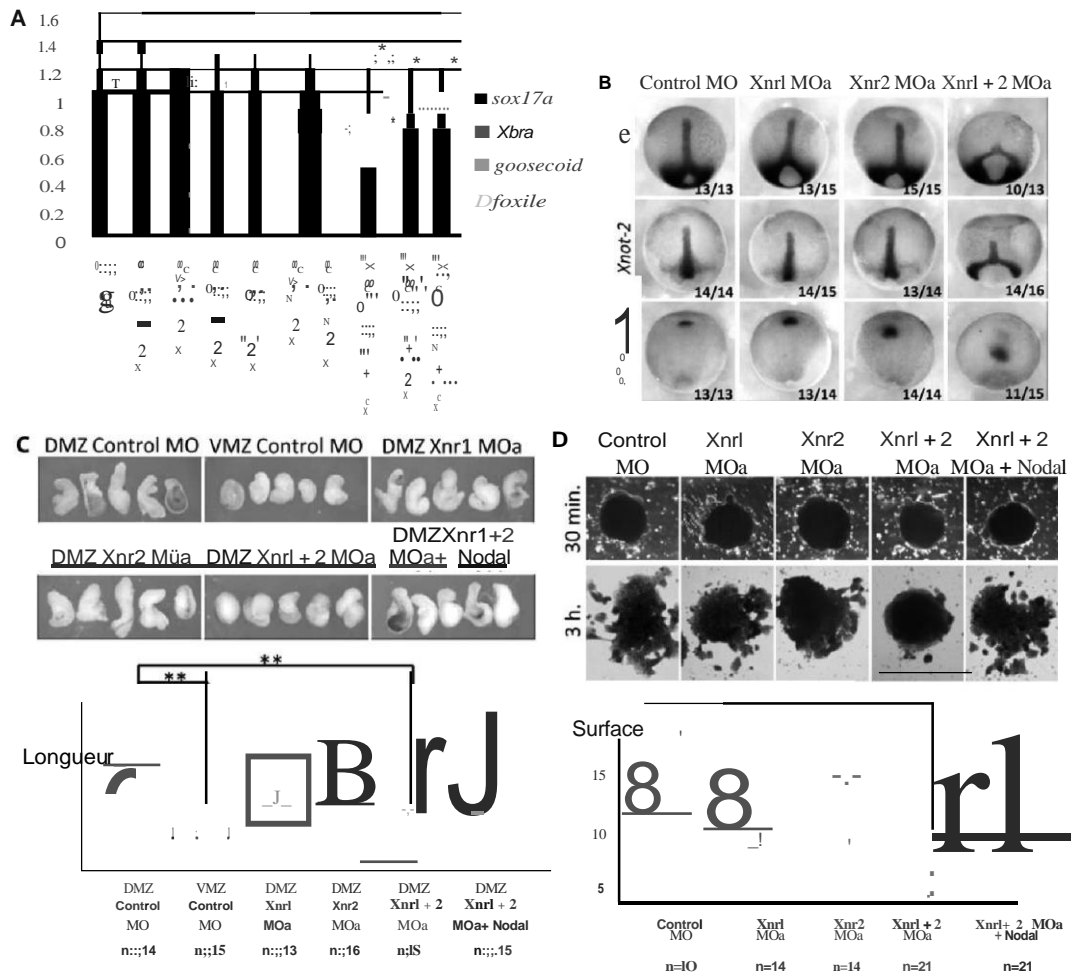


Figure BC6. Des oligomorpholinos antisens Xnr1 (Xnr1 MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens Xnr2 (Xnr2 MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression de plusieurs gènes du mésendoderme (**Figure BC6 A**). Les mêmes embryons expérimentaux sont ensuite analysés par hybridation in situ au stade 15 pour l'expression de Xbra, gooseoid et de Xnot-2 (**Figure BC6 B**). Des zones marginales dorsales (DMZ) et des zones marginales ventrales (VMZ) des mêmes embryons expérimentaux qu'à la **Figure BC 6A** au stade 10, sont ensuite mises en culture pendant 12h et leur longueur mesurée (**Figure BC6 C**). Du mésoderme céphalique est ensuite prélevé au stade 11 de ces mêmes embryons expérimentaux et mis en culture dans une boîte de pétri recouverte de fibronectine, pendant 3h. La surface de l'expiant est mesurée après 3h de culture (**Figure BC6 D**). L'injection concomitante de Xnr1+2 MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté dans les **Figures BC6 C-D** (Xnr1+2 MOa +Nodal). (Contra MO) : Témoin. (**) : Significativement différent. (n) : nombre d'échantillons mesurés.

Question BC10. A partir des résultats de la Figure BC6, que pouvez-vous dire sur le rôle de Xnr1 et Xnr2 ? Le rôle de Xnr1 et Xnr2 est-il le même que celui de Xnr5 et Xnr6 au cours de l'embryogenèse du xénope ? Expliquez. (2)

Xnr1 et Xnr2 par rapport à Xnr5 et Xnr6, ont un rôle crucial dans les mouvements de la gastrulation et jouent un rôle moins important dans l'induction du mésendoderme

Xnr1 et Xnr2 sont essentiels à la migration des cellules du mésoderme céphalique in vitro.

L'expression de gènes (*rnd1*, *has2*, *pape*, *camelle* et *pdgfra*) impliqués dans les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation est maintenant étudiée. Tous ces gènes sont exprimés dans le mésendoderme en cours d'invagination et sont plus fortement exprimés dans la région dorsale au début de la gastrulation. Les embryons sont injectés par la protéine recombinante Letty au stade 9 et analysés au stade 12 pour l'expression de ces gènes par hybridation in situ (**Figure BC7 A**). Des combinaisons différentes des oligomorpholinos antisens *Xnr1* (*Xnr1 MOa*) eUou des oligomorpholinos antisens *Xnr2* (*Xnr2 MOa*) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression des gènes ci-dessus (**Figure BC7 B**). Dans une dernière expérience, des calottes animales de blastula sont prélevées et mises en culture en présence de cycloheximide, de Nodal ou de cycloheximide+Nodal, et des analyses par RT-qPCR sont réalisées (**Figure BC7 C**).

Question BC11. Quelles informations amènent les résultats de la figure BC7 quand à l'implication de *Xnr1* et *Xnr2* dans l'expression des gènes étudiés ? (1)

*La signalisation Nodal active directement (à l'exception de *rnd1* activé indirectement) tous les gènes impliqués dans les mouvements cellulaires étudiés et les protéines *Xnr1* et *Xnr2* ont un rôle redondant sur la régulation de l'expression de ces gènes*

Question BC12. A partir de l'ensemble de ces travaux, résumez de manière synthétique et précise le rôle des différents membres de la famille Nodal analysés, lors de l'embryogenèse du xénope. (1)

Les protéines de la famille Nodal induisent le mésendoderme (*Xnr5* et *Xnr6* principalement) et contrôlent les mouvements de la gastrulation (*Xnr1* et *Xnr2*) de manière séquentielle

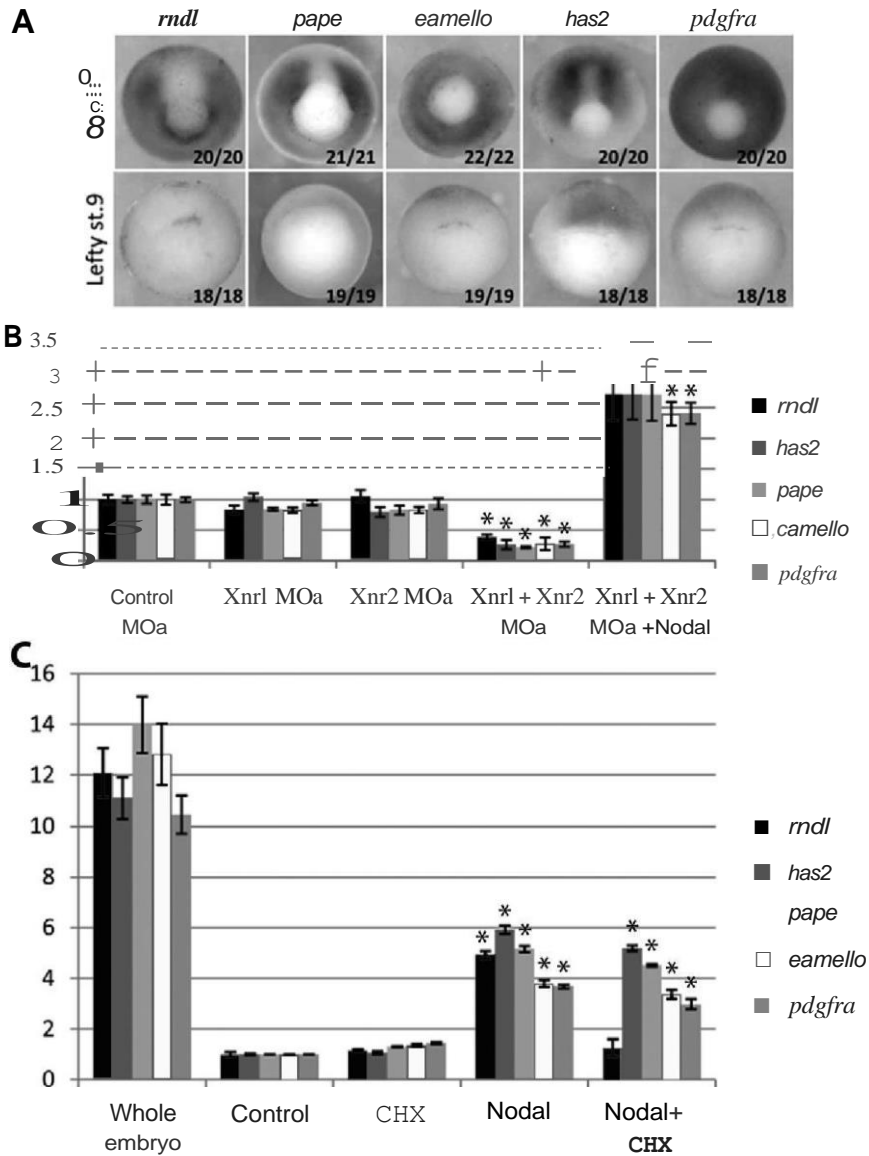


Figure 8C7. Etude de l'expression de gènes (*rnd1*, *has2*, *pape*, *camello* et *pdgfra*) impliqués dans les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation. Les embryons sont injectés par la protéine recombinante Letty au stade 9 et analysés au stade 12 pour l'expression de ces gènes par hybridation in situ (**8C7 A**). (Control) : Embryon témoin (**8C7 A**). Des combinaisons différentes des oligomorpholinos antisens *Xnr1* (*Xnr1* MOa) et/ou des oligomorpholinos antisens *Xnr2* (*Xnr2* MOa) sont injectés au stade 4 cellules dans les 2 blastomères dorsaux. Les embryons au début de la gastrulation sont soumis à des analyses par RT-qPCR pour l'expression des gènes ci-dessus (**8C7 B**). L'injection concomitante de *Xnr1+2* MOa avec un cocktail de protéines Nodal est aussi présenté (**8C7 B**). (Control MOa): Embryon témoin (**8C7 B**). Des calottes animales de blastula sont prélevées et mises en culture

en présence de cycloheximide (CHX), de Nodal ou de cycloheximide+Nodal, et des analyses par RT-qPCR sont réalisées **(BC7 C)**. (Whole embryo): Embryon témoin. (Contra): Calotte animale témoin. (*) : Significativement différent par rapport au (Contra).

FIN



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Évaluation 1 – S4
Sujet

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Correction sujets de Biologie (Evaluation 1)

Une nouvelle protéine sécrétée, que nous appellerons protX, vient d'être isolée chez l'embryon de Xénope par une équipe de chercheurs. Dans le but d'étudier sa fonction, une série d'expériences est entreprise. Elles commencent par une analyse par RT-PCR (figure 1A) et par hybridation *in situ* (Figure 1B), de son expression au cours du développement.

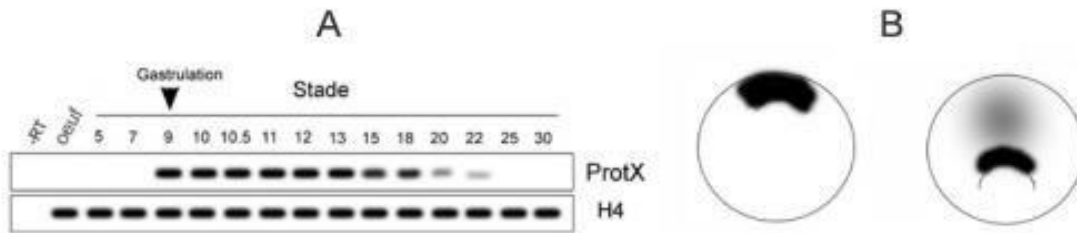


Figure 1. Etude de l'expression de protX : Analyse par RT-PCR (A) et par hybridation *in situ* au cours de la gastrulation (B).

Question 1 : Que pouvez-vous déduire de l'étude du profil d'expression de protX ? Quel est son domaine d'expression ?

Les embryons au stade gastrula sont ensuite disséqués en différentes régions : les ARN totaux sont extraits et soumis à une RT-PCR pour protX, goosecoïd et l'histone H4.

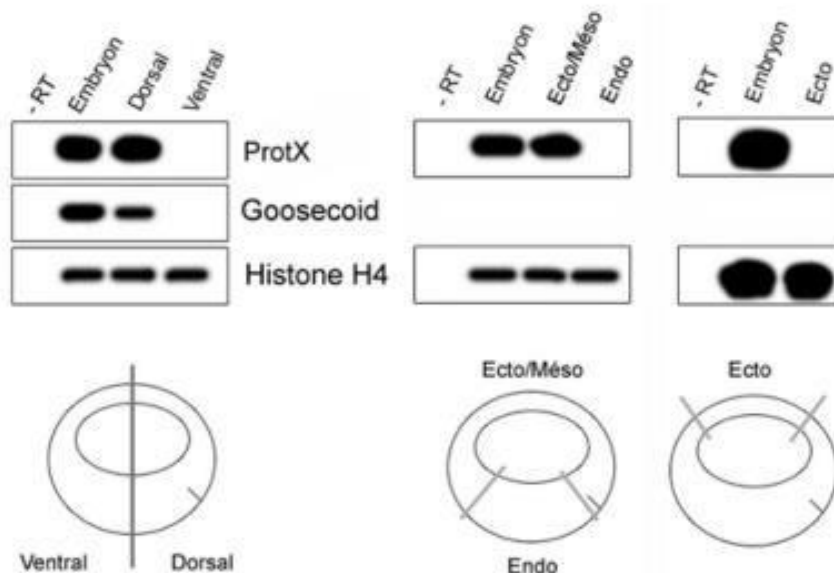


Figure 2. (Endo) : endoderme, (Ecto) : ectoderme, (Méso) : mésoderme.

Question 2 : De l'analyse des résultats de la figure 2, que pouvez vous conclure ?

Pour étudier la fonction de *protX*, les doses croissantes d'ARNm *protX* sont injectés dans le blastomère dorsal d'embryons au stade 4 cellules : le phénotype obtenu est présenté (Figure 3A). La Figure 3B représente une coupe transversale d'embryon injecté par l'ARNm *protX*.

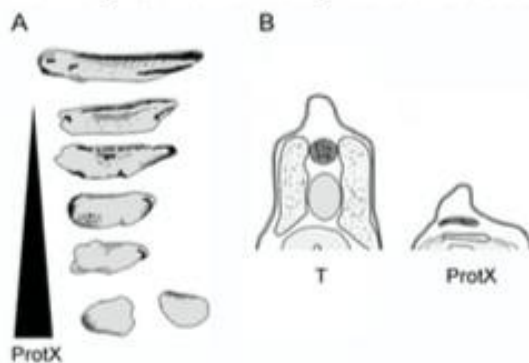


Figure 3. (T) : embryon témoin non injecté. La région dorsale des embryons en coupes transversales est présentée figure B.

Question 3 : Quelles informations amènent ces observations sur le rôle de *protX* ? Ces résultats sont-ils surprenants ? Pourquoi ?

Pour mieux comprendre les facteurs régulant l'expression de *protX*, des embryons sont traités aux UV ou au LiCL et analysés par northern blot (Figure 4B) pour l'expression de *protX* au stade gastrula.

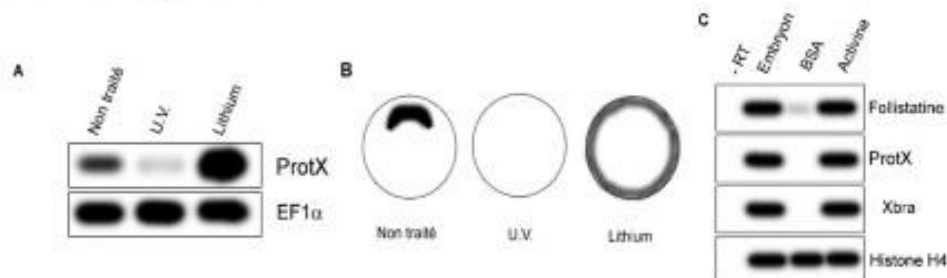
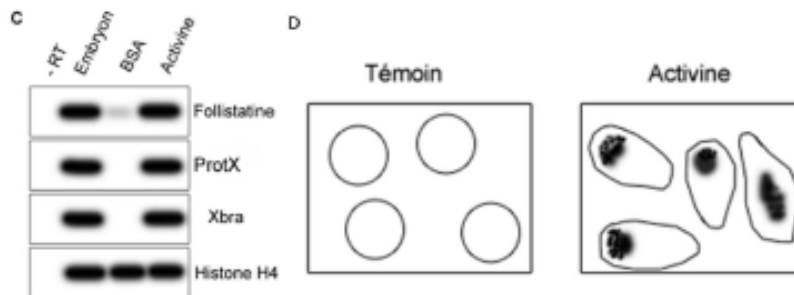


Figure 4A-C. (BSA) : calotte animale, traitée à la BSA, témoin. (activine) : calotte animale traitée à l'activine. (Embryon) : embryon entier.

Question 4 : Quel est l'effet d'un traitement aux UV ou d'un traitement au LiCl ?

Question 5 : Que vous apportent les résultats des figures 4A et 4B ?

Dans un deuxième temps, les calottes animales de jeunes blastula sont prélevées et mises en culture, avec ou sans activine, jusqu'au stade gastrula. Les ARN totaux sont alors extraits et soumis à une RT-PCR pour les gènes *protX*, *follistatine* et *Xbra* (Figure 4C). Dans une expérience complémentaire, les calottes animales traitées à l'activine sont directement analysées par hybridation *in situ* pour l'expression de *protX* (figure 4D).



Question 6 : Quelle conclusion pouvez-vous tirer de l'analyse des figures 4C et 4D ? Va-t-elle dans le sens des résultats précédents ?

Des ARNm *protX* (1ng) ou des ARNm *activine* sont ensuite injectés au niveau de l'oeuf fécondé. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-PCR pour l'expression des gènes *Noggin*, *goosecoïd* et *follistatine* au stade gastrula, et pour *MyoD*, *NCAM* et l'actine musculaire, au stade bourgeon caudal (Figure 5). Dans une deuxième expérience, après injection des ARNm *protX*, les calottes animales des jeunes blastulas sont prélevées et mises en culture jusqu'au stade gastrula puis les ARN totaux analysés par RT-PCR pour *Noggin*, *Xbra* et *XWnt-8* (Figure 6).

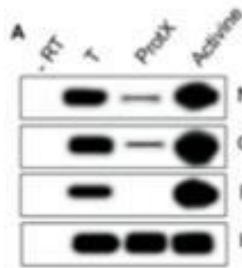


Figure 5. Etude du rôle de protX in vivo. (A) : les embryons analysés sont au stade gastrula. (B) : embryons au stade bourgeon caudal. (T) : embryon témoin non injecté.

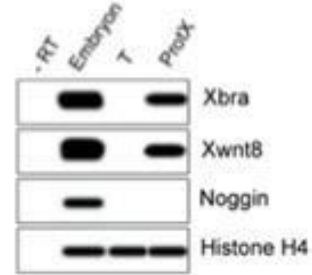
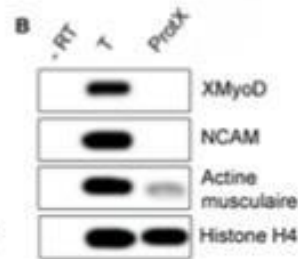


Figure 6. Etude du rôle de protX en « test de la calotte animale » (T) : calotte animale témoin non injectée.

Question 7 : Quelle est l'action de protX sur l'expression des gènes mésodermique et neuraux étudiés ?

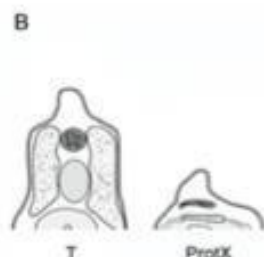
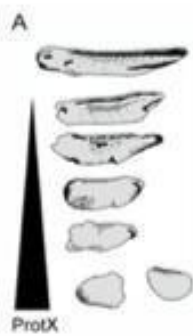


Figure 3. (T) : embryon témoin non injecté. La région dorsale des embryons en coupes transversales est présentée figure B.

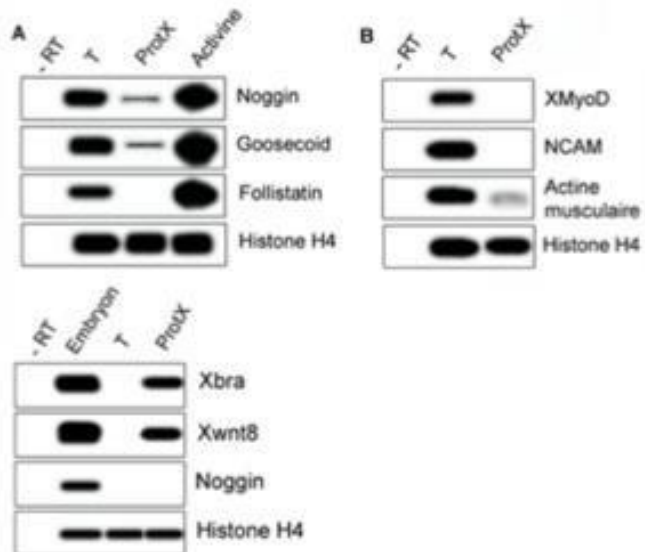


Figure 5. Etude du rôle de protX in vivo. (A) : les embryons analysés sont au stade gastrula. (B) : embryons au stade bourgeon caudal. (T) : embryon témoin non injecté.

Figure 6. Etude du rôle de protX en « test de la calotte animale » (T) : calotte animale témoin non injectée.

Question 8 : Ces observations sont-elles cohérentes avec le phénotype des embryons injectés par l'ARNm protX ?

Question 9 : Connaissez-vous des protéines sécrétées, exprimées au cours du développement, qui, injectées précocement au cours de la segmentation, peuvent induire une ventralisation totale de l'embryon ?

Question 10 : A partir de l'ensemble des expériences présentées dans cet exercice, vous pouvez conclure et/ou émettre comme hypothèse(s) pertinente(s) ?



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Évaluation 1 – S4 Correction

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

Correction sujets de Biologie (Evaluation 1)

Une nouvelle protéine sécrétée, que nous appellerons protX, vient d'être isolée chez l'embryon de Xénope par une équipe de chercheurs. Dans le but d'étudier sa fonction, une série d'expériences est entreprise. Elles commencent par une analyse par RT-PCR (figure 1A) et par hybridation *in situ* (Figure 1B), de son expression au cours du développement.

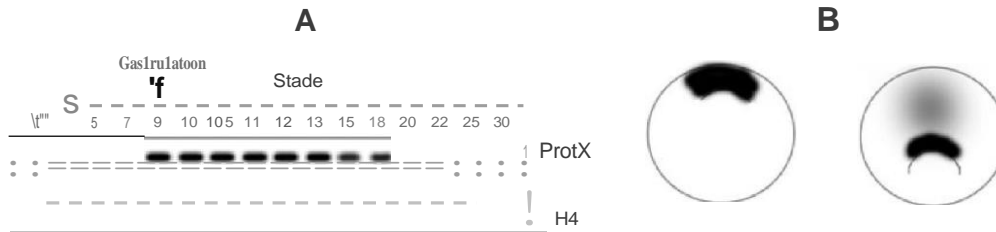


Figure 1. Etude de l'expression de protX: Analyse par RT-PCR (A) et par hybridation *in situ* au cours de la gastrulation (B).

Question 1 : Que pouvez-vous déduire de l'étude du profil d'expression de protX ? Quel est son domaine d'expression ?

On remarque que l'expression de ce gène est zygotique (embryonnaire) car il commence à s'exprimer en début de gastrulation. De plus, son expression est transitoire, c'est à dire qu'on ne détecte plus le transcrit à partir du stade 25. L'étude des ARNm protX par l'hybridation sur embryon entier indique que le domaine d'expression de protX est l'organisateur de Spemann (au niveau de la lèvre dorsal du blastopore).

Les embryons au stade gastrula sont ensuite disséqués en différentes régions les ARN totaux sont extraits et soumis à une RT-PCR pour protX, goosecoïd et l'histone H4.

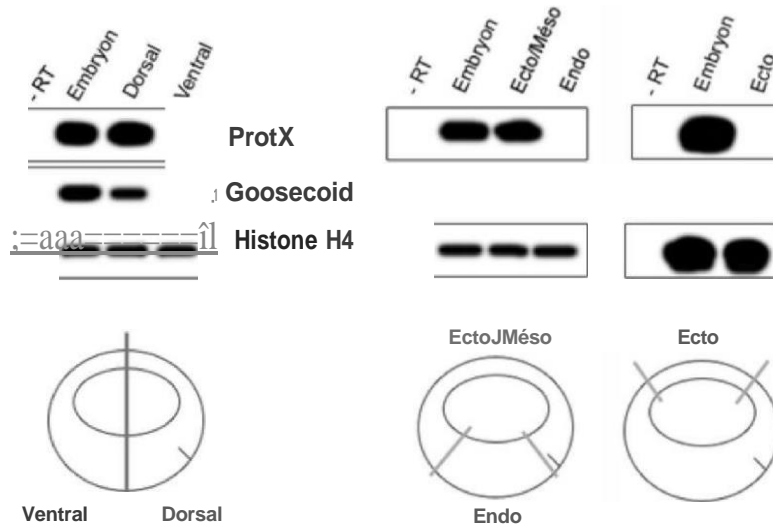


Figure 2. (Endo) : endoderme, (Ecto) : ectoderme, (Méso): mésoderme.

Question 2: De l'analyse des résultats de la figure 2, que pouvez vous conclure?

L'analyse confirme les résultats de l'hybridation in situ (vue précédemment). On remarque que protX est exprimé dans la région mésodermique dorsale, tout comme Goosecoid qui est un marqueur du mésoderme dorsal. La RT-PCR est une méthode d'amplification qui aurait pu montrer une autre expression de protX (par exemple dans l'endoderme ou encore l'ectoderme, ce qui n'est pas le cas), indétectable en hybridation in situ. L'histone H4, est utilisé comme témoin d'homogénéité car il est ubiquitaire.

Pour étudier la fonction de protX, les doses croissantes d'ARNm protX sont injectés dans le blastomère dorsal d'embryons au stade 4 cellules : le phénotype obtenu est présenté (Figure 3A). La Figure 3B représente une coupe transversale d'embryon injecté par l'ARNm protX.

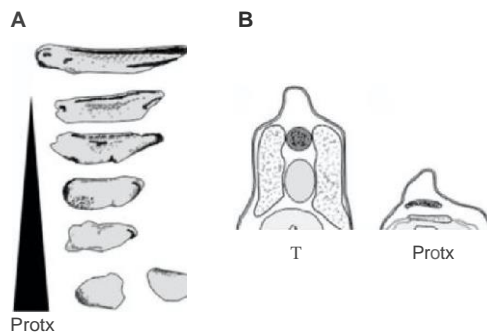


Figure 3. (T) : embryon témoin non éclairé, La région dorsale des embryons en coupes transversales est présentée figure B.

Question 3: Quelles informations amènent ces observations sur le rôle de protX ? Ces résultats sont-ils surprenants ? Pourquoi ?

ProtX agit selon un effet dos et entraîne progressivement la suppression des structures axiales dorsales et conduit à la réduction du tube neural ainsi que de la corde et des somites. Ces résultats sont surprenants car il semblerait qu'elle ait le "comportement" d'une molécule dorsalisante (comme Goosecoid) mais pourtant elle possède un effet ventralisant.

Pour mieux comprendre les facteurs régulant l'expression de protX, des embryons sont traités aux UV ou au LiCL et analysés par northern blot (Figure 4B) pour l'expression de protX au stade gastrula.



Figure 4A-C. (BSA): calotte animale, traitée à la BSA, témoin. (actine) calotte animale traitée à l'actine. (Embryon): embryon entier.

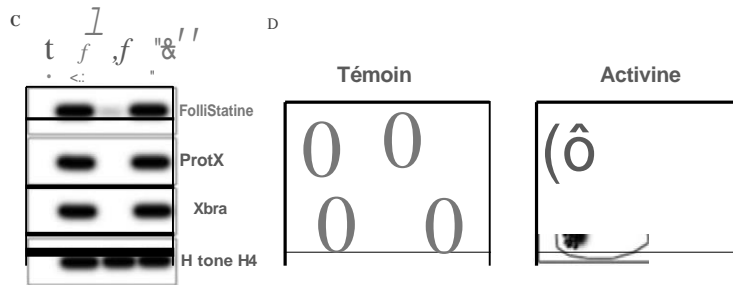
Question 4: Quel est l'effet d'un traitement aux UV ou d'un traitement au LiCl?

Le traitement aux UV entraîne une ventralisation de l'embryon à l'inverse du traitement au LiCl qui entraîne une dorsalisation. En effet le traitement aux UV bloque la rotation de symétrisation de l'oeuf. Pour rappel, LiCl est un inhibiteur de la GSK-3.

Question 5: Que vous apportent les résultats des figures 4A et 4B ?

Ils montrent que le traitement ventralisant inhibe l'expression de protX alors que le traitement dorsalisant favorise son expression.

Dans un deuxième temps, les calottes animales de jeunes blastula sont prélevées et mises en culture, avec ou sans activine, jusqu'au stade gastrula. Les ARN totaux sont alors extraits et soumis à une RT-PCR pour les gènes protX, follistatine et Xbra (Figure 4C). Dans une expérience complémentaire, les calottes animales traitées à l'activine sont directement analysées par hybridation *in situ* pour l'expression de protX (figure 40).



Question 6: Quelle conclusion pouvez-vous tirer de l'analyse des figures 4C et 40? Va-t-elle dans le sens des résultats précédents ?

On remarque que protX est induite par l'activine qui est un inducteur dorsalisant entraînant des mouvements d'élongation et de convergence, qui est une caractéristique du mésoderme dorsal au niveau des cellules de la calotte animale (territoire compétent jusqu'à la gastrulation qui devrait donner en tant normal de l'épiderme). De plus, protX induit également Xbra (marqueur pan-mésodermique) et follistatine (marqueur du mésoderme dorsal). Ainsi on en conclut que l'activine ou bien le LiCl induisent l'expression de protX.

Des ARNm protX (1ng) ou des ARNm activine sont ensuite injectés au niveau de l'oeuf fécondé. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-PCR pour l'expression des gènes Noggin, goosecoïd et follistatine au stade gastrula, et pour MyoD, NCAM et l'actine musculaire, au stade bourgeon caudal (Figure 5). Dans une deuxième expérience, après injection des ARNm protX, les calottes animales des jeunes blastulas sont prélevées et mises en culture jusqu'au stade gastrula puis les ARN totaux analysés par RT-PCR pour Noggin, Xbra et XWnt-8 (Figure 6).

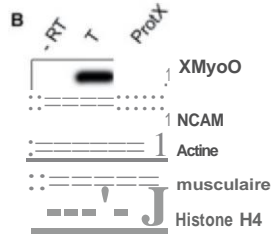
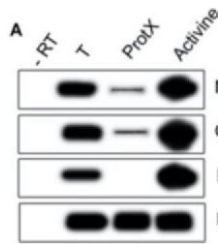


Figure 5. Etude du rôle de protX in vivo. (A) : les embryons analysés sont au stade gastrula. (B) : embryons au stade bourgeon caudal. (T) : embryon témoin non injecté.



Figure 6. Etude du rôle de protX en « test de la caloe animale » (T) : calotte animale témoin non injectée.

Question 7 : Quelle est l'action de protX sur l'expression des gènes mésodermique et neuraux étudiés ?

L'analyse en "animal cap assay" montre que protX réprime l'expression des marqueurs mésodermique (dorsal) tel que : Noggin ; Goosecoid ; Follistatine contrairement à l'activine qui quand à elle les active. On en déduit donc que protX régule positivement l'expression des marqueur du mésoderme ventral tel que Wnt-8 (mais également pan-mésodermique avec Xbra). De plus on remarque qu'au stade bourgeon caudal, protX réprime MyoD, l'actine et NCAM qui sont respectivement des marqueurs musculaire et neuraux.

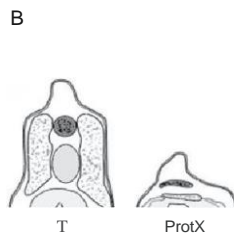
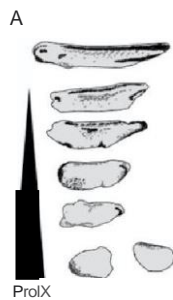


Figure 3. (T) : embryon témoin non injecté. La région dorsale des embryons en coupes transversales est présentée figure B

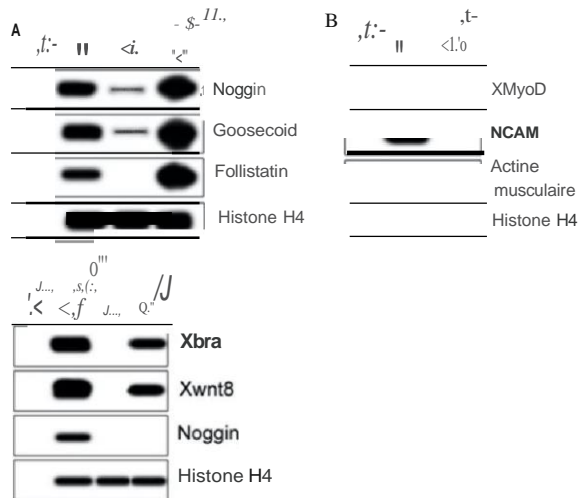


Figure 5. Etude du rôle de protX in vivo. (A) : les embryons analysés sont au stade gastrula. (B) : embryons au stade bourgeon caudal. (T) : embryon témoin non injecté

Figure 6. Etude du rôle de protX en « test de la calote animale » (T) : calone animale témoin non injectée.

Question 8: Ces observations sont-elles cohérentes avec le phénotype des embryons injectés par l'ARNm protX?

La réduction de la chorde, muscle et tube nerveux est corrélée à la répression par protX des gènes neuronaux et musculaire.

Question 9 Connaissez-vous des protéines sécrétées, exprimées au cours du développement, qui, injectées précocement au cours de la segmentation, peuvent induire une ventralisation totale de l'embryon?

La protéine BMP4 est un marqueur du mésoderme ventral capable d'entraîner une ventralisation totale d'un embryon après injection au cours des premiers stades de la segmentation.

Question 10 : A partir de l'ensemble des expériences présentées dans cet exercice, vous pouvez conclure et/ou émettre comme hypothèse(s) pertinente(s) ?

Le rôle de protX pourrait être de limiter l'activité dorsalisante et l'extension du champ d'action de l'organisateur de Spemann. En effet il pourrait être impliqué dans l'inhibition de la formation des structures dorsales, c'est à dire qu'il jouerait un rôle d'antagoniste à l'action dorsalisante de Spemann. De plus on rappelle que protX est exprimé au niveau du mésoderme dorsal sous le contrôle d'agent ventralisant comme l'activine ou LiCL.



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicale 2019-2020

Session 1 – Évaluation 2 – S4
Sujet

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

S4 - Bio du dev - Session 1 - Eval 2

Chez l'embryon de drosophile, la mise en place de la polarité dorso-ventrale (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. implique l'accumulation de la protéine Dorsal dans les noyaux dorsaux, créant un gradient dorso-ventral décroissant
- b. est spécifiée par la localisation de protéines maternelles dans l'enveloppe vitelline
- c. implique l'activation du récepteur Toll par la protéine Dorsal
- d. aucune proposition n'est exacte
- e. implique une voie de signalisation mettant en jeu la protéine hyaloplasmique Cactus

L'amniogenèse se fait (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. aucune des propositions n'est correcte
- b. par soulèvement et fusion des replis amniotiques chez le poulet
- c. par cavitation chez le poulet
- d. par cavitation chez le poisson zèbre
- e. chez l'homme par cavitation comme chez le poulet

La protéine Sonic Hedgehog est (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. un facteur de croissance
- b. une molécule diffusible
- c. un morphogène
- d. aucune proposition n'est correcte
- e. impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur du membre régionalisation dorso-ventrale et de l'axe gauche-droit ??

Des protéines de la famille Nodal, vous pouvez dire que (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. au cours de la segmentation du xénoppe, les Xnrs d'origine maternelle ont une fonction de morphogène sur l'induction du mésoderme
- b. les Xnrs agissent avec un effet dose sur l'induction de l'endoderme
- c. tous les Xnrs sont des inducteurs du mésoderme
- d. Xnr3 est un inducteur du mésoderme
- e. aucune des réponses ci-dessus n'est exacte

Le poisson zèbre est un modèle d'étude du développement de plus en plus utilisé car (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. il a un développement rapide
- b. les embryons sont transparents dans les premières 24 heures
- c. aucune proposition n'est correcte
- d. il allie les avantages de la drosophile et du poulet
- e. les mutagenèses expérimentales induites sont aisées dans cette espèce

Chez le poisson zèbre, la segmentation est (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. superficielle
- b. aucune proposition n'est exacte
- c. méroblastique
- d. discoïdale
- e. totale

Chez le xénope, l'injection d'un ARNm Noggin au niveau du blastomère D4 au stade 32 cellules entraîne (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. la mise en place d'une deuxième région ventrale
- b. aucune modification du phénotype de l'embryon injecté
- c. la mise en place d'un axe embryonnaire surnuméraire
- d. la mise en place d'une deuxième région dorsale sans région céphalique
- e. aucune des propositions n'est exacte

Le traitement de calotte animale par l'IGF (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. bloque la signalisation BMP
- b. aucune des réponses ci-dessus n'est exacte
- c. induit la formation de tissu neural postérieur en l'absence de mésoderme
- d. inactive la protéine SMAD1
- e. induit la formation de tissu neural antérieur

L'organogenèse de l'oeil (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. est contrôlée chez toutes les espèces par le facteur de croissance , Pax 6
- b. implique une série d'inductions d'ordre secondaire
- c. implique une induction primaire
- d. aucune proposition n'est correcte
- e. met en jeu le gène "maître", Pax 6

Les annexes embryonnaires (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. sont au nombre de 3
- b. aucune proposition n'est exacte
- c. chez l'Homme, la vésicule vitelline à un rôle aussi important que chez le poulet
- d. chez le poulet, l'allantoïde est très développée et finit par s'étendre dans le sac vitellin
- e. assurent des fonctions de protection et d'autonomie métabolique

Le test de la calotte animale (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. implique une culture in vitro
- b. est facilement utilisable chez le xénope comme chez le poulet
- c. est une technique exclusivement in vivo
- d. aucune proposition n'est correcte
- e. permet d'analyser la faculté d'un facteur protéique à induire l'expression de gènes cibles putatifs

(Il manque une question)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2019-2020

Session 1 – Évaluation 2 – S4
Correction

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

S4 - Bio du dev - Session 1 - Eval 2

Chez l'embryon de drosophile, la mise en place de la polarité dorso-ventrale (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. implique l'accumulation de la protéine Dorsal dans les noyaux dorsaux, créant un gradient dorso-ventral décroissant
Faux - On observe un gradient croissant de la protéine Dorsal au niveau nucléaire, de la région dorsale vers la région ventrale

- b. est SRécifiée Rar la localisation de Rrotéines maternelles dans l'envelORRe vitelline
Vrai -
- c. implique l'activation du récepteur Toll par la protéine Dorsal
Faux - Spatzle se fixe sur son récepteur Toll, ce qui induit la transduction du signal et donc le passage de Dorsal dans le noyau
- d. aucune proposition n'est exacte
Faux -

- e. im:lli ue une voie de signalisation mettant en jeu la Rrotéine hyalo:llasmique Cactus
Vrai - La transduction du signal, induite par la fixation de Spatzle sur Toll, va induire la libération de Dorsal de la protéine Cactus qui lui été associée (destruction de Cactus)

L'amniogenèse se fait (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. aucune des propositions n'est correcte
Faux -

- b. Rar soulèvement et fusion des re lis amniotiques chez le ROUle1
Vrai -
- c. par cavitation chez le poulet
Faux -
- d. par cavitation chez le poisson zèbre
Faux - Le poisson zèbre ne fait pas parti des amniotes (modèles chez lesquelles vont apparaître, durant leur évolution, des annexes embryonnaires (le placenta, l'amnios, etc.). Il n'y a donc pas d'amniogenèse chez le poisson zèbre.
- e. chez l'homme par cavitation comme chez le poulet
Faux - L'amniogenèse se fait bien par cavitation chez l'Homme (oeuf de mammifère), mais se fait par soulèvement chez le poulet

La protéine Sonic Hedgehog est (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. un facteur de croissance
une molécule diffusible
un mog:1hogène
- d. aucune proposition n'est correcte

- e. impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur du membre régionalisation dorso-ventrale et de l'axe gauche-droit ??

Des protéines de la famille Nodal, vous pouvez dire que (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. au cours de la segmentation du xénope, les Xnrs d'origine maternelle ont une fonction de morphogène sur l'induction du mésoderme
Faux - L'origine des Xnrs est embryonnaire
- b. les Xnrs agissent avec un effet dose sur l'induction de l'endoderme
Faux - Les Xnrs agissent avec un effet dose sur l'induction du mésoderme
- c. tous les Xnrs sont des inducteurs du mésoderme
Faux - Xnr3 est un inducteur du neurectoderme
- d. Xnr3 est un inducteur du mésoderme
Faux - Xnr3 est le seul Xnr qui n'induit pas des structures mésodermiques dorsales mais du neurectoderme
- e. aucune des réponses ci-dessus n'est exacte

Le poisson zèbre est un modèle d'étude du développement de plus en plus utilisé car (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. il a un développement rapide
Vrai - Il possède un cycle de développement court et rapide : 2 à 4 jours
- b. les embryons sont transparents dans les premières 24 heures
Vrai -
- c. aucune proposition n'est correcte
Faux -
- d. il allie les avantages de la drosophile et du poulet
Faux - il allie les avantages de la drosophile et du xénope
- e. les mutagenèses expérimentales induites sont aisées dans cette espèce
Vrai - intéressant par exemple en termes d'analyse par hybridation in situ, ou encore via des mutagenèses dirigées (obtention de nombreux mutants) très facilement. Cette espèce favorise donc les analyses génétiques

Chez le poisson zèbre, la segmentation est (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. superficielle
Faux -
- b. aucune proposition n'est exacte
Faux -
- c. mérolastique
Vrai -
- d. discoïdale

Vrai -

e. totale

Faux - La segmentation est méroblastique, soit partielle (incomplète)

Chez le xénope, l'injection d'un ARNm Noggin au niveau du blastomère D4 au stade 32 cellules entraîne (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

a. la mise en place d'une deuxième région ventrale

Faux -

b. aucune modification du phénotype de l'embryon injecté

Faux -

c. la mise en place d'un axe embryonnaire surnuméraire

Faux - (activine et siamois et Vg1)

d. la mise en place d'une deuxième région dorsale sans région céphalique

Faux -

e. aucune des propositions n'est exacte

Vrai - L'injection de Noggin dans un oeuf fécondé aux UVs dorsalise l'embryon, suivant un effet dose

Le traitement de calotte animale par l'IGF (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

a. bloque la signalisation BMR

Vrai -

b. aucune des réponses ci-dessus n'est exacte

Faux -

c. induit la formation de tissu neural postérieur en l'absence de mésoderme

Faux -

d. inactive la protéine SMAD1

Vrai - Inactivation de SMAD1 par sur-phosphorylation via une MAPK activée par la transduction du signal issue de la fixation de IGF sur son récepteur

e. induit la formation de tissu neural antérieur

Vrai - induit la formation de tissu neural antérieur en l'absence de mésoderme

L'organogenèse de l'oeil (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

a. est contrôlée chez toutes les espèces par le facteur de croissance , Pax 6

Faux - C'est un gène maître

b. implique une série d'inductions d'ordre secondaire

Vrai - L'organogenèse de l'oeil est une série d'inductions secondaires car on est dans une phase d'organogenèse : ce sont des régions d'organes qui sont progressivement induites.

c. implique une induction primaire

Faux -

- d. aucune proposition n'est correcte

Faux -

- e. met en jeu le gène "maître" Pax 6

Vrai - Gène maître de la mise en place de l'organogenèse de l'oeil, de la drosophile jusqu'au mammifère

Les annexes embryonnaires (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. sont au nombre de 3

Vrai - la vésicule vitelline, l'amnios et l'allantoïde

- b. aucune proposition n'est exacte

Faux -

- c. chez l'Homme, la vésicule vitelline à un rôle aussi important que chez le poulet **Faux -**
Chez le mammifère, il n'y a pas de réserves vitellines ; donc le lécithocèle secondaire constitue une structure homologue à la vésicule vitelline observée chez l'oiseau et joue un rôle mineur dans le développement du mammifère

- d. chez le poulet, l'allantoïde est très développée et finit par s'étendre dans le sac vitellin

Faux - L'allantoïde prend de plus en plus de place, jusqu'à s'étaler dans le coelome et puis le faire disparaître

- e. assurent des fonctions de Protection et d'autonomie métabolique

Vrai - nutrition, excrétion, respiration

Le test de la calotte animale (choisir la ou les bonnes réponses)

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. imRlique une culture in vitro

Vrai -

- b. est facilement utilisable chez le xénope comme chez le poulet

Faux - Propre aux amphibiens

- c. est une technique exclusivement in vivo

Faux -

- d. aucune proposition n'est correcte

Faux -

- e. l)ermet d'anal ser la faculté d'un facteur l)rotéique à induire l'exl)ression de gènes cibles l)Utatifs

Vrai -

(Il manque une question)



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2021-2022

Session 1 – S4 Sujet

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

UE SA04M030 Biologie 4

Développement, plasticité et cellules souches

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Document et/ou matériel autorisés : *(sans indication, tout document et/ou matériel sera interdit)*

Durée totale de l'épreuve : 1h30 12 pages - 15

questions

Chez la souris, la première source d'érythropoïétine (EPO) au cours du développement embryonnaire sont les cellules de la crête neurale (CCN). Puis ces cellules migrent vers le rein qui devient à son tour la principale source d'EPO.

Chez les patients atteints de maladie rénale chronique, la production d'EPO est fortement réduite, ce qui entraîne une anémie rénale. Les tentatives de traitement de cette maladie via l'administration d'EPO humaine ont montré des effets indésirables à long terme.

Question 1 : En vous basant sur vos connaissances acquises en cours, décrivez le rôle de l'EPO dans l'hématopoïèse. 1 point

Chez l'homme, on ignore encore si les CCN peuvent produire de l'EPO. Les chercheurs ont alors tenté de répondre à cette question en développant un nouveau protocole de différenciation de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en CCN. En effet, l'utilisation de telles cellules pourrait constituer une approche thérapeutique idéale pour le traitement de l'anémie rénale.

Question 2 : En vous basant sur les connaissances acquises en cours, donnez 3 caractéristiques des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). 1 point

Question 3 : Citez brièvement les étapes de développement de la crête neurale et donnez 3 exemples de types cellulaires qui en dérivent. 1 point

L'activation de la voie Wnt canonique est impliquée dans la différenciation des hiPSC en CCN *in vitro*. Les auteurs traitent alors des hiPSC pendant 8 jours avec 5mM de chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur puissant de GSK3 β , dans des conditions normales d'oxygènes (normoxie). Ils obtiennent par RT-PCR les résultats de la **figure 1**.

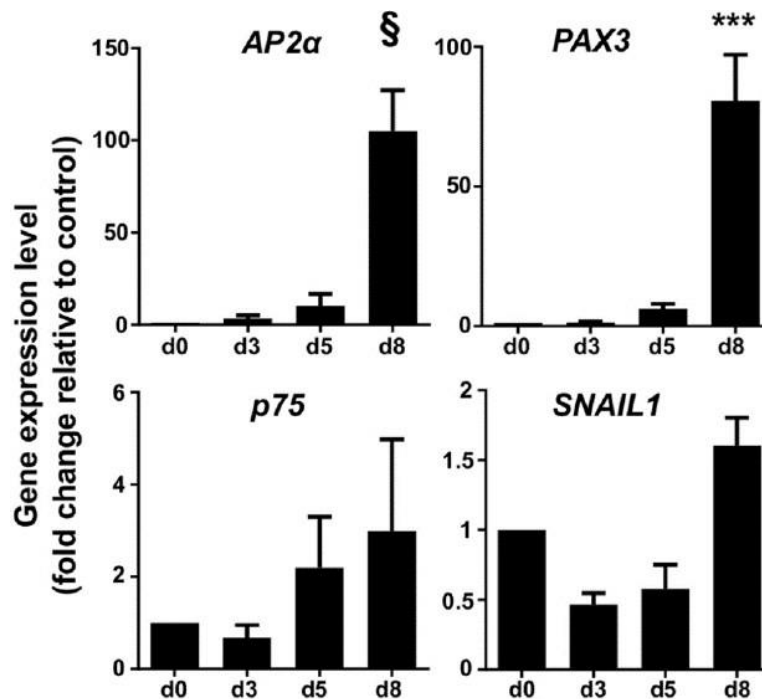
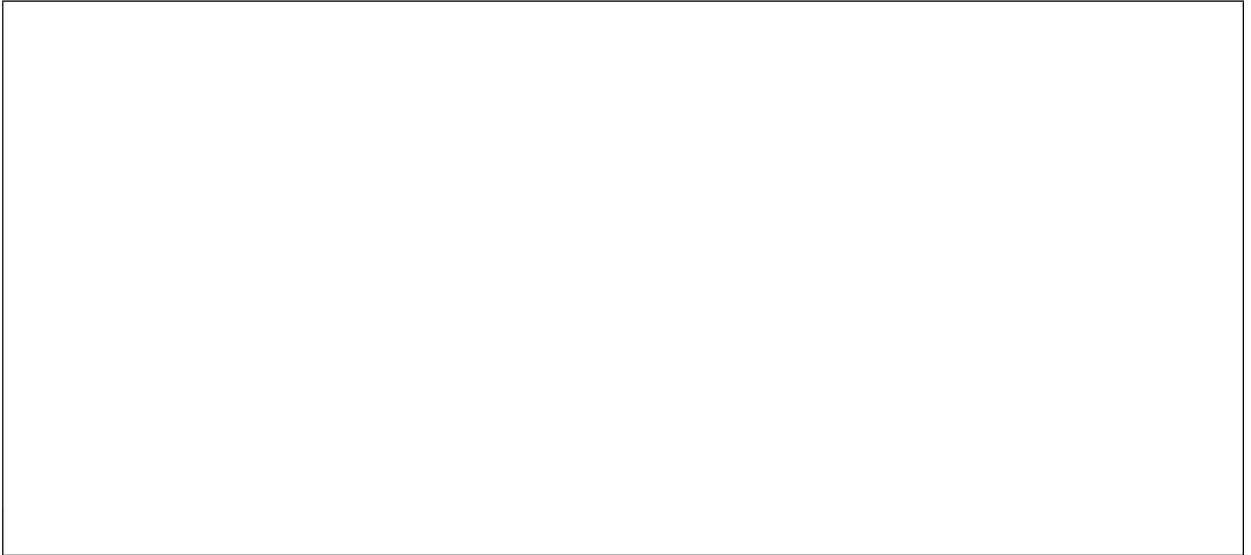


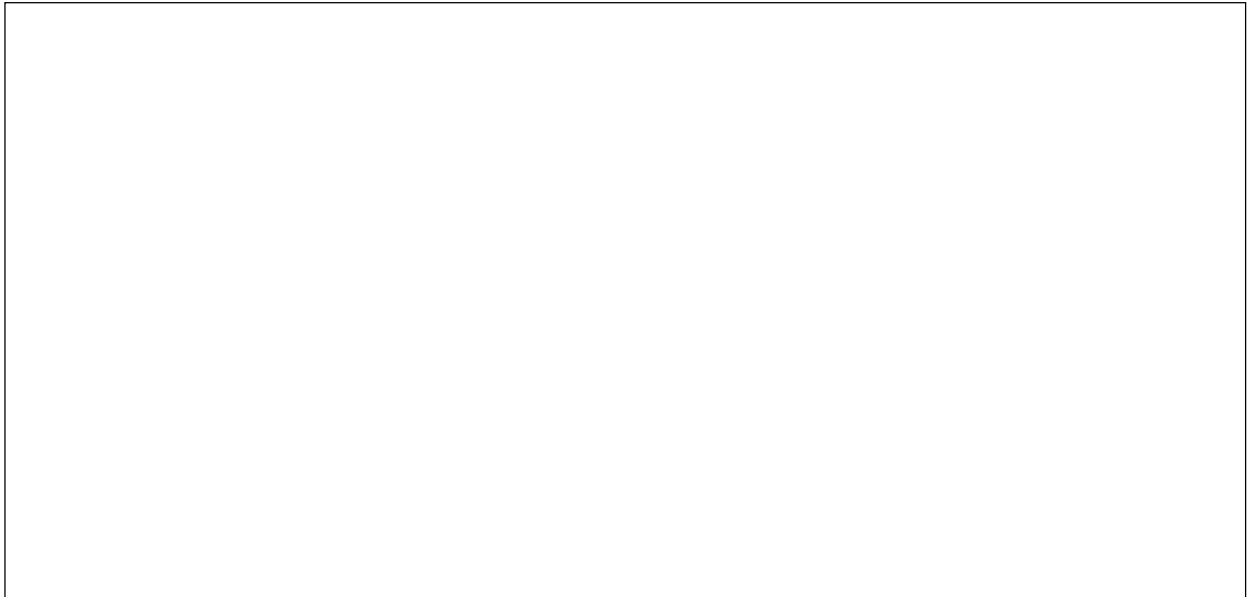
Figure 1 : Niveaux d'expression d'AP2 α , PAX3 et p75, entre 0 (d0) et 8 jours (d8) de traitement par le LiCl en conditions normoxiques. AP2 α , PAX3 et p75 sont des gènes exprimés au cours de la différenciation en CCN. § et *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 4 : Proposez un schéma de la voie de signalisation Wnt canonique en précisant bien le rôle du LiCl dans ce protocole. 2 points



Question 5 : Détaillez le principe de la technique de la RT-PCR. 1 point

Question 6 : Que pouvez-vous déduire des résultats de la figure 1 ? 1 point



Toujours *in vitro* après 8 jours de culture, les auteurs regardent ensuite une autre caractéristique des CCN, présentée dans la **figure 2**.

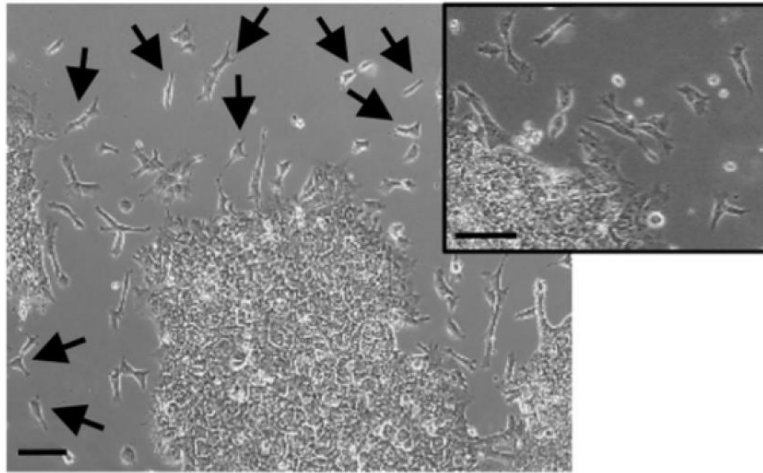


Figure 2 : hiPSC traitées par du LiCl pendant 8 jours en conditions normoxiques.
Les flèches montrent les cellules qui sortent des clones cellulaires formés.
Ces cellules ne sont pas observées dans les cultures de hiPSC non différenciées.

**Question 7 : Quelle est cette caractéristique démontrée dans la figure 2 ?
Expliquez pourquoi elle est importante pour les CCN ? 1 point**

Ensuite, les auteurs analysent la capacité des CCN à produire et à sécréter de l'EPO. La concentration d'EPO est mesurée dans le surnageant de hiPSC indifférenciées (d0, contrôle) et de CCN dérivées de hiPSC (5 mM LiCl) cultivées dans des conditions normoxiques ou hypoxiques (faible quantité d'O₂: 5% O₂) pendant 48 et 72 heures. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 3**.

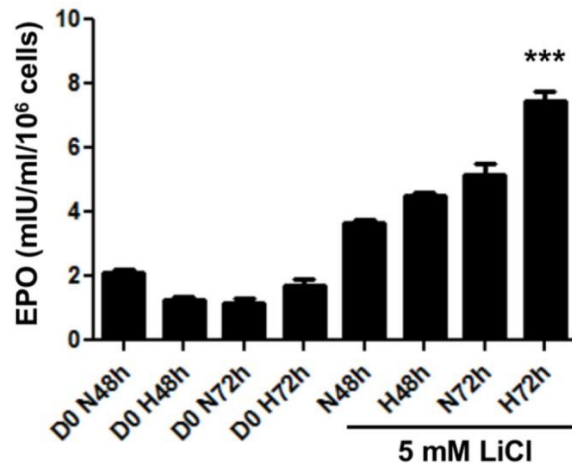


Figure 3 : Concentration d'EPO dans le surnageant de hiPSC indifférenciées (d0, contrôle) et de CCN dérivées de hiPSC (5 mM LiCl) cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) pendant 48 et 72 heures. *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 8 : Donnez une interprétation de ces résultats obtenus avec des cellules humaines. 1 point

Afin de vérifier si l'EPO produite par les CCN possède une activité érythropoïétique, les chercheurs exposent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines au surnageant de CCN préalablement cultivées dans des conditions hypoxiques pendant 72 h (groupe EPO). Le nombre de colonies érythroïdes (BFU-E) est quantifié et comparé à celui du groupe contrôle (**figures 4 A-C**). De plus, certains surnageants sont traités avec un anticorps neutralisant l'EPO (EPO + inh, **figure 4D**).

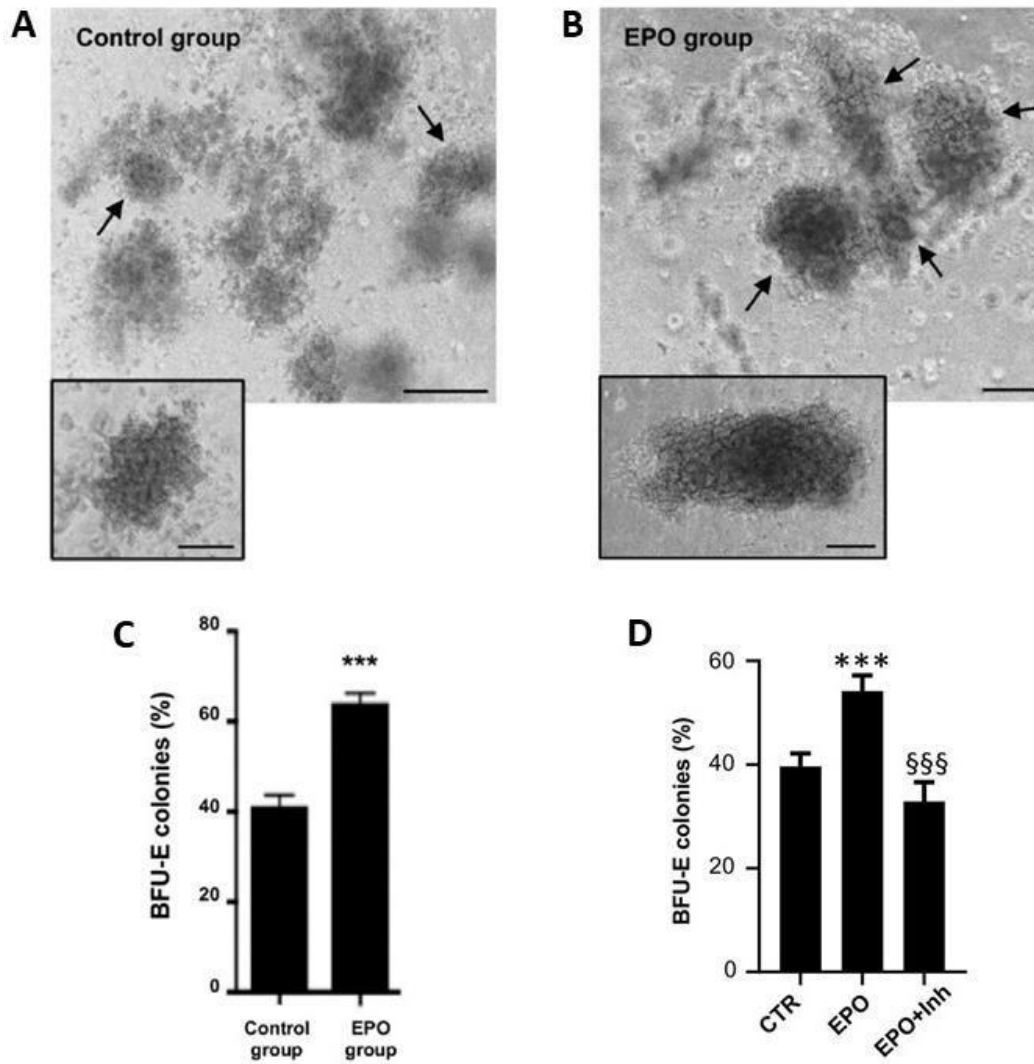


Figure 4 : Effet de l'EPO produite par les cellules différenciées en CCN sur les CSH.

(A) Photos du groupe CCN contrôle.

(B) Photos du groupe CCN préalablement cultivées en hypoxie pendant 72h.

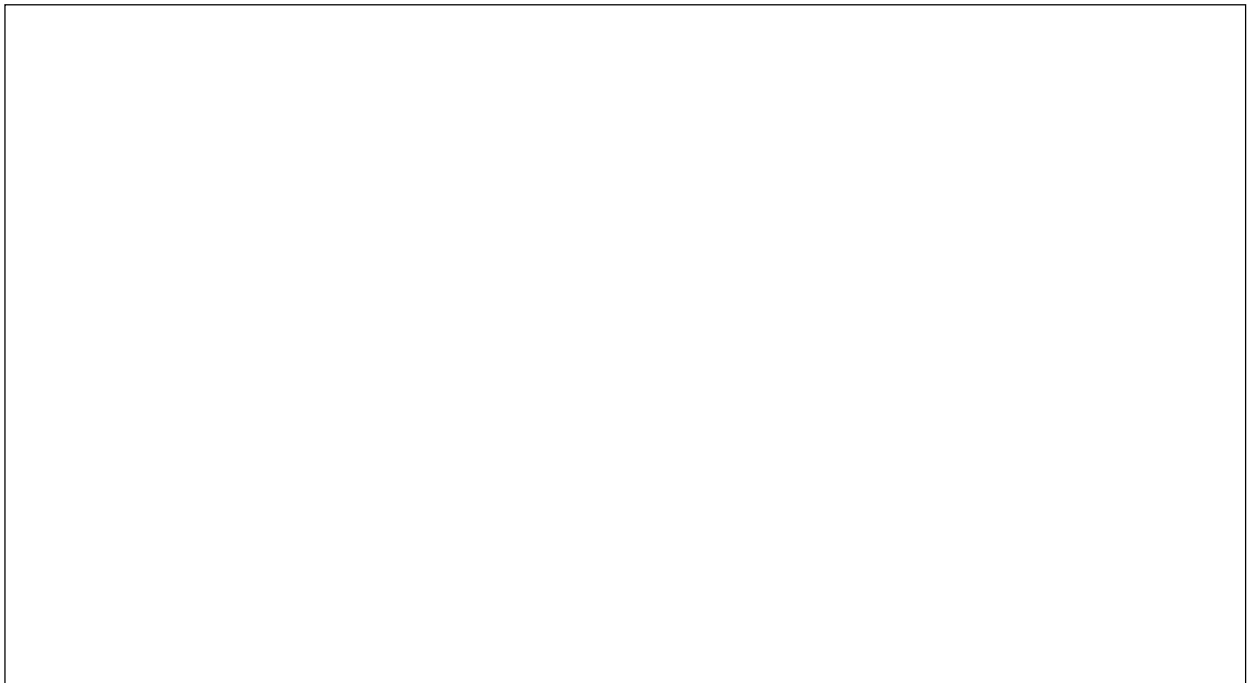
(C) Pourcentage de colonies érythroïdes (BFU-E).

(D) Pourcentage de BFU-E + ajout d'un anticorps neutralisant l'EPO (EPO+inh).

§§§ et *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 9 : Rappelez les grandes étapes de différenciation des cellules souches hématopoïétiques ? 1 point

Question 10 : Que pouvez-vous conclure des résultats de la figure 4 ? 1 point



Afin d'évaluer si les CCN dérivées de hiPSC peuvent répondre à l'hypoxie *in vivo* et ainsi améliorer l'anémie, les auteurs transplantent des CCN dans des disques d'atélocollagène à des souris immunodéprimées en sous-cutané. Ces souris sont anémiées en effectuant des prélèvements sanguins rapides aux jours 0 et 1. Au jour 2, lorsque le taux d'hématocrite (Hct) a diminué de manière significative, les CCN sont transplantées. L'hématocrite correspond au volume occupé par les érythrocytes dans le sang par rapport au volume total de sang et son taux sert donc à diagnostiquer ou suivre certaines anomalies sanguines comme l'anémie. Ce taux est mesuré 2, 3 ou 5 jours après la transplantation soit après 4, 5 ou 7 jours. (d4, d5, d7) dans la **figure 5 A**. Dans la **figure 5B**, les chercheurs regardent la concentration d'hémoglobine (Hgb) dans le lysat de rate de souris anémiques témoins (Ctrl) et transplantées (TX).

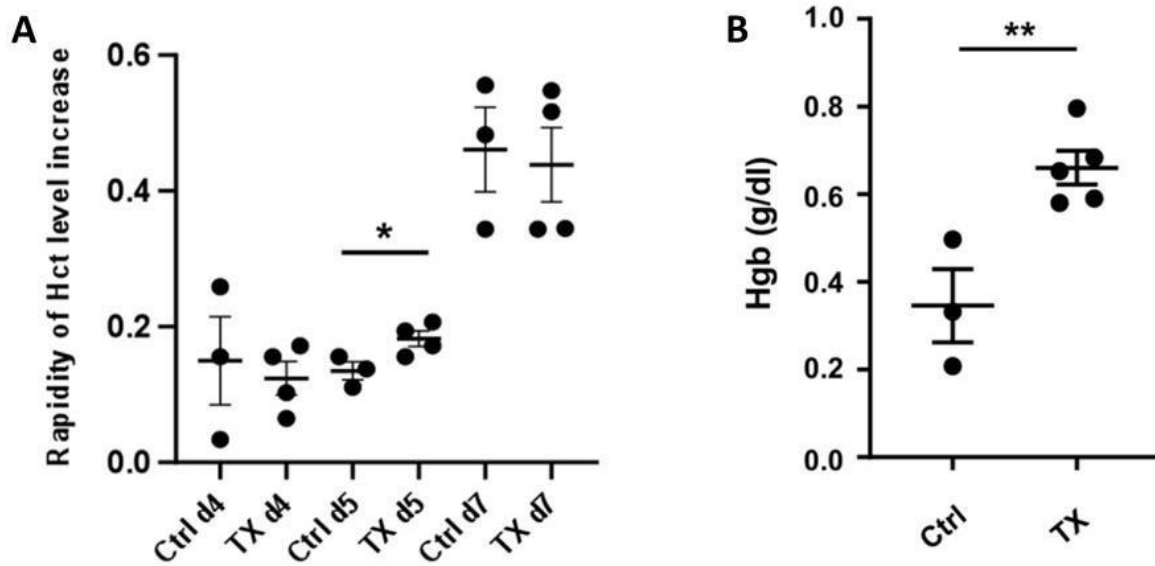


Figure 5 : Réponse à l'hypoxie des CCN dérivées de hiPSC *in vivo*.

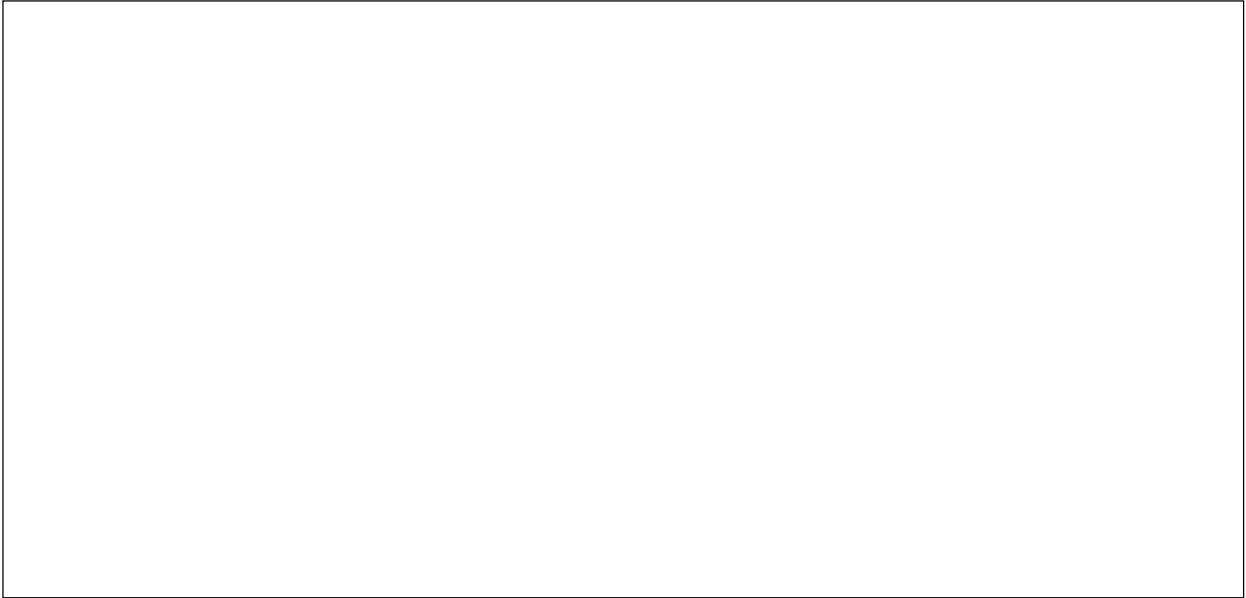
(A) Taux d'Hct chez les souris anémiques témoins (Ctrl) et transplantées (TX).

(B) Concentration d'hémoglobine (Hgb) dans le lysat de rate de souris anémiques contrôle (Ctrl) et transplantées (TX).

* et ** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 11 : Pourquoi les auteurs utilisent-ils des souris immunodéprimées pour leurs expériences *in vivo* ? 1 point

Question 12 : Interprétez le graphique de la figure 5. 1 point

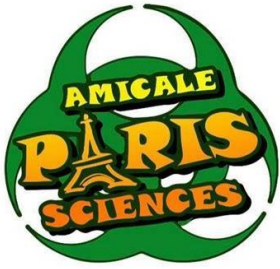


Question 13 : Donnez une conclusion globale sur les expériences présentées. 3 points



Question 14 : Quels sont les avantages et limites des différents outils biologiques utilisés ? 2 points

Question 15 : Pensez-vous que ces résultats pourraient permettre le développement d'une thérapie cellulaire pour l'anémie en général ? Argumentez. 2 points



Amicale Paris Sciences

Licence Sciences Biomédicales 2021-2022

Session 1 – S4 Correction

Biologie

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris

<http://www.aps-paris5.fr> - Email : assosaps@gmail.com

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris

UE SA04M030 Biologie 4

Développement, plasticité et cellules souches

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Document et/ou matériel autorisés : *(sans indication, tout document et/ou matériel sera interdit)*

Durée totale de l'épreuve : 1h30 12 pages - 15 questions

Chez la souris, la première source d'érythropoïétine (EPO) au cours du développement embryonnaire sont les cellules de la crête neurale (CCN). Puis ces cellules migrent vers le rein qui devient à son tour la principale source d'EPO.

Chez les patients atteints de maladie rénale chronique, la production d'EPO est fortement réduite, ce qui entraîne une anémie rénale. Les tentatives de traitement de cette maladie via l'administration d'EPO humaine ont montré des effets indésirables à long terme.

Question 1 : En vous basant sur vos connaissances acquises en cours, décrivez le rôle de l'EPO dans l'hématopoïèse. 1 point

Hormone synthétisée par les reins suite à une anémie ou un manque d'oxygène.
Active la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroblastiques.

Chez l'homme, on ignore encore si les CCN peuvent produire de l'EPO. Les chercheurs ont alors tenté de répondre à cette question en développant un nouveau protocole de différenciation de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en CCN. En effet, l'utilisation de telles cellules pourrait constituer une approche thérapeutique idéale pour le traitement de l'anémie rénale.

Question 2 : En vous basant sur les connaissances acquises en cours, donnez 3 caractéristiques des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). 1 point

Prolifération, capacité de différenciation, pluripotence, obtenues par reprogrammation génétique...

Question 3 : Citez brièvement les étapes de développement de la crête neurale et donnez 3 exemples de types cellulaires qui en dérivent. 1 point

- 1- Induction de la bordure neurale
 - 2- Spécification de la crête neurale
 - 3- Migration
 - 4- Différenciation
- 31 dérivés possibles : tissu adipeux (adipocytes), cartilage (chondroblastes) et tissu osseux (ostéoblastes), tissu musculaire (myocytes), glandes sécrétrices (thyroïde,

L'activation de la voie Wnt canonique est impliquée dans la différenciation des hiPSC en CCN *in vitro*. Les auteurs traitent alors des hiPSC pendant 8 jours avec 5mM de chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur puissant de GSK3 β , dans des conditions normales d'oxygènes (normoxie). Ils obtiennent par RT-PCR les résultats de la **figure 1**.

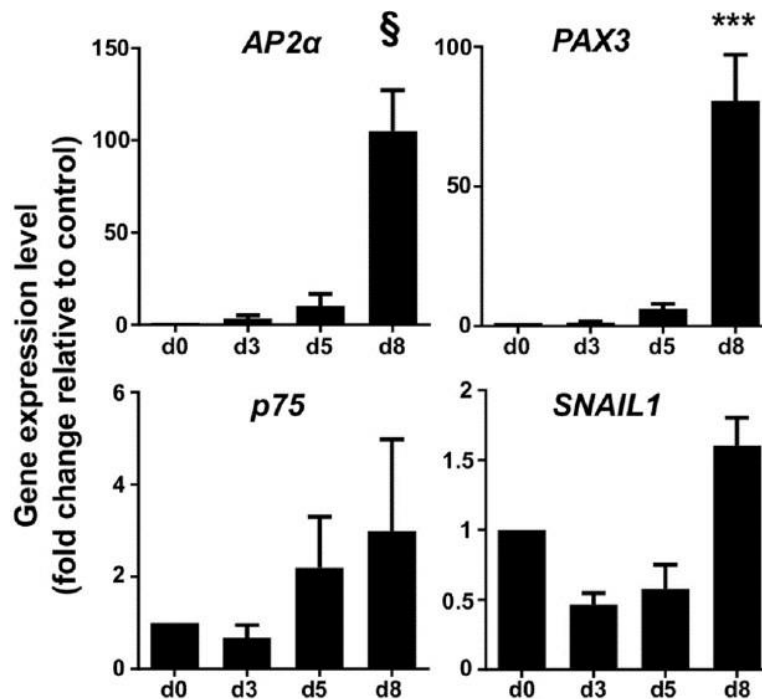
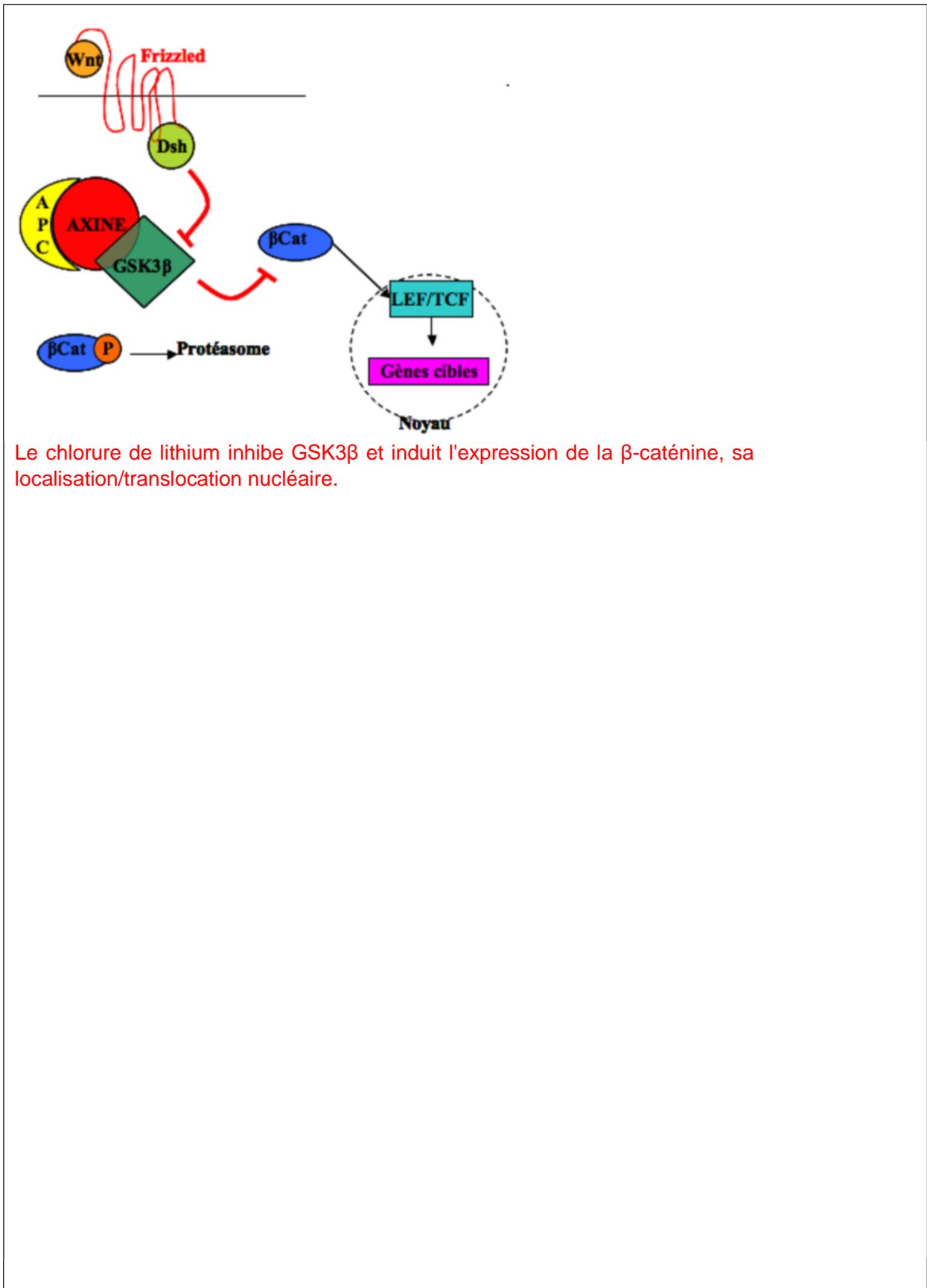


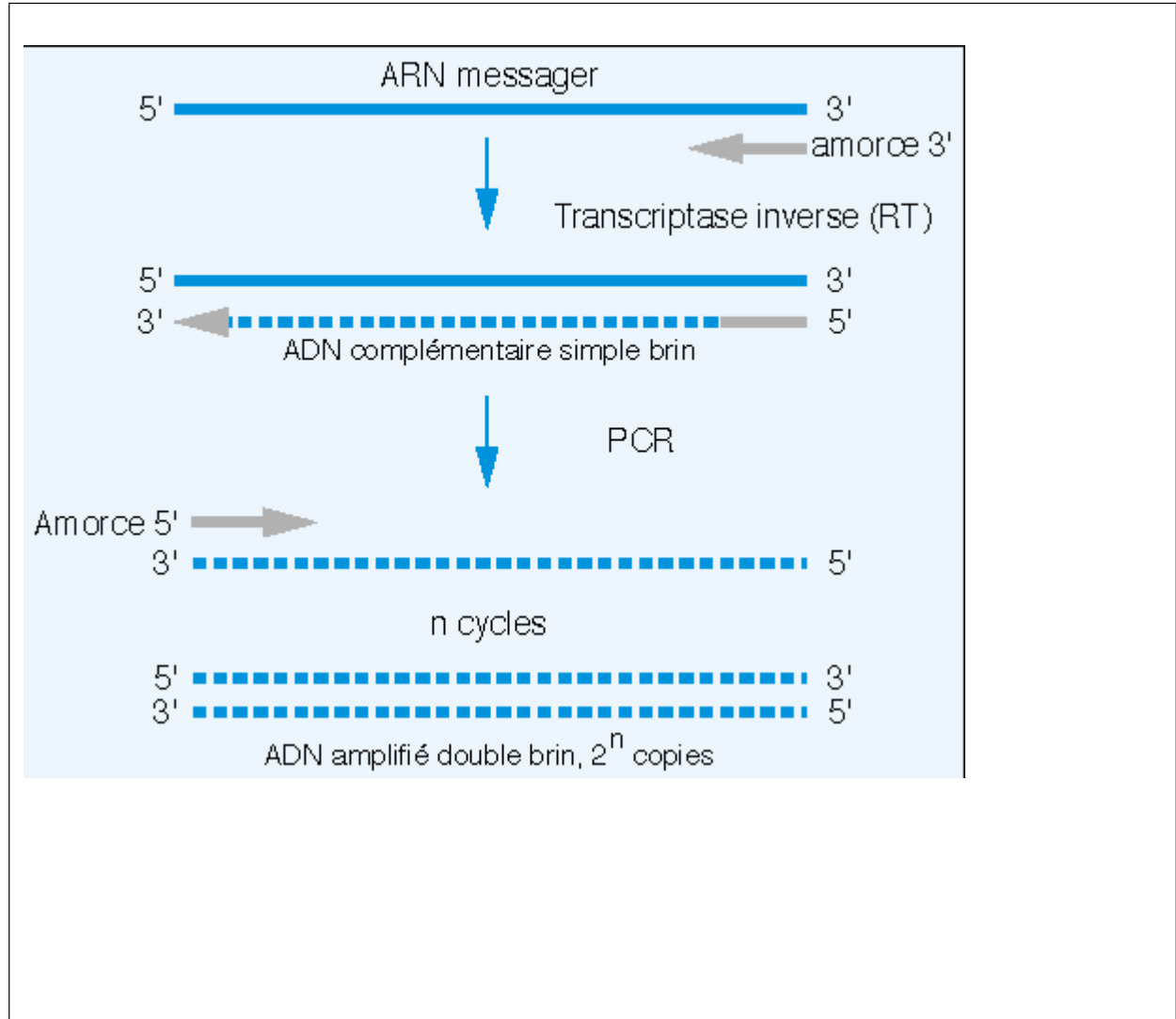
Figure 1 : Niveaux d'expression d'AP2 α , PAX3 et p75, entre 0 (d0) et 8 jours (d8) de traitement par le LiCl en conditions normoxiques. AP2 α , PAX3 et p75 sont des gènes exprimés au cours de la différenciation en CCN. § et *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 4 : Proposez un schéma de la voie de signalisation Wnt canonique en précisant bien le rôle du LiCl dans ce protocole. **2 points**



Le chlorure de lithium inhibe GSK3β et induit l'expression de la β-caténine, sa localisation/translocation nucléaire.

Question 5 : Détaillez le principe de la technique de la RT-PCR. 1 point



Toujours *in vitro* après 8 jours de culture, les auteurs regardent ensuite une autre caractéristique des CCN, présentée dans la **figure 2**.

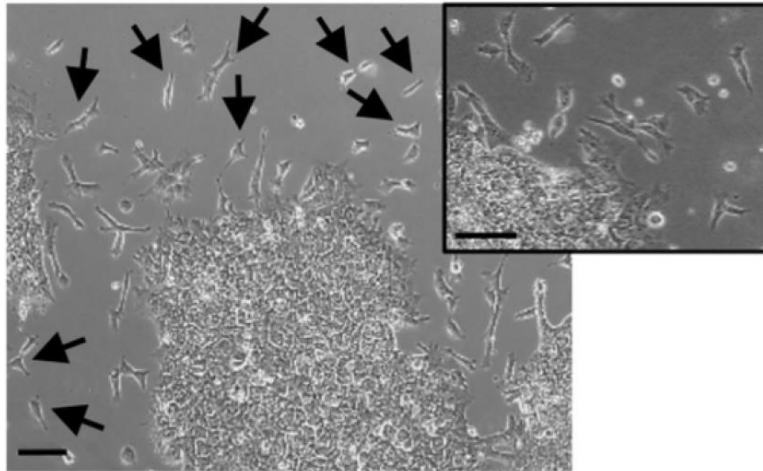


Figure 2 : hiPSC traitées par du LiCl pendant 8 jours en conditions normoxiques. Les flèches montrent les cellules qui sortent des clones cellulaires formés. Ces cellules ne sont pas observées dans les cultures de hiPSC non différenciées.

Question 7 : Quelle est cette caractéristique démontrée dans la figure 2 ? Expliquez pourquoi elle est importante pour les CCN ? 1 point

Formation de colonies classiques avec des cellules individuelles migrant en périphérie. Les CCN sont connues pour être très mobiles.

Ensuite, les auteurs analysent la capacité des CCN à produire et à sécréter de l'EPO. La concentration d'EPO est mesurée dans le surnageant de hiPSC indifférenciées (d0, contrôle) et de CCN dérivées de hiPSC (5 mM LiCl) cultivées dans des conditions normoxiques ou hypoxiques (faible quantité d'O₂: 5% O₂) pendant 48 et 72 heures. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 3**.

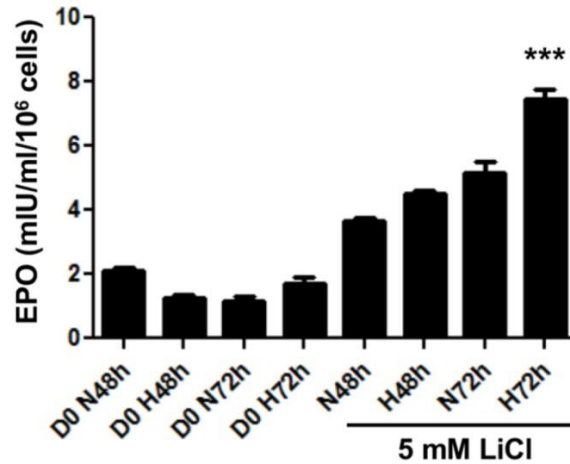


Figure 3 : Concentration d'EPO dans le surnageant de hiPSC indifférenciées (d0, contrôle) et de CCN dérivées de hiPSC (5 mM LiCl) cultivées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) pendant 48 et 72 heures. *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 8 : Donnez une interprétation de ces résultats obtenus avec des cellules humaines. 1 point

Les CCN dérivés de hiPSC peuvent produire et libérer de l'EPO et sont très sensibles à l'hypoxie. Possiblement pour l'érythropoïèse non seulement chez la souris mais aussi dans les embryons humains.

Afin de vérifier si l'EPO produite par les CCN possède une activité érythropoïétique, les chercheurs exposent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) humaines au surnageant de CCN préalablement cultivées dans des conditions hypoxiques pendant 72 h (groupe EPO). Le nombre de colonies érythroïdes (BFU-E) est quantifié et comparé à celui du groupe contrôle (**figures 4 A-C**). De plus, certains surnageants sont traités avec un anticorps neutralisant l'EPO (EPO + inh, **figure 4D**).

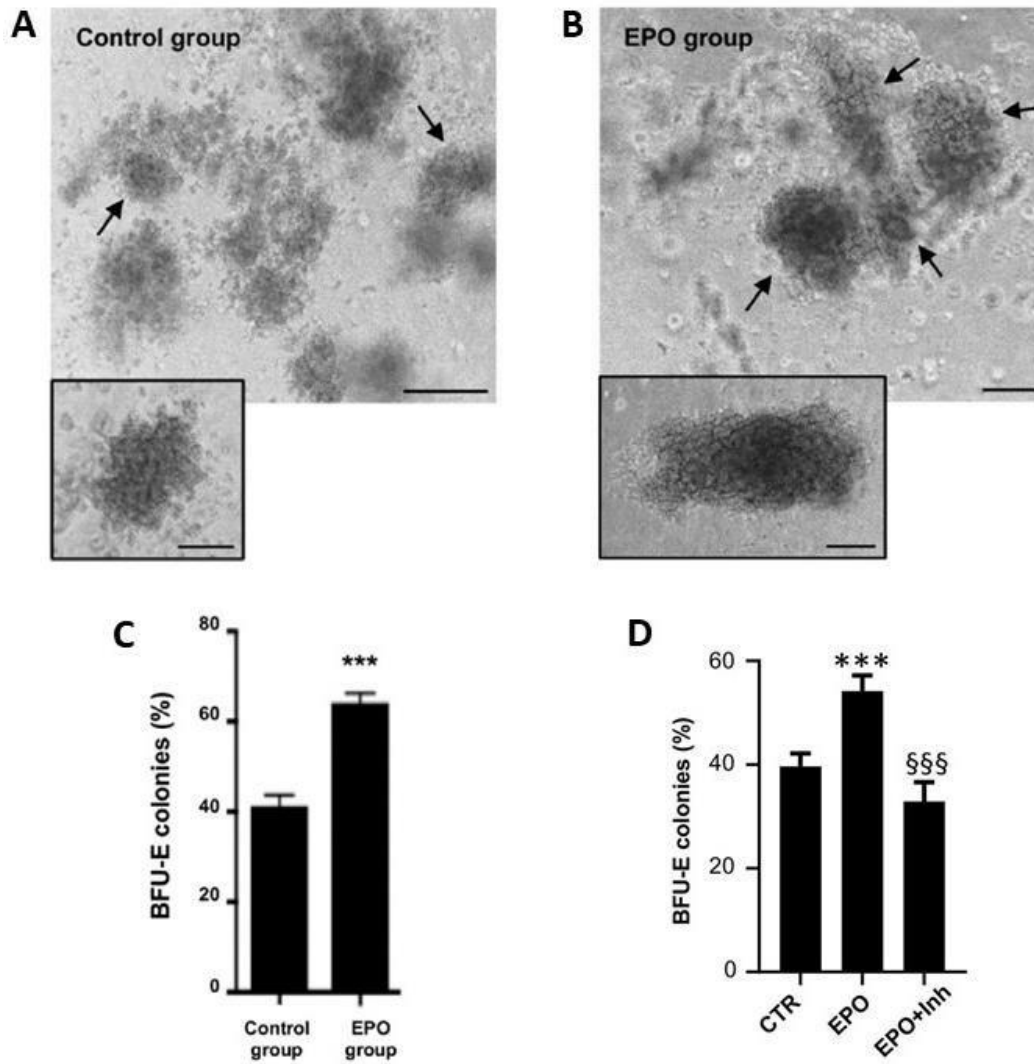


Figure 4 : Effet de l'EPO produite par les cellules différenciées en CCN sur les CSH.

(A) Photos du groupe CCN contrôle.

(B) Photos du groupe CCN préalablement cultivées en hypoxie pendant 72h.

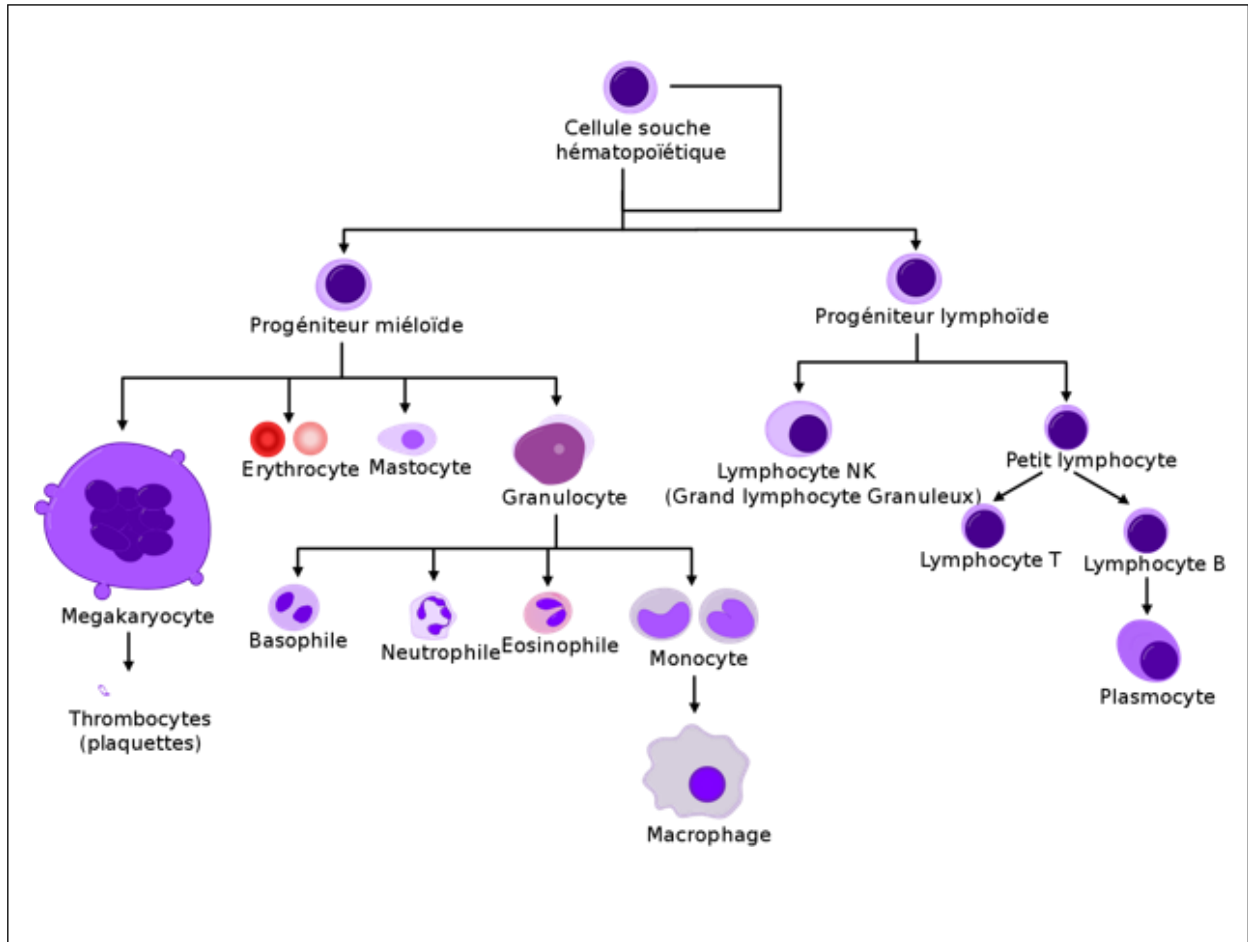
(C) Pourcentage de colonies érythroïdes (BFU-E).

(D) Pourcentage de BFU-E + ajout d'un anticorps neutralisant l'EPO (EPO+inh).

§§§ et *** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 9 : Rappelez les grandes étapes de différenciation des cellules souches hématopoïétiques ?

1 point



Question 10 : Que pouvez-vous conclure des résultats de la figure 4 ? 1 point

Les cellules traitées forment beaucoup plus de colonies BFU-E que le groupe témoin. Cette réponse est abolie lorsque le surnageant est traité avec un anticorps neutralisant l'EPO. Ces résultats suggèrent que, en réponse à l'hypoxie, les CCN libèrent de l'EPO fonctionnelle qui peut stimuler l'érythropoïèse humaine.

Afin d'évaluer si les CCN dérivées de hiPSC peuvent répondre à l'hypoxie *in vivo* et ainsi améliorer l'anémie, les auteurs transplantent des CCN dans des disques d'atélocollagène à des souris immunodéprimées en sous-cutané. Ces souris sont anémiées en effectuant des prélèvements sanguins rapides aux jours 0 et 1. Au jour 2, lorsque le taux d'hématocrite (Hct) a diminué de manière significative, les CCN sont transplantées. L'hématocrite correspond au volume occupé par les érythrocytes dans le sang par rapport au volume total de sang et son taux sert donc à diagnostiquer ou suivre certaines anomalies sanguines comme l'anémie. Ce taux est mesuré 2, 3 ou 5 jours après la transplantation soit après 4, 5 ou 7 jours. (d4, d5, d7) dans la **figure 5 A**. Dans la **figure 5B**, les chercheurs regardent la concentration d'hémoglobine (Hgb) dans le lysat de rate de souris anémiques témoins (Ctrl) et transplantées (TX).

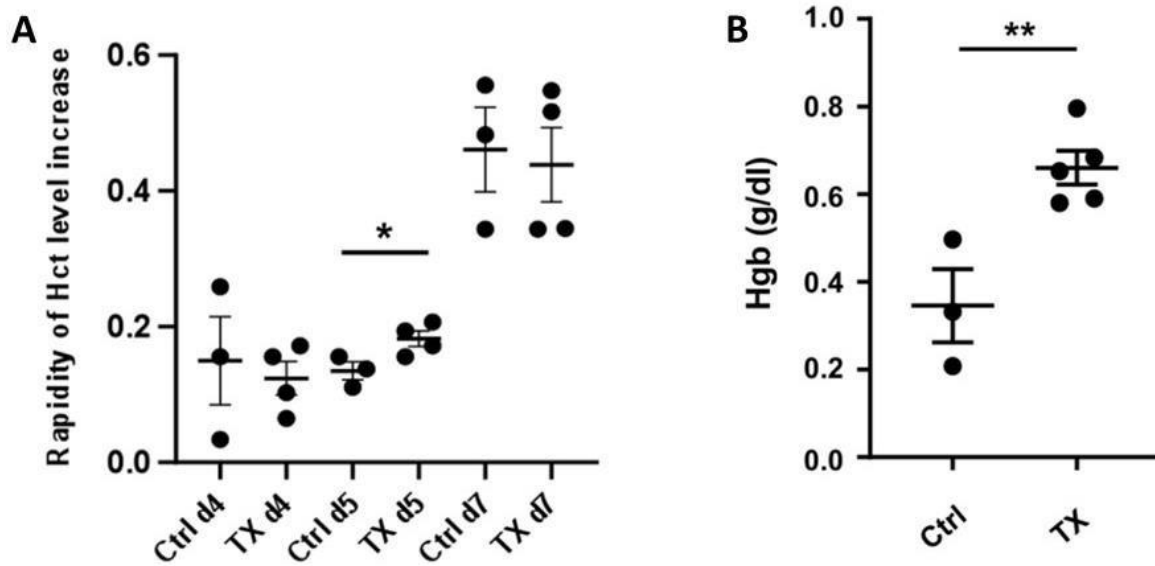


Figure 5 : Réponse à l'hypoxie des CCN dérivées de hiPSC *in vivo*.

(A) Taux d'Hct chez les souris anémiques témoins (Ctrl) et transplantées (TX).

(B) Concentration d'hémoglobine (Hgb) dans le lysat de rate de souris anémiques contrôle (Ctrl) et transplantées (TX).

* et ** indiquent des résultats statistiquement significatifs.

Question 11 : Pourquoi les auteurs utilisent-ils des souris immunodéprimées pour leurs expériences *in vivo* ? 1 point

Rejet espèces différentes cellules humaines / souris.
Modèle classique présenté en cours.

Question 12 : Interprétez le graphique de la figure 5. 1 point

Les CCN transplantées augmentent de manière significative les taux de Hct 3 jours (d5) après la transplantation mais aussi le taux d'Hgb.

Question 13 : Donnez une conclusion globale sur les expériences présentées. 3 points

Ces résultats démontrent que les CCN dérivés de hiPSC induisent l'érythropoïèse in vitro et in vivo. In vivo, ces cellules semblent survivre et peuvent répondre physiologiquement à l'anémie...
A + détailler.

Question 14 : Quels sont les avantages et limites des différents outils biologiques utilisés ? 2 points

Avantages : assez facile d'utilisation, résultats robustes...

Limites : les iPS et les cellules dérivées sont-elles safe, limite du modèle animal immunodéprimé, suivi à plus long terme des animaux...

Question 15 : Pensez-vous que ces résultats pourraient permettre le développement d'une thérapie cellulaire pour l'anémie en général ? Argumentez. 2 points

En termes de développement de la thérapie cellulaire, l'implantation sous-cutanée répond aux exigences d'une application clinique facile. Néanmoins, il faut évaluer l'innocuité et la survie à long terme de ces cellules, l'efficacité de l'implantation sous-cutanée, l'efficacité thérapeutique dans un modèle d'anémie chronique car ici on ne regarde que l'anémie rénale...