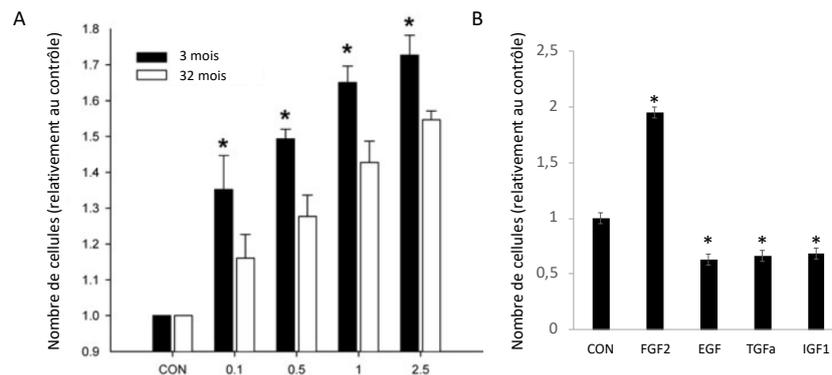


# TD1 : Modulation de l'expression génique en réponse à des voies de signalisation

## 1. Réponses cellulaires à des facteurs de croissance

Le terme « facteur de croissance » regroupe de nombreuses protéines sécrétées stimulant la prolifération et la survie cellulaires (effets à la base leur nom), mais également bien d'autres processus comme la migration, le métabolisme ou la différenciation cellulaire (acquisition des fonctions spécialisées).



**Figure 1 :** (A) Effets du FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) sur des progéniteurs musculaires de rats jeunes (3 mois) ou âgés (32 mois). Rappel : le terme « progéniteur » fait référence à des cellules en devenir, c'est à dire des cellules qui sont destinées à générer des cellules différenciées fonctionnelles (en l'occurrence ici, il s'agit de futures cellules musculaires). Les cellules ont été mises en culture (même densité cellulaire de départ pour toutes les conditions expérimentales) en présence de différentes doses de FGF2 (de 0,1 à 2,5 ng/mL), puis comptées 48h après (en excluant les cellules mortes). Adapté de Jump et al. Exp Physiol 2009. (B) Effets de différents facteurs de croissance sur des progéniteurs neuronaux en culture. Les cellules ont été mises en culture (même concentration de départ pour toutes les conditions expérimentales) en présence de 10 ng/mL de FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), EGF (Epidermal Growth Factor), TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ) ou IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1), puis comptées 24h après (en excluant les cellules mortes). Adapté de Ochoa et al. J Neuroscience Research 1997. CON : contrôle négatif non traité. \* : différence statistiquement significative (entre les conditions 3 mois et 32 mois en A et relativement au contrôle en B).

**1.1** Quel processus cellulaire peut expliquer l'augmentation du nombre de cellules au cours du temps après traitement par un facteur de croissance ?

**1.2** Décrire le graphique de la Figure 1A en prenant soin (i) de commenter les effets des différentes doses de FGF et (ii) de comparer la réponse des progéniteurs musculaires jeunes et âgés.

**1.3** Proposer une hypothèse pour expliquer la différence de réponse observée entre progéniteurs jeunes et âgés.

**1.4** Décrire le graphique de la Figure 1B. Que vous apprend-il sur les facteurs de croissance et leurs effets sur les cellules ?

## 2. Schématisation d'une voie de signalisation

### Introduction

La voie de signalisation Wnt (du nom de la famille de ligands impliqués), contrôle de nombreux aspects du développement comme la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaire. Sa suractivation est à l'origine de nombreux cancers, comme le cancer colorectal.

### Objectif

Le texte ci-dessous décrit le fonctionnement de la voie Wnt. À partir des informations fournies, réalisez un schéma légendé décrivant le plus précisément possible les liens entre les différents acteurs moléculaires en présence ou absence du ligand de la voie (travail de groupe). On prendra soin de bien distinguer sur le schéma le cytoplasme du noyau.

### Texte à schématiser (schéma à compléter en page suivante)

Les ligands de la famille Wnt lient des récepteurs membranaires appelés Frizzled (Frz). L'effecteur intracellulaire majeur de la voie Wnt est une protéine appelée  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat).

En l'absence de signaux Wnt extracellulaires, la  $\beta$ -cat est associée dans le cytoplasme à un complexe protéique contenant plusieurs protéines dont une kinase appelée GSK3 (Glycogen Synthase 3). Au sein de ce complexe, la  $\beta$ -cat est phosphorylée par la kinase GSK3, ce qui conduit à son adressage au protéasome et donc à sa destruction. Dans le noyau un facteur de transcription nommé TCF inhibe la transcription des gènes cibles de la voie (il se comporte dans ce cas comme un inhibiteur transcriptionnel).

La fixation du ligand Wnt à son récepteur Frz active un second messager cytoplasmique nommé Dishevelled (Dsh) qui entraîne la dissociation du complexe protéique contenant la  $\beta$ -cat et la GSK3. La  $\beta$ -cat « libre » n'est plus phosphorylée ni dégradée. Elle s'accumule alors dans la cellule et une partie est transloquée dans le noyau. Là, elle s'associe au facteur de transcription TCF qui devient alors capable d'activer la transcription des gènes cibles de la voie (il se comporte désormais comme un activateur transcriptionnel).

*NB : On notera que les gènes cibles de la voie Wnt peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre et par conséquent la réponse de la cellule au signal est elle-même variable.*

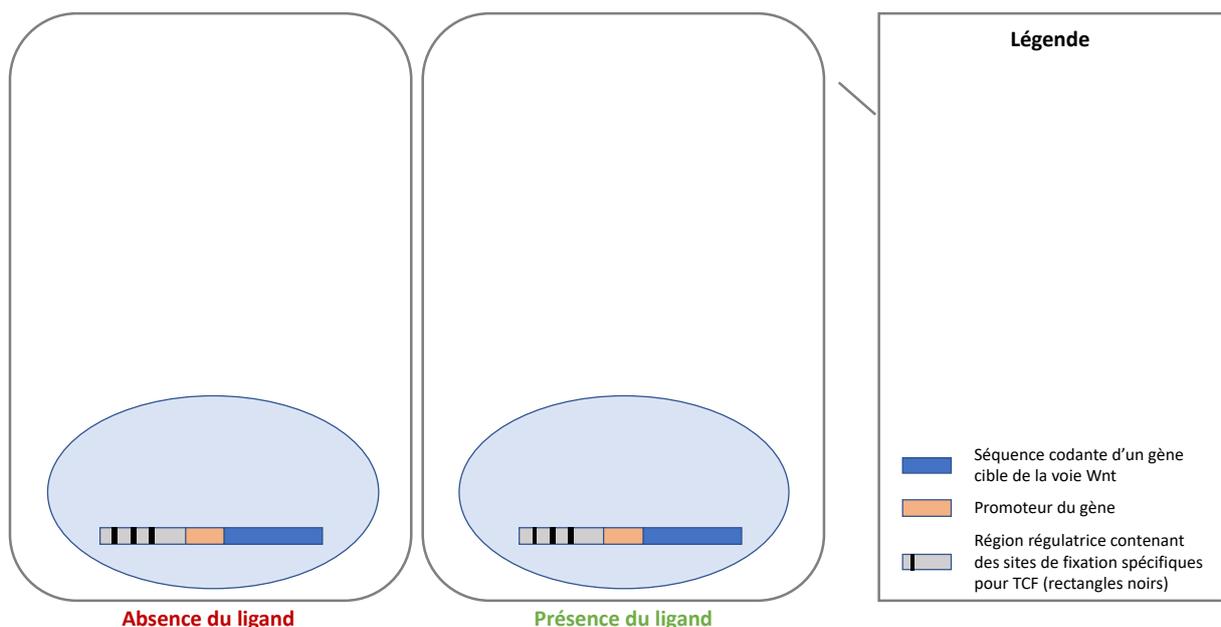
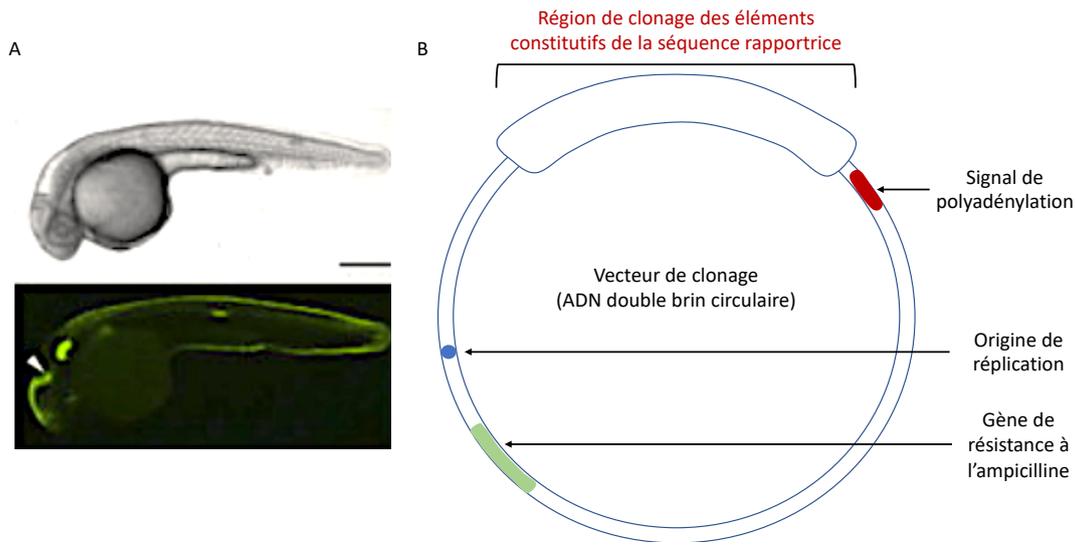


Figure 2 : Schéma à compléter de la voie Wnt.

### 3. Défi technologique : construire un gène « rapporteur » de l'activité de la voie de signalisation Wnt

On souhaite construire un vecteur codant une protéine fluorescente « rapportrice » de la voie Wnt. Une fois le vecteur transfecté dans des cellules ou introduit dans un organisme, il doit permettre de **visualiser les cellules ou tissus dans lesquels la voie est active** (cellules ou tissus dans lesquels la transcription des gènes cibles de la voie est activée suite à la réception d'un signal ; Figure 3A).



**Figure 3 :** (A) Embryon de poisson zèbre transgénique exprimant une protéine GFP rapportrice de l'activité de la voie Wnt. Le panel du haut correspond à l'embryon observé en contraste de phase, celui du bas, au même embryon observé en fluorescence (vues de profil ; antérieur à gauche, dos en haut). D'après Shimizu *et al.* *Developmental Biology* 2012. (B) Schéma à compléter du vecteur d'expression codant la protéine « rapportrice » de l'activité de la voie Wnt.

**3.1** Rappelez brièvement les étapes d'un clonage moléculaire.

**3.2** À l'aide du schéma de la Figure 2, et en supposant que vous disposez de toutes les séquences nucléotidiques requises, compléter le schéma de vecteur en Figure 3B, en indiquant les éléments qu'il doit contenir pour que l'expression de la protéine rapportrice GFP reflète les régions d'activités de la voie Wnt, telles qu'observées en Figure 3A.

**3.3** L'agent pharmacologique BIO est un inhibiteur de la GSK3. Représentez l'effet de cet agent sur votre schéma de la Figure 2. Quelles peuvent être les conséquences d'un traitement BIO sur (i) les cibles de la voie de la Wnt, (ii) l'expression du rapporteur GFP des embryons transgéniques de la Figure 3A ?

**3.4** L'agent pharmacologique IWR1 est un inhibiteur de la  $\beta$ -caténine. Représentez l'effet de cet agent sur votre schéma de la Figure 2. Quelles peuvent être les conséquences d'un traitement IWR1 sur (i) les cibles de la voie de la Wnt, (ii) l'expression du rapporteur GFP des embryons transgéniques de la Figure 3A ?

## TD2 : Contrôle de la progression du cycle cellulaire

### 1. Schématiser le contrôle de la transition G1/S

#### Introduction

Dans les organismes pluricellulaires, un contrôle précis du cycle cellulaire au cours du développement et de la croissance est crucial pour déterminer la taille et la forme de tous les tissus. Un tel contrôle existe aussi dans les tissus adultes qui se renouvellent et le moindre dérèglement du cycle peut conduire à la genèse de tumeurs. Vous avez vu les différentes phases du cycle cellulaire et le principe général de leur contrôle par les couples Cyclines-CDK. On s'intéresse plus précisément dans cet exercice au contrôle de la transition G1/S.

**Objectif de l'exercice : Schématiser la régulation de la transition G1/S à partir d'un texte.**

Le texte ci-dessous décrit les événements moléculaires qui président à cette transition. À partir des informations fournies, réalisez un schéma légendé décrivant le plus précisément possible les événements moléculaires à l'œuvre dans le contrôle du passage de G1 à S (travail de groupe).

#### Texte à schématiser

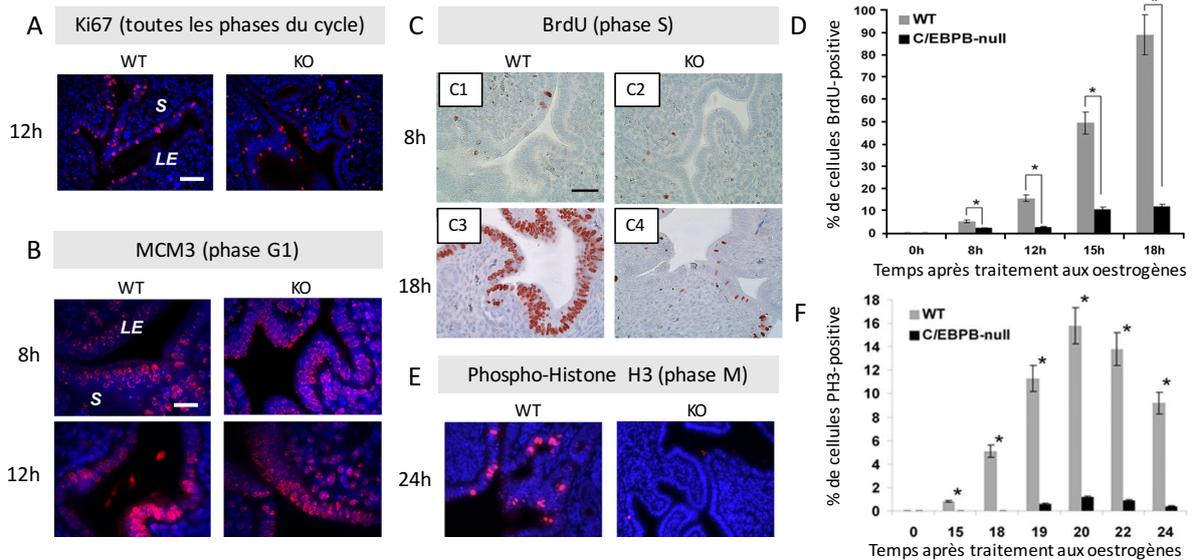
Au début de la phase G1, la cellule contient le complexe Cycline D-CDK 4/6. Elle contient également un complexe moléculaire nucléaire composé de la protéine Rb associée au facteur de transcription E2F. Ce dernier, même fixé à ses séquences régulatrices spécifiques, ne peut pas activer ses gènes cibles tant qu'il est associé à Rb sous sa forme non phosphorylée. Le complexe Cycline D-CDK 4/6 une fois activé (par exemple sous l'effet de facteurs extracellulaires mitogènes) initie la phosphorylation de la protéine Rb. La protéine Rb est un des substrats les plus importants pour les Cycline-CDK de la phase G1 chez les mammifères.

La phosphorylation de Rb entraîne l'activation de la transcription de gènes codant les protéines indispensables à la synthèse de l'ADN et à la transition G1/S, dont le gène codant une nouvelle cycline, la Cycline E.

Une fois synthétisée, la Cycline E peut alors s'associer avec la kinase CDK2. Or, ce nouveau complexe Cycline E-CDK2 a lui aussi pour protéine cible la protéine Rb qu'il phosphoryle. On est donc en présence d'une boucle de rétro-activation positive permettant l'amplification de la phosphorylation de Rb et la libération de E2F. L'hyperphosphorylation de Rb (sur 14 sites) permet le passage du « point de restriction », moment à partir duquel les cellules peuvent poursuivre leur cycle cellulaire indépendamment de toute influence extérieure.

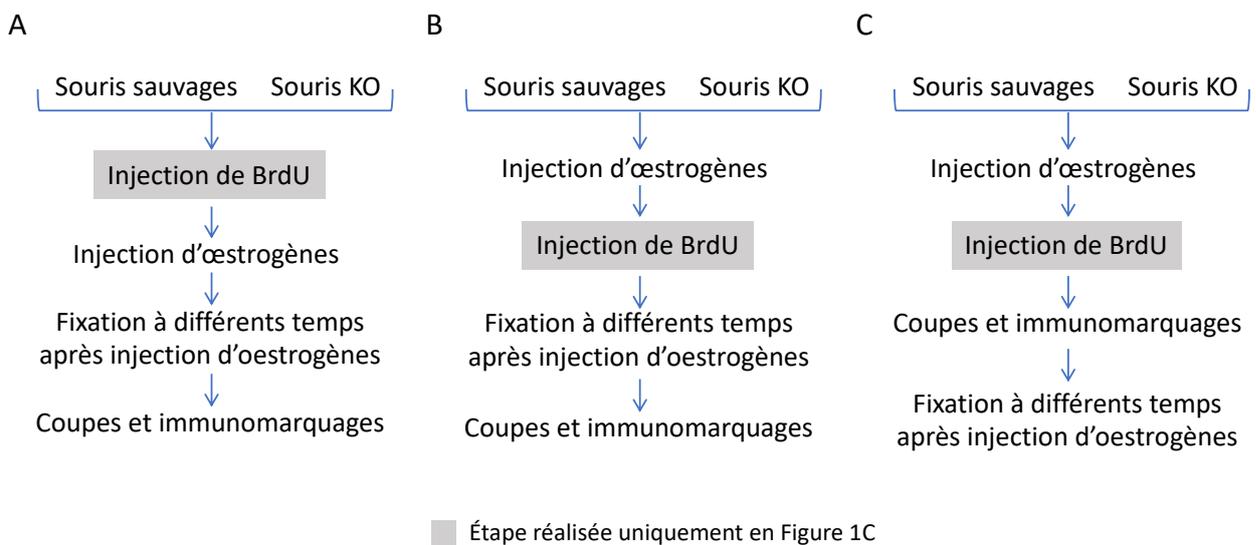
En fin de phase G1, le facteur E2F stimule la transcription de gènes permettant l'entrée et la progression dans la phase S (cycline A).





**Figure 1 :** Analyse par immunofluorescence (A, B, E) ou immunocytochimie (C) de l'expression de différents marqueurs des phases du cycle cellulaire (A, B, E, F) ou de l'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU, un analogue de désoxythymidine ; C, D). En (A, B, E), les signaux apparaissent en rouge et les noyaux sont contre-colorés en bleu. En (C), le signal apparaît en brun. L'analyse est réalisée sur des coupes d'épithélium utérin à différents temps après injection d'oestrogènes aux souris sauvages (WT) ou KO (*C/EBPβ*<sup>-/-</sup>). L'injection de BrdU a été réalisée une heure avant le sacrifice des souris. (D, F) Quantification du pourcentage de cellules marquées au BrdU (D) ou de cellules en mitose (F) au cours du temps (les astérisques indiquent les différences statistiquement significatives). LE : épithélium luminal ; S : stroma.

**2.3** Parmi ces 3 schémas expérimentaux, lequel représente l'expérience réalisée dans la Figure 1 ?



**2.4** D'après la figure 1A et sachant (i) que la prolifération dans l'épithélium utérin est quasiment nulle en l'absence d'œstrogènes (données non montrées) et (ii) que la protéine Ki67 marque les cellules en prolifération (quelle que soit la phase du cycle où elles se trouvent), quelles propositions parmi les suivantes vous paraissent correctes ?

- A. De nombreuses cellules épithéliales sont rentrées dans le cycle sous l'effet des œstrogènes mais uniquement chez le sauvage.
- B. De nombreuses cellules épithéliales sont rentrées dans le cycle sous l'effet des œstrogènes mais uniquement chez les souris KO.
- C. De nombreuses cellules épithéliales sont rentrées dans le cycle sous l'effet des œstrogènes dans les souris sauvages et KO.

**2.5** Décrire la figure 1B. À quelle phase du cycle cellulaire la majeure partie des cellules WT se trouvent-elles après 8h à 12h de traitement aux œstrogènes ? Et les cellules KO ? Montrez le chemin parcouru par ces cellules en complétant la Figure 2 avec des flèches.

**2.6** Décrire la figure 1C, D. À quelle phase du cycle cellulaire la majeure partie des cellules WT se trouvent-elles après 15h à 18h de traitement aux œstrogènes ? Qu'en est-il des cellules KO ? Montrez le chemin parcouru par ces cellules en complétant la Figure 2 avec des flèches.

**2.7** Décrire la figure 1E, F. À quelle phase du cycle cellulaire la majeure partie des cellules WT se trouvent-elles après 19h à 24h de traitement aux œstrogènes ? Qu'en est-il des cellules KO ? Montrez le chemin parcouru par ces cellules en complétant la Figure 2 avec des flèches.

**2.8** Proposer une explication au fait que toutes les cellules ne rentrent pas en mitose en même temps après traitement aux œstrogènes.

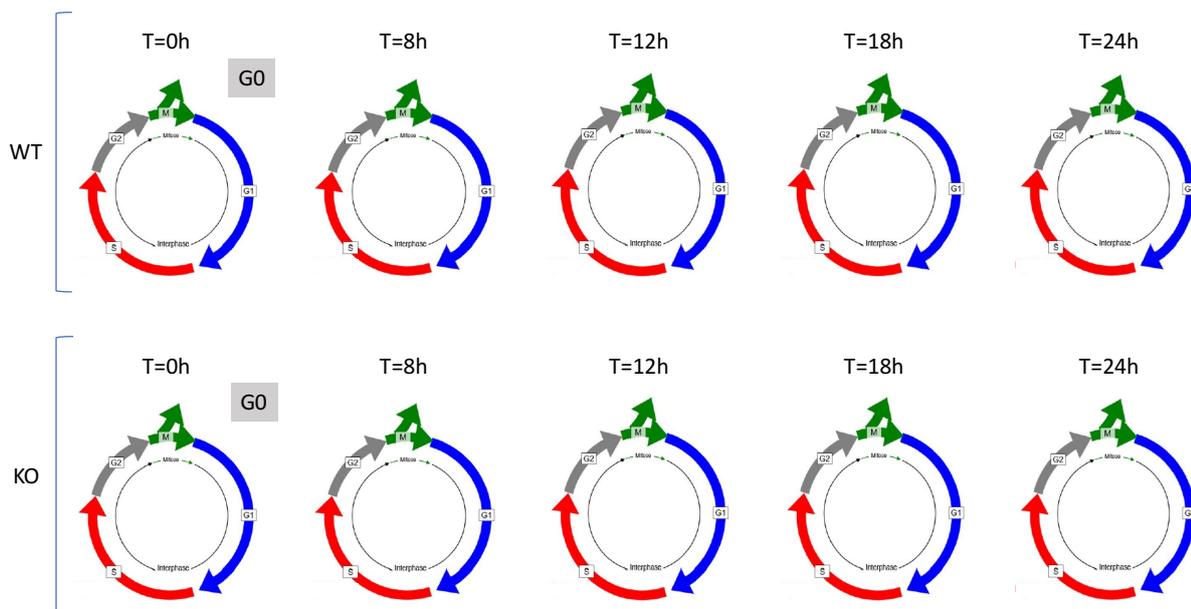


Figure 2 : Schéma à compléter.

**2.9** Quelle(s) proposition(s) traduit(en)t les résultats obtenus précédemment ?

- A. Les cellules dont le gène *C/EBPβ* est invalidé sont insensibles aux œstrogènes.
- B. Les cellules dont le gène *C/EBPβ* est invalidé sortent de G<sub>0</sub>, rentrent dans le cycle mais sont coincées en phase S.
- C. Les cellules dont le gène *C/EBPβ* est invalidé sortent de G<sub>0</sub>, rentrent dans le cycle mais n'arrivent pas à effectuer la transition G<sub>1</sub>/S.
- D. Les cellules dont le gène *C/EBPβ* est invalidé sortent de G<sub>0</sub>, rentrent dans le cycle mais n'arrivent pas à effectuer la transition G<sub>2</sub>/M.
- E. Les cellules dont le gène *C/EBPβ* est invalidé n'arrivent pas à se diviser.

**2.10** Conclure sur le rôle du facteur de transcription *C/EBPβ* dans le contrôle de la prolifération cellulaire induite par les oestrogènes.

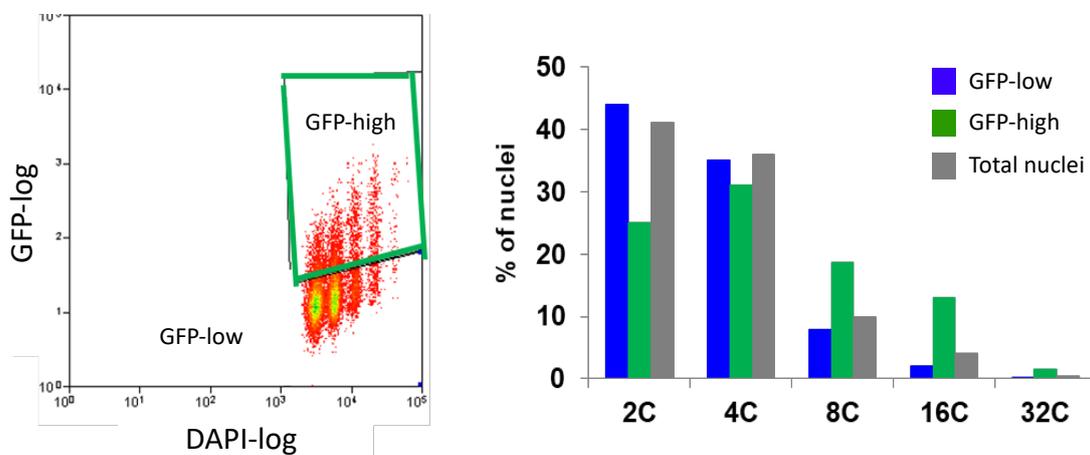
## TD3 : Endoréplication et développement

### 1. Endoréplication et élongation cellulaire

Le développement des plantes dépend de l'activité des méristèmes. Au sein des méristèmes, les cellules souches génèrent des cellules qui vont subir une importante transition au cours de leur vie, passant de cellules non spécialisées et se divisant rapidement à des cellules spécialisées qui seront incorporées dans les primordia. Ainsi la stimulation ou l'inhibition de la prolifération cellulaire est un déterminant majeur du développement des plantes. Chez différentes espèces de plantes, dont *Arabidopsis*, la transition de la prolifération cellulaire vers la différenciation s'accompagne d'un phénomène appelé endoréplication, qui est un cycle cellulaire particulier caractérisé par une succession de phases S sans mitose. Chaque cycle d'endoréplication aboutit à un doublement de la quantité d'ADN du noyau, et s'accompagne généralement d'un accroissement de la taille des cellules.

Les régulateurs clé du cycle cellulaire chez les eucaryotes sont les complexes CDK/Cyclines. Leur activité peut être notamment contrôlée par des inhibiteurs appelés protéines KRP. Afin de mieux comprendre le rôle des KRP chez les plantes, des chercheurs se sont intéressés à l'une d'entre elles, appelée KRP5 (Jégu *et al.*, Plant Physiology 2013).

Dans une première expérience, ils se sont intéressés au profil d'expression du gène *KRP5*, en utilisant des plantes transgéniques rapportrices exprimant la protéine GFP (« Green Fluorescent Protein ») sous le contrôle du promoteur du gène *KRP5* ( $pKRP5::GFP$  – Figure 1).



**Figure 1 :** Distribution du contenu en ADN de noyaux isolés à partir de feuilles d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant le gène codant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur de *KRP5* ( $pKRP5::GFP$ ). Les noyaux ont été marqués au DAPI. Les cellules ont ensuite été triées en fonction de l'intensité de fluorescence DAPI (reflétant la quantité d'ADN) et de l'intensité de fluorescence GFP (reflétant le niveau d'expression de *KRP5*). Sur le panel de gauche, chaque point représente une cellule. Le rectangle vert délimite les cellules présentant une forte intensité de fluorescence GFP (groupe « GFP-high » par opposition au groupe « GFP-low » dont l'intensité de fluorescence GFP, nulle ou faible, peut être considérée comme du bruit de fond).

1.1 Comment peut-on mesurer la quantité d'ADN d'un noyau ?

1.2 Que mesure-t-on dans cette expérience ? Que signifie 2c, 4c, 8c, etc... ? Décrire la répartition de chaque catégorie de noyaux (2c, 4c, 8c...) au sein de la population totale analysée (« total nuclei »).

1.3 Commentez la quantité d'ADN des cellules GFP-high et des cellules GFP-low. Quelle interprétation pouvez-vous faire de ce résultat ?

Afin de caractériser la fonction de KRP5, les chercheurs ont ensuite généré des plantes sur-exprimant cette protéine grâce à l'utilisation d'un promoteur viral (35S) qui confère une expression forte et constitutive aux gènes placés sous son contrôle. Ils ont ensuite mesuré l'effet de la sur-expression de KRP5 sur la quantité d'ADN des cellules (Figure 2).

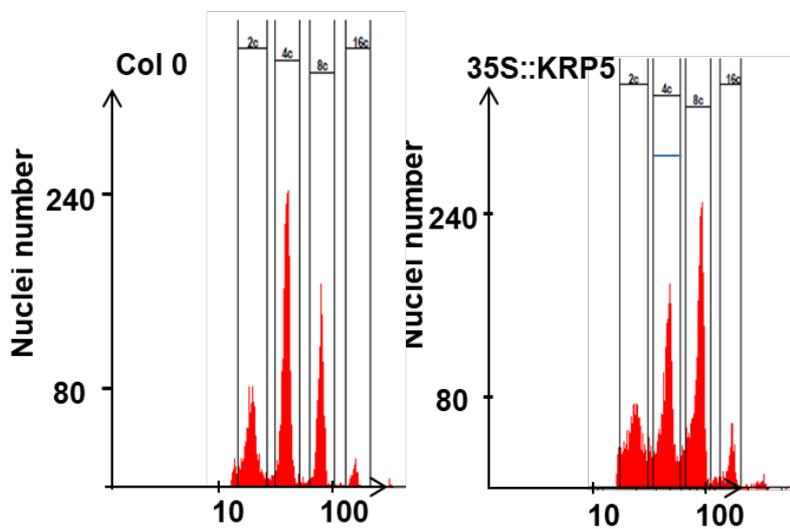
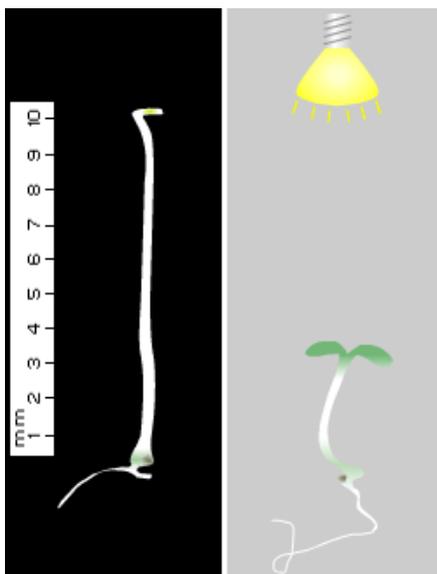


Figure 2 : Distribution du contenu en ADN de noyaux isolés à partir de feuilles de plantes sauvages (Col 0) et de plantes transgéniques sur-exprimant la protéine KRP5 (35S::KRP5).

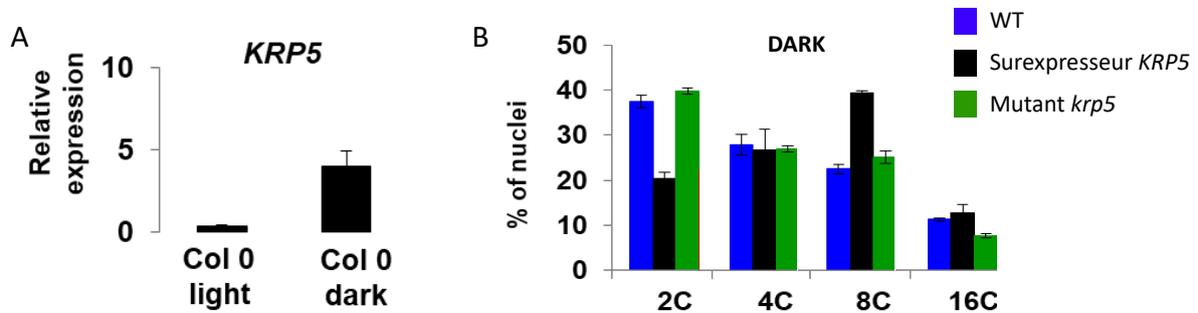
1.4 Analyser les résultats de la figure 2. Que pouvez-vous conclure ?



Lorsque des plantes sont privées de lumière, un certain nombre de changements physiologiques et développementaux se mettent en place. L'ensemble de ces processus est appelé étiolement, et permet aux plantes de s'allonger et d'éventuellement dépasser ainsi l'obstacle qui les prive de lumière. Les plantules d'*Arabidopsis* étioilées présentent en particulier un accroissement en longueur de l'hypocotyle. L'allongement de cet organe est uniquement dû à une élongation cellulaire, associée à une augmentation de l'endoréplication des cellules (Figure 3).

Figure 3 : Phénotype comparé de 2 jeunes plantes d'*Arabidopsis thaliana* s'étant développées à la lumière (plante dé-étioilée à droite) ou à l'obscurité (plante étioilée, à gauche).

Afin de déterminer si *KRP5* pourrait jouer un rôle lors du processus d'étiollement, les chercheurs ont mesuré l'expression de *KRP5* dans des plantules étiolées, et analysé l'effet d'une perte de fonction ou d'un gain de fonction de *KRP5* (surexpression) sur l'étiollement des plantes (Figure 4).



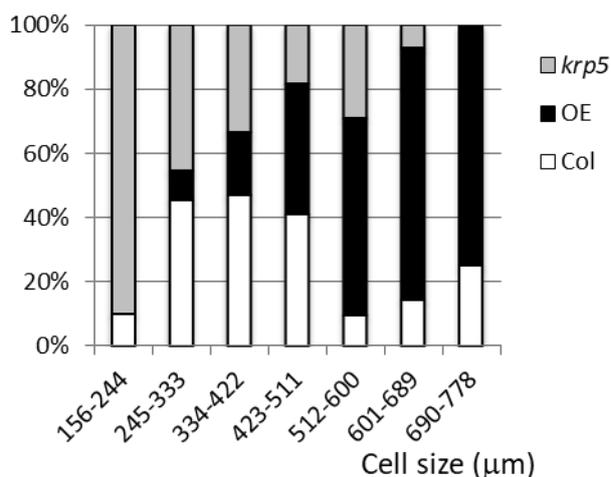
**Figure 4 :** (A) Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de *KRP5* dans des plantes sauvages (Col 0), en condition de lumière (light) ou d'obscurité (dark). (B) Distribution du contenu en ADN de noyaux isolés d'hypocotyles de plantes sauvages (WT), de plantes sur-exprimant *KRP5* ou du mutant *krp5*.

1.5 Commenter l'effet du passage à l'obscurité sur l'expression de *KRP5*.

1.6 Quels effets la surexpression de *KRP5* et sa perte de fonction ont-elles sur la quantité d'ADN des cellules (comparez à chaque fois par rapport au sauvage) ?

1.7 Conclure sur ces résultats.

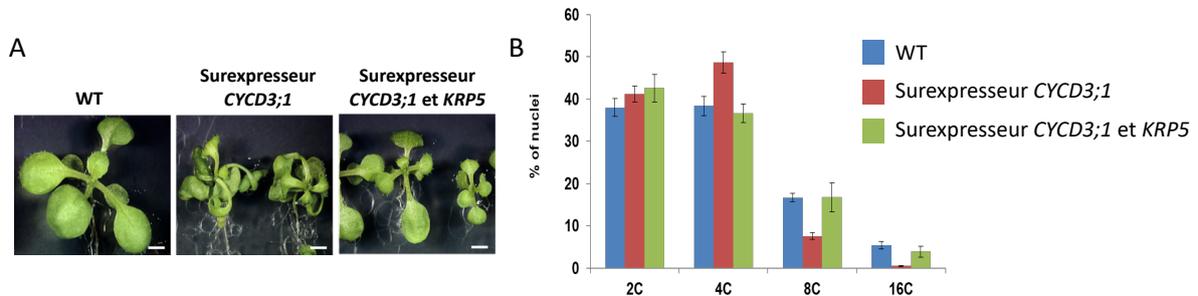
L'index d'endoréplication est souvent associé à la taille des cellules chez de nombreux organismes et dans différents types cellulaires. La distribution des cellules en fonction de leur taille a été mesurée au sein de l'hypocotyle de différents génotypes (Figure 5).



**Figure 5 :** Distribution de la taille des cellules corticales d'hypocotyles issus d'une plante sauvage (Col), du mutant *krp5* et de plantes surexprimant *KRP5* (OE).

1.8 Analyser les résultats de la figure 5. Que pouvez-vous conclure ?

L'un des rôles connus des protéines KRP est d'inhiber les complexes CDK/Cyclines en se fixant notamment aux cyclines de type D. Chez *Arabidopsis*, la sur-expression du gène codant la Cycline D3 (*CYCD3;1*) entraîne des changements importants de la morphologie des plantes ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules en 4C. Une lignée sur-exprimant le gène *CYCD3;1* a été transformée avec une construction 35S::*KRP5* (Figure 6).



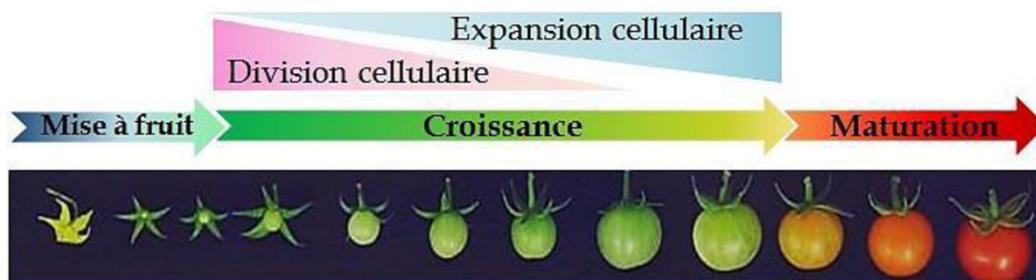
**Figure 6 :** (A) Phénotype de plantes sauvages (WT), sur-exprimant la *Cycline D3;1* seule ou sur-exprimant la *Cycline D3;1* et *KRP5*. (B) Distribution du contenu en ADN de noyaux isolés de feuilles des plantes correspondantes.

1.9 Quelle est l'hypothèse testée au cours de cette expérience ?

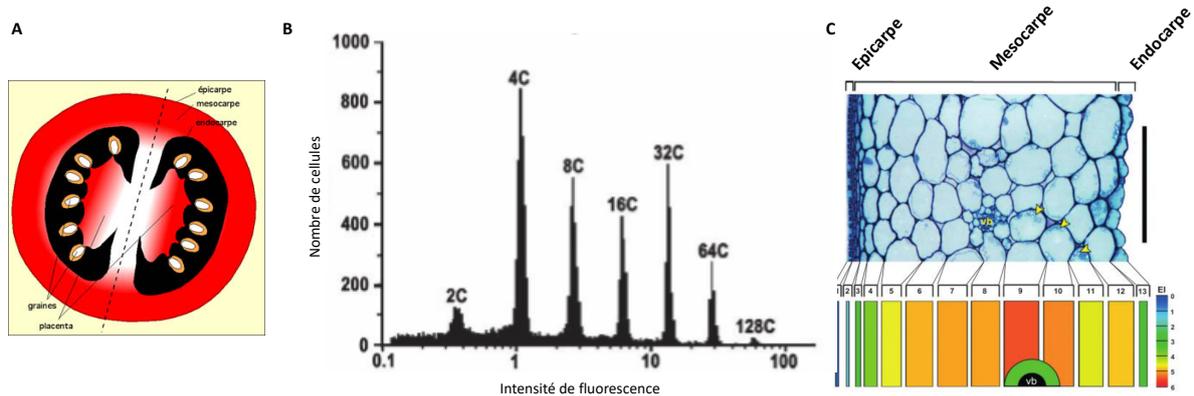
1.10 Analysez les résultats. Que pouvez-vous conclure ?

## 2. Endoréplication et développement du fruit de tomate

La croissance du fruit de tomate repose sur des événements de divisions puis de croissance cellulaire.



Au sein des différentes assises cellulaires qui composent le fruit, on observe des tailles de cellules très variables pour lesquelles des analyses de cytométrie en flux ont été effectuées (Figure 7).



**Figure 7 :** (A) Représentation schématique d'une coupe de tomate montrant les différentes assises cellulaires : épicarpe, mésocarpe et endocarpe (B) Analyse par cytométrie en flux de cellules de tomates matures après marquage au DAPI (intercalant de l'ADN). (C) Distribution des index moyens d'endoréplication en fonction des assises cellulaires. L'échelle de couleur à droite indique le nombre de cycles d'endoréplication moyen observé (d'autant plus élevé que la couleur est chaude). D'après Bourdon *et al.*, *The Plant Journal* 2011.

2.1 Décrire le graphique de la Figure 7B. Conclure sur la quantité d'ADN des cellules de la tomate.

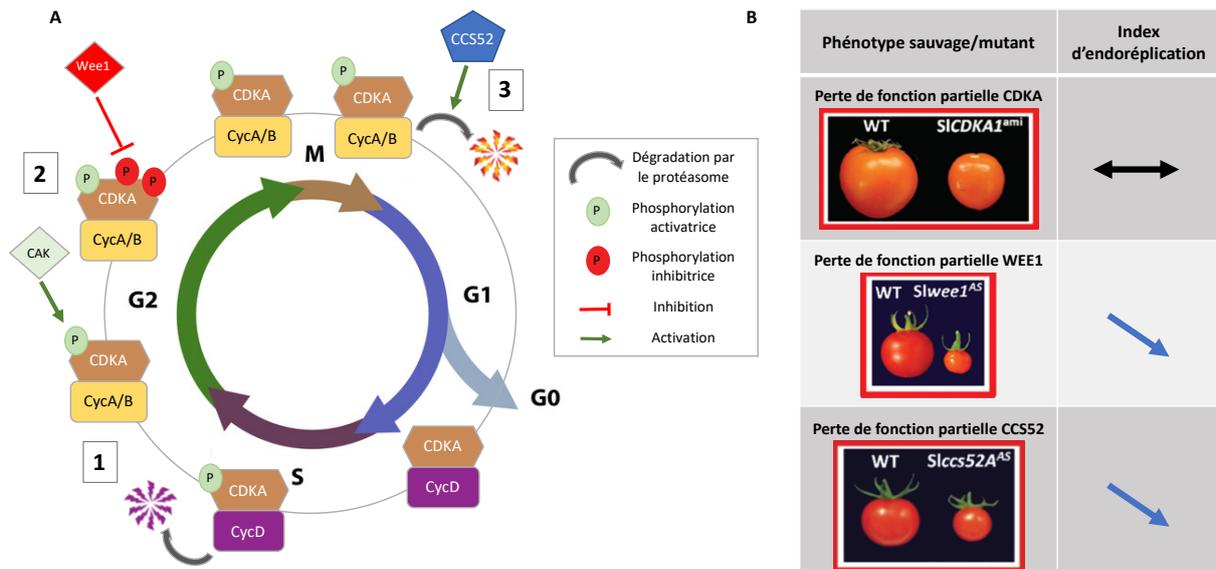
2.2 Décrire la Figure 7C. Conclure sur la corrélation entre quantité d'ADN et taille des cellules.

Des approches génétiques et moléculaires ont permis d'identifier des acteurs conservés de contrôle du cycle cellulaire (Figure 8A). Des expériences de perte ou de gain de fonction de certains de ces gènes ont montré des conséquences sur les phénotypes du fruit de tomate et sur l'index d'endoréplication (Figure 8B).

2.3 D'après la Figure 8A, quel peut être l'effet sur la progression du cycle cellulaire des pertes de fonction partielle de (i) *CDKA*, (2) *WEE1*, (3) *CCS52*.

2.4 Décrire les différents phénotypes des mutants d'expression. Conclure sur le lien entre contrôle du cycle cellulaire et endoréplication.

2.5 Quelles applications biotechnologiques pourraient être issues de ces résultats ?

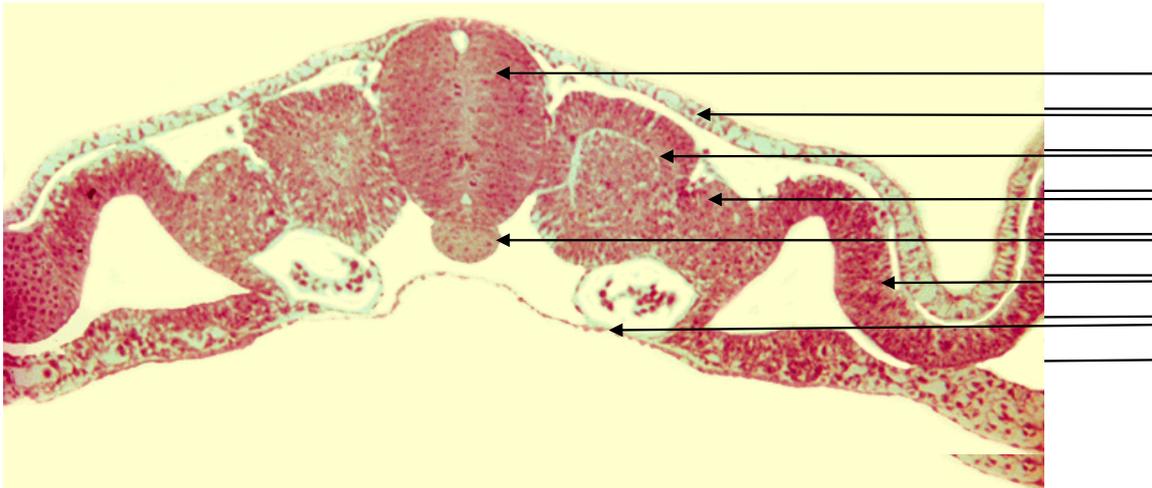


**Figure 8. (A)** Contrôle moléculaire du cycle cellulaire. **(1)** En phase S tardive, la cycline D (CYCD) du complexe CDKA-CYCD est détruite et remplacée par des cyclines de type A et B pour former les complexes CDK-CYCA/B spécifiques de G2 et M. **(2)** En G2, les complexes CDKA-CYCA/B sont temporairement maintenus inactifs suite à la phosphorylation de deux résidus (thréonine 14 et tyrosine 15) de la CDKA par la kinase WEE1. En fin de G2, une activité phosphatase encore inconnue va déphosphoryler ces 2 résidus, ce qui va conduire à l'activation des complexes CDK-CYCA/B et à l'entrée en phase M. **(3)** En fin de mitose, le système ubiquitine-protéasome permet la protéolyse des cyclines de type B permettant ainsi la cytokinèse. La protéine CCS52 est un régulateur positif de la dégradation des cyclines de type B. **(B)** Effets de la perte de fonction de différents acteurs du cycle cellulaire sur le phénotype des tomates et l'index d'endoréplication au sein de ces dernières. D'après Chevalier *et al.*, Journal of Experimental Botany, 2014.

## TD4 : Lignages cellulaires et expression des gènes au cours du développement

### 1. Légender une coupe d'embryon de vertébré

1. Légender la Figure 1 en plaçant les termes suivants : tube neural, chorde, somite, épiderme, pièces intermédiaires, lames latérales, paroi digestive, dorsal, ventral

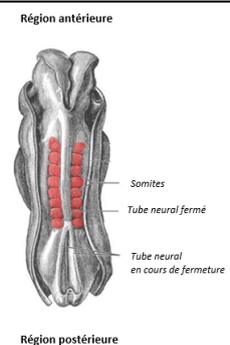


**Figure 1 :** Coupe transversale d'un embryon de poulet à 2,5 jours d'incubation. Le marquage nucléaire met en évidence les différentes structures embryonnaires.

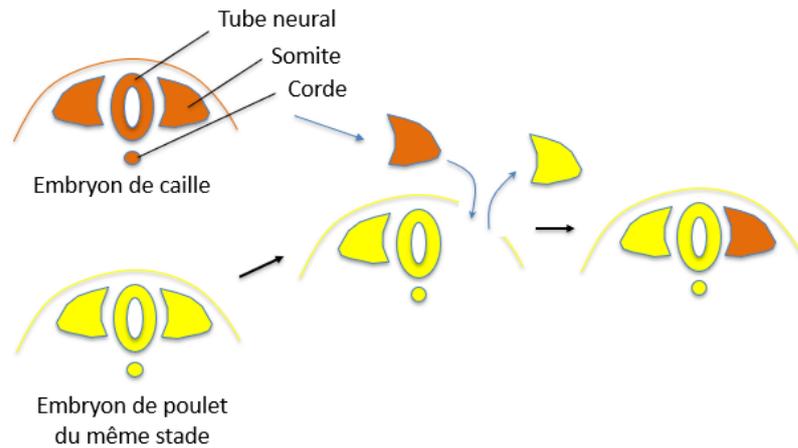
### 2. Analyser une expérience de lignage chez le poulet

Au cours de l'organogenèse, des structures cubiques apparaissent progressivement le long de l'axe antéro-postérieur, de part et d'autre du tube neural en cours de fermeture (Figure 2). Ce sont les somites. L'exercice qui suit vise à explorer diverses expériences permettant d'analyser leur lignage.

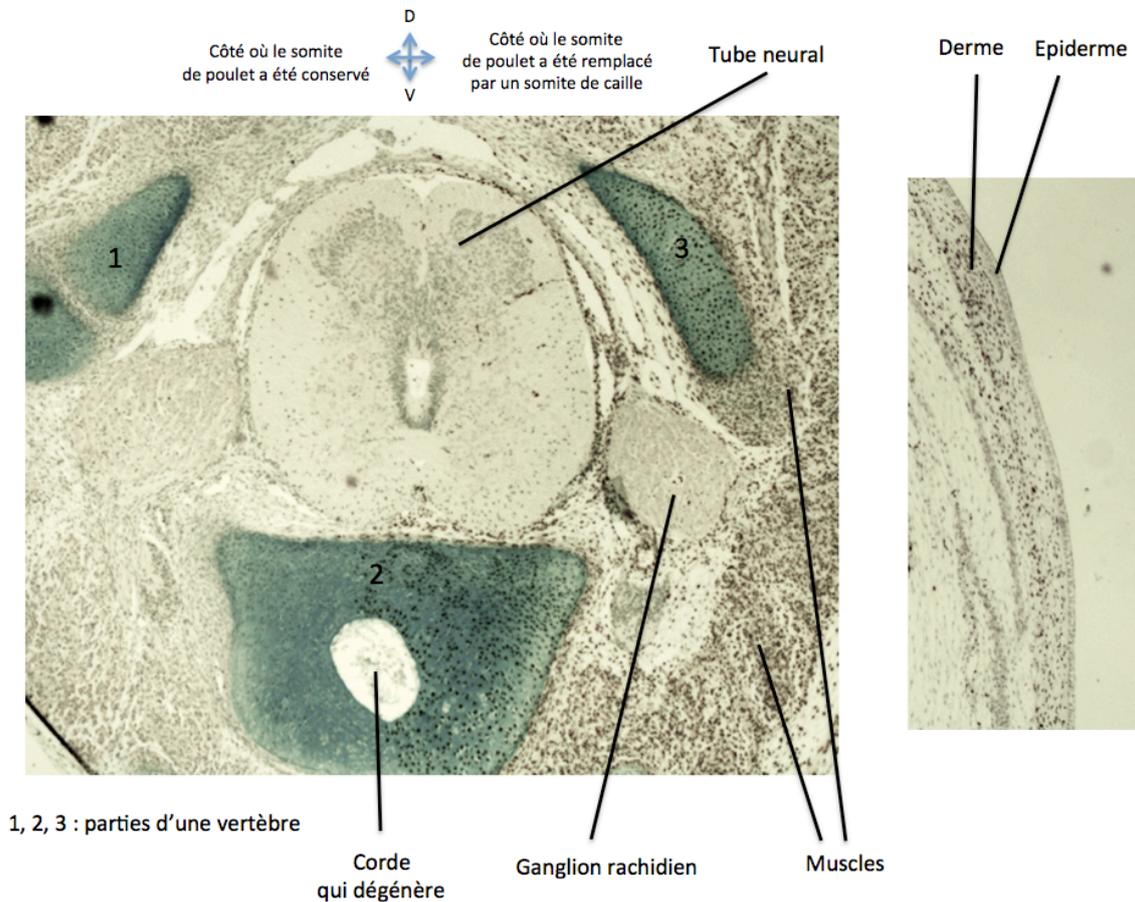
**Figure 2 :** Embryon humain 3 semaines après la fécondation en vue dorsale. Les somites ont été colorés en rouge.



Pour examiner les devenir somitiques, on utilise la technique de greffe caille-poulet. Les deux espèces, très proches, ont des développements similaires. On greffe généralement des tissus de caille (donneur) sur un embryon de poulet (receveur), ce qui engendre des chimères parfaitement viables. On peut ensuite suivre le devenir des cellules greffées grâce à un immunomarquage avec un anticorps anti-QCPN (Quail/Chicken PeriNuclear) qui reconnaît un épitope spécifique de caille. La Figure 3 montre une expérience dans laquelle un somite de poulet a été remplacé par un somite de caille. La figure 4 montre le résultat quelques jours après.



**Figure 3 :** Principe de la greffe caille-poulet. On prélève un somite chez un embryon de caille de 2 jours et on le greffe sur un embryon de poulet du même stade à la place du somite correspondant. Il en résulte un embryon chimère caille-poulet.



**Figure 4 :** Coupe transversale d'un embryon chimère caille-poulet, 5 jours après la greffe de somite de caille réalisée selon le protocole présenté en figure 3. La coupe a été immunomarcuée à l'aide d'un anticorps anti-QCPN. Ce dernier a ensuite été révélé avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui donne une coloration brune en présence de son substrat. La vertèbre visible sur la coupe a été colorée au bleu d'alcyon (un colorant qui marque les tissus cartilagineux). L'image de gauche correspond à la partie centrale de la coupe transversale. Celle de droite est un zoom de la périphérie de la coupe pour voir la peau.

2.1 Observer la localisation du marquage QCPN (en brun) de la figure 4 et compléter le tableau 1 ci-après. Que peut-on en déduire ?

2.2 Que constatez-vous d'intéressant sur la partie 2 de la vertèbre, en bas sur la photo de gauche ?

2.3 Les somites à gauche et à droite sont initialement bien séparés (voir Figure 2). Quelle(s) hypothèse(s) peut-on poser pour expliquer l'origine de la partie ventrale de la vertèbre (partie située autour de la corde) ?

Structures situées à droite sur l'image	Quelle origine : caille ou poulet ?
Tube neural	
Ganglion rachidien	
Muscles	
Vertèbres	
Derme	
Épiderme	

Tableau 1

3. Étudier le lignage des 2 premières cellules de l'embryon d'*Arabidopsis thaliana*

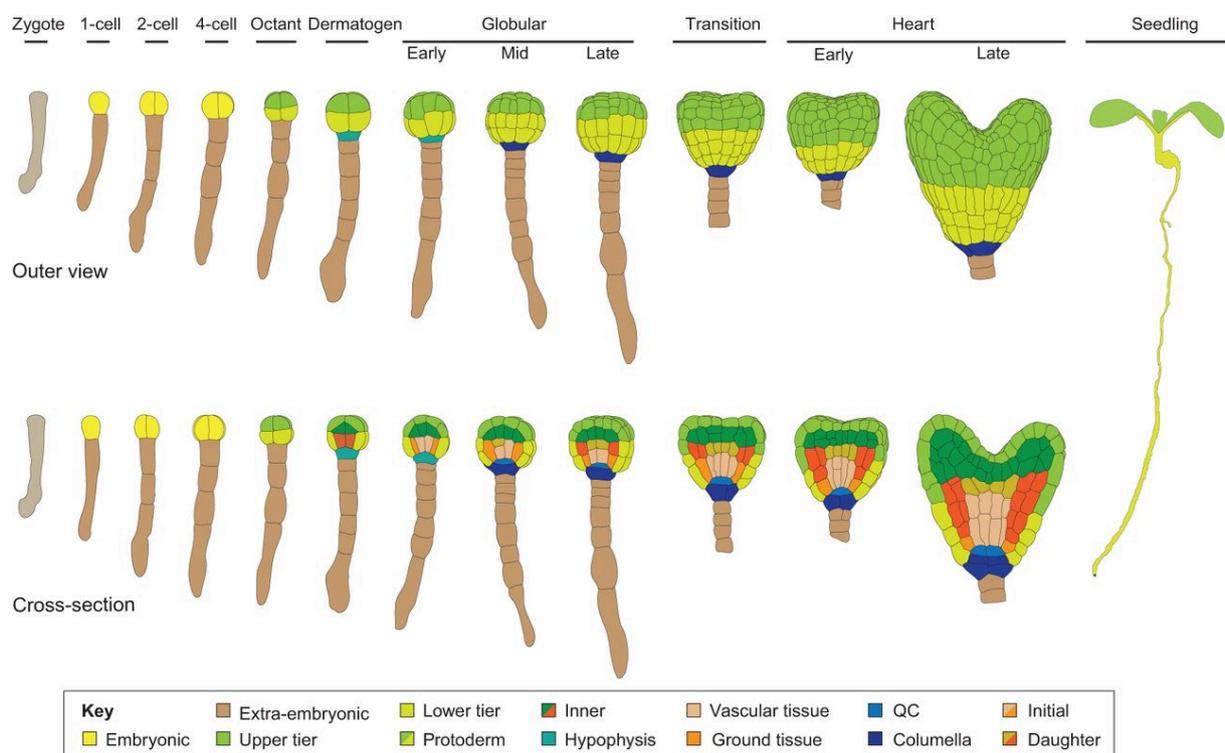
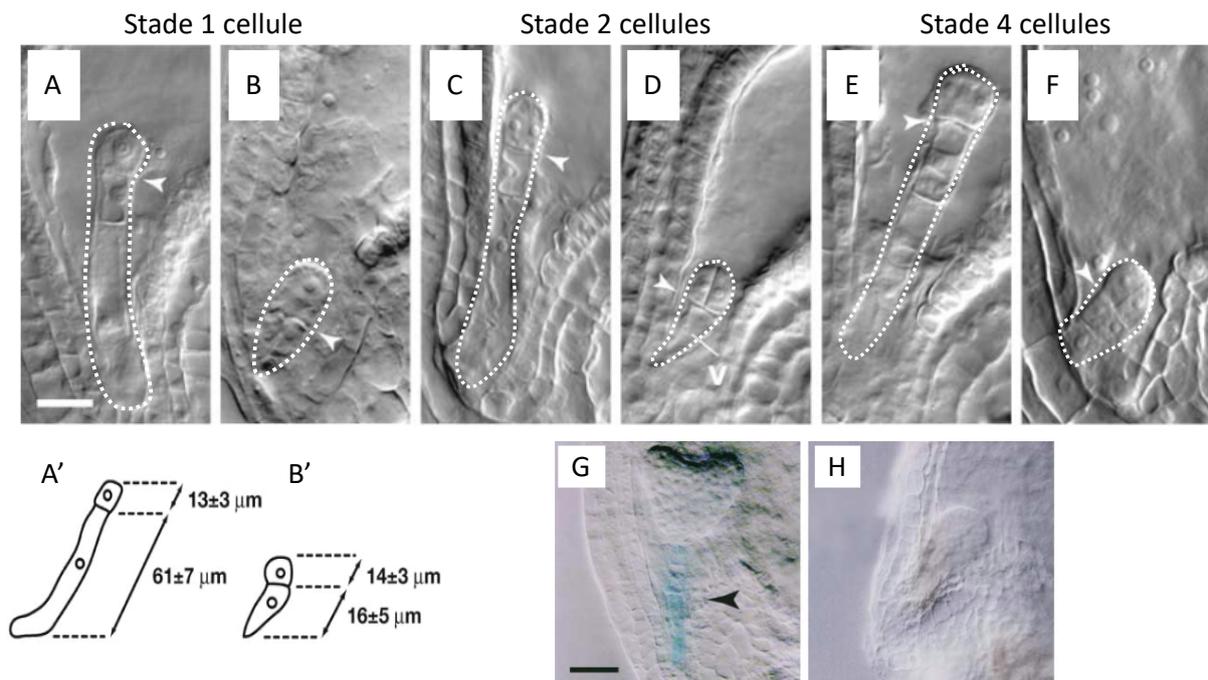


Figure 5 : Représentation schématique des différentes étapes de l'embryogenèse chez *A. thaliana* (en haut : vues en 3D ; en bas : coupes longitudinales). D'après Hove et al. Development 2015.

3.1 Qualifier la première division du zygote.

3.2 En vous aidant de la Figure 5 et de son code couleur, décrire le devenir de la cellule apicale et de la cellule basale issues de la première division du zygote.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui déterminent les cellules vers un destin proembryon ou suspenseur au cours des premières divisions embryonnaires, des chercheurs se sont intéressés à la protéine YODA, exprimée dans le zygote. La Figure 6 ci-après montre le phénotype d'embryons homozygote mutants pour un allèle perte de fonction du gène *yoda*.



**Figure 6 :** (A-F) Photos en microscopie optique d'embryons d'*Arabidopsis* sauvages (A, C, E) ou mutants *yoda* (B, D, F) à différents stades. (A', B') représentation schématique des embryons observés en A, B au stade 1 cellule. Les embryons sont entourés en blanc. La pointe de flèche blanche indique la frontière entre les cellules du lignage apical (proembryon) et celles du lignage basal (suspenseur). v : vacuole. (G, H) Analyse de l'expression du marqueur de suspenseur *ptrak276S* dans des embryons sauvages (G) ou mutants *yoda* (H) au stade « cœur ». Échelle : 20  $\mu$ m (A-F) et 50  $\mu$ m (G, H). D'après Lukowitz et al. Cell 2004.

3.3 Décrire la Figure 6 A-F en distinguant bien les cellules du lignage apical et celles du lignage basal. Que suggèrent ces résultats quant à la première division du zygote (observer les panels A' et B') ?

3.4 Décrire la Figure 6G, H. Que suggèrent ces résultats quant à la formation du suspenseur dans le mutant *yoda* ?

3.5 Conclure sur le rôle de la protéine YODA.

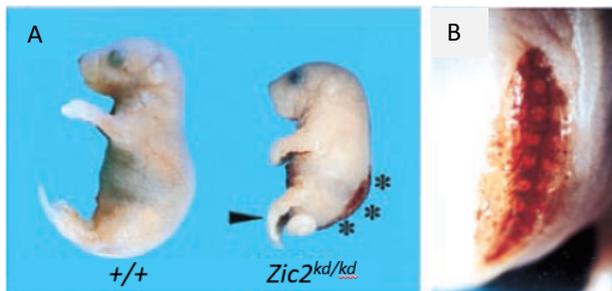
#### 4. Utiliser des marqueurs moléculaires pour analyser un phénotype

La spina bifida est une malformation liée à un défaut de fermeture postérieure du tube neural au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire humain. Elle peut être légère et asymptomatique ou alors plus grave avec protrusion de la moelle épinière et des méninges (Figure 7). L'exercice qui suit vise à analyser les mécanismes à l'origine de cette malformation dans un modèle animal murin, le mutant *Zic2<sup>kd/kd</sup>*.



**Figure 7 :** Vue dorsale d'un fœtus humain présentant une spina bifida sévère.

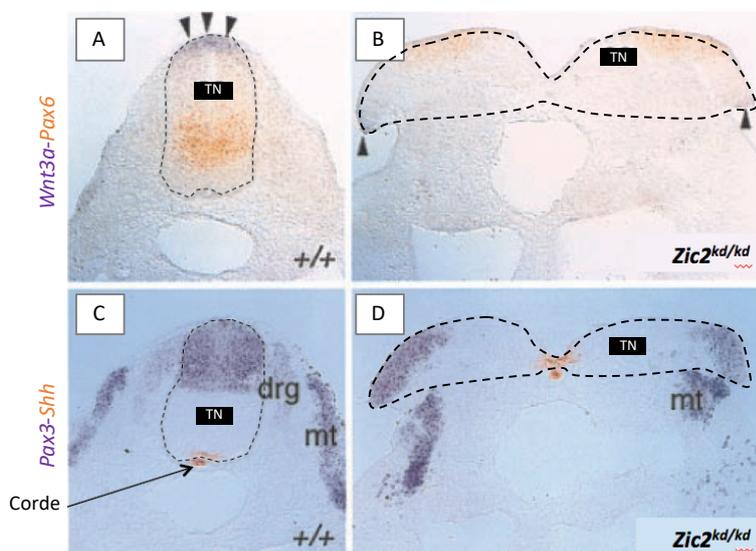
Des chercheurs ont obtenu une souris homozygote mutante pour un allèle perte de fonction du gène *Zic2* (*Zic2<sup>kd</sup>*; produisant une protéine non fonctionnelle). Le phénotype est montré en Figure 8.



**Figure 8 :** (A) vue latérale de souriceaux nouveau-nés sauvages (+/+) ou mutant *Zic2<sup>kd/kd</sup>*. (B) Agrandissement en vue dorsale de la région marquée par les étoiles en A. Référence : Nagai et al., *PNAS* **97**, 1618-1623 (2000).

#### 4.1 Décrire le phénotype des souris mutantes *Zic2<sup>kd/kd</sup>*.

Afin de mieux comprendre les défauts observés, des doubles hybridations *in situ* visant à mettre en évidence l'expression de différents marqueurs du tube neural ont été réalisées sur des coupes transversales d'embryons de souris de 10,5 jours au niveau de la région postérieure (Figure 9).



**Figure 9 :** Analyse par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *Wnt3a* et *Pax6* (A, B) ou *Pax3* et *Shh* (C, D) sur des coupes transversales de la région postérieure d'embryons de souris sauvages (A, C) ou mutants *Zic2<sup>kd/kd</sup>* (B, D) à 10,5 jours de développement. Les pointillés marquent la délimitation du tube neural. Les flèches noires pointent le marquage *Wnt3a*. TN : tube neural ; drg : ganglion rachidien ; mt : myotome. Référence : Nagai et al., *PNAS* **97**, 1618-1623 (2000).

**4.2** Rappeler brièvement le principe de l'hybridation *in situ*. Comment peut-on réaliser des doubles hybridations *in situ* ?

**4.3** Décrire le patron d'expression des gènes marqueurs *Wnt3a*, *Pax6*, *Pax3* et *Shh* dans le tube neural de l'embryon sauvage en précisant bien leur position relativement à l'axe dorso-ventral.

**4.4** Faire un schéma du tube neural et de la corde chez le sauvage et chez le mutant et reporter l'expression des 4 gènes étudiés.

**4.5** Interpréter les défauts structuraux observés chez le mutant *Zic2<sup>kd/kd</sup>* en vous aidant du profil d'expression des différents marqueurs relativement à l'axe dorso-ventral et de vos connaissances sur la morphogenèse du tube neural.

## TD 5 : Analyse d'expériences sur les inductions embryonnaires et la notion de morphogène

### 1. Principe du travail à faire en amont du TD

Au cours du TD5, vous travaillerez sur la méthodologie de l'analyse de documents. Les exercices visent aussi à vous familiariser avec des techniques de perturbations géniques et d'analyse phénotypiques. **Il est essentiel que vous ayez analysé les expériences proposées avant le TD (travail en autonomie).** Vous travaillerez en groupe sur l'une des séries d'expériences IE1 ou IE2 (la série choisie sera définie avec votre enseignant de TD au cours du TD4).

Votre travail en amont du TD5 va consister à :

- Télécharger le diaporama correspondant. Les légendes des figures se trouvent sous chaque diapositive.
- Prendre connaissance de la problématique générale associée à ces expériences.
- Analyser les expériences pas à pas et compléter au brouillon la trame d'analyse fournie ci-après (bien lire toutes les légendes qui se trouvent en bas des diapos).
- Compléter la diapositive de conclusion générale.

#### Questions à se poser sur chacune des expériences et aide à la rédaction d'une analyse :

- Quelle est la question biologique posée par le document ?

*Le but de l'expérience est ici de savoir si... **Attention : poser uniquement la question précise à laquelle l'expérience tente de répondre, pas une question générale !!***

- Quel type d'expérience est réalisé (Analyse d'un profil d'expression ? Étude du rôle d'un gène par gain ou perte de fonction) ?

*Pour répondre à la question posée, on fait ceci ou cela aux embryons... On observe l'expression de... On utilise tel agent pharmacologique... Le contrôle utilisé est...*

- Comment le phénotype résultant est-il analysé, par quelle méthode ?

*Le phénotype est analysé par telle technique... Tel paramètre est quantifié... **Attention : Assurez-vous que vous comprenez bien le protocole !!***

- Qu'est-ce que j'observe (décrire la situation contrôle puis la situation expérimentale) ?

*On observe dans la condition contrôle que... Dans la situation expérimentale on voit que... (par exemple : modification du patron d'expression d'un marqueur, augmentation ou diminution de son expression). La quantification montre que...*

- Qu'est-ce que j'en conclus relativement à la question posée ?

*On peut donc conclure que... **Attention : on s'en tient aux données fournies on n'extrapole pas, on reste factuel !!***

## 2. Trame d'analyse à compléter

**Diapo 1 : À lire ; elle contient une présentation du contexte biologique et de la problématique générale.**

### **Diapo 2 : Analyse de l'expérience 1**

Question biologique posée (1 phrase ou 2) : Le but de l'expérience est ici de savoir si...

Stratégie expérimentale : Pour répondre à la question posée, on fait ceci ou cela aux embryons... On observe l'expression de... On utilise tel agent pharmacologique... Le contrôle utilisé est... Le phénotype est analysé par telle technique... Tel paramètre est quantifié...

Description des données : On observe dans la condition contrôle que... Dans la situation expérimentale on voit que... La quantification confirme/montre que...

Conclusion (1 phrase ou 2) : On peut donc conclure que...

### **Diapo 3 : Analyse de l'expérience 2**

Question biologique posée (1 phrase ou 2 en faisant le lien avec les données précédentes) :

Stratégie expérimentale :

Description des données :

Conclusion (1 phrase ou 2) :

**Diapo 4 : Analyse de l'expérience 3**

Question biologique posée (1 phrase ou 2 en faisant le lien avec les données précédentes) :

Stratégie expérimentale :

Description des données :

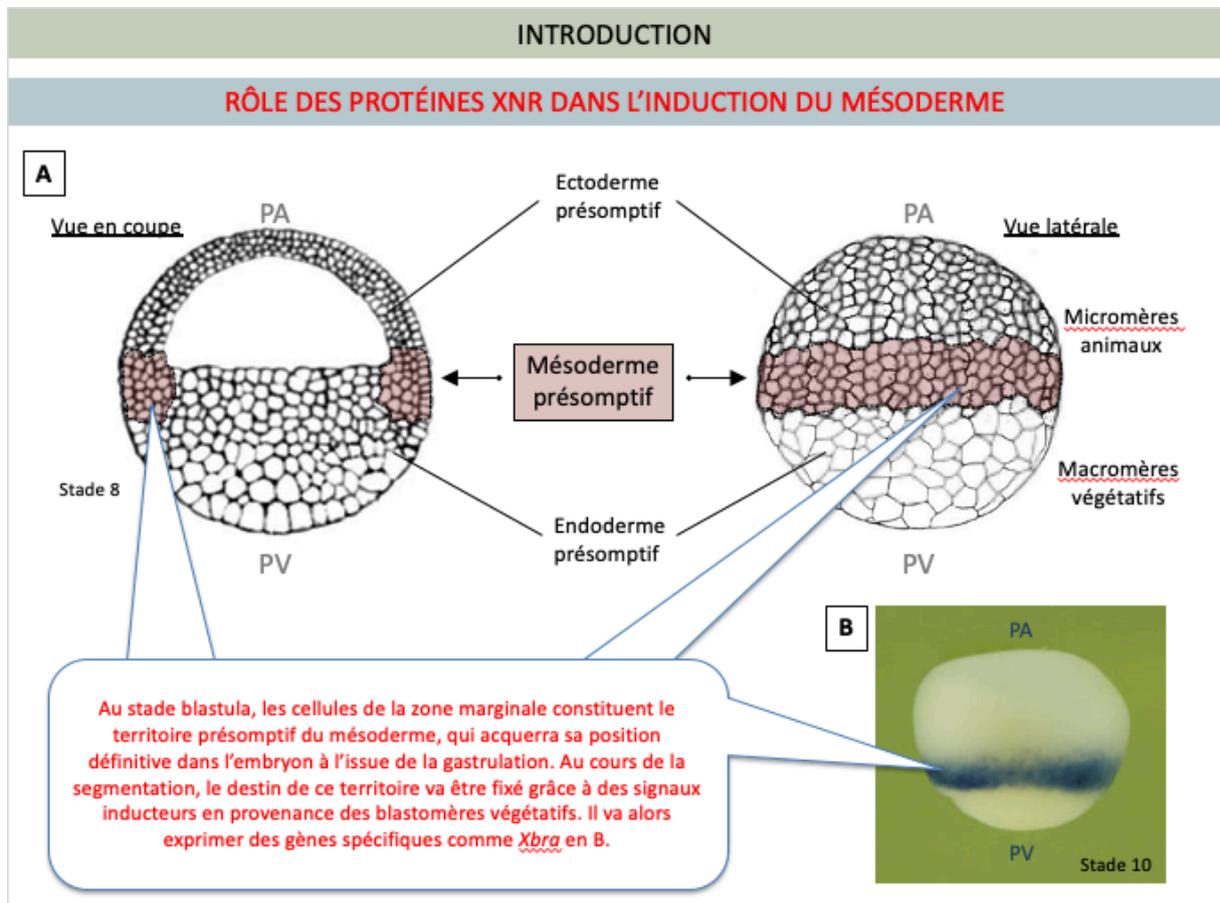
Conclusion (1 phrase ou 2) :

**Diapo 5 : Conclusion générale**

Conclusion (1 phrase ou 2) : L'ensemble de ces expériences montre que... et que... Sur la base de ces expériences, on peut émettre telle ou telle hypothèse...

### 3. Induction du mésoderme

#### 3.1 Analyse de la série d'expériences IE1

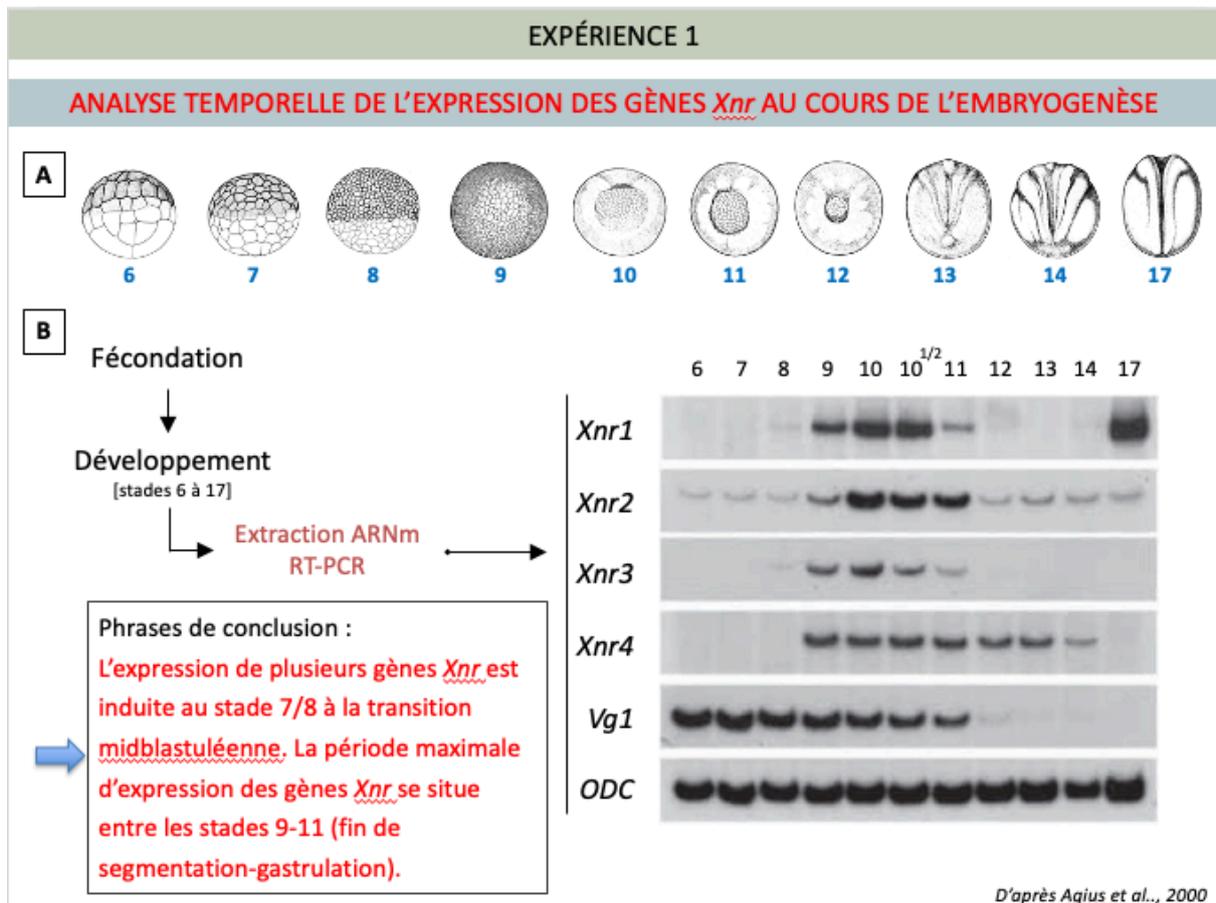


#### IE1 Introduction

(A) Représentation schématique d'un embryon de Xénope au stade blastula en coupe et en vue latérale. Les cellules formant le mésoderme présomptif ont été coloriées en rose. Ce territoire appelé « zone marginale » se situe à la frontière entre l'endoderme présomptif au pôle végétatif (matérialisé par des grosses cellules ou macromères) et l'ectoderme au pôle animal (petites cellules ou micromères). (B) Profil d'expression typique détecté par hybridation *in situ* d'un marqueur mésodermique au tout début de la gastrulation (avant que le mésoderme ne commence à s'insinuer entre ectoderme et endoderme par le biais des mouvements gastruléens).

#### CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE :

Au stade blastula des expériences de lignage permettent de déterminer quelles cellules donneront naissance aux différents dérivés mésodermiques, ectodermiques et endodermiques. On parle de TERRITOIRES PRÉSOMPTIFS. Celui du mésoderme se situe dans la région marginale de l'embryon. Ce territoire présomptif doit recevoir des signaux pour être irrémédiablement déterminé. Une fois déterminé, il exprimera des marqueurs spécifiques comme le gène *Xbra* qu'on observe en B. Le but des expériences qui suivent est d'explorer le rôle des protéines XNR dans l'induction du destin mésodermique.



### IE1 Expérience 1

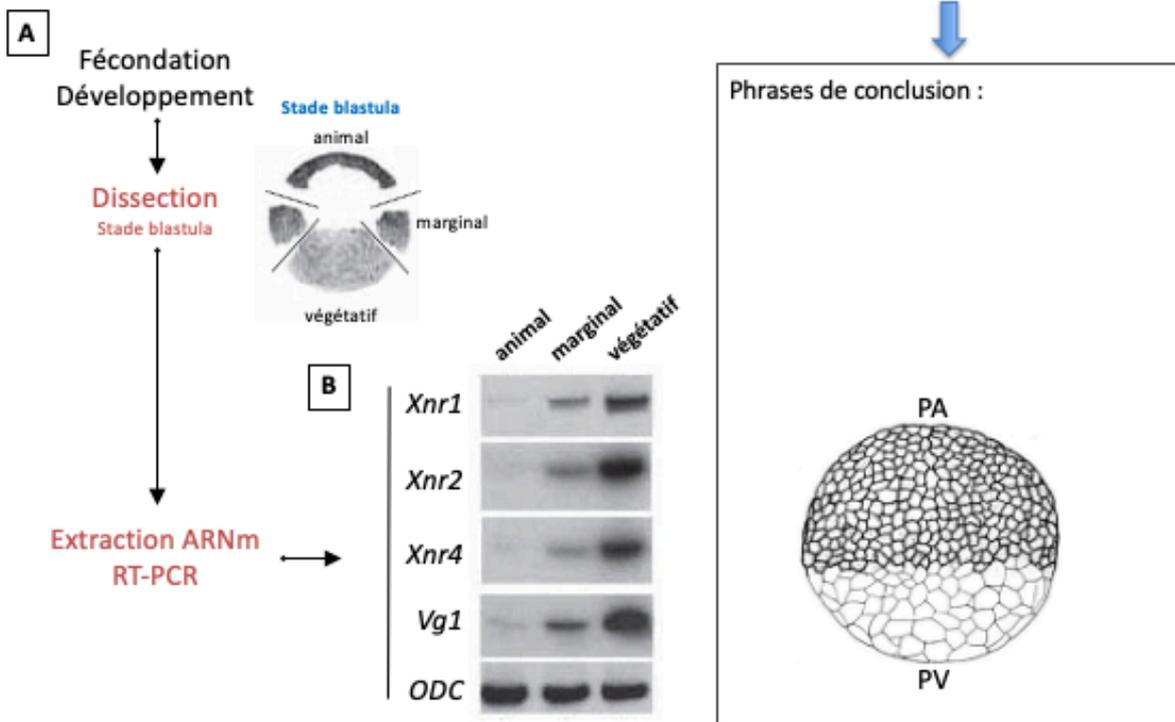
**(A)** Schéma d'embryons de Xénope à différents stades de la segmentation (stades 6 à 9), de la gastrulation (stades 10 à 12) et de la neurulation/organogenèse (stades 13 à 17). **(B)** Analyse par RT-PCR de l'expression du gène *Vg1* ou de différents gènes de la famille *Xnr* (*Xenopus Nodal-related*). Les ARNm ont été extraits d'embryons entiers aux stades indiqués (stades 6 à 17). L'analyse de l'expression du gène *ODC* (ubiquitaire) sert de contrôle interne à la PCR. Les protéines *Xnr* sont des morphogènes.

### AIDE A L'INTERPRÉTATION :

Décrire les profils d'expression temporelle en essayant de faire des regroupements logiques (ne pas décrire gène/gène et puits/puits ; faites ressortir l'essentiel en mettant bien en lumière ce qui concerne la période développementale qui est étudiée dans cet exercice !). Attention : gardez en tête que la transition mid-blastuléenne a lieu au stade 7, il faut donc distinguer les expressions maternelles et zygotiques.

EXPÉRIENCE 2

Titre ?



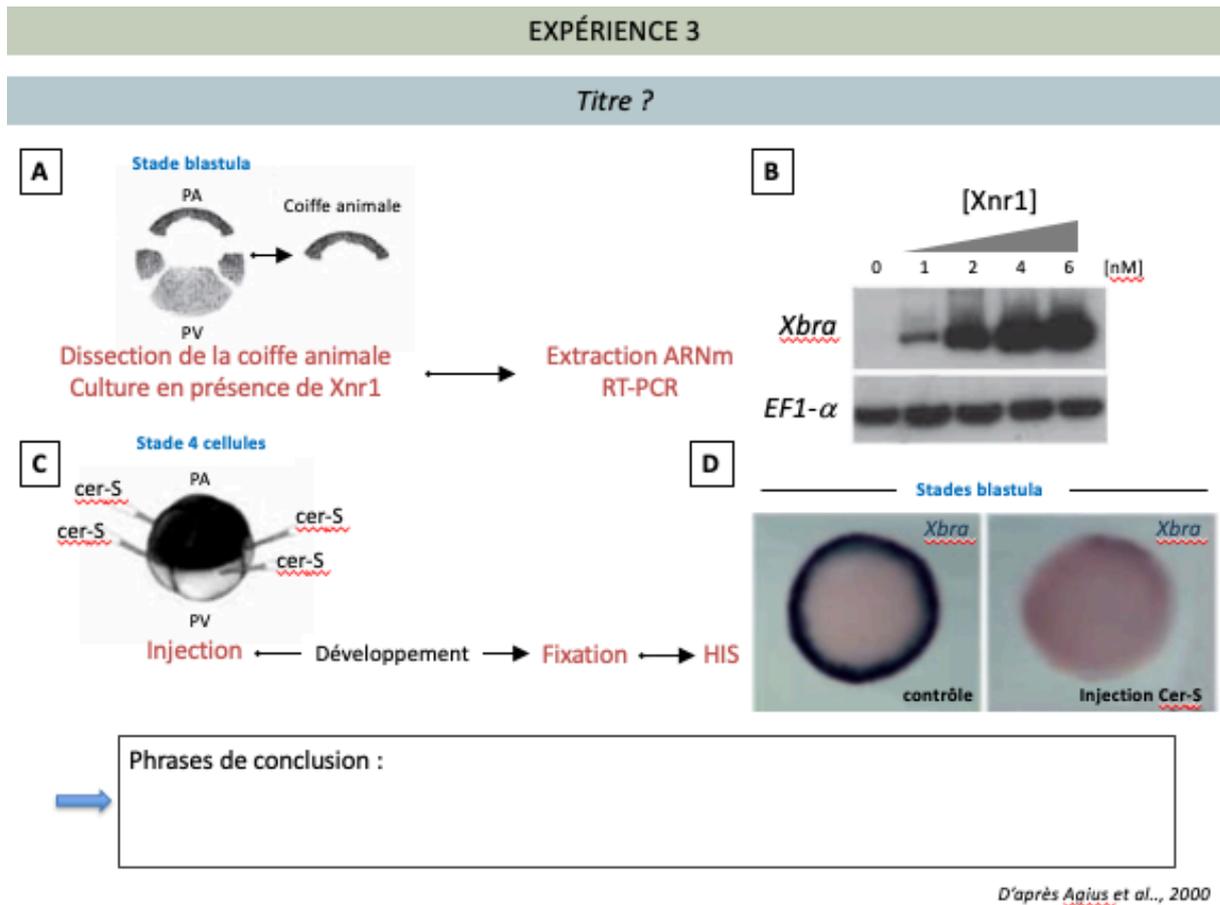
D'après Agius et al., 2000

IE1 Expérience 2

(A) Protocole expérimental de l'expérience réalisée en B. (B) Analyse par RT-PCR de l'expression de différents gènes *Xnr* au stade blastula. Les ARNm ont été extraits à partir de différentes régions de l'embryon disséquées comme décrit en A. L'analyse de l'expression du gène *ODC* (ubiquitaire) sert de contrôle interne à la PCR.

AIDE A LA SCHÉMATISATION DU RESULTAT :

Utiliser le schéma fourni dans l'encart « conclusion » pour représenter graphiquement le phénotype observé. Opter pour un code couleur ou tout autre formalisme de votre choix. Faire le lien avec les résultats de l'expérience précédente.



### IE1 Expérience 3

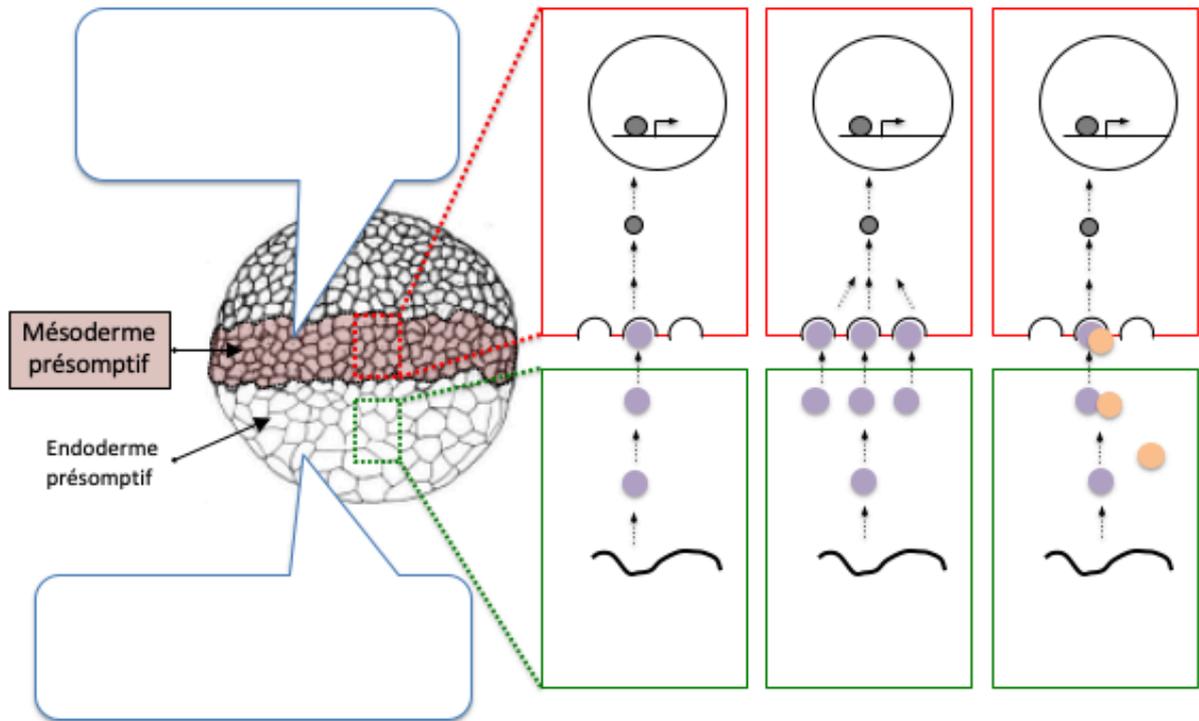
(A) Protocole expérimental de l'expérience réalisée en B. (B) Analyse par RT-PCR de l'expression du marqueur mésodermique *Xbra*. Les ARNm ont été extraits à partir de coiffes animales disséquées puis cultivées en présence de différentes concentrations de protéine Xnr1 (0 à 6 nM). L'analyse de l'expression du gène *EF1-a* (ubiquitaire) sert de contrôle interne à la PCR. (C) Protocole expérimental de l'expérience réalisée en D. Des ARNm codant la protéine Cerberus (Cer-S ; un inhibiteur des protéines Xnr) sont injectés dans les 4 blastomères au stade 4 cellules. Les embryons sont ensuite fixés au stade blastula puis soumis à hybridation *in situ* (HIS) avec une sonde antisens dirigée contre les ARNm *Xbra*. (D) Photographies de deux embryons représentatifs après hybridation *in situ* contre *Xbra* : un embryon contrôle (non injecté), et un embryon dans lequel ont été injectés les ARNm Cer-S. Les embryons sont ici observés depuis le pôle animal.

### AIDE A L'INTERPRÉTATION :

Attention à ne pas faire de confusion entre tous ces ARN : l'ARNm exogène injecté (pour surexprimer Cerberus), les ARNm *Xbra* endogènes que l'on cherche à détecter (pour analyser le phénotype) et la sonde antisens utilisée pour ce faire. En C, D : réfléchissez bien aux effets d'une surexpression de Cerberus. Cela a-t-il pour conséquence un gain ou une perte de fonction des Xnr ?

CONCLUSION GÉNÉRALE

Titre ?



**IE1 conclusion générale et modèle :**

Aidez-vous des schémas pour conclure sur les événements moléculaires mis en évidence. Les schémas de gauche et du centre correspondent à la situation physiologique (i.e. ce qui a lieu au cours du développement normal). Le schéma le plus à droite correspond à la situation expérimentale rencontrée en Fig. 3, C, D (surexpression de Cerberus, ronds beiges).

**3.2 Quiz de compréhension sur l'expérience n°3 de la présentation IE1**

1) Lesquelles de ces propositions sont correctes :

- La détection par RT-PCR des transcrits *Xbra* en (B) vise à étudier leur localisation.
- La détection par RT-PCR des transcrits *Xbra* en (B) vise à déterminer leur taille qui est fonction de l'intensité du signal.
- La détection par RT-PCR des transcrits *Xbra* en (B) vise à déterminer si leur transcription est sensible à l'ajout de *Xnr1*.
- La détection par hybridation *in situ* des transcrits *Xbra* en (D) vise à déterminer leur taille qui est fonction de l'intensité du marquage.
- La détection par hybridation *in situ* des transcrits *Xbra* en (D) permet de déterminer leur profil d'expression dans l'embryon.
- La détection par hybridation *in situ* des transcrits *Xbra* en (D) vise à déterminer si leur transcription dépend de l'activité de *Xnr1*.

2) Le profil d'expression des transcrits *Xbra* :

- Présente une spécificité spatiale.
- Coïncide avec la zone marginale, c'est à dire le territoire mésodermique.
- Suggère un probable contrôle transcriptionnel de leur expression.
- Suggère que *Xbra* joue un rôle dans les cellules où il est exprimé.

3) La figure B montre que la protéine *Xnr1* :

- Est suffisante pour induire l'expression de *Xbra* dans les coiffes animales.
- Stimule la transcription de *Xbra* dans les coiffes animales de façon dose-dépendante.
- Constitue le signal inducteur du mésoderme.
- Est nécessaire à l'expression de *Xbra* dans le mésoderme.

4) L'injection d'ARNm *Cerberus* :

- Correspond à un gain de fonction *Cerberus*.
- Correspond à une perte de fonction *Cerberus*.
- Vise une perte de fonction de la protéine *Xnr1*.
- Vise un gain de fonction de la protéine *Xnr1*.

5) La figure D :

- Montre que la protéine *Cerberus* est nécessaire à l'expression du gène *Xbra*.
- Montre que la surexpression de *Cerberus* entraîne une activation de l'expression du gène *Xbra*.
- Montre que la surexpression de *Cerberus* entraîne une répression de l'expression du gène *Xbra*.
- Suggère que l'activité de *Cerberus* est nécessaire à l'induction du mésoderme.
- Suggère que l'activité de *Xnr1* est nécessaire à l'induction du mésoderme.

6) Si l'hypothèse ci-dessus était avérée, quel pourrait être l'effet d'une injection de morpholinos dirigés contre les ARNm *Cerberus* dans l'embryon de *Xénope* :

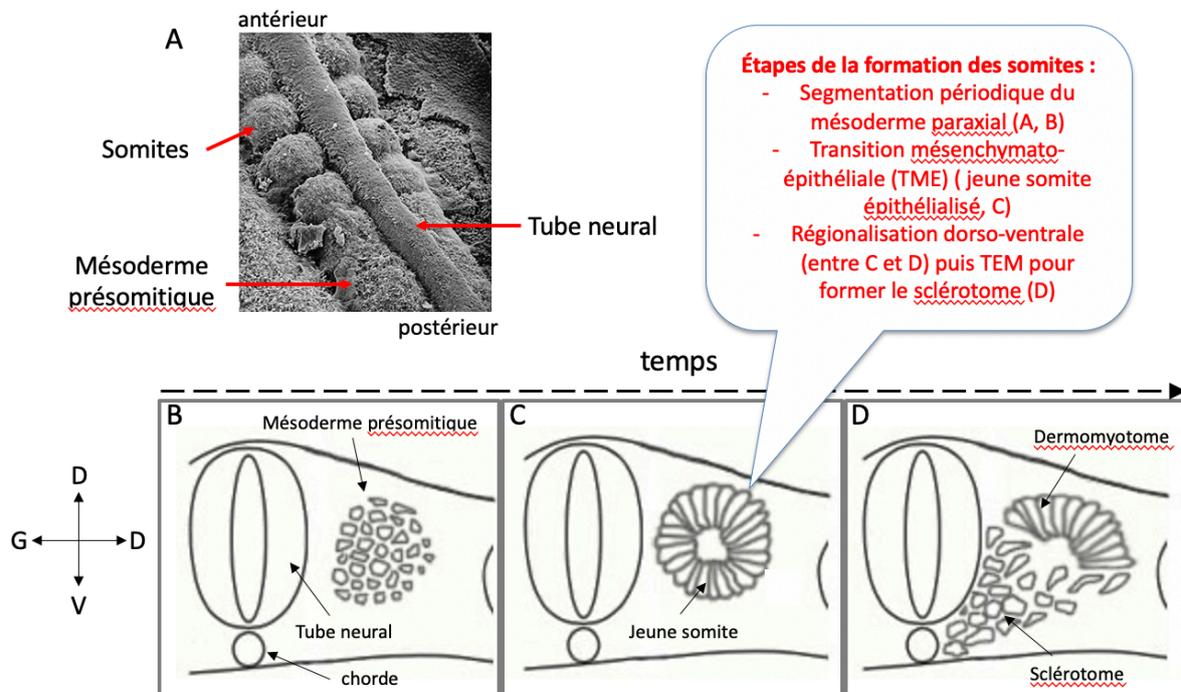
- On devrait détecter moins de transcrits *Cerberus*.
- On devrait détecter moins de protéines *Cerberus*.
- On pourrait s'attendre à une diminution plus drastique de l'expression de *Xbra*.
- On pourrait s'attendre à une augmentation de l'expression de *Xbra*.

## 4. Régionalisation des somites

### 4.1 Analyse de la série d'expériences IE2

#### INTRODUCTION

#### RÔLE DES SIGNAUX ÉMIS PAR LA CHORDE DANS LA RÉGIONALISATION D/V DES SOMITES



#### IE2 Introduction

(A) Photo en vue dorso-latérale gauche d'un embryon de poulet montrant des somites à différents stades de développement (microscopie électronique à balayage). (B-D) Schémas de coupes transversales d'embryons de poulet à trois étapes caractéristiques du développement des somites.

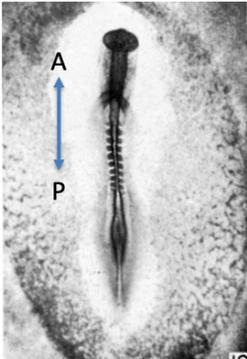
#### CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE :

Les somites se forment par segmentation périodique du mésoderme paraxial (ou présomitique) de la région antérieure de l'embryon vers la région postérieure. Le jeune somite formé s'épithélialise (transition mésenchymato-épithéliale) puis il va se régionaliser sous l'effet de signaux de son environnement. Deux territoires vont être induits : le dermomyotome dorsalement et le sclérotome ventralement. Ce dernier subit une transition épithélio-mésenchymateuse. Les expériences qui suivent visent à explorer le rôle inducteur de la corde dans la régionalisation dorso-ventrale des somites.

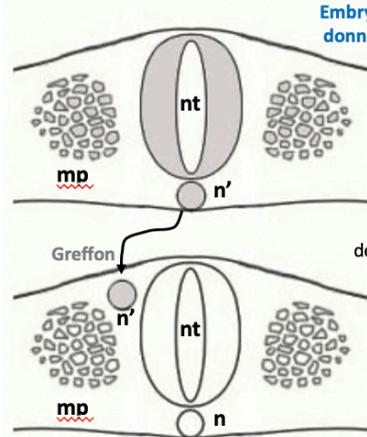
**EXPÉRIENCE 1**

*Titre ?*

**A** Embryon de poulet au stade 10 somites

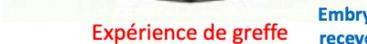


**Embryon donneur**

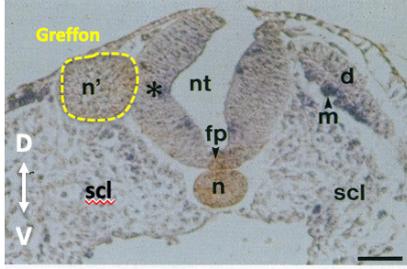


**Expérience de greffe**

**Embryon receveur**



**B**



Phrases de conclusion :

*D'après Pourauié et al, 1993*

### IE2 Expérience 1

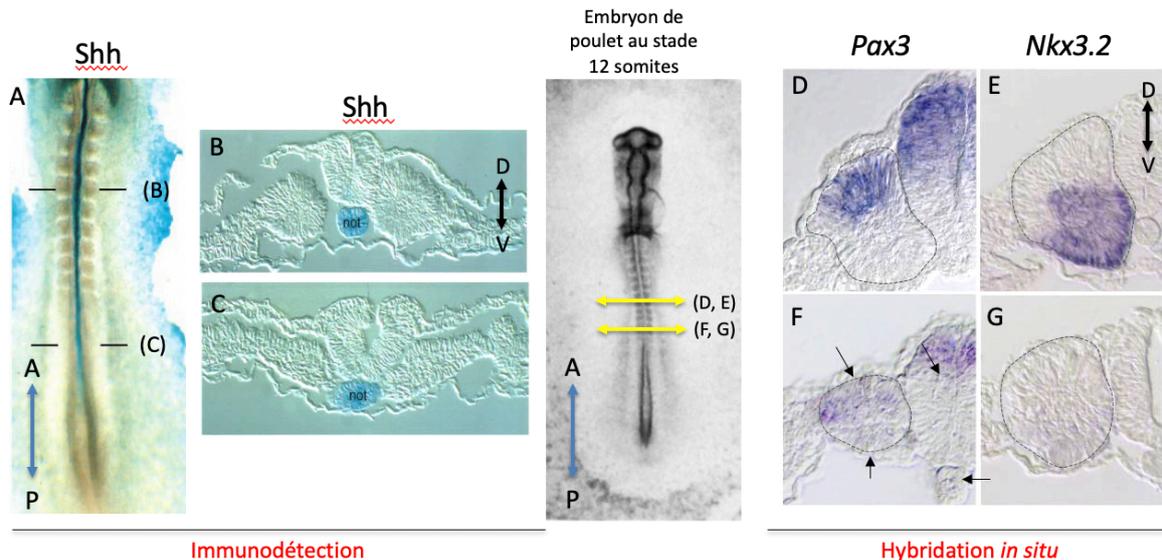
(A) Expérience de greffe hétérotopique (hors du lieu habituel = ectopique) et isochronique (sur un embryon de même stade) de notochorde chez le poulet au stade 10 somites. Un fragment de notochorde (n') issu d'un embryon donneur est placé en position dorsale (relativement au tube neural) de l'embryon receveur, dans la région du mésoderme présomitique. (B) Résultat typique observé 2 jours après la greffe (coupe transversale). Ne pas tenir compte du marquage brun et du marqueur bleu. d/m : dermomyotome ; mp : mésoderme présomitique ; n : notochorde ; nt : tube neural ; scl : sclérotome. Barre d'échelle : 40 µm. A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral.

#### AIDE A LA DESCRIPTION :

Quelle structure manque du côté du greffon ? Émettre au moins une hypothèse pour expliquer le phénomène observé.

EXPÉRIENCE 2

Titre ?



Phrases de conclusion :

D'après Marti et al 1995 et Cairns et al 2008

IE2 Expérience 2

(A-C) Analyse par immunodétection de l'expression de la protéine Sonic Hedgehog (Shh ; une protéine sécrétée) au stade 10 somites chez le poulet. L'anticorps secondaire utilisé ici est couplé à une enzyme dont l'activité (en présence de son substrat) permet la formation d'un produit coloré de couleur bleue. Plus la protéine est abondante, plus la coloration est foncée. Vue dorsale en A ; Coupes transversales en B, C (selon plans de coupes indiqués en A).

(D-G) Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de Pax3 (marqueur du dermomyotome) et Nkx3.2 (marqueur du sclérotome) sur des embryons au stade 12 somites. Les plans de coupes transversales sont indiqués sur la photo de gauche (somites régionalisés en D, E ; jeunes somites individualisés en F, G). Les somites sont délimités en pointillés. Seule la moitié gauche de chaque embryon est montrée. Not : notochorde ; A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral.

COMPLÉTION DE LA FIGURE ET AIDE À L'INTERPRÉTATION ET À LA TRANSITION :

Ajouter les légendes manquantes au niveau des flèches en F. Bien observer les différences de niveaux d'expression de Shh selon l'axe antéro-postérieur en A (attention, elles ne sont pas franchement visibles sur les coupes). Formuler une hypothèse faisant le lien entre la conclusion de l'expérience 1 et les données de cette expérience 2. Cette hypothèse doit servir de transition à l'expérience 3.

**EXPÉRIENCE 3**

*Titre ?*

**A**

Embryon de poulet

↓ Dissection

Mésoderme présomitique

↓ Culture *in vitro* (5 jours) en présence de différentes concentrations de Shh

Extraction ARNm  
RT-PCR

**B**

Shh

Gapdh

Nkx3.2

Pax3

Contrôle 34 ng 2 µg

Phrases de conclusion :

*D'après Cairns et al 2008*

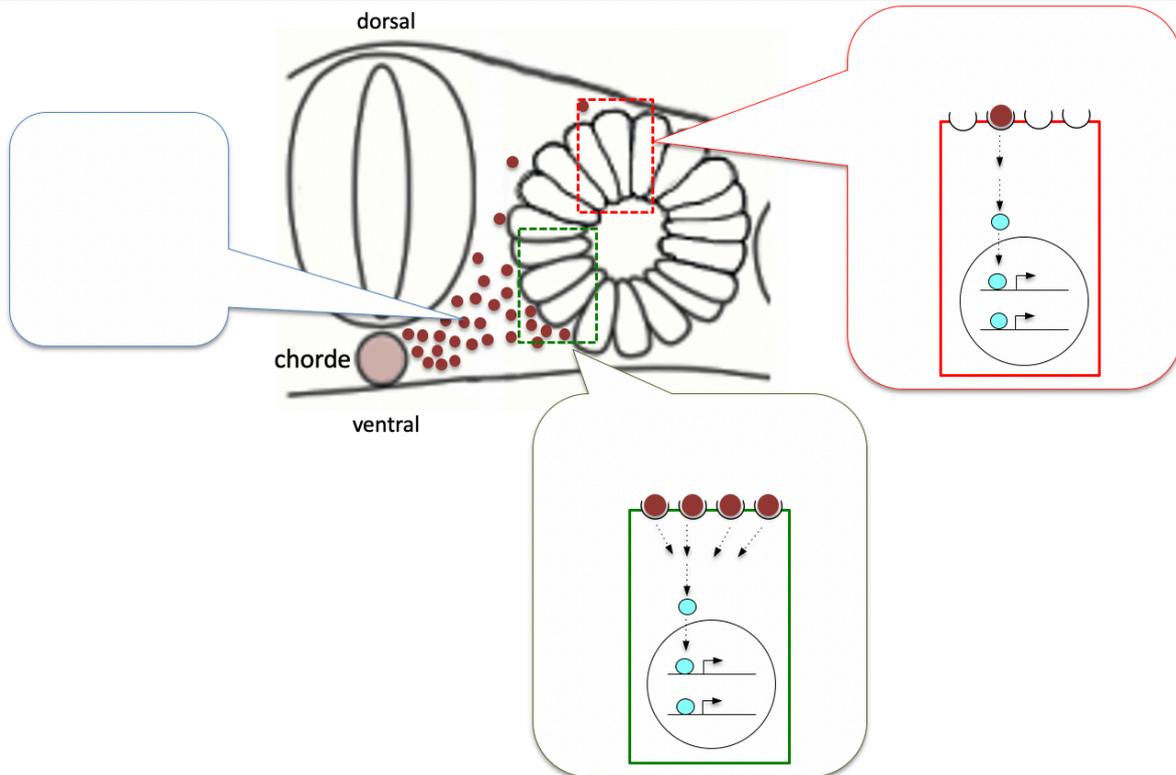
### IE2 Expérience 3

**(A)** Protocole expérimental de l'expérience réalisée en B. Des explants de mésoderme présomitique ont été cultivés pendant 5 jours dans un milieu contenant des quantités croissantes de protéine Shh. Les ARNm ont ensuite été extraits puis soumis à RT-PCR.

**(B)** Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *Pax3* et *Nkx3.2* sur des extraits de mésoderme présomitique contrôles (non traités) ou traités avec Shh. L'analyse de l'expression du gène *Gapdh* (ubiquitaire) sert de contrôle interne à la PCR.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Titre ?



**IE2 Conclusion générale et modèle** : Aidez-vous des schémas pour conclure sur les événements moléculaires mis en évidence. Les encadrés de droite doivent être complétés pour mettre en évidence les gènes dont l'expression est induite ou non dans chaque situation.

**4.2 Quizz de compréhension sur l'expérience n°3 de la présentation IE2**

1) Quelles propositions parmi les suivantes vous semblent correctes :

- Le but de cette expérience est de tester l'effet de Shh sur la segmentation du mésoderme présomitique.
- Le but de cette expérience est de tester l'effet de Shh sur l'induction des territoires somitiques dorsaux et ventraux *in vivo*.
- Le but de cette expérience est de tester l'effet de Shh sur l'induction des territoires somitiques dorsaux et ventraux *in vitro*.
- Le but de cette expérience est de tester l'effet de la dissection du mésoderme présomitique sur l'expression des gènes *Pax3* et *Nkx3.2*.

2) Dans l'expérience :

- L'incubation en absence de Shh permet de s'assurer du niveau nul d'expression de *Pax3* et *Nkx3.2* avant traitement (c'est un contrôle positif).
- L'incubation en absence de Shh permet de s'assurer du niveau nul d'expression de *Pax3* et *Nkx3.2* avant traitement (c'est un contrôle négatif).
- L'amplification des transcrits du gène *Gapdh* constitue un contrôle positif des effets de Shh.
- L'amplification des transcrits du gène *Gapdh* est indispensable au caractère semi-quantitatif de l'expérience.

3) La figure 3B montre que :

- Les gènes *Pax3* et *Nkx3.2* sont tous deux induits dans le mésoderme présomitique en réponse à Shh.
- L'expression des gènes *Pax3* et *Nkx3.2* dépend de la concentration de Shh.
- Les gènes *Pax3* et *Nkx3.2* répondent de façon similaire à des doses croissantes de Shh.
- Les gènes *Pax3* et *Nkx3.2* répondent de façon opposée à des doses croissantes de Shh.
- Seule l'expression du gène *Nkx3.2* est sensible à Shh.

4) Que peut-on déduire de ces résultats ?

- Que les cellules du mésoderme présomitique sont compétentes à recevoir un signal inducteur Shh.
- Que les cellules du mésoderme présomitique sont inductrices.
- Que les cellules du mésoderme présomitique produisent le signal Shh.
- Que les cellules du mésoderme présomitique répondent de façon spécifique en fonction de la dose de Shh.

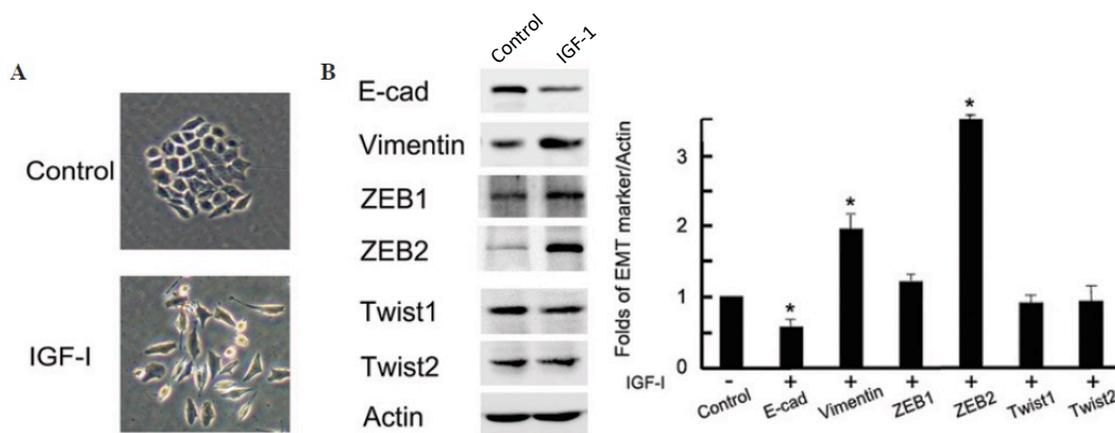
5) Parmi les conclusions biologiques suivantes, laquelle ou lesquelles vous paraissent correctes et rigoureuses ?

- Le récepteur de Shh est probablement exprimé à la surface du mésoderme présomitique.
- Shh a un effet morphogène sur le devenir des cellules du mésoderme présomitique.
- De faibles doses de Shh induisent une identité dermomyotome et de fortes doses induisent une identité sclérotome.
- De faibles doses de Shh induisent une identité sclérotome et de fortes doses induisent une identité dermomyotome.

## TD6 : TEM et migration

### 1. Étude de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Dans un article paru dans *Oncology letter* en 2015, les chercheurs ont voulu étudier les mécanismes impliqués dans la formation de métastases dans les cancers gastriques. Ils ont travaillé sur des cellules cancéreuses de l'épithélium gastrique en culture et ont traité ces cellules, pendant 48 heures, avec un facteur de croissance : IGF-1 (*Insulin Growth factor -1*). Ils ont pris des photos de cellules traitées ou non traitées à l'IGF-1. Les cellules ont ensuite été lysées et les extraits protéiques ont été déposés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Après migration et transfert sur membrane de nitrocellulose, une immuno-détection a été effectuée à l'aide d'anticorps dirigés contre la cadhérine E (E-Cad), la vimentine, l'actine et les facteurs de transcription ZEB 1 et 2, Twist 1 et 2.



**Figure 1 :** (A) Cellules cancéreuses gastriques traitées ou non (« control ») avec de l'IGF-1 (100ng/ml) observées en microscopie photonique. (B) Analyse par Western-blot de l'expression de différentes protéines dans des extraits protéiques issus de cellules traitées ou non par l'IGF-1. Le panel de droite présente la quantification des résultats du Western-blot. Pour chaque protéine étudiée (Cadhérine E, vimentine ou facteurs de transcription), l'intensité de la bande correspondante a été normalisée par celle de l'actine. L'axe des ordonnées montre la moyenne de ces ratios sur plusieurs expériences indépendantes, relativement au contrôle (ramené à 1). Les différences statistiquement significatives sont indiquées par une étoile.

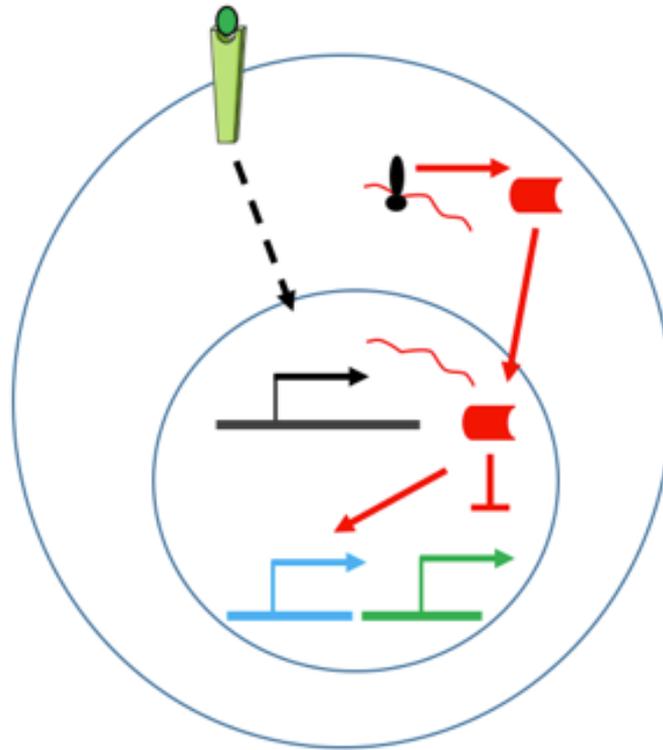
1.1 D'après la Figure 1A, quels effets l'IGF-1 a-t-il sur la morphologie des cellules ?

1.2 Quel est le but de l'immuno-détection de l'actine (partie B de la figure) ?

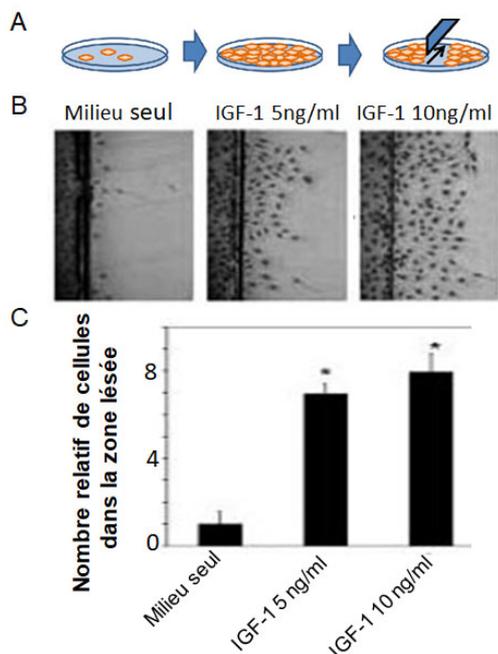
1.3 Décrivez l'effet de l'IGF-1 sur l'expression de la cadhérine E et de la vimentine.

1.4 À quel niveau la régulation de l'expression de ces protéines pourrait-elle s'effectuer ?

1.5 À partir des informations précédentes et sachant que ZEB2 est un facteur de transcription qui réprime la transcription du gène codant la cadhérine E, complétez le schéma ci-dessous (modèle hypothétique à l'échelle cellulaire).



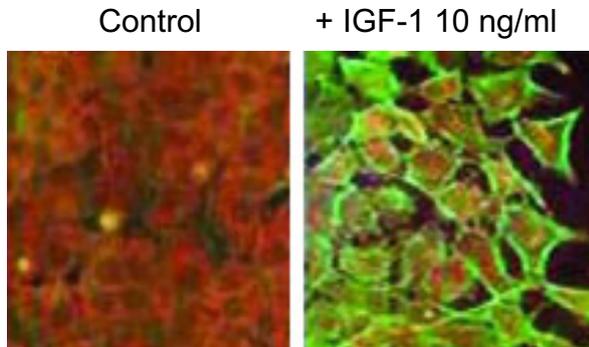
Une brèche a été réalisée dans la monocouche formée par les cellules cancéreuses de l'épithélium gastrique en culture en utilisant un scalpel. La recolonisation par les cellules tumorales de la zone lésée, en absence ou en présence d'IGF-1, a ensuite été étudiée à l'aide d'un microscope photonique.



**Figure 2 :** (A) Procédure utilisée pour créer une brèche dans la monocouche de cellules cancéreuses gastriques. (B) Images représentatives de l'aspect de la brèche, 24h après réalisation de cette dernière, en fonction de la concentration en IGF-1 présente dans le milieu de culture. (C) Dénombrement des cellules présentes à l'intérieur de la brèche 24h après réalisation de la brèche, en fonction de la concentration en IGF-1 présente dans le milieu de culture. Les expériences ont été réalisées en triplicat et répétées 2 fois. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport au nombre de cellules identifiées dans la condition contrôle (=milieu seul). Les différences statistiquement significatives sont indiquées par une étoile.

1.6 Que montre la figure 2 ? Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer les résultats obtenus ?

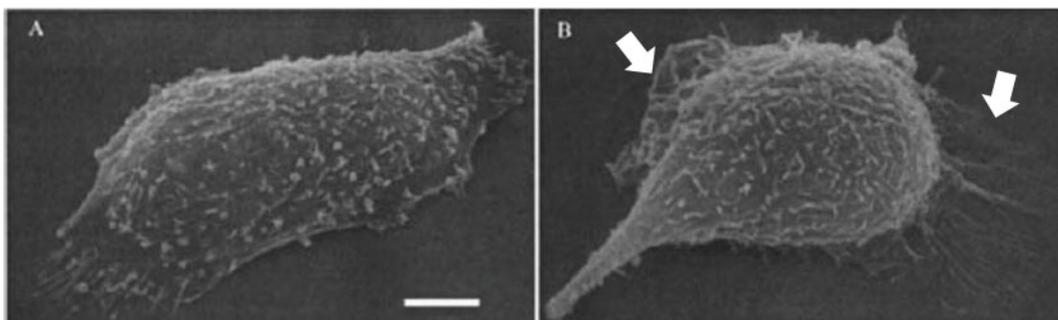
Les chercheurs ont ensuite voulu savoir si le phénomène observé était corrélé avec des modifications du cytosquelette. Ils ont alors mis en évidence les distributions subcellulaires de l'actine G (rouge) et de l'actine F (vert) dans les cellules traitées ou non avec l'IGF-1 à l'aide d'un microscope à épifluorescence.



**Figure 3 :** Observation en microscopie à épifluorescence des distributions subcellulaires de l'actine G (rouge) et de l'actine F (vert) dans des cellules cancéreuses gastriques traitées ou non avec 10 ng/ml d'IGF1 à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

**1.7** Que peut-on déduire des images présentées dans la figure 3 ?

Les cellules cancéreuses gastriques traitées ou non pendant 30 minutes avec de l'IGF-1 ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage.



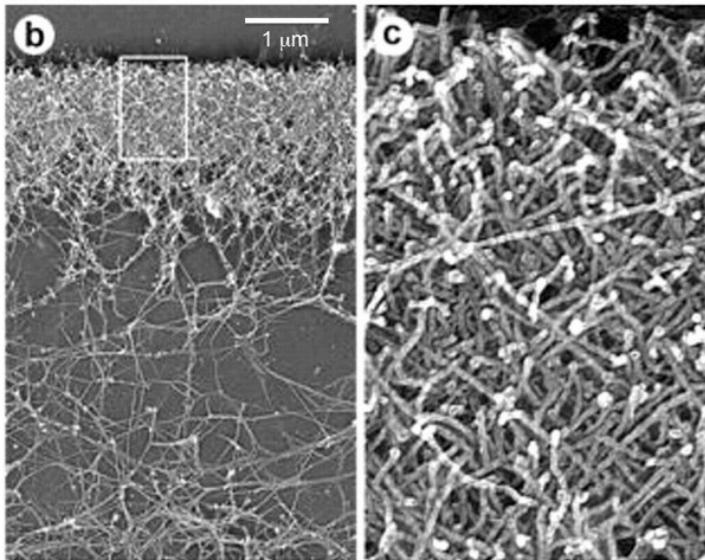
**Figure 4 :** Images de microscope électronique à balayage montrant des cellules cancéreuses gastriques non traitées (A) ou traitées pendant 30 minutes avec 10ng/ml d'IGF-1 (B). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m.

**1.8** Comment s'appellent les structures désignées par les flèches blanches ? De quel type de comportement cellulaire sont-elles caractéristiques ?

L'actine F présente dans la structure morphologique désignée par les flèches blanches dans la figure 4 a été observée au microscope électronique à transmission (figure 5 ci-dessous).

**1.9** Commentez la figure 5. Quel est le nom du complexe protéique qui permet l'assemblage de ce réseau d'actine F ?

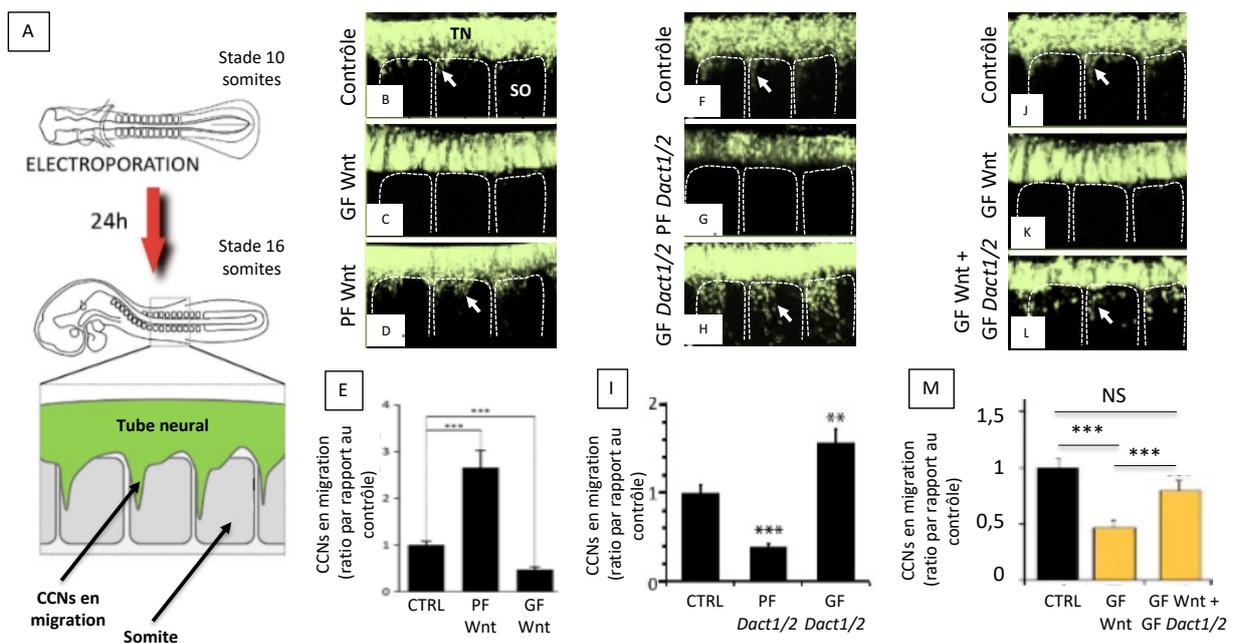
**1.10** L'ensemble des résultats obtenus est-il en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'IGF-1 favorise la formation de métastases ? Justifiez votre réponse.



**Figure 5 :** Organisation de l'actine F au sein de la structure désignée par les flèches blanches dans la figure 4 (microscopie électronique à transmission). La photo de droite (c) correspond à un grossissement du cadre blanc montré en (b).

## 2. Travail sur une annale d'examen (session 2 2019-2020) : Rôle de la voie Wnt et de la protéine DACT1/2 dans la migration des cellules des crêtes neurales

La voie Wnt est connue pour réguler la délamination des cellules des crêtes neurales (CCNs). On s'intéresse ici au lien fonctionnel entre cette voie de signalisation et une protéine cytosolique appelée DACT1/2, exprimée dans les CCNs au moment de leur délamination (Figure 5).



**Figure 5 :** (A) Représentation schématique des expériences réalisées en B-M. Le tube neural d'embryons de poulet au stade 10 somites a été électroporé avec (i) des plasmides permettant de surexprimer des protéines activatrices de la voie de signalisation Wnt et/ou la protéine cytosolique DACT1/2 (situation de gain de fonction ; GF) ou (ii) des ARN interférents dirigés contre les ARNm codant des protéines activatrices de la voie de signalisation Wnt ou contre les ARNm codant DACT1/2 (situation de perte de fonction ; PF). Un plasmide codant la GFP est systématiquement ajouté pour identifier le côté électroporé. Les contrôles (CTRL) correspondent à l'électroporation du vecteur GFP seul. La fluorescence (en vert sur le schéma et les photos) est ensuite visualisée sur des coupes longitudinales d'embryons au stade 16 somites. (B-D, F-H, J-L) Observation des cellules GFP-positives sur des coupes longitudinales d'embryons après gain ou perte de fonction de la voie Wnt (B-D), gain ou perte de fonction de DACT1/2 (F-H) ou gain de fonction simultanée de la voie Wnt et de DACT1/2 (J-L). Les flèches montrent les cellules de crêtes neurales (CCNs) en migration. Les somites sont délimités en pointillés. So : somite ; TN : tube neural. (E, I, M) Quantification dans les conditions indiquées de la proportion de CCNs en migration, relativement aux situations contrôles. Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives. NS : Différence non significative.

**3.1** Sur les panels B-D, F-H, J-L, que visualise-t-on grâce à l'expression de la GFP ?

Oui	Non	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La régionalisation des somites.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Le processus de fermeture du tube neural.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Le tube neural et les CCNs qui s'en échappent.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La transition épithelio-mésenchymateuse des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La différenciation des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les cellules électroporées.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les cellules sauvages.

**3.2** Décrivez les phénotypes de gain et perte de fonction de la voie Wnt observés sur les panels C et D (on s'aidera de la quantification en E et on n'oubliera pas de comparer les résultats à la situation contrôle en B).

**3.3** Quelle(s) conclusion(s) peut-on tirer des résultats des expériences B-E ?

Oui	Non	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	L'activation de la voie Wnt inhibe la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	L'activation de la voie Wnt stimule la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	L'inhibition de la voie Wnt stimule la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	L'inhibition de la voie Wnt inhibe la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La voie Wnt est nécessaire et suffisante à la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La voie Wnt est nécessaire et suffisante pour freiner la délamination des CCNs.

**3.4** Décrivez les phénotypes de perte et gain de fonction de DACT1/2 observés sur les panels G et H (on s'aidera de la quantification en I et on n'oubliera pas de comparer les résultats à la situation contrôle en F).

**3.5** Quelles conclusions peut-on tirer des expériences de perte et gain de fonction de DACT1/2 présentées en F-I ? Formulez votre réponse par une ou deux phrases simples utilisant obligatoirement les termes « nécessaire » et/ou « suffisant ».

3.6 En prenant en compte les résultats précédents et les résultats des panels J-M, sélectionnez parmi les propositions suivantes celles qui vous semblent correctes.

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les panels B-I montrent que la signalisation Wnt et la protéine DACT1/2 ont des effets opposés sur la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les panels B-I montrent que la signalisation Wnt et la protéine DACT1/2 ont des effets identiques sur la délamination des CCNs.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La signalisation Wnt et la protéine DACT1/2 semblent agir sur des processus distincts.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les panels J-M montrent que le gain de fonction de la protéine DACT1/2 sauve le phénotype du gain de fonction Wnt.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Les panels J-M montrent que le gain de fonction de la protéine DACT1/2 aggrave le phénotype du gain de fonction Wnt.

3.7 **QUESTION BONUS.** À l'aide du schéma ci-dessous et sachant que la protéine DACT1/2 régule la signalisation Wnt en jouant sur la localisation subcellulaire de la  $\beta$ -caténine, quelle hypothèse parmi celles ci-dessous vous paraît raisonnable pour expliquer les résultats précédents ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que DACT1/2 favorise la délamination des CCNs en inhibant la voie Wnt. Cet effet de DACT1/2 passe probablement par une inhibition de la translocation nucléaire de la $\beta$ -caténine.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que DACT1/2 favorise la délamination des CCNs en activant la voie Wnt. Cet effet de DACT1/2 passe probablement par une activation de la translocation nucléaire de la $\beta$ -caténine.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que DACT1/2 limite la délamination des CCNs en inhibant la voie Wnt. Cet effet de DACT1/2 passe probablement par une inhibition de la translocation nucléaire de la $\beta$ -caténine.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que DACT1/2 limite la délamination des CCNs en activant la voie Wnt. Cet effet de DACT1/2 passe probablement par une activation de la translocation nucléaire de la $\beta$ -caténine.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que la voie Wnt favorise la délamination des CCNs en inhibant DACT1/2. Cet effet de la voie Wnt passe probablement par une répression de la transcription du gène codant DACT1/2.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que la voie Wnt favorise la délamination des CCNs en activant DACT1/2. Cet effet de la voie Wnt passe probablement par une stimulation de la transcription du gène codant DACT1/2.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que la voie Wnt limite la délamination des CCNs en inhibant DACT1/2. Cet effet de la voie Wnt passe probablement par une répression de la transcription du gène codant DACT1/2.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ces résultats suggèrent que la voie Wnt limite la délamination des CCNs en activant DACT1/2. Cet effet de la voie Wnt passe probablement par une stimulation de la transcription du gène codant DACT1/2.

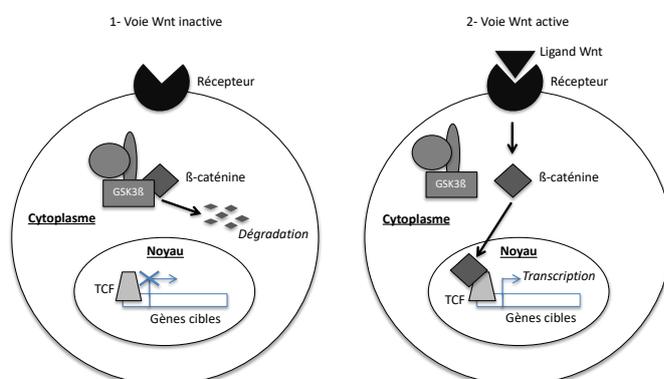


Figure 6 : Représentation schématique et simplifiée de la voie de signalisation Wnt en présence ou en absence du ligand.

## TD7 : Cellules souches et différenciation

### Partie I : Boucle de régulation WUSCHEL/CLAVATA et auto-maintien du méristème apical caulinaire

#### 1. Rappel : Organisation du MAC en zones et tuniques (à faire en amont du TD)

L'organisation du méristème apical caulinaire (MAC) peut se décrire sous forme de zones sur la base de l'index mitotique (pourcentage de cellules en mitoses au sein de la population considérée) ou bien de couches selon l'orientation des plans de divisions. Les zones médullaire (ZM) et périphérique (ZP) contiennent des progéniteurs qui se divisent rapidement et produisent respectivement les tissus internes axiaux de la tige et les organes latéraux et tissus corticaux. Les cellules souches à division lente se trouvent dans la zone centrale (ZC), qui occupe le sommet du méristème et s'étend en profondeur sur une partie du corpus. À la base de la ZC (et débordant sur la zone médullaire) se trouve le centre organisateur (CO ; cellules quiescentes), qui a un rôle crucial dans le maintien des cellules souches de la ZC.

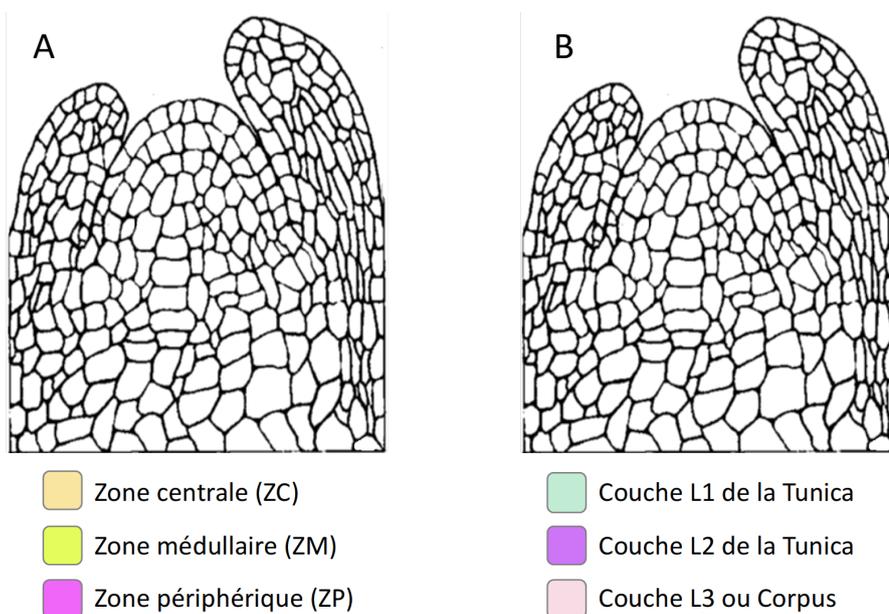


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation du MAC. (A) Organisation en zones. (B) Organisation en couches. D'après Sharma et al. (2002).

1. Sur la base de ces explications et de vos connaissances, représenter sur la Figure 1 ci-dessus l'emplacement des différentes zones et couches, comme indiqué dans la légende.

2. Profils d'expression des gènes *WUSCHEL* et *CLAVATA 1/3* dans le MAC (à faire en amont du TD)

2.1 Observer la Figure 2 et décrire les profils d'expression des gènes *WUSCHEL* (*WUS*), *CLAVATA3* (*CLV3*) et *CLAVATA1* (*CLV1*) en se référant aux zones d'intérêt décrites en Figure 1.

2.2 Reporter le plus précisément possible ces domaines d'expression sur le schéma A de l'annexe **Modélisation 1**. Utiliser un code couleur.

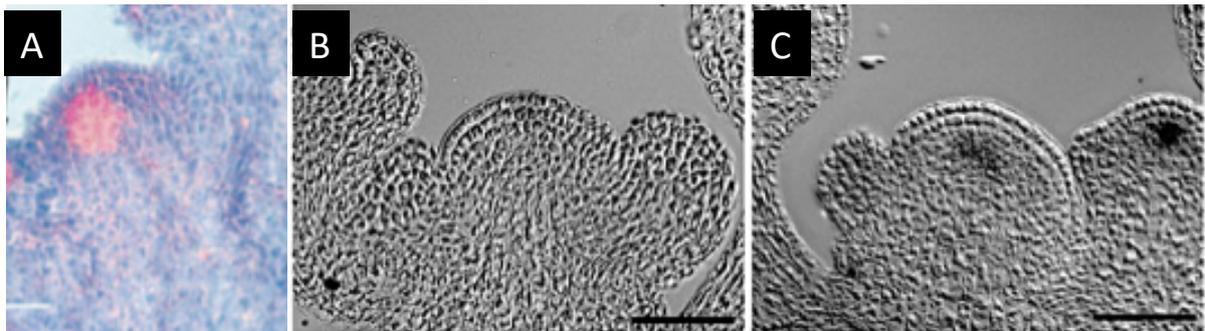


Figure 2 : Analyse par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *CLV1* (A ; utilisation d'une sonde fluorescente), *CLV3* (B) et *WUS* (C). Les transcrits *WUS* sont détectés dans les 3 premiers rangs cellulaires du corpus, les transcrits *CLV3* uniquement dans les couches L1 et L2 (zoomer pour bien voir le signal). Échelle : 50  $\mu$ m. D'après Clark *et al.* 1997 et Kinoshita *et al.* 2010.

3. Comparaison du domaine d'expression du gène *WUS* et de la localisation de la protéine correspondante (à faire en amont du TD)

3.1 Observer la Figure 3 et comparer le profil d'expression du gène *WUS* à la localisation de la protéine *WUS* en se référant aux zones d'intérêt décrites en Figure 1.

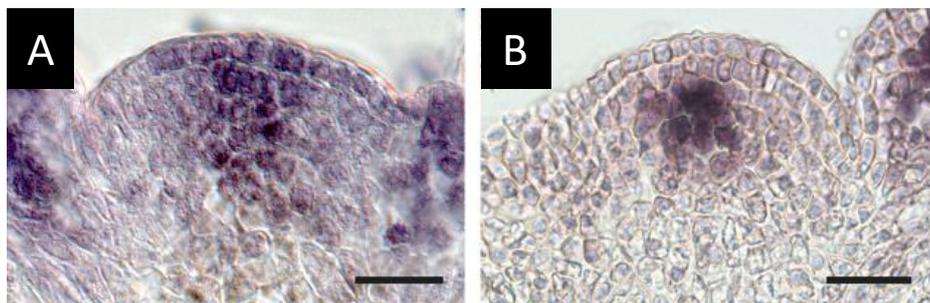


Figure 3 : (A) Détection par immunocytochimie de la protéine *WUS*. (B) Détection par hybridation *in situ* des transcrits *WUS*. Échelle : 20  $\mu$ m D'après Daum *et al.* 2014.

3.2 Reporter le plus précisément possible ces résultats sur le schéma B de l'annexe **Modélisation 1**. Utiliser un code couleur.

#### 4. Localisation cellulaire de la protéine WUS

4.1 Observer la Figure 4 et comparer le profil d'expression des protéines rapportrices GFP-NLS et GFP.

4.2 Quel mécanisme moléculaire explique le résultat montré en Figure 4A ?

4.3 Comparer les Figures 4A et 4B et interpréter les résultats obtenus ?

4.4 Sur la base de cette observation, proposer une hypothèse permettant d'expliquer la différence de localisation de la protéine WUS et de ses messagers en précisant les structures subcellulaires qui pourraient être impliquées.

4.5 Reporter vos hypothèses sur le schéma B de l'annexe **Modélisation 2**.

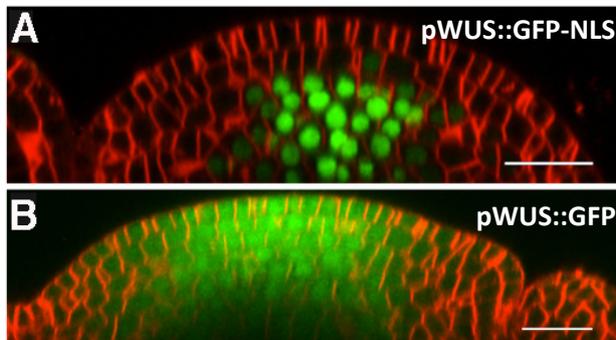


Figure 4 : Comparaison des profils d'expression de deux protéines rapportrices dans un MAC transgénique. La plantule exprime une protéine rapportrice GFP-NLS (A) ou GFP (B) sous contrôle du promoteur du gène *WUSCHEL* (pWUS). NLS est le peptide signal d'adressage au noyau. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ . D'après Daum et al. 2014.

#### 5. Effets d'une perte de fonction de *CLV1* sur l'expression de *WUS*

5.1 Observer la Figure 5 et comparer le profil d'expression du gène *WUS* dans le MAC sauvage et le mutant *clv1*.

5.2 Reporter ce résultat sur le schéma C de l'annexe **Modélisation 1**.

5.3 Conclure sur le rôle du gène *CLV1* vis-à-vis de l'expression du gène *WUS*.

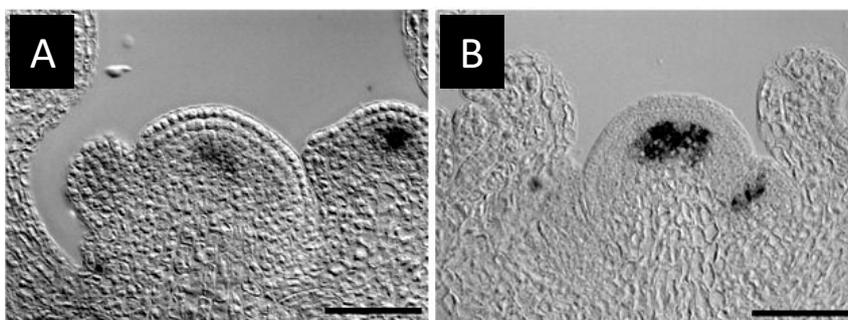


Figure 5 : Analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène *WUS* dans un MAC sauvage (A) ou mutant *clv1* (B ; perte de fonction du gène *CLV1*). Échelle : 50  $\mu\text{m}$ . D'après Kinoshita et al. 2010.

6. Modélisation du mode d'action des protéines WUSCHEL et CLAVATA1/3

**6.1** Reporter sur le schéma A de l'annexe **Modélisation 3** les régions d'expression des gènes *WUS*, *CLV3*, *CLV1*.

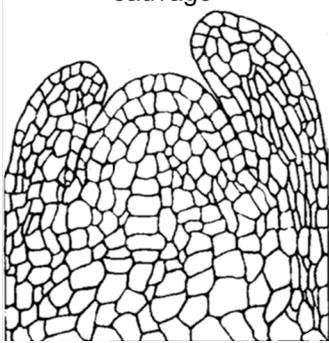
**6.2** À l'aide de l'ensemble des résultats précédents et sachant que (i) *WUS* est un facteur de transcription dont l'activité est nécessaire à l'expression du gène *CLV3*, (ii) la protéine *CLV3* est un ligand diffusible et que (iii) *CLV1* est un récepteur membranaire de *CLV3*, compléter le schéma B de l'annexe **Modélisation 3** pour rendre compte des mécanismes de signalisation et de contrôle de l'expression des gènes à l'échelle cellulaire et moléculaire/biochimique.

**6.3** Compléter les phrases ci-dessous dans le but de synthétiser en quelques phrases la boucle de régulation que vous venez de mettre en évidence.

1. L'ARNm *WUS* est transcrit dans les cellules du .....
2. La protéine *WUS* .....
3. Elle promeut l'expression du ..... dans les cellules .....
4. .... est sécrétée et se fixe sur..... au niveau des cellules.....
5. Les voies de signalisation activées en aval du..... entraînent.....
6. Cette boucle de régulation permet de.....

Modélisation 1 : Localisation des transcrits et protéines dans différentes zones

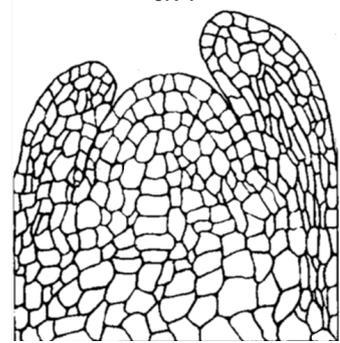
**(A)** Expression des gènes *WUS* et *CLV1/3* dans le MAC sauvage



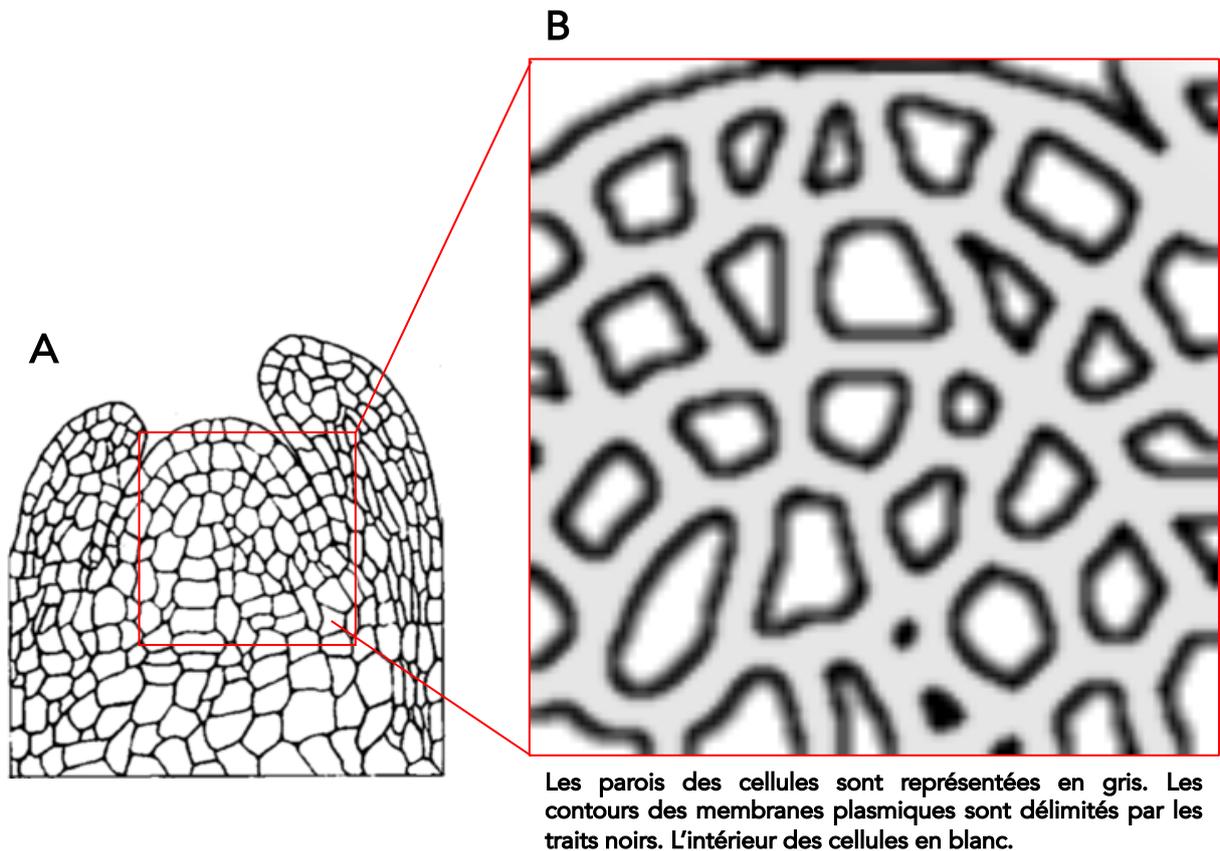
**(B)** Localisation de la protéine WUS dans le MAC sauvage



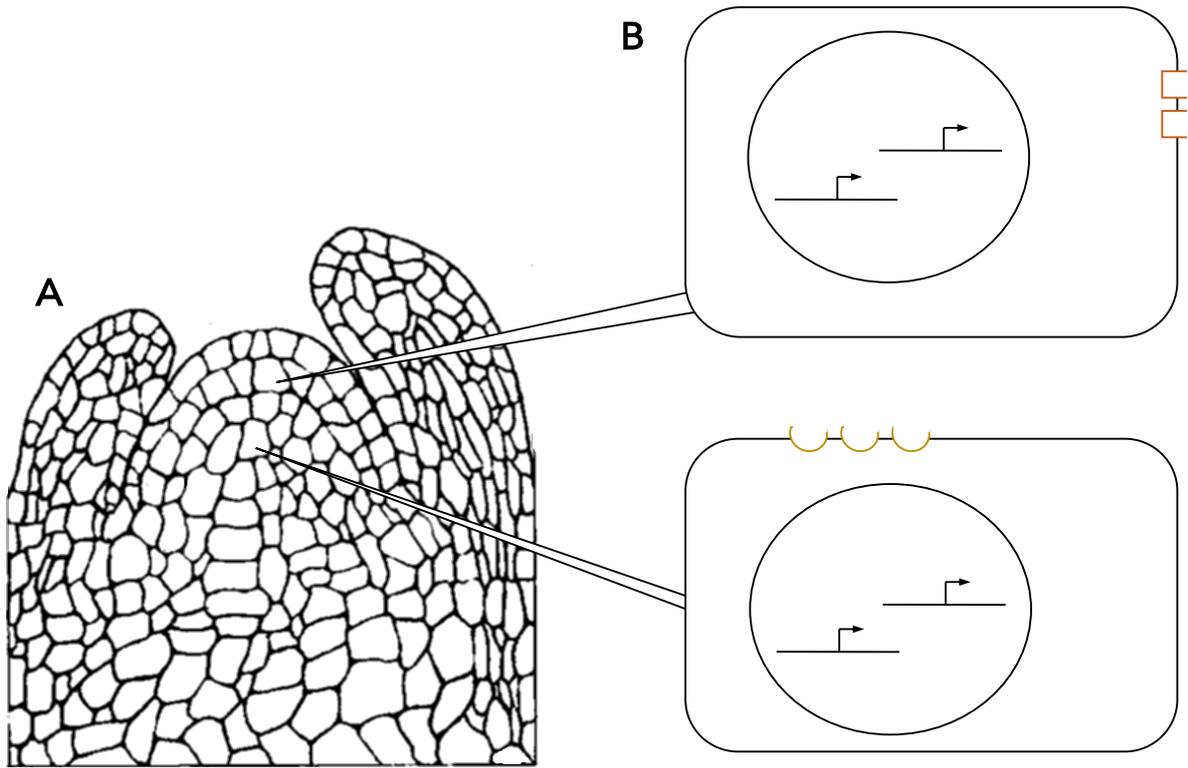
**(C)** Expression du gène *WUS* dans le mutant *clv1*



Modélisation 2 : Transport et communication intercellulaire dans le MAC

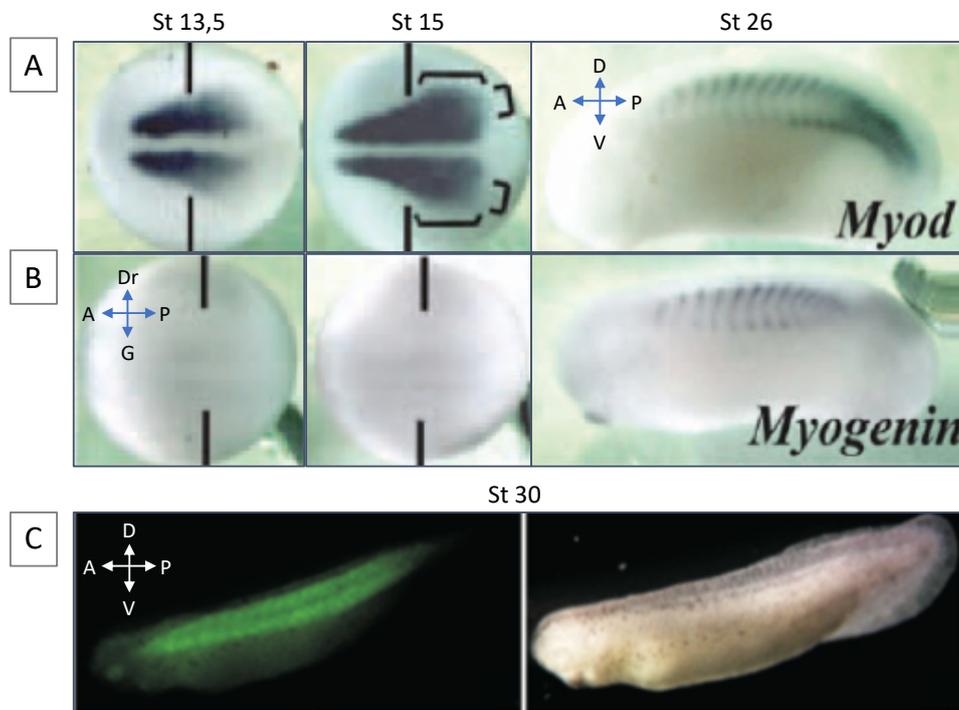


Modélisation 3 : Contrôle de l'expression des gènes dans différentes zones du MAC



## Partie II : Cellules souches et différenciation myogénique

1. Observer la temporalité du programme de différenciation myogénique *in vivo*



**Figure 1 :** (A, B) Analyse par hybridation *in situ* de l'expression des gènes *MyoD* (A) et *Myogénine* (B) aux stades 13,5, 15 (neurulation ; vues dorsales) et 26 (bourgeon caudal ; vue latérale). (C) Observation en fluorescence ou en lumière visible d'un embryon de Xénope transgénique au stade 30. Cet embryon exprime la protéine rapportrice GFP sous le contrôle du promoteur du gène *MCK*. Le gène *MCK* code la créatinine kinase, une enzyme qui n'est exprimée que dans les cellules musculaires striées différenciées. D'après Lim et al. *Physiol Genomics* 18, 79–86 (2004) et Della Gaspera et al., *Dev Dyn* 241, 995-1007 (2012).

1.1 Décrire le profil d'expression du gène *MyoD* aux stades 13,5 et 15.

1.2 Commenter l'expression du gène *Myogénine* à ces stades. Que pouvez-vous en déduire quant à l'état des cellules du myotome à cette étape du développement ?

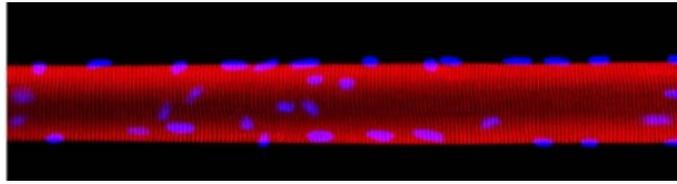
1.3 Décrire le profil d'expression des gènes *MyoD* et *Myogénine* au stade 26.

1.4 Que pouvez-vous en déduire quant à l'état des cellules du myotome (i) dans la région troncale, (ii) dans la région caudale de l'embryon ?

1.5 Que vous apprend l'expression du rapporteur GFP quant à l'état des cellules du myotome au stade 30 ?

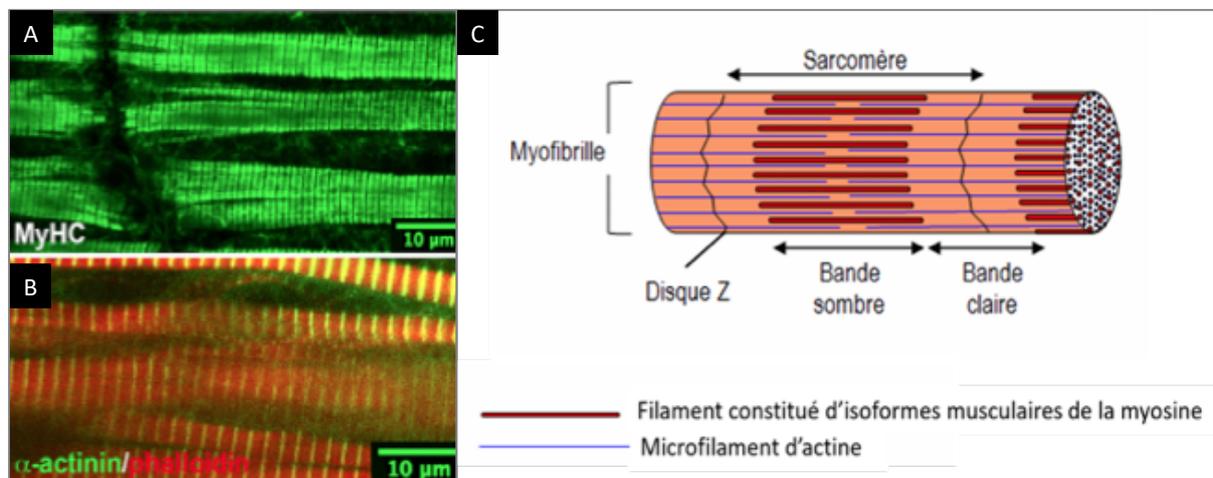
1.6 Ces observations sont-elles suffisantes pour affirmer qu'au stade 30, la musculature dorsale est fonctionnelle ? Quelles autres expériences pourriez-vous proposer pour le démontrer ?

## 2. Observer les caractéristiques de la cellule musculaire différenciée



**Figure 2 :** Myofibre isolée colorée avec la phalloïdine qui reconnaît l'actine et le DAPI qui marque les noyaux. D'après Qaisar R. and Larsson L. *Ind J of Physio and Pharma* 58, 1 (2014).

### 2.1 Quelle caractéristique des myofibres est mise en évidence sur la Figure 2 ?



**Figure 3 :** (A, B) Analyse par immunofluorescence de l'expression des protéines MyHC et  $\alpha$ -actinine sur des muscles striés squelettiques différenciés de Xénope. MyHC est une isoforme musculaire de la myosine. L' $\alpha$ -actinine est une protéine qui ancre les microfilaments d'actine aux disques Z des myofibrilles. La phalloïdine reconnaît l'actine. D'après Geach and Zimmerman, *BMC Developmental Biology* 10, 75 (2010). (C) Représentation schématique de l'organisation du cytosquelette dans une cellule musculaire striée. D'après <https://fonctionnement-du-muscle-43.webself.net/presentation-muscles>.

### 2.2 À l'aide du schéma en C, retrouver sur les immunofluorescences les différentes structures cytosquelettiques caractéristiques d'une cellule musculaire différenciée.

## 3. Obtenir des dérivés différenciés *in vitro* à partir d'iPS

Un de vos patients est atteint d'un défaut de fonctionnement musculaire. Afin de trouver une thérapie adaptée, vous souhaitez dériver des iPS ayant son génome puis les différencier en cellules musculaires sur lesquelles vous pourrez ultérieurement tester divers agents pharmacologiques.

Vous disposez des matériels et méthodes suivants :

Machines	Techniques	Outils moléculaires
Appareil à PCR	Transfection de plasmides	Anticorps dirigés contre diverses protéines d'intérêt
Appareil à Western Blot	Extraction d'ARNm ou protéines	Amorces spécifiques de divers gènes d'intérêt
Microscope à fluorescence	Reverse transcription	Vecteurs d'expression codant tous les gènes souhaités
	Culture cellulaire	Inducteurs de la détermination myogénique et inducteurs de la différenciation

**Tableau 1** : Matériels et méthodes disponibles.

**3.1** Lister dans le tableau 2 ci-dessous les étapes nécessaires à l'obtention de cellules musculaires différenciées à partir de fibroblastes prélevés sur votre patient.

**3.2** Sur la base (i) de vos connaissances, (ii) des observations effectuées précédemment (parties 1 et 2) et (iii) en utilisant au moins une fois chacun des outils/techniques listés ci-dessus, indiquer dans le tableau ci-après les tests à effectuer pour vous assurer que chacune des étapes listées a correctement fonctionné.

Étapes du protocole	Tests à effectuer pour s'assurer du bon fonctionnement de chacune des étapes
1.	
2.	
3.	

**Tableau 2** : Obtention de cellules iPS et induction *in vitro* de la différenciation myogénique.