

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :
-----------------------------------	--------------------------------------

**AGREGATION DES SCIENCES DE LA VIE,
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

Concours externe 2005

Epreuve de Travaux Pratiques de Spécialité A

Durée totale : 6 heures

Nombre total de pages : 22

Cette épreuve est centrée sur un thème unique, mais elle a été subdivisée en 5 parties. Avant de vous lancer dans les manipulations, lisez le sujet en entier. Vous constaterez que la partie 2 ne peut-être réalisée qu'après la partie 1. Bien que complémentaires des parties 1 et 2, les parties 3, 4 et 5 peuvent être traitées avant les parties 1 et 2, et dans un ordre quelconque. Évaluez le temps que vous pensez passer pour chaque partie de façon à organiser vos 6 heures de travail. Le barème de points attribués à chaque partie est donné à titre indicatif. Tenez compte de temps potentiels d'attente pour l'utilisation du spectrophotomètre.

Vous trouverez dans le document un certain nombre d'indications pratiques vous permettant de réaliser les expériences demandées. Cependant, ces indications laissent place à votre initiative personnelle : à vous par exemple de choisir l'objectif qui permettra l'observation microscopique la plus adaptée, ou à vous de concevoir dans les règles de l'art un protocole de mesure d'absorbance.

Pour toute utilisation d'appareillage commun à la salle, appelez un surveillant qui, au besoin, pourra être amené à établir une liste d'attente et à limiter votre temps d'utilisation.

A certaines étapes de vos manipulations, vous devrez faire évaluer vos résultats par un enseignant responsable. Pensez-y !

Répondez directement sur les feuilles dans les cadres prévus à cet effet. Indiquez vos nom et numéro de place sur chaque feuille. Même si vous ne répondez pas, rendez la totalité de vos feuilles.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Un laboratoire de recherche spécialisé dans l'étude des facteurs de croissance et des cytokines a purifié quatre facteurs, numérotés 1, 2, 3 et 4. Vous allez dans un premier temps reproduire quelques unes des expériences préliminaires qui ont été réalisées afin de caractériser leurs effets biologiques. Dans un second temps vous analyserez des résultats d'études plus poussées.

Première partie (20 points)

Vous allez évaluer l'effet biologique des quatre facteurs sur des cellules épithéliales de rein de chien MDCK (Madin-Darby canine kidney). Il s'agit de cellules établies en lignée, mais qui ont conservé des caractéristiques de cellules épithéliales non transformées. Le jour J-2, des boîtes de culture ont étéensemencés avec des cellules MDCK dans un milieu de culture adéquat et placées dans une étuve à 37°C. Le jour J-1, les facteurs ont été ajoutés au milieu de culture et les boîtes remises à l'étuve. Une boîte contrôle, notée C, sans facteur ajouté, a été conservée.

Expérience à réaliser le jour J de l'épreuve :

Attention avant de vous lancer dans les manipulations, lisez le protocole en entier, préparez toutes vos solutions et réfléchissez aux questions posées afin de concevoir vos protocoles de la meilleure façon.

Tant que les cellules ne sont pas fixées, vous devez travailler avec des gants et jeter les milieux de culture et autres solutions, ainsi que les pipettes ou cônes, dans un bac d'eau de Javel.

Afin que les cellules vivantes ne s'altèrent pas sur votre paillasse à température ambiante, vous devez réaliser l'étape de fixation en priorité.

Protocole :

- Vider les milieux de culture.
- Laver deux fois avec 2 mL de tampon phosphate salin (PBS) **que vous aurez à préparer (voir cadre page suivante)**.
- Fixer à l'éthanol 95° : ajoutez 1 mL d'éthanol par boîte, videz, rajoutez de nouveau 1 mL d'éthanol et laissez fixer pendant 5 min.
- Vider l'éthanol et laisser sécher les boîtes à l'air libre. Pour faciliter cette étape, vous pouvez retourner vos boîtes sur du papier absorbant et les tapoter. Vous pouvez conserver vos boîtes à sec le temps que vous voulez.
- Une fois l'éthanol bien évaporé, colorer par 1 mL de cristal violet pendant 10 min, boîtes fermées. La solution de cristal violet est fournie.
- Laver à l'eau du robinet au moins 3 fois. Attention à ne pas utiliser un jet trop puissant.
- Laisser sécher les boîtes à l'air libre. Vous pouvez à nouveau conserver vos boîtes le temps que vous voulez dans cet état.

Faites vérifier le résultat de la coloration par un enseignant.

Observation des résultats :

Vous pouvez observer le résultat des colorations à l'œil nu, à petit grossissement à l'aide de l'objectif 4 de votre microscope ou à l'aide de la loupe binoculaire, ou à plus fort grossissement à l'aide des objectifs 10, 40 et 100 de votre microscope. Vous pouvez procéder aux observations microscopiques même si les boîtes ne sont pas complètement sèches. Les observations microscopiques à l'aide des objectifs 4, 10 et 40 peuvent être réalisées sans

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :
-----------------------------------	--------------------------------------

mettre de lamelle. En revanche, l'utilisation de l'objectif 100 nécessite de déposer une goutte d'eau et une lamelle au fond de la boîte de façon à pouvoir mettre l'objectif 100 à immersion dans l'huile, sans que l'huile ne vienne au contact direct des cellules colorées. Attention, à cause du rebord des boîtes de culture, le passage d'un objectif à l'autre nécessite de rabaisser préalablement la platine du microscope. Prenez bien soin des boîtes et des cellules qu'elles contiennent car ce sont ces mêmes boîtes que vous utiliserez pour la deuxième partie de l'épreuve.

Préparation du tampon phosphate salin : A réaliser à partir d'une solution mère concentrée 10 fois et d'eau distillée.

Expliquez ci-dessous votre protocole de préparation :

Pourquoi doit-on utiliser des gants et jeter les milieux et solutions dans l'eau de Javel tant que les cellules n'ont pas été fixées ?

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Observer les cellules colorées à tous les grossissements qui vous paraîtront adéquats.
Faites dans les espaces ci-dessous un compte-rendu de l'effet comparé des différents facteurs,
sous les formes que vous jugerez les plus adaptées : schémas, dessins, texte...

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :
-----------------------------------	--------------------------------------

Deuxième partie (20 points)

Attention, cette deuxième partie ne peut-être engagée qu'une fois que vous avez complètement achevé la première partie. En effet, elle utilise les mêmes boîtes de cellules qu'elle détruit, interdisant toute nouvelle observation microscopique.

Pour procéder à cette deuxième partie, vos boîtes colorées au cristal violet doivent être parfaitement sèches :

- *si vous avez réalisé un montage sous lamelle pour observer à l'objectif 100, vous devez enlever les lamelles. Pour ce faire, rajouter délicatement de l'eau au fond de la boîte de façon à faire flotter la lamelle, et récupérez cette dernière à l'aide d'une pince, sans toucher les cellules ;*
- *laissez ensuite sécher vos boîtes. Vous pouvez accélérer le temps de séchage en rajoutant 1 mL d'éthanol 95° par puits, videz et laissez sécher à l'air libre.*

Protocole :

- Rajouter par boîte 1 mL d'acide acétique à 33% (vol/vol) **que vous aurez à préparer (voir cadre ci-dessous)**. Fermer les boîtes car l'acide acétique est volatile. Agiter délicatement.
- Concevez un protocole de mesure de l'intensité de la couleur de la solution obtenue dans chaque boîte. Cette intensité peut-être mesurée par absorbance à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Vous disposez de tubes Eppendorf de 1 mL pour préparer vos échantillons. Vous transvaserez ensuite 100 µL de chaque échantillon dans les puits d'une plaque 96 puits. Notez le plan de votre plaque. Celle-ci sera lue par un surveillant qui vous remettra les résultats imprimés et en même temps les vérifiera. Après lecture, le contenu des puits sera jeté et les puits seront nettoyés, de façon à ce qu'un autre candidat puisse réutiliser la plaque. Cependant, au besoin, vous pourrez refaire une autre lecture. Vous devez concevoir votre protocole de mesure d'absorbance en tenant compte des règles d'utilisation d'un spectrophotomètre et de façon à avoir des mesures les plus fiables possibles.

Préparation de l'acide acétique à 33% (vol/vol)

A réaliser à partir d'acide acétique glacial (c'est-à-dire pur à 99,9%) et d'eau du robinet. Expliquez ci-dessous votre protocole de préparation.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Expliquez l'intérêt de l'acide acétique. Que permet de mesurer ce protocole ?

Présentez et justifiez votre protocole de mesure d'absorbance

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Collez ici vos résultats bruts de mesure d'absorbance.

Traitez vos chiffres bruts de mesure d'absorbance de la manière qui vous paraîtra la plus adéquate pour bien mettre en valeur les résultats. Une calculatrice (avec son mode d'emploi) et du papier millimétré sont disponibles.

Présentez vos résultats dans le cadre ci-dessous et page suivante. Analysez et concluez.

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Si vous disposiez d'un laboratoire de culture cellulaire et du matériel présent en salle aujourd'hui, que changeriez-vous au plan d'expérience de ces deux premières parties pour rendre les observations et les mesures plus fiables ?

Nom :

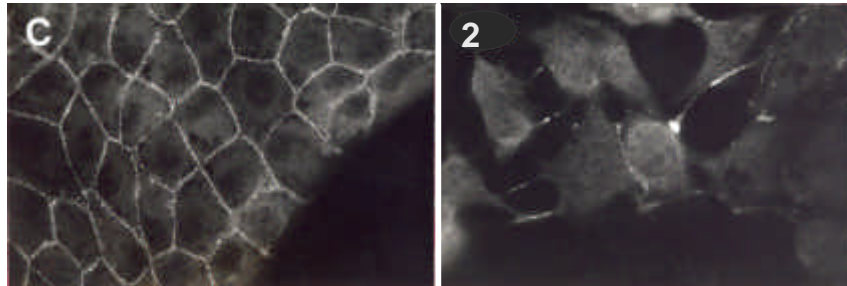
Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Troisième partie (5 points)

Afin de confirmer ou d'infirmer les effets du facteur 2 observables dans la première partie, une immunofluorescence anti-cadhérine a été réalisée sur des cellules "contrôle" et des cellules traitées par le facteur 2, préparées de la même manière que précédemment. Les résultats sont présentés sur les documents photographiques ci-dessous (photo C : cellules "contrôle" ; photo 2 : cellules traitées par le facteur 2) :



Expliquez le principe et décrivez brièvement le protocole d'une expérience d'immunofluorescence

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Quel est le rôle principal des cadhérines dans les cellules épithéliales ?

Analysez les résultats et concluez quant à l'effet biologique du facteur 2. Qu'apporte cette expérience par rapport à vos observations de la première partie ?

Nom :

Numéro de salle :

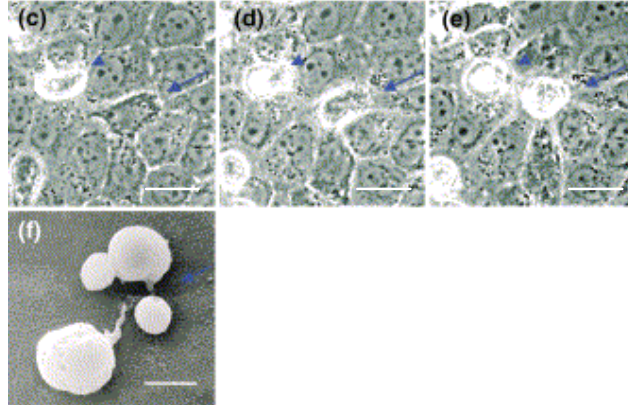
Prénom :

Numéro de place :

Quatrième partie (5 points)

Première expérience :

Des cellules MDCK ont été cultivées comme précédemment puis traitées au facteur 3. Des photographies des cellules ont été réalisées à l'aide d'un microscope à contraste de phase au bout de 60 (photo c), 80 (photo d) et 100 min (photo e) de traitement. Après les 100 min de traitement, le tapis de cellules a été préparé pour être observé au microscope électronique à balayage (photo f). Les barres représentent 10 μm .



Décrivez l'effet du facteur 3. Qu'apporte cette expérience par rapport à celles que vous avez réalisées ?

Nom :

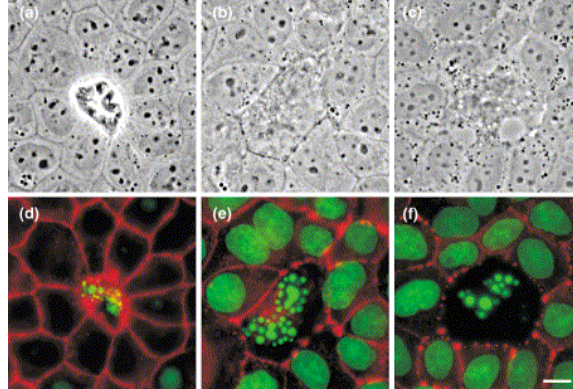
Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Deuxième expérience :

Des cellules MDCK ont été traitées comme précédemment pendant 100 min par le facteur 3, en absence (photos a et d) ou en présence de deux drogues inhibant la contraction de l'actine : la latrunculine (photos b et e) et Y-27632 (photos c et f). Les cellules ont ensuite été fixées et une immunofluorescence anti-actine a été réalisée. L'actine est révélée par une fluorescence rouge, l'ADN est coloré grâce à un intercalant fluorescent vert. Les photos a, b et c représentent les cellules observées au microscope à contraste de phase. Les photos d, e et f représentent les cellules observées au microscope confocal à fluorescence. La barre représente 10 μm .



Quel phénomène induit le facteur 3 ? Quel est l'intérêt d'utiliser les drogues bloquant la contraction de l'actine ?

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Cinquième partie (10 points)

Le récepteur du facteur 1 a été caractérisé. Il s'agit d'une protéine transmembranaire. La liaison du facteur 1 sur son récepteur induit la dimérisation du récepteur et l'autotransphosphorylation de son domaine intracellulaire. Les sites phosphorylés servent alors de site de fixation pour la phospholipase C gamma1 (PLC- γ 1). Il a été montré que l'association de la PLC- γ 1 au récepteur est nécessaire à l'expression des effets biologiques du facteur 1.

La PLC- γ 1 contient deux domaines SH2 et un domaine SH3 ainsi que deux domaines catalytiques PLC capables d'hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG). Deux hypothèses quant au mode d'action de la PLC- γ 1 sont envisagées :

- 1- La PLC- γ 1 transduit les effets du facteur 1 en produisant de l'IP3 et du DAG qui eux-mêmes iront activer des cibles comme la protéine kinase C
- 2- Grâce à ses domaines SH2 et SH3, la PLC- γ 1 agit comme une protéine adaptatrice capable d'interagir d'une part avec le récepteur et d'autre part avec d'autres protéines qui seront alors activées.

Afin de trancher entre ces deux hypothèses, l'expérience suivante a été réalisée :

- 1- Par génie génétique on construit un ADNc codant une protéine PLC- γ 1 restreinte aux domaines SH2 et SH3 (appelée PLC- γ 1 SH2-SH2-SH3 sur la figure 1). On produit et on purifie cette protéine.

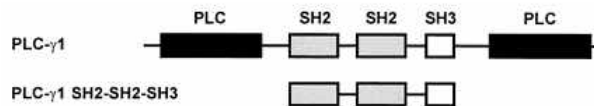


Figure 1 : Représentation schématique des domaines composant la protéine PLC- γ 1 entière et la protéine PLC- γ 1 restreinte aux domaines SH2 et SH3

- 2- On cultive des cellules MDCK pendant 48h. On microinjecte quelques cellules avec la protéine PLC- γ 1 SH2-SH2-SH3 à forte concentration. Puis on cultive les cellules pendant 24 h :
 - en présence de bromodésoxyuridine (BrdU) (un analogue de thymidine),
 - en présence ou en absence de facteur 1,
 - en présence ou en absence d'IP3 et DAG perméants.

Après ces 24h, on fixe les cellules et on procède à une expérience de double immunofluorescence permettant de révéler en rouge la BrdU et en vert la protéine microinjectée. Les résultats sont présentés sur les figures 2 et 3:

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

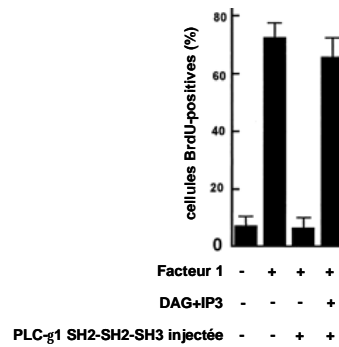


Figure 2 : Les cellules BrdU-positives sont dénombrées dans la population totale pour les deux premières conditions, et uniquement dans la population microinjectée pour les deux dernières conditions (les deux colonnes de droite).

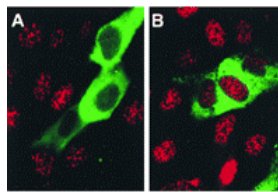


Figure 3 : Micrographies représentatives des résultats correspondant aux deux colonnes de droite de l'histogramme de la figure 2 : des cellules ont été microinjectées avec la protéine PLC-g1 restreinte aux domaines SH2 et SH3 puis cultivées en absence (A) ou en présence (B) d'IP3 et DAG ; une double immunofluorescence anti-BrdU (rouge) et anti PLC-g1 (vert) a été réalisée. La barre représente 10 μ m.

Analyse des résultats et conclusions :

- 1- Reformulez les deux hypothèses relatives à cette étude sous forme d'un schéma.
- 2- Quel est l'effet biologique du facteur 1 mis en évidence dans cette étude ?
- 3- Comment agit la protéine PLC- γ 1 tronquée ? Que peut-on conclure du rôle de la protéine PLC- γ 1 endogène ?
- 4- Quel est le mode de transduction du signal de la PLC- γ 1 ?
- 5- Sur le même principe expérimental, proposez une expérience complémentaire ou témoin permettant d'appuyer vos conclusions ? (Présentez le principe de l'expérience et exposez le résultat attendu ou les résultats possibles).

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

--

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

--

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Conclusion générale

Faites le bilan des effets des 4 facteurs. En fonction de ces effets, proposez un nom pour chacun de ces facteurs.

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :