

BIOLOGIE CELLULAIRE

DS n°5

22 janvier 2011

Durée : 3 heures

A partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, vous décrirez l'importance de la membrane dans les échanges entre la cellule et son milieu extérieur.

- L'exposé sera encadré par une introduction et une conclusion, et sera structuré par un plan faisant apparaître explicitement les thèmes abordés et la progression suivie.
- L'exposé doit se limiter aux trois thèmes abordés par les documents, qui feront l'objet de trois parties indépendantes.
- Le candidat ne doit pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le sujet indépendamment de l'exploitation des documents.
- Les documents peuvent être découpés et intégrés à la copie, à condition d'être légendés, commentés et exploités ; des croquis légendés peuvent aussi être proposés.

THÈME 1

FLUX SODIQUES A TRAVERS LA MEMBRANE PLASMIQUE DES CELLULES ANIMALES

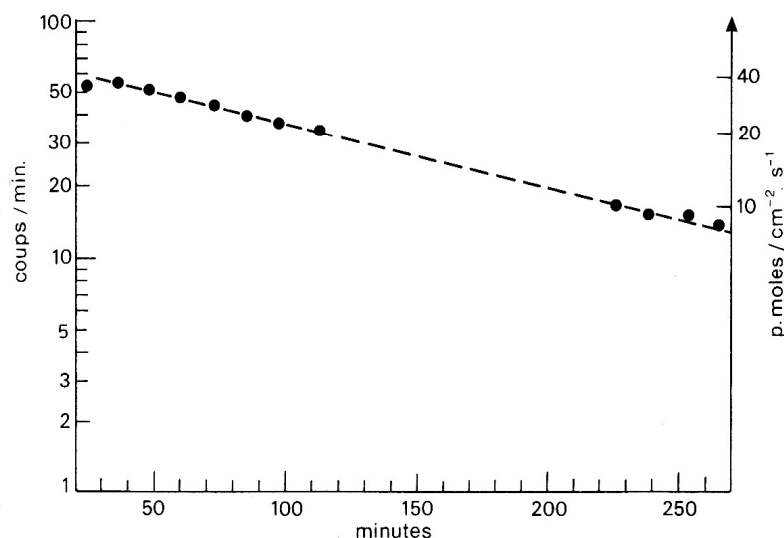
Document 1A

Expériences de Hodgkin et Keynes sur les axones géants de Calmar (1950)

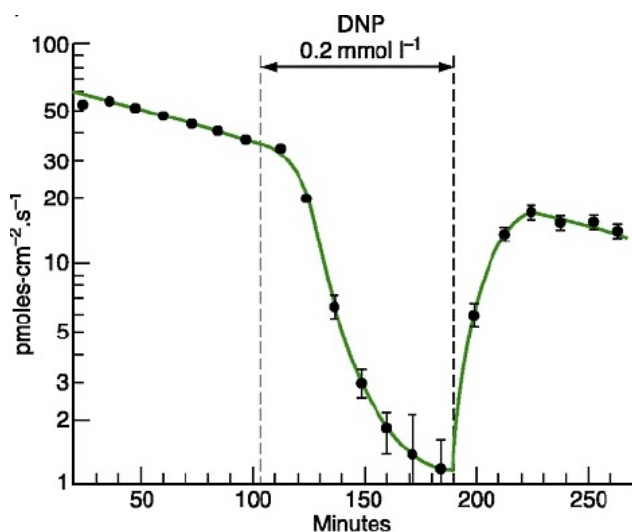
Les résultats expérimentaux relatés ici sont ceux obtenus par Hodgkin et Keynes dans les années 1950. Ils ont étudié les flux ioniques à travers la membrane plasmique d'axone géant de Calmar.

Un axone géant est pré-incubé dans une solution d'eau de mer renfermant du Na⁺ radioactif (²⁴Na⁺) puis transféré dans un milieu non radioactif. Du milieu extracellulaire au contact de l'axone est alors prélevé et le ²⁴Na⁺ dosé (coups par minute convertis en concentrations molaires).

Les effets de l'ajout de dinitrophénol (DNP), un inhibiteur métabolique, ou de l'absence de K⁺ dans le milieu de perfusion sont également testés.



Document 1-1 : Efflux de ²⁴Na⁺ au cours du temps (Le temps en abscisse correspond au temps de transfert dans le milieu non radioactif.)



Document 1-2 : Effet du DNP (dinitrophénol) sur l'efflux de $^{24}\text{Na}^+$

Les mêmes expériences sont reconduites en utilisant transitoirement un milieu de transfert après marquage dépourvu de potassium, alors que l'eau de mer en contient naturellement une concentration proche de 10 mmol.L⁻¹.

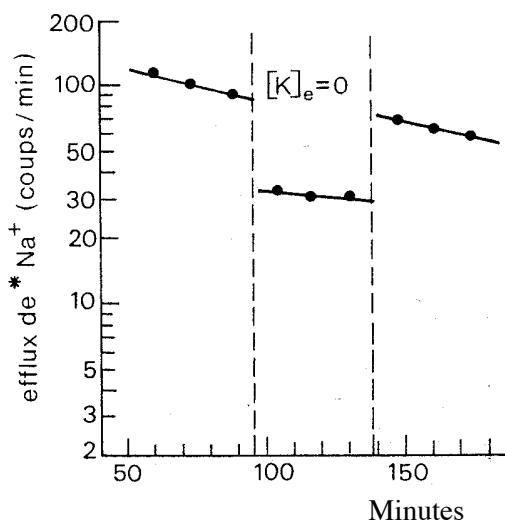
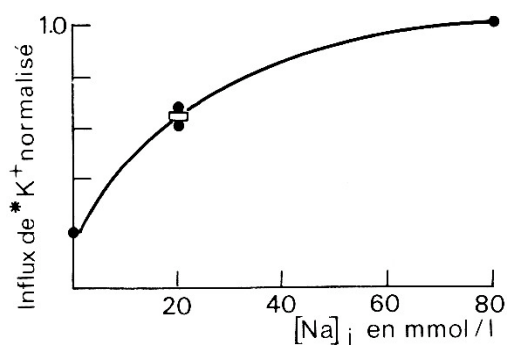


Figure 1-3 : Efflux de $^{24}\text{Na}^+$ en absence de K^+ dans l'eau de mer



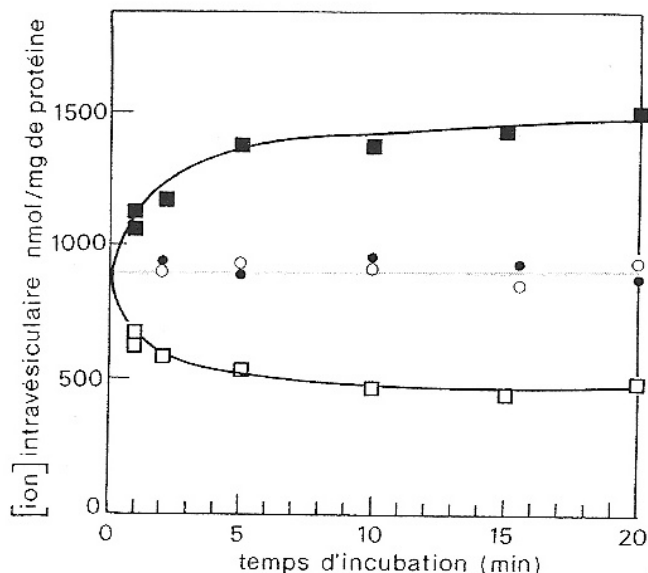
Document 1-4 : Influx de K^+ radioactif en fonction de la concentration en Na^+ utilisée dans le liquide de perfusion.

La valeur mesurée est normalisée par rapport à l'influx mesuré lorsque Na^+ perfusé = 80 mmol.L⁻¹

Document 1B

Utilisation de liposomes pour l'étude de la protéine impliquée dans l'efflux de Na^+

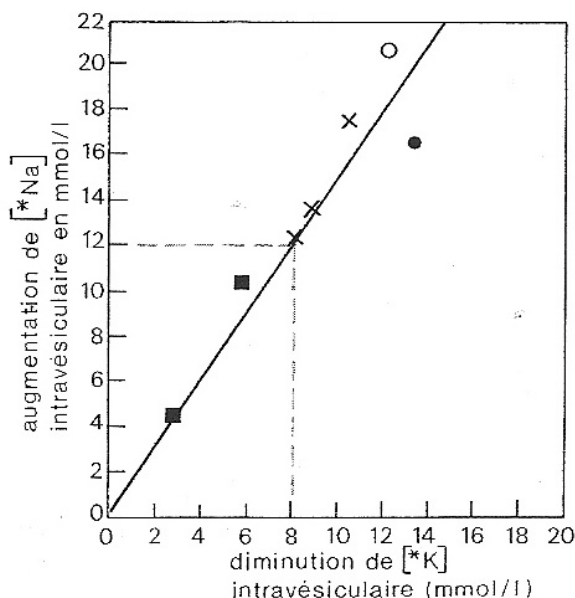
La protéine impliquée dans l'efflux de sodium que celle étudiée précédemment a été purifiée à partir de membranes plasmiques de cellules rénales de mammifères. Elle est incorporée dans des liposomes, le site de liaison au sodium exposé vers le milieu extérieur.



Document 1-4 : Variation du contenu des liposomes en ions Na^+ et K^+

Mesure des contenus intravésiculaires en ions Na^+ (en noir) et K^+ (en blanc).

Ces expériences sont réalisées en présence (carrés) ou en absence (ronds) de 4 mmol.l⁻¹ d'ATP.



Document 1-5 : Concentrations à l'intérieur du liposome en ions Na^+ et K^+ à l'équilibre

Mesure des contenus intravésiculaires en ions Na^+ et K^+ après 15 minutes d'incubation en présence de 4 mmol.l⁻¹ d'ATP.

Ne pas tenir compte des différences de figurés pour les points.

THÈME 2

L'INTERNALISATION DE PARTICULES EXTERNES

D'après articles divers de médecine-sciences, Nature, Science et Journal of Cell Biology.

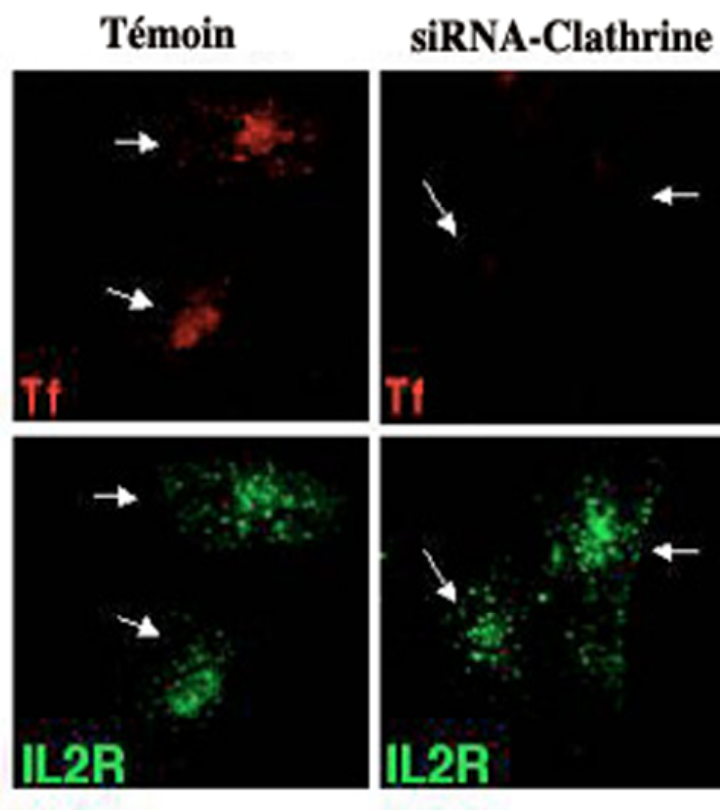
Document 2A

Les voies d'internalisation

Des cultures de cellules immunitaires ont été suivies par microscopie confocale à fluorescence. Deux lots de cellules sont utilisés :

- des cellules témoins non traitées ;
- des cellules auxquelles on a injecté grâce au lentivirus des ARN antisens du gène de la clathrine. Cette interférence des ARN natifs avec les ARN antisens conduit à l'absence de clathrine dans ces cellules.

La transferrine ou les récepteurs de l'interleukine-2 sont marqués spécifiquement avec un fluorochrome. Après mise en contact avec la transferrine ou l'interleukine-2 dans le milieu de culture, les cultures sont observées en microscopie confocale à fluorescence.



Les clichés montrent chaque fois deux cellules de la culture. La transferrine est marquée avec la rhodamine (rouge) et les récepteurs à interleukine-2 avec la fluorescéine (vert pâle).

Document 2B

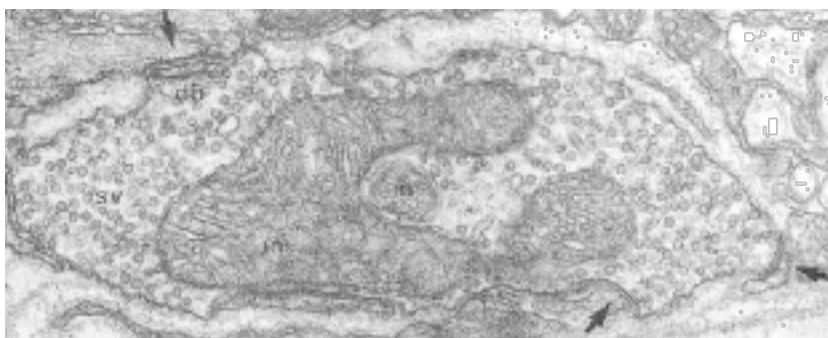
Rôle de la dynamine dans l'internalisation des particules

En 1973, une classe de mutant de *Drosophile*, appelée *shibire*, de nature thermosensible. Cela signifie que la mutation ne s'exprime qu'au-delà d'une certaine température, de l'ordre de 26°C.

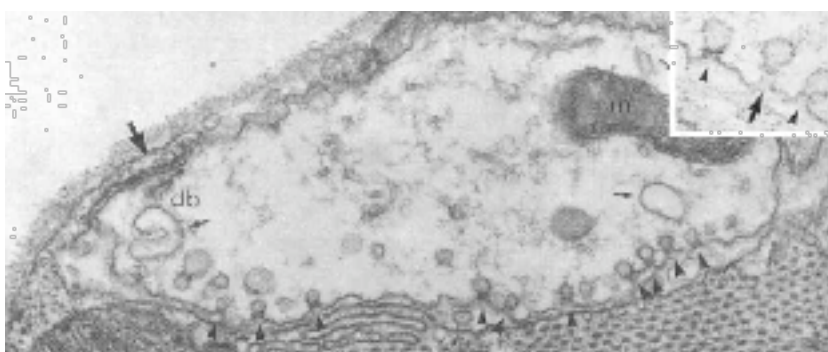
Ces mutants sont parfaitement normaux à 19°C mais deviennent paralysés à température de 29°C.

Le gène muté a été identifié : il code pour une protéine : la dynamine.

L'étude des synapses chimiques de motoneurones a montré les clichés ci-dessous :



Observation à T = 19°C



Observation à T = 29°C

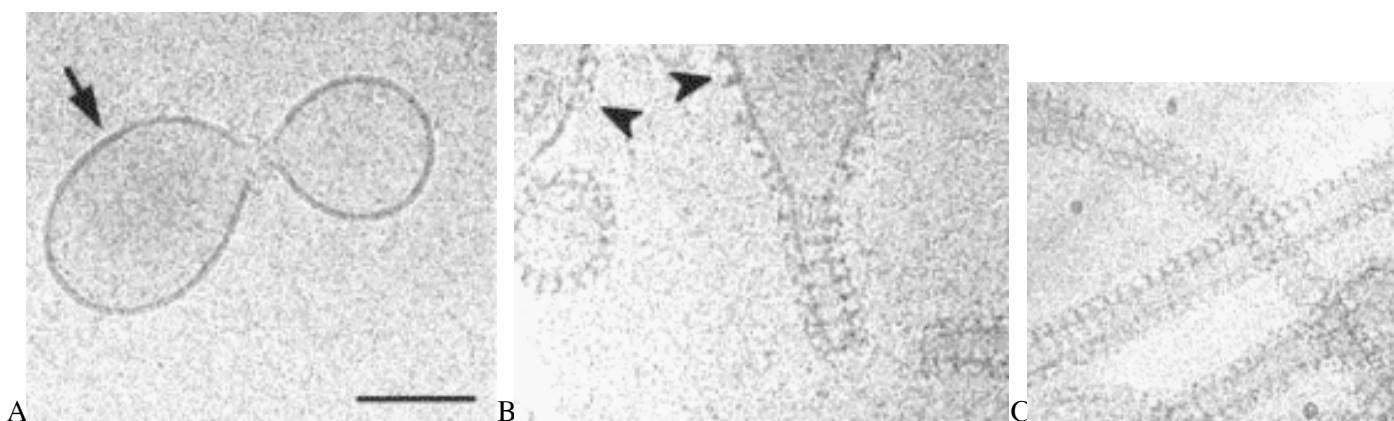
Les individus retrouvent leur mobilité si on les transfère de nouveau dans un milieu à 19°C.

Document 2C

Construction de liposomes avec dynamine

1) Des liposomes sont construits à partir d'un mélange de phospholipides. Ils sont constitués par une double couche lipidique (flèche du cliché A). Les expériences ont été réalisées dans l'éthane liquide pour ralentir considérablement les vitesses de réaction ou d'association moléculaire.

La dynamine et les liposomes ont été incubés ensemble pendant un laps de temps de assez bref puis des fractions, prélevées toutes les 20 minutes, ont été congelées dans l'azote liquide pour être observées au microscope à cryo-électrons. Les dynamines sont suffisamment grosses pour être détectées au microscope à cryo-électrons (elles sont indiquées par une pointe de flèche sur le cliché B).



Clichés de ME obtenus à partir de fraction prélevée au bout de 20 minutes (cliché A), 40 minutes (cliché B) ou 1 heure (cliché C) après la mise en contact dynamine – liposomes. Barre d'échelle = 100 nm.

2) Effet de l'ajout de GTP

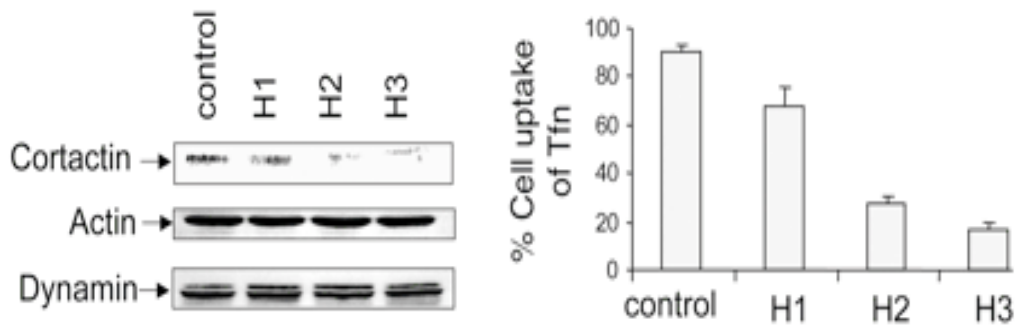
Le diamètre des tubes membranaires du cliché C ont été mesurés en présence ou non de GTP. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Témoin	Avec 1mM GTP
Diamètre du tube membranaire en nm	52 +/- 4	43 +/-2

Document 2D
Autres acteurs : cortactine et actine

1) Des cultures cellulaires ont été traitées 24 heures par transfection afin de moduler l'expression d'une protéine, la cortactine. Les cellules ont reçu des ARN anti-sens du gène de la cortactine. L'expression des protéines de ces cellules est évaluée par analyse immunoblot.

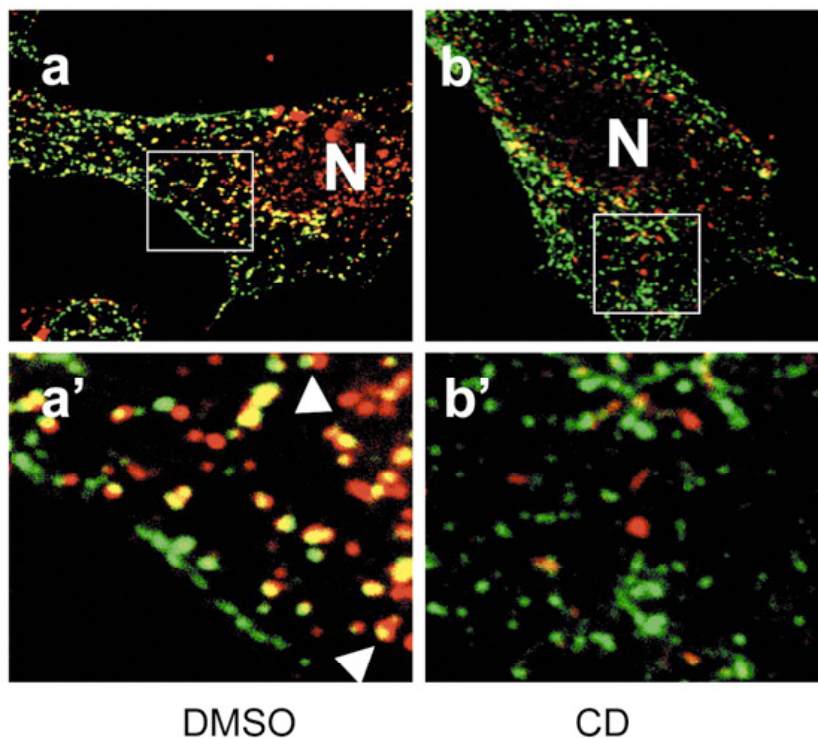
Les cultures de cellules sont, en plus du témoin, H1, H2 et H3 : 3 niveaux d'expression de la cortactine. Pour chaque culture le pourcentage d'internalisation de la transferrine a été mesuré (% cell uptake of Tfn) par une technique de fluorescence.



2) Lien actine – cortactine – dynamine.

Des cellules NIH3T3 ont été traitées ou non par de la cytochalasine D à 10 μ M, qui empêche la polymérisation d'actine F. Après une heure de traitement, les cellules ont été incubées 10 minutes dans un milieu contenant de la transferrine marquée à 20 μ g/ml. Les cultures cellulaires ont alors été fixées et des anticorps fluorescents dirigés contre la dynamine ou la cortactine ont été ajoutés.

Les flèches indiquent la colocalisation dynamine – cortactine. N : noyau.



Observation d'une cellule de cultures cellulaires doublement marquées (dynamine en vert et la cortactine en rouge). Le témoin est une culture notée DMSO, à 2 échelles (a : cellule totale, et a' : détail du cytoplasme). Les cellules traitées à la cytochalasine D sont indiquées en b et b' (b : cellule totale et b' : détail du cytoplasme).

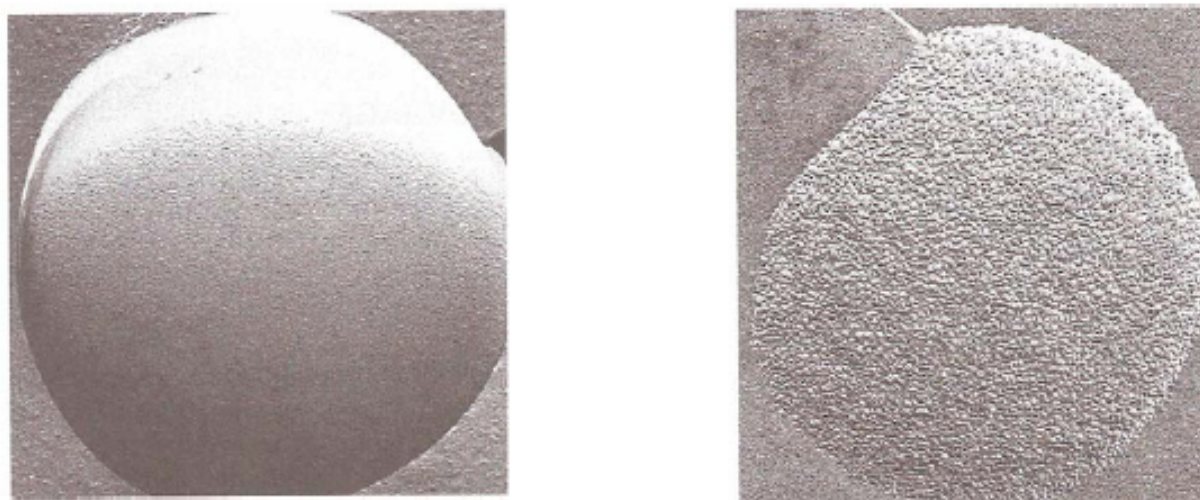
THÈME 3

LA DYNAMIQUE DES MEMBRANES CELLULAIRES

D'après sujet concours G2E 2009

Document 3A
Étude des mouvements intra-membranaires

Les membranes peuvent être visualisées grâce à la technique de cryofracture au microscope électronique. Voici deux clichés obtenus l'un sur un liposome, l'autre sur une cellule d'E.coli.

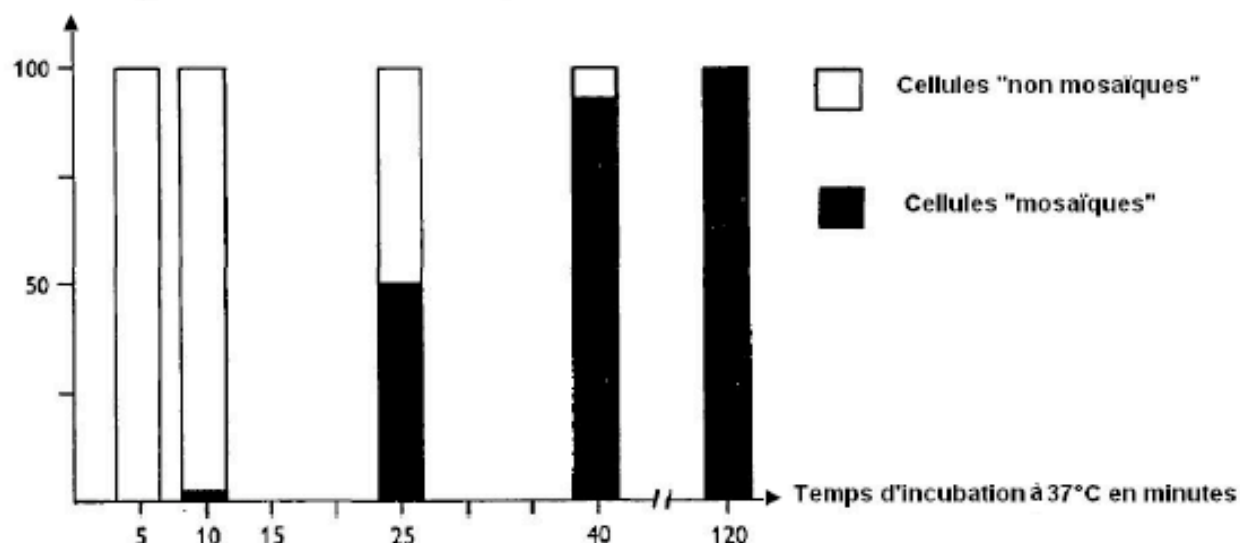


Document 1 : Clichés de cryofracture au microscope électronique d'un liposome et d'une membrane. A gauche, cryofracture de liposomes (agrandissement : 80000). A droite, cryofracture d'une membrane cytoplasmique d'E. coli (agrandissement : 50000) ; Les irrégularités visibles sur le cliché de droite disparaissent après un traitement aux protéases.

D'après Biochimie et biophysique des membranes, Shechter E., 1997, Masson, 2^e édition.

En 1970, Frye et Edidin ont pu créer des hybrides cellulaires ou hétérocaryons en fusionnant une cellule humaine avec une cellule de souris pour former une seule cellule avec une membrane plasmique continue et contenant des protéines membranaires humaines et de souris. Après la fusion, la distribution des protéines sur la surface cellulaire a été suivie durant plusieurs heures en utilisant un marquage spécifique des protéines humaines et des protéines de souris. Les auteurs distinguent des cellules mosaïques où il y a un mélange des antigènes de surface et des cellules non mosaïques où les antigènes de surface sont séparés. La distribution spatiale des protéines de ces cellules doublement marquées a été comparée avec des témoins d'hybrides de cellules humaines et d'hybrides de cellules de souris qui étaient marquées exclusivement d'une couleur spécifique aux cellules humaines et aux cellules de souris ; dans ce cas, les cellules restent « non mosaïques ». Les résultats de Frye et Edidin sont fournis dans le Document 2.

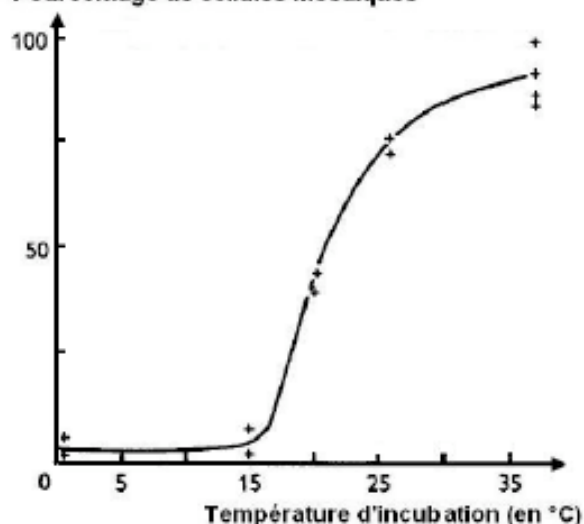
Pourcentage de cellules doublement marquées



Document 2 : Pourcentage de cellules doublement marquées (hybrides) montrant une distribution en mosaïque (noir) ou non-mosaïque (blanc) de protéines humaines ou de souris sur leur surface en fonction du temps d'incubation (en minutes à 37°C). D'après *The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons*. Frye L.D. and Edidin M., *Journal of Cell Science* 7:319-335, 1970.

Document 3B Effet de la température

Pourcentage de cellules mosaïques



Document 3 : Effet de la température sur l'apparition des cellules mosaïques 40 minutes après la fusion cellulaire.

Des inhibiteurs de la synthèse protéique et du métabolisme ont été testés et n'ont montré aucun effet sur l'apparition de cellules mosaïques.

D'après *The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons*. Frye, L.D. and Edidin M., *Journal of Cell Science*. 7:319-335, 1970.