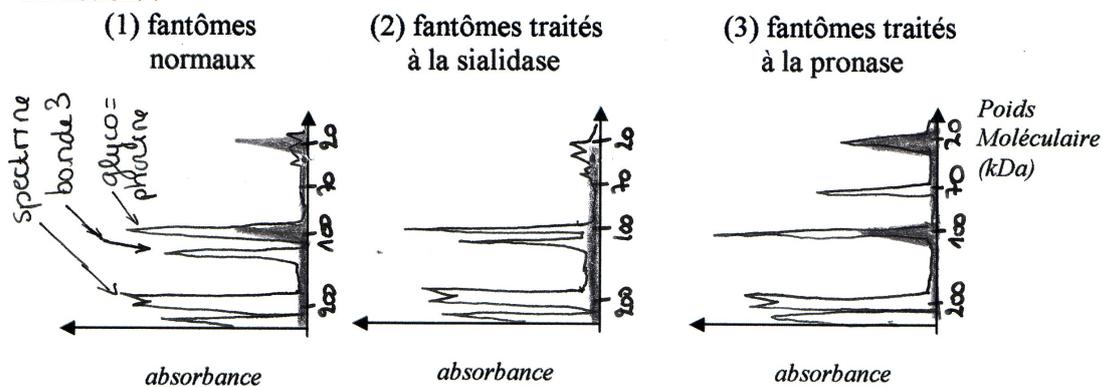


Livret d'exercice n°4
membranes, matrices, cytosquelettes
Exercice 1 : les protéines membranaires du globule rouge

Afin de connaître l'orientation de trois protéines de la membrane des hématies, spectrine, bande 3 et glycopherine, on réalise l'expérience suivante sur des fantômes d'hématies, non inversés au cours de la préparation :

- on traite des fantômes d'hématies à la sialidase, enzyme qui enlève les résidus glucidiques d'acide sialique des protéines, ou à la pronase, enzyme protéase clivant les liaisons peptidiques.
- Après traitement on extrait la fraction protéique des fantômes membranaires
- On sépare les protéines par électrophorèse sur gel en présence de SDS
- On traite les électrophorèses au rouge Ponceau, un colorant rouge spécifique des protéines, et à un colorant des sucres
- Après rinçage on mesure l'absorbance des électrophorèses à deux longueurs d'onde, correspondant aux radiations absorbées par les deux colorants utilisés.

On obtient :



La courbe simple désigne l'absorbance du rouge Ponceau et la courbe grisée désigne l'absorbance du colorant des sucres.

Q : analyser l'expérience et positionner ces trois protéines dans la membrane.

Afin de préciser la disposition des protéines au sein de la membrane, on extrait quatre protéines de la membrane des fantômes d'hématies : spectrine, ankyrine, bande 3 et actine. Des mélanges de deux protéines sont mis à incuber *in vitro* puis un anticorps spécifiques de l'une des deux protéines du mélange est ajouté : les complexes anticorps-antigènes précipitent, sont récupérés et analysés.

Mélange protéique	Spécificité de l'anticorps	Protéines précipitées
bande 3 + actine	actine	actine
bande 3 + spectrine	spectrine	spectrine
bande 3 + ankyrine	ankyrine	bande 3 + ankyrine
actine + spectrine	spectrine	actine + spectrine
actine + ankyrine	ankyrine	ankyrine
spectrine + ankyrine	spectrine	spectrine + ankyrine

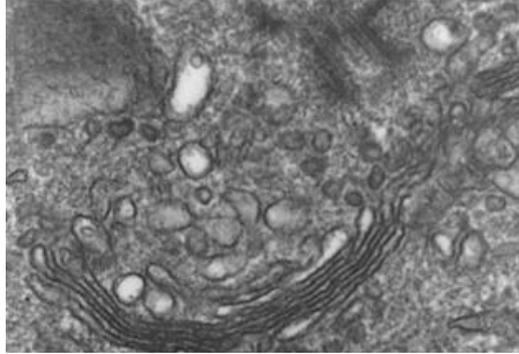
Q : expliquer comment un anticorps peut provoquer la précipitation d'une ou deux protéines

Q : proposer un schéma de la membrane de globule rouge figurant l'ensemble des protéines citées.

Exercice 2 : à propos des microtubules*d'après Sandoval et al, 1984 - d'après Cole et al, 1996*

On observe que dans la plupart des cellules animales, le centrosome et l'appareil de Golgi se situent dans la même région centrale de la cellule, à proximité du noyau. D'où l'hypothèse d'un lien entre le cytosquelette microtubulaire et l'appareil de Golgi.

Document 2.1 : observation en microscopie électronique de l'appareil de Golgi d'une cellule en condition de culture normale



X 10 000

Q : légènder la photographie

Document 2.2 : marquages fluorescents

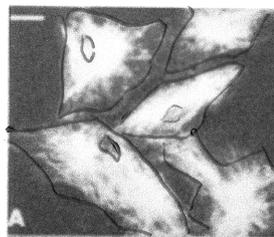
Expérience 2.1.a : marquage fluorescent de microtubules et de l'appareil de Golgi dans des cellules en culture

Des cellules de reins de rat en culture, cellules non polarisées, servent de support à l'observation :

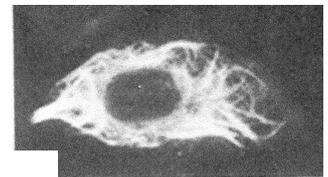
- on introduit dans les cellules un anticorps de lapin, fluorescent, dirigé spécifiquement **contre la tubuline α** et on réalise l'observation A
- on introduit dans d'autres cellules un anticorps fluorescent dirigé spécifiquement **contre une enzyme située spécifiquement dans l'appareil de Golgi** et on réalise l'observation B.

Sur certaines micrographies, les contours cellulaires ont été dessinés ; la fluorescence apparaît en blanc sur fond sombre.

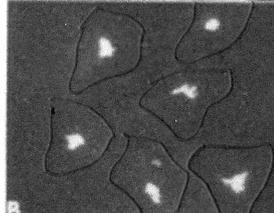
observation A
x600



observation A
x 1600



observation B
x600

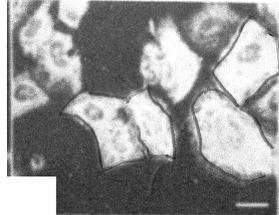


Q : décrire en 2 phrases la position des objets marqués.

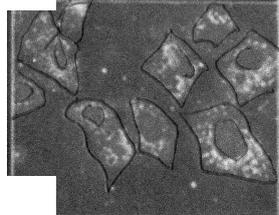
Expérience 2.2.b : effet de la colcemide sur les cellules en culture

Les cellules de reins de rat sont mises en présence de **colcemide**, une substance toxique qui provoque la désagrégation des microtubules, pendant 2 heures. Puis on réalise le marquage avec l'anticorps anti- tubuline α (observation A') ou avec l'anticorps anti-enzyme golgienne (observation B')

Observation A'
x 600

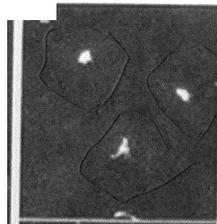


observation B'
x 600



Après deux heures de contact cellules-colcemide, on supprime la colcemide du milieu de culture et, après une heure supplémentaire, on réalise à nouveau le marquage avec l'anticorps anti-enzyme golgienne (observation B'')

observation B''
x 600

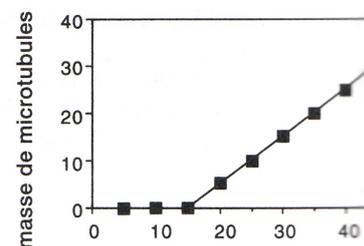


Q : analyser l'action de la colcémide

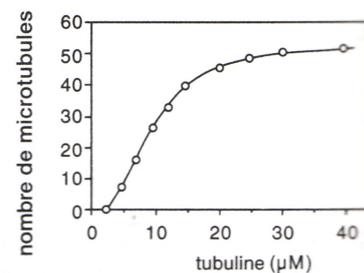
Document 2.3 : étude in vitro

On étudie in vitro l'assemblage de la tubuline en microtubule, en présence ou en absence de centrosomes, en sachant que dans une cellule animale typique la concentration en dimères de tubuline est comprise entre 5 et 15 μM .

(A) SANS CENTROSOMES



(B) AVEC CENTROSOMES



Exercice 3 : interaction entre la fibronectine et les cellules animales

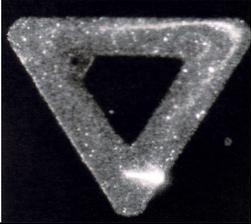
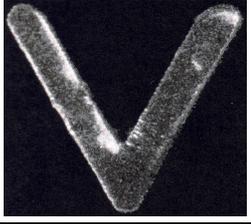
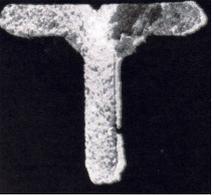
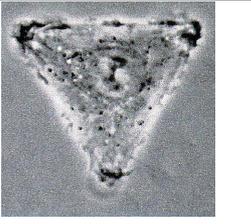
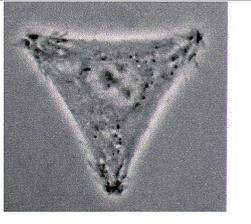
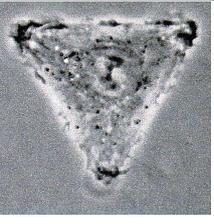
Les fibroblastes sont des cellules animales conjonctives, présentant des caractères embryonnaires (non différenciés). Dans toutes les expériences ci-dessous les fibroblastes sont au préalable préparés par un traitement doux à la trypsine, permettant de supprimer leur matrice extracellulaire et de les séparer les uns des autres.

Document 3.1 : effet de la fibronectine sur la morphologie de fibroblastes isolés

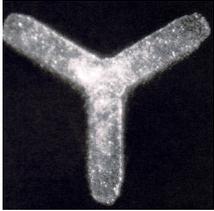
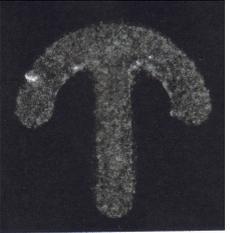
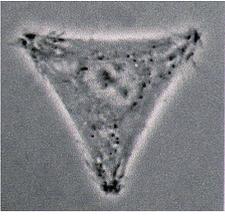
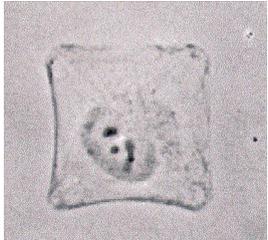
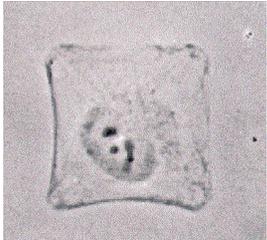
Des micro patrons géométriques de fibronectine sont collés sur une lame : les formes variées des micro patrons sont présentés dans la première ligne du tableau 2.I ci-dessous. Chaque micro patron est recouvert par un fibroblaste isolé; l'ensemble est plongé dans un milieu de culture adapté aux cellules eucaryotes.

Au bout de 2 heures, les fibroblastes posés sur les micro patrons sont observés au microscope à contraste de phase : les micrographies obtenues sont présentées dans la deuxième ligne du tableau.

Tableau 2.I

Lame uniformément recouverte de fibronectine	Micro patron en triangle	Micro patron en V	Micro patron en T
			
			

50 μm

Micro patron en Y	Micro patron en U	Micro patron en flèche	Micro patron en ombrelle
			
			

Dans tous les cas, les fibroblastes adhèrent au support expérimental.

Document 3.2 : effet de la fibronectine sur l'ultrastructure de fibroblastes isolés

Expérience 3.2.1 : disposition des microfilaments d'actine dans les fibroblastes cultivés sur micro patron de fibronectine.

Sur 4 fibroblastes cultivés pendant deux heures sur un micro patron de fibronectine, on réalise deux marquages :

- un marquage des filaments d'actine par de la phalloïdine portant un marqueur fluorescent
- un immunomarquage des molécules de vinculine grâce à des anticorps de souris, dirigés spécifiquement contre cette vinculine ; les anticorps de souris sont révélés par des anticorps fluorescents anti-anticorps de souris

Les résultats des marquages sont présentés dans le tableau 2.II ci-dessous

Tableau 2.II

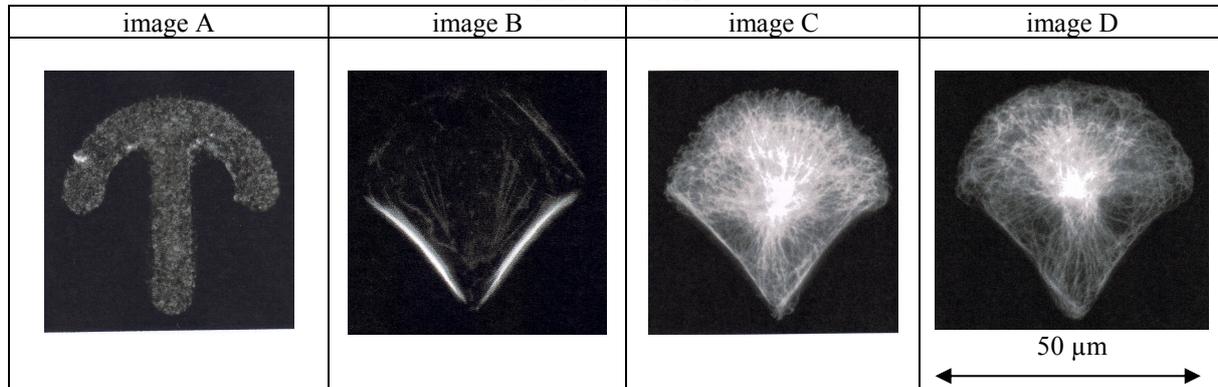
Micro patron de fibronectine	Résultat du marquage de l'actine à la phalloïdine	Résultat de l'immonu-marquage de la vinculine

Expérience 3.2.2 : cytosquelette des fibroblastes sur micro patron en ombrelle.

On réalise deux marquages sur des fibroblastes cultivés deux heures sur un micro patron de fibronectine en ombrelle (image A):

- un marquage de l'actine, par de la phalloïdine fluorescente (image B)
- un immunomarquage de la tubuline α grâce à des anticorps fluorescents dirigés spécifiquement contre cette tubuline (images C et D)

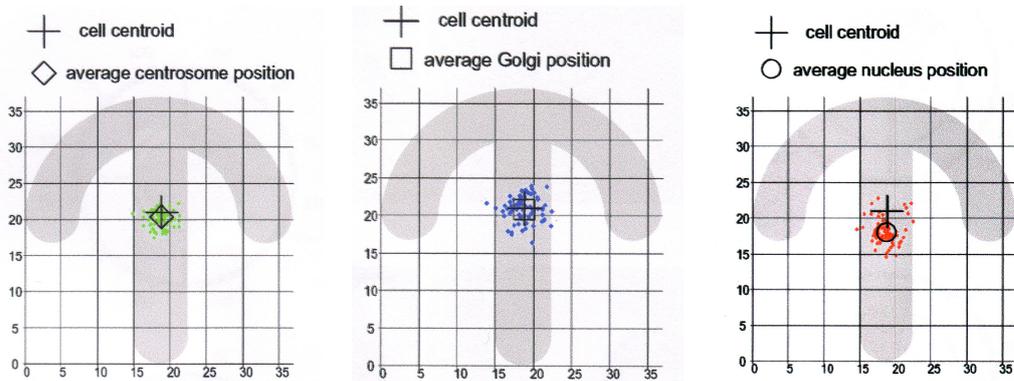
Tableau 2.III



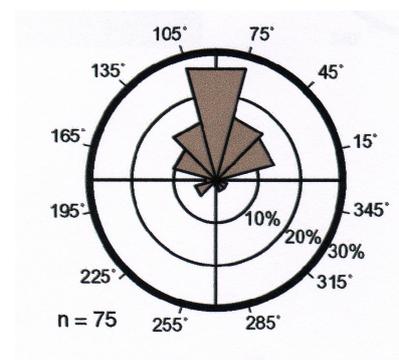
Expérience 3.2.3 : disposition de certains éléments intracellulaires dans les fibroblastes cultivés sur micro patron

On localise sur 75 fibroblastes cultivés sur micro patron en ombrelle le centrosome, le centre de l'appareil de Golgi et le centre du noyau.

Les résultats sont présentés sur des diagrammes donnant l'ensemble des mesures, le centre de la cellule (« cell centroid ») et la position moyenne de chaque élément (« average position »), sur une trame quadrillée de $5\mu\text{m}$ en $5\mu\text{m}$.



Sur les 75 fibroblastes cultivés sur micro patron en ombrelle, on mesure aussi la direction du vecteur centre du noyau – centrosome: l'histogramme circulaire ci-contre représente les proportions de vecteurs noyau – centrosome dans chaque secteur angulaire.



Document 3.3 : fibronectine et adhérence cellulaire

Des fibroblastes isolés sont séparés en 3 lots selon le milieu de culture.

- lot A : la culture a lieu dans un milieu de culture standard
- lot B : le milieu de culture est un milieu standard auquel on a ajouté des anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine membranaire : l'intégrine
- lot C : le milieu de culture est un milieu standard auquel on a ajouté une solution de peptide RGD ; RGD est un tripeptide de séquence Arginine - Glycine - Aspartate qui est identique à une séquence hautement conservée de la fibronectine

Puis ces fibroblastes sont déposés sur un support uniformément recouvert de fibronectine. On observe leur aspect au bout d'une heure de culture sur le support.

	Fibroblastes du lot A	Fibroblastes du lot B	Fibroblastes du lot C
Forme cellulaire	Plats et irréguliers	Sphériques	Sphériques
Adhérence au support	Forte	Nulle	Nulle