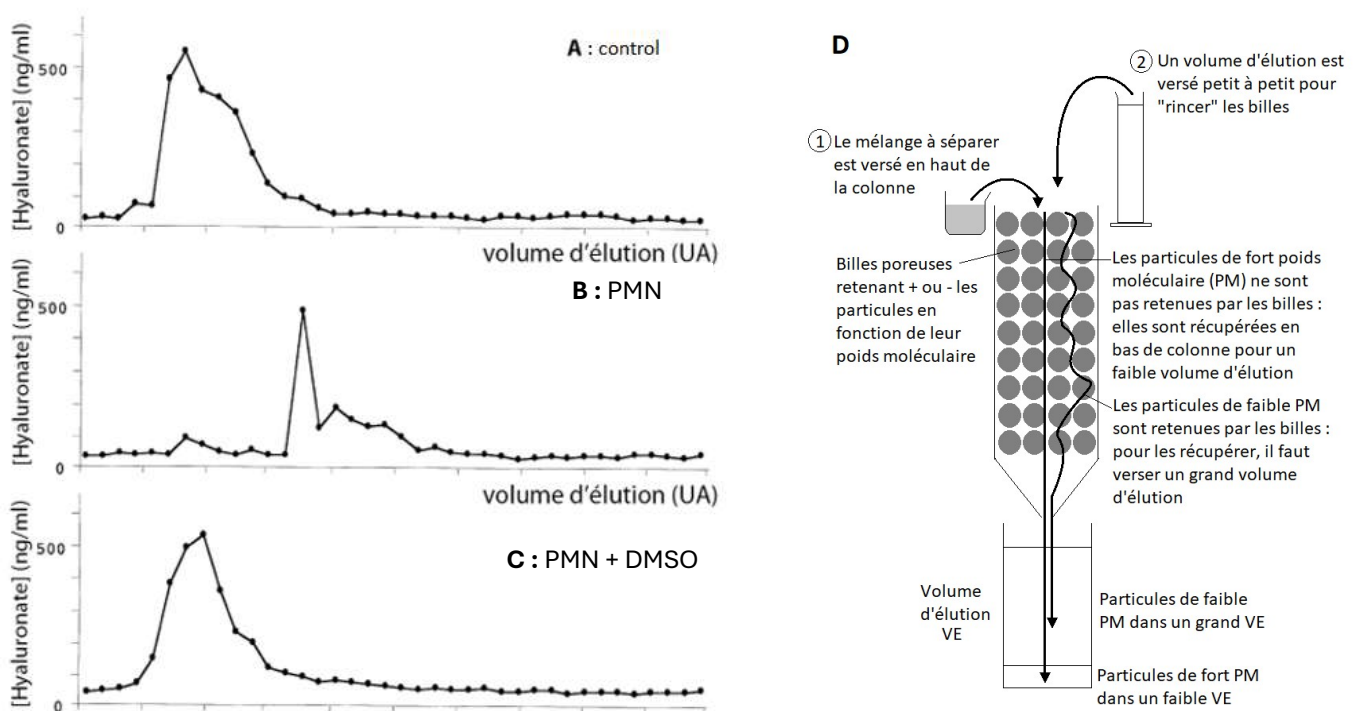


On s'intéresse ici à un mécanisme permettant la guérison d'une blessure faisant suite à une lésion cutanée (= de la peau). Les globules blancs polymorphonucléaires (**PMN**) sont des cellules du système immunitaire intervenant dans la réaction inflammatoire, notamment en produisant des espèces réactives de l'oxygène comme le composé radicalaire hydroxyle **HO•**. Expérimentalement, on peut utiliser certains composés comme le **DMSO** pour détruire le **HO•**.

Document 1 : de l'acide hyaluronique (noté **HA** pour Hyaluronic Acid, aussi appelé **hyaluronate**) est incubé en absence (A) ou en présence de **PMN** (B) ou en présence de **PMN** et de **DMSO** (C). On récupère ensuite l'acide hyaluronique, que l'on traite par chromatographie sur colonne : le mélange passe dans une colonne contenant des billes poreuses. Les molécules passent à travers ces billes plus ou moins rapidement selon leur masse moléculaire (plus la masse moléculaire est importante, plus les molécules arrivent dans des volumes d'élution faibles, voir schéma explicatif ci-dessous (D). Ce schéma explicatif n'est pas à analyser). On mesure ensuite la concentration en HA dans chaque volume d'élution.

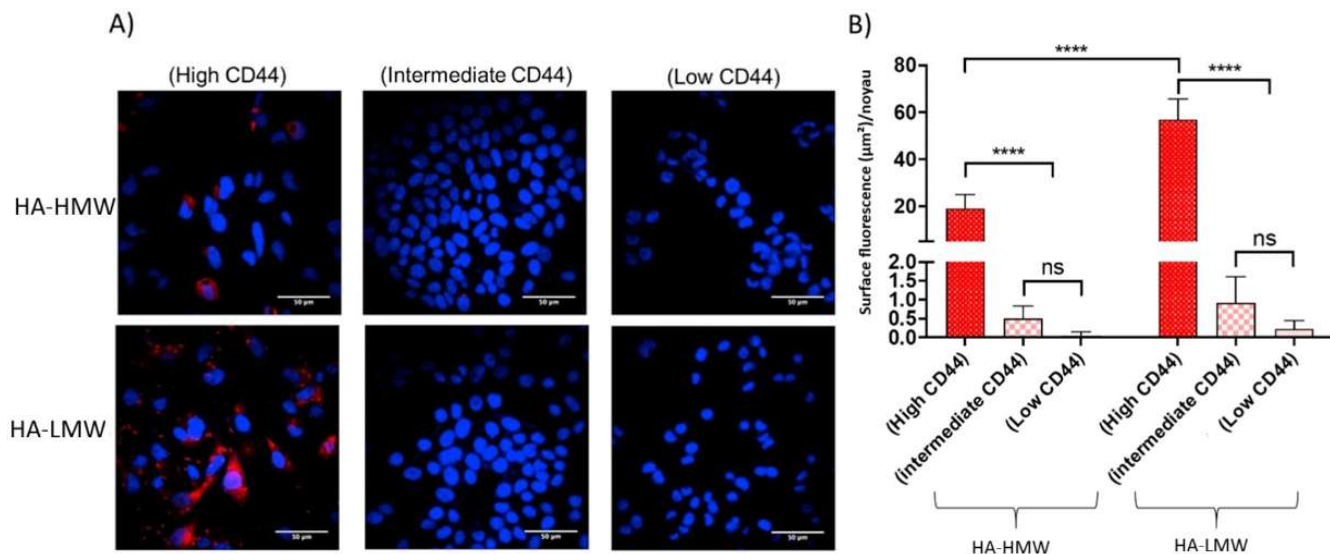


1. Rappeler la structure, la localisation et la fonction de l'acide hyaluronique.
2. Expliquer l'objectif de la manipulation effectuée dans le document 1.
3. D'après l'analyse du document 1, mettre en évidence l'une des conséquences de l'action des PMN dans une région blessée.

L'acide hyaluronique peut interagir avec les cellules alentours, notamment les fibroblastes, cellules exprimant une protéine membranaire appelée CD44.

Document 2 : des fibroblastes exprimant plus ou moins la protéine CD44 à la surface de leur membrane plasmique (« High CD44 » : expression élevée de CD44, « Intermediate CD44 » : expression moyenne de CD44, « Low CD44 » : faible expression de CD44) sont mis en culture pendant 30 minutes avec de l'acide hyaluronique de fort (HA-HMW pour « High Molecular Weight ») ou de faible masse moléculaire (HA-LMW pour « Low Molecular Weight »). Ces fibroblastes sont ensuite récupérés et rincés, afin d'ôter toute molécule non liée aux fibroblastes.

- A. Les fibroblastes sont traités avec des anticorps dirigés contre l'acide hyaluronique, émettant une fluorescence rouge. Le noyau des fibroblastes est mis en évidence en bleu par du DAPI et les fibroblastes sont observés au microscope à fluorescence (remarque : la différence de nombre de cellules n'est pas à analyser).
- B. On quantifie par ailleurs la fluorescence rouge associée au fibroblastes (mesurée en surface fluorescente rouge par noyau). Les astérisques montrent des différences significatives, ns = non significatif.



- Expliquer l'objectif du protocole effectué dans le document 2.
- Analyser le document 2 et faire le lien avec le document 1 pour mettre en évidence un lien entre lésion cutanée, acide hyaluronique et CD44.

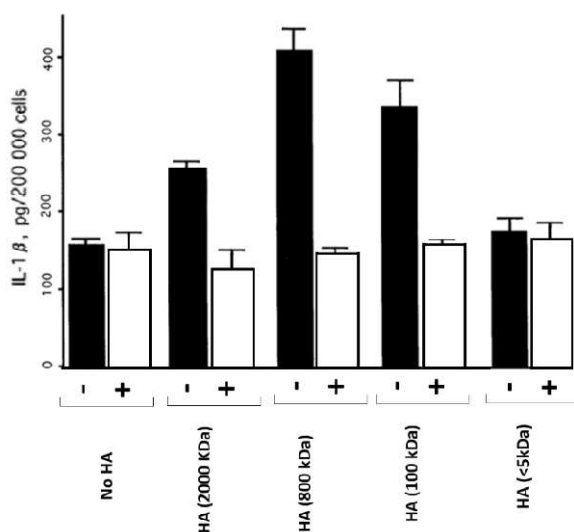
Lors d'une lésion tissulaire les fibroblastes sécrètent des cytokines (molécules solubles permettant la communication intercellulaire, impliquées notamment dans les réponses immunitaires) comme l'interleukine 1 β (IL-1 β). On s'intéresse ici aux rôles de l'acide hyaluronique dans cette sécrétion.

Document 3 : L'acide hyaluronique étant un long polymère, il est possible de le découper en petits fragments oligomériques (oligomère = polymère de taille variable) de différentes masses moléculaires par dégradation enzymatique (via l'enzyme hyaluronidase, **on précise que la masse moléculaire de l'acide hyaluronique est de 2000 kDa lorsqu'il n'est pas fragmenté**). Les fragments obtenus sont ensuite séparés en fonction de leur masse moléculaire.

Des fibroblastes sont mis en culture en absence ou présence des fragments de différentes masses moléculaires. Les masses moléculaires des fragments sont indiquées entre parenthèses en kDa. Par ailleurs, on rajoute (« + ») ou non (« - ») des anticorps anti-CD44 dans le milieu de culture.

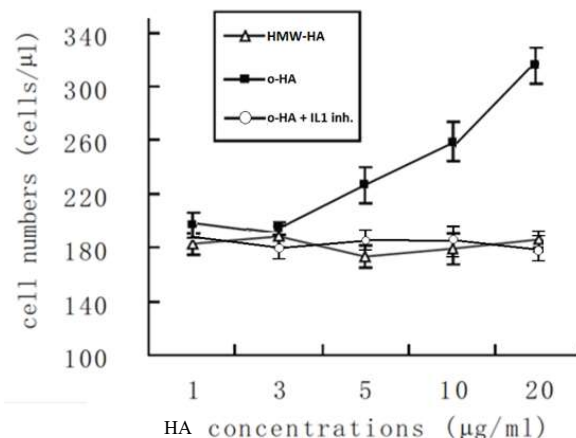
On quantifie ensuite la production d'IL-1 β par les fibroblastes après 12h de culture (en picogramme pour 200 000 cellules).

Remarque : lorsqu'une protéine est fixée à son anticorps, elle ne peut plus se fixer à d'autres molécules (la protéine est « saturée » par son anticorps).



- Analyser le document 3 pour mettre en évidence la relation entre l'acide hyaluronique et la production d'interleukine par les fibroblastes.

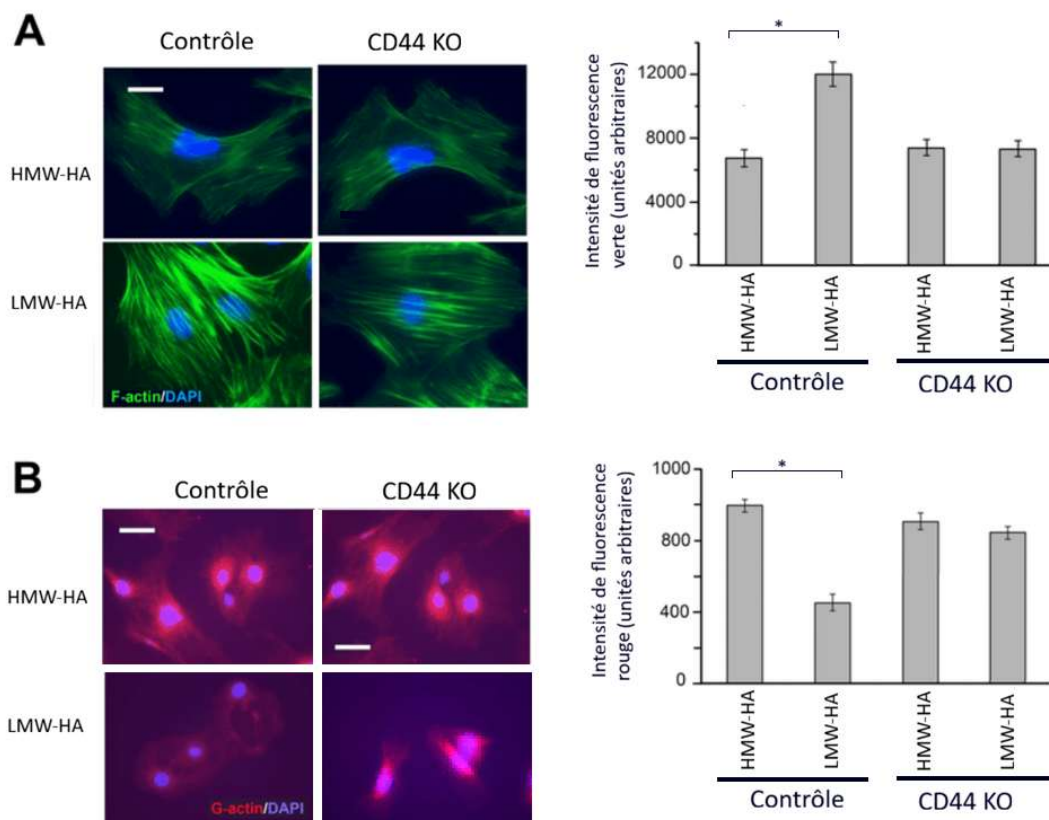
Document 4 : des fibroblastes ont été mis en cultures sur un milieu nutritif contenant des concentrations croissantes d'acide hyaluronique de grande masse moléculaire (**HMW-HA**) ou d'acide hyaluronique fragmenté en unités de plus petite taille (**o-HA pour « oligomeric hyaluronic acid »**), seul ou additionné d'un inhibiteur d'IL-1 β (**o-HA + IL1 inh.**). La quantité de cellules en culture est évaluée 48h après traitement (on précise que le nombre initial de cellules est le même pour tous les traitements).



7. Analyser le document 4. Comment la variation observée du nombre de cellules pourrait expliquer la guérison d'une lésion cutanée ?
8. En mettant en relation les documents 1 à 4, mettre en évidence un mécanisme aboutissant à la guérison d'une lésion.

Document 5 : des fibroblastes sont cultivés dans un milieu contenant de l'acide hyaluronique de forte masse moléculaire (HMW-HA) ou de faible masse moléculaire (LMW-HA). On utilise des fibroblastes sauvages (contrôle, non génétiquement modifiés) et des fibroblastes génétiquement modifié : ces fibroblastes CD44 KO n'expriment pas la protéine CD44.

- A. On marque les cellules avec des anticorps anti actine-F couplée à un fluorochrome vert, et du DAPI qui colore les noyaux en bleu. On mesure l'intensité de la fluorescence dans les différents cas. Barre d'échelle : 5μm
- B. On marque les cellules avec des anticorps anti actine-G couplée à un fluorochrome rouge et du DAPI qui colore les noyaux en bleu. On mesure l'intensité de la fluorescence dans les différents cas. Barre d'échelle : 5μm



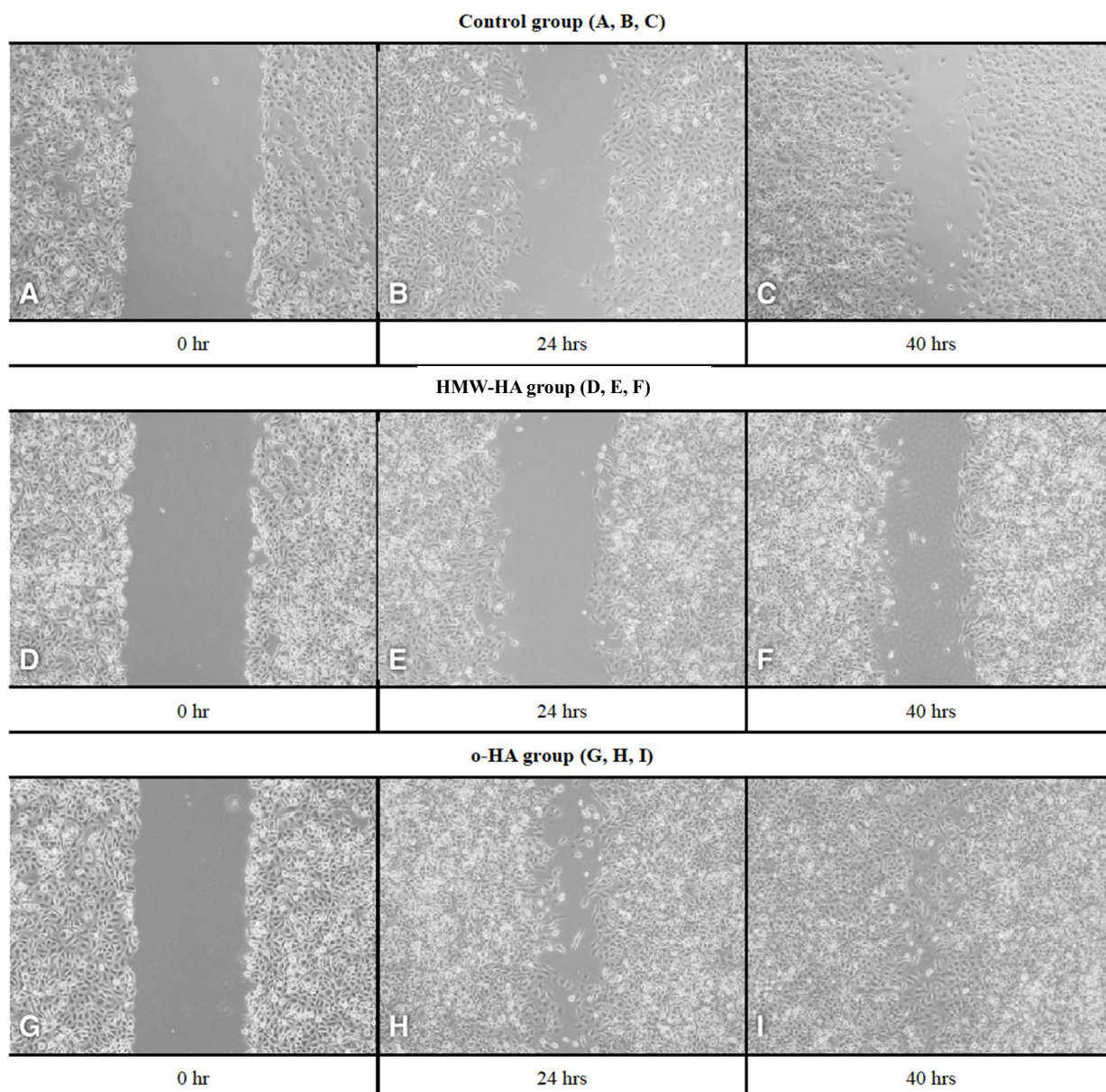
9. Expliquer à quoi correspondent l'actine G et l'actine F.

10. Analyser le document 5.

Document 6 : des fibroblastes ont été mis en cultures sur un milieu nutritif et une lésion artificielle a été simulée en créant une zone sans cellule. 3 milieux de cultures ont été produits :

- Un milieu contrôle (**control group**) (A, B, C),
- Un milieu de culture contenant de l'acide hyaluronique de grande masse moléculaire (**HMW-HA group**) (D, E, F),
- Un milieu de culture contenant de l'acide hyaluronique fragmenté en petites unités oligomériques (**o-HA group**) (G, H, I).

On étudie la **migration** des fibroblastes en suivant la fermeture de la lésion par observation microscopique des cultures à 0 heures, 24 heures et 40 heures (grossissement X100).



11. D'après l'analyse du document 6, comment l'acide hyaluronique influence la migration des fibroblastes ?

12. Mettre en relation les document 5 et 6.

13. Résumer les observations tirées des documents 1 à 6 sous la forme de votre choix.