

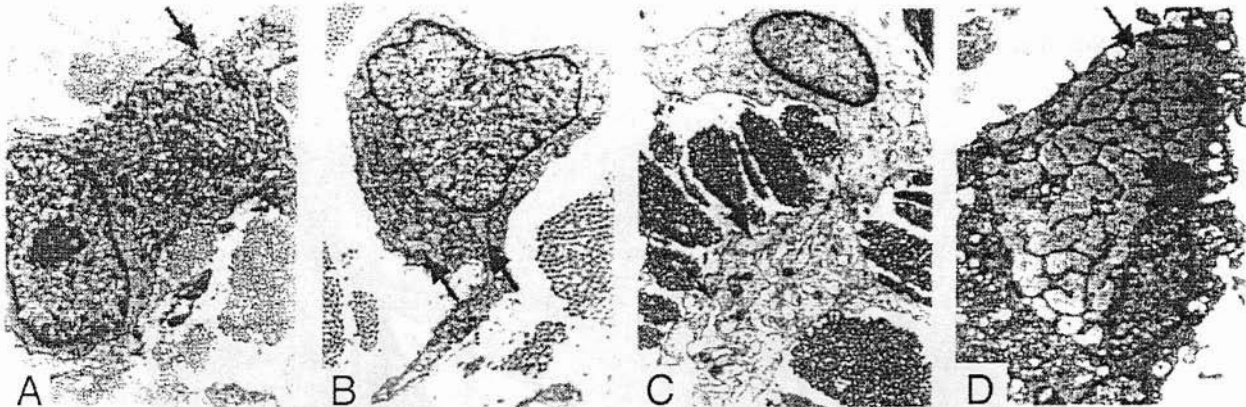
## I) Introduction

Les syndromes d'Ehlers-Danlos (SED) sont un groupe hétérogène de maladies héréditaires du tissu conjonctif ou tissu de soutien. Ils regroupent des affections génétiques rares et différentes, nommées d'après les travaux d'un danois, Ehlers, et d'un français Danlos, au début du siècle. La nouvelle classification reconnaît six formes cliniques parmi lesquelles le type vasculaire (ancien type IV) est une entité distincte. Ses critères diagnostiques majeurs sont un aspect caractéristique du visage, une peau fine translucide, une tendance marquée aux hématomes, et la survenue de complications artérielles, intestinales ou utérines engageant le pronostic vital. Une fois le diagnostic établi, l'avis d'un généticien doit être demandé et un dépistage familial entrepris. Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique de cette affection, dont le diagnostic doit être systématiquement envisagé devant une rupture artérielle, un accident vasculaire, une dissection carotidienne ou une perforation digestive du sujet jeune.

## II) Description de la pathologie vers un gène candidat pour le SED vasculaire dit de type IV

### II-1) Observations histologiques

#### A Observations cellulaires



**Légende :** Observations de fibroblastes dermiques issus de sujets sains (A, B) et SED-IV (C, D) en microscopie électronique. Les flèches noires pointent le REG (D'après Smith et *al*, 1997).

1) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez **parmi** les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

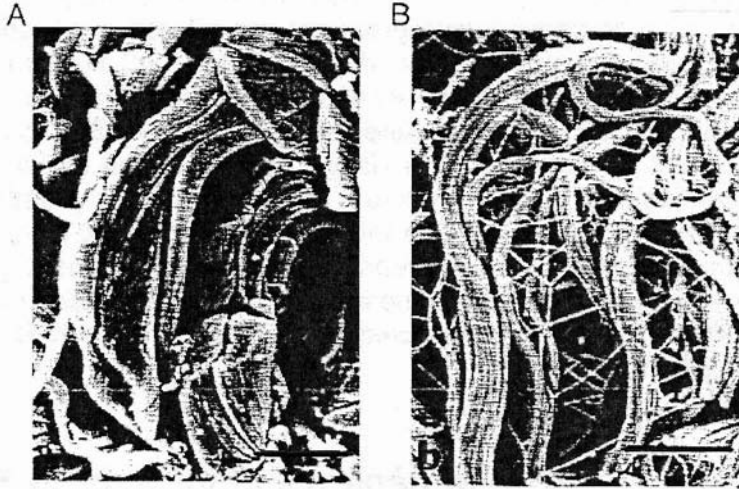
A- La population cellulaire majoritaire du derme est constituée de fibroblastes.

B- Pauvres **en** organites cytoplasmiques au repos, **le** fibroblaste **en** activité possède de nombreux organites cellulaires.

C- Les REGs ainsi que les appareils de golgi chez les sujets sains et SED-IV présentent les mêmes morphologies.

D- L'observation de ces cellules témoignent d'une grande activité de synthèse.

**B Analyse de la Matrice Extra-Cellulaire**

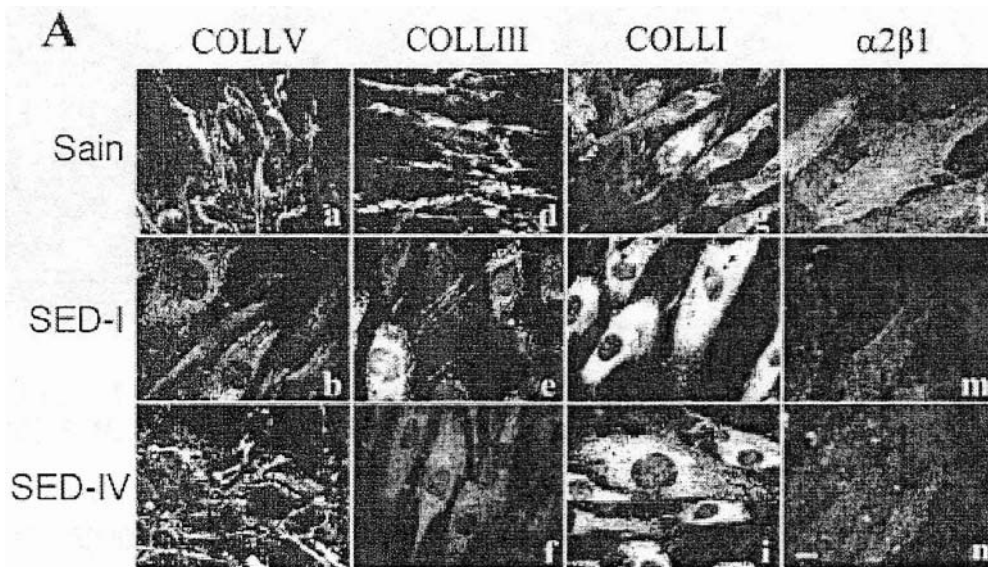


Légende : Observations de matrices extracellulaires issues de sujets sain (A) et SED-IV (b) en microscopie électronique. (D'après Smith et al, 1997).

2) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez, parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

- A- Les fibres majoritaires de la MEC appartiennent à la famille du collagène.
- B- La MEC est dense et organisée chez les patients SED-IV.
- C- Chez le patient SED, on observe beaucoup de fibres fines élastiques collatérales.
- D- Les faisceaux de collagène apparaissent épars et irréguliers en diamètres. Ils donnent un aspect diffus à la MEC.

II-2) Observations biochimiques = immunohistochimie



on peut tracer des infos sans qu'on se rende compte et quantifier

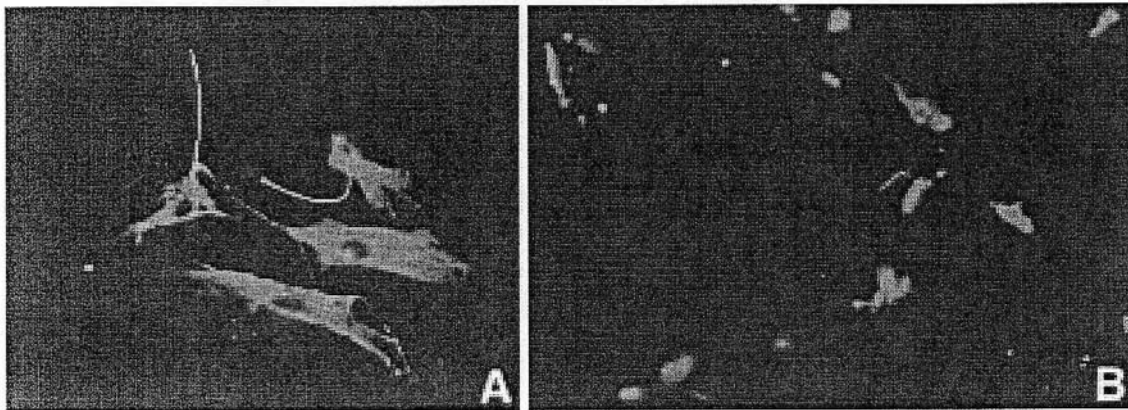
Sujet	COL1V	COL1III
	IOD	IOD
Sain	12±4 [out]	10±2 [out]
SED-I	6±3 [in]	7±1 [90% in, 10%out]
SKD-IV	9±4 [out]	1±0.1 [in]

**Légende :** Organisation des collagènes de type V, III, I et des intégrines  $\alpha 2\beta 1$  sur des cultures de fibroblastes dermiques de sujets sain ou SED de type I ou IV. Les cellules ont été cultivées à confluence et ont été marquées avec des sérums polyclonaux anti-collagène V, III, I et intégrine. A) Observations par épifluorescence. B) Evaluations quantitatives par analyse d'image (IOD : *integrated optical density*) (D'après Zoppi et al, 2004).

3) A partir de ces données, indiquez parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

- A- Les niveaux d'expression des intégrines sont altérés dans les syndromes SED-I/IV.
- B- Les fibroblastes de SED-I et IV organisent aussi mal leurs fibres de collagène V dans leur matrice extra-cellulaire respective.
- C- Les fibroblastes de SED-I et IV expriment beaucoup d'ARNm pour le collagène de type I.
- D- Les fibroblastes de SED-IV présentent une baisse de production nette de collagène de type III, associée à une séquestration intracellulaire.

C



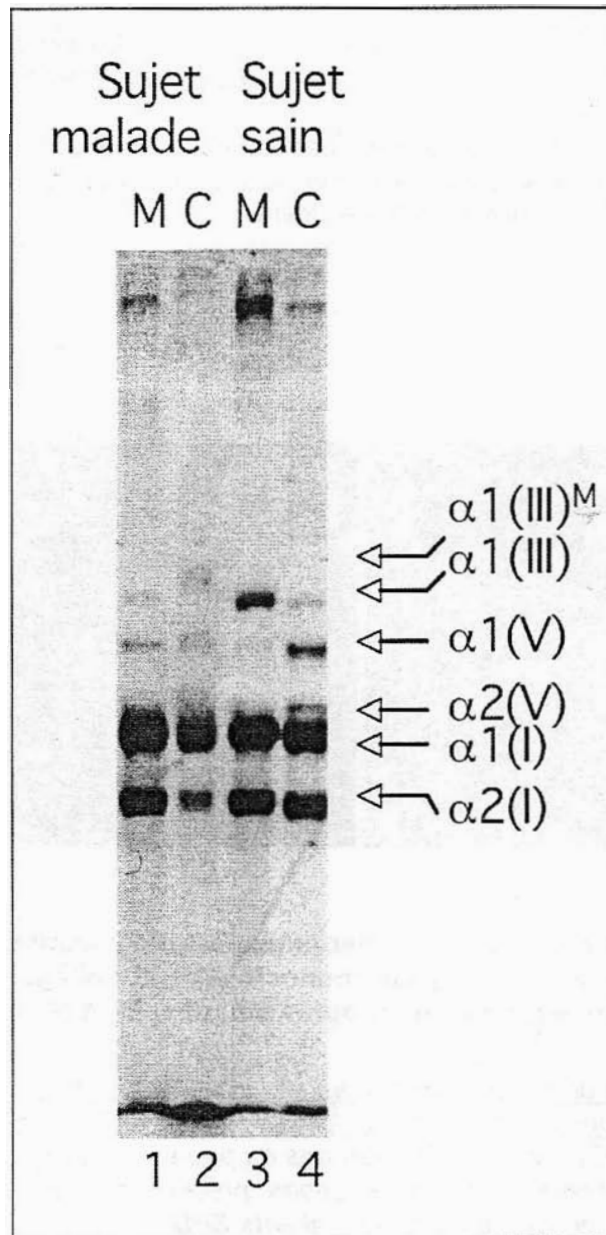
**Légende :** Observation de fibroblastes dermiques issus de patients sains (A) et SED-IV (B) ayant été marqués avec un sérum monoclonal anti-collagène III distinct de ceux utilisés dans la première expérience. (D'après Mitsuhashi et al, 2004).

4) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

- A- Les fibroblastes de SED-IV ne produisent pas ou peu de collagène de type I.
- B- Cette expérience confirme les observations précédentes qui montrent l'absence de production de collagène de type III chez les patients SED-IV.
- C- Cette expérience n'apporte scientifiquement rien de plus.
- D- Cette expérience est complémentaire des expériences précédentes par la nature du sérum utilisé.

## D

Le collagène de type III est un collagène fibrillaire, or tous les collagènes fibrillaires sont constitués d'homodimères ou hétérodimères formés par l'association de 3 monomères ou chaînes  $\alpha$ . Le collagène de type III est un homotrimère de 3 chaînes  $\alpha 1(III)$  codées par le gène COL3A1.



5) A partir de ces données, indiquez **parmi** les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

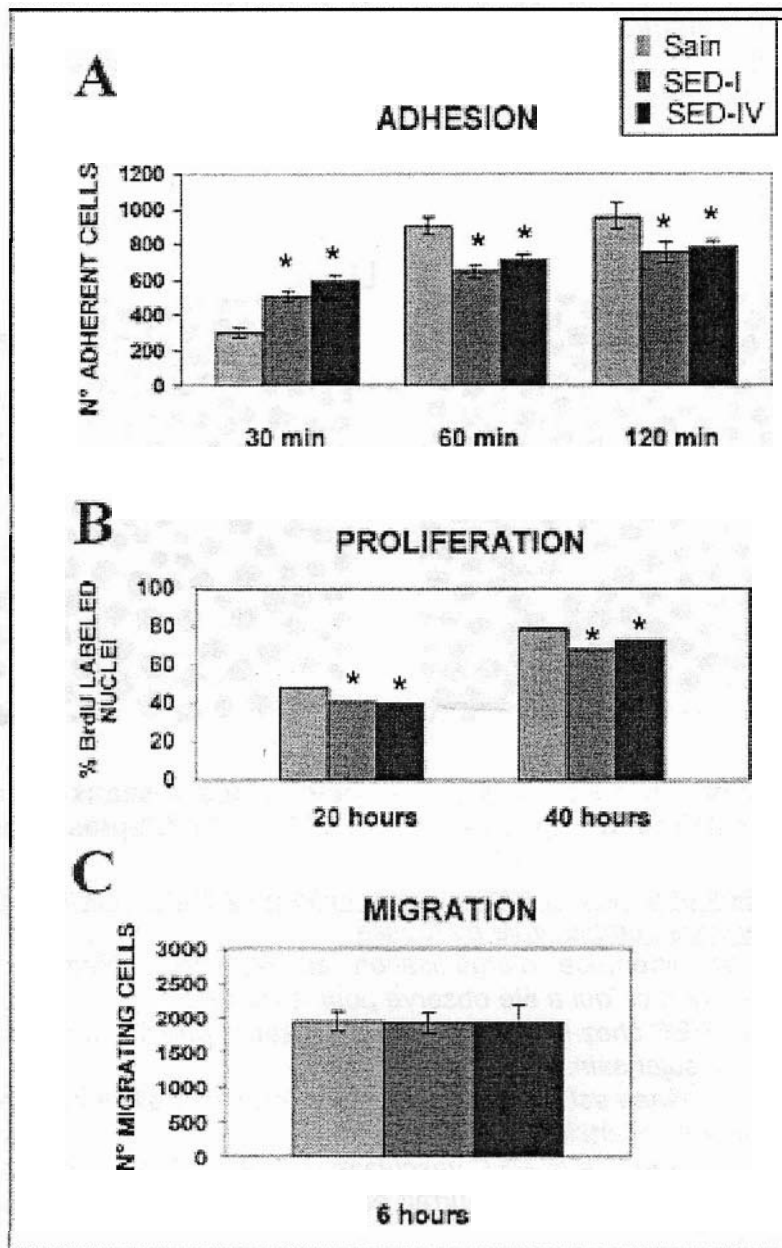
A- Le mode de marquage du gel d'électrophorèse utilisé pour ce protocole permet l'observation exclusive du collagène de type III.

B- Un défaut de synthèse mais pas de sécrétion est observé chez le sujet SED-IV pour le collagène de type III.

C- Le taux d'ARNm codant pour le collagène  $\alpha 1(I)$  est constant.

D- Seule la fraction collagène III est altérée chez le patient SED-IV.

11-3) Tests *in vitro*



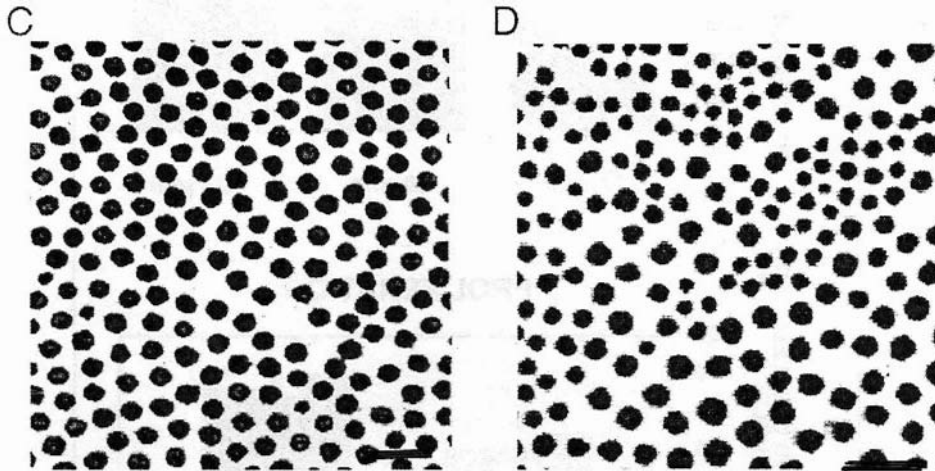
Légende : Expériences *in vitro* sur des fibroblastes dermiques en culture issus de sujets sains, SED-I ou SED-IV (D'après Zoppi et al, 2004).

- 6) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez, parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :
- A- A 30 minutes, les fibroblastes sains adhèrent plus vite que les cellules pathologiques.
  - B- Les modifications de synthèse et de sécrétion du collagène de type III perturbent les constantes d'adhésion et de prolifération des cellules.
  - C- La migration n'est pas altérée chez les fibroblastes de sujets SED-I et IV.
  - D- Il est surprenant que les fibroblastes SED ne migrent pas moins que les cellules saines.

*II-4) Observations au niveau vasculaire*

Des échantillons de vaisseaux sanguins issus d'interventions chirurgicales ont montré que les cellules **musculaires** lisses, qui participent de manière active à l'élaboration d'une MEC spécifique des vaisseaux, et **les cellules endothéliales** présentaient des morphologies normales avec des réticulums normaux. Seuls les fibroblastes présentent des REGs dilatés comme cela a été observé précédemment dans le **derme**.

**B**



**Légende :** Observation en microscopie électronique des réseaux de collagènes au sein des parois vasculaires de sujets sain (C) et SED-IV (D) (D'après Pope et al, 1997).

7) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :

A- Il n'existe pas de différence d'organisation au sein des matrices extracellulaires vasculaires contrairement à ce qui a été observé pour le derme.

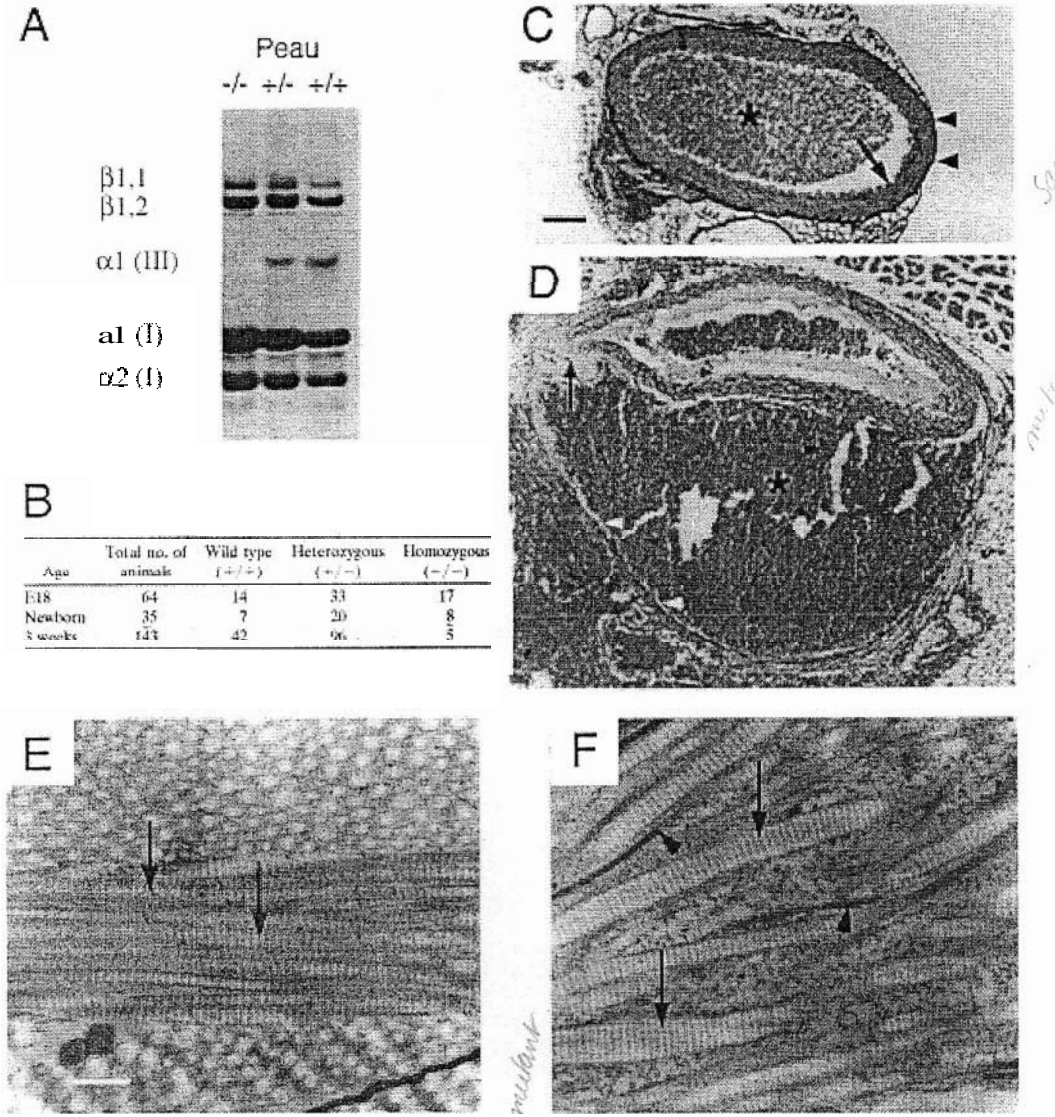
B- L'organisation de la MEC chez le patient SED-IV présente une diminution de la densité de fibres versus la MEC de sujet sain.

C- L'organisation de ce réseau est anormale avec des fibres de collagène variables pour leur diamètre comme pour leur répartition spatiale.

D- Cette observation suggère **que** la MEC vasculaire de patient SED-IV pourrait présenter un manque d'intégrité et de cohésion qui pourrait **être** la cause des complications vasculaires décrites chez ces malades.

### III) Le COL3A1 : vers une relation génotype/phénotype

#### Les modèle animaux



**Légende :** A) Caractérisation par électrophorèse SDS-Page d'un modèle de souris transgénique présentant un Knock-out du gène COL3A1 à partir d'extrait de peau. B) Evaluation de la survie des animaux transgéniques en fonction de leurs génotypes. C/D) Coloration au trichrome de Masson de coupes d'aorte d'animal sauvage (C) ou mutant (D). E/F) Observations au microscope électronique à transmission des réseaux de collagène issus d'aorte d'animaux sauvage (E) et mutant (F) (D'après Liu et al, 1997).

- 8) A partir de ces données et de vos connaissances, indiquez parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse :
- A- La mortalité est accrue a 3 semaines chez les animaux homozygotes.
  - B- L'ADNc codant pour le collagène de type III est indétectable chez les mutants homozygotes.
  - C- Les étoiles noires signalent des globules rouges.
  - D- On note la présence d'un anévrisme aortique important chez l'animal mutant.
  - E- Les modifications observées rappellent les altérations décrites précédemment pour la MEC dermique de sujet SED-IV.

181

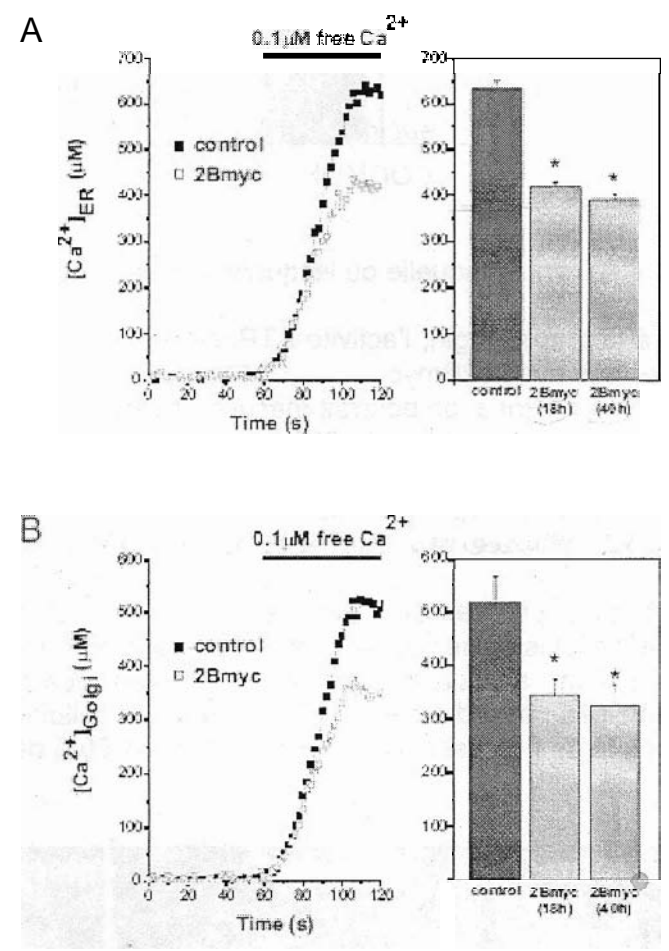
0,15€

# ED de Biologie Cellulaire N°6

Dr Gilles Lambert

## Semaine du 20 au 24 mars 2006

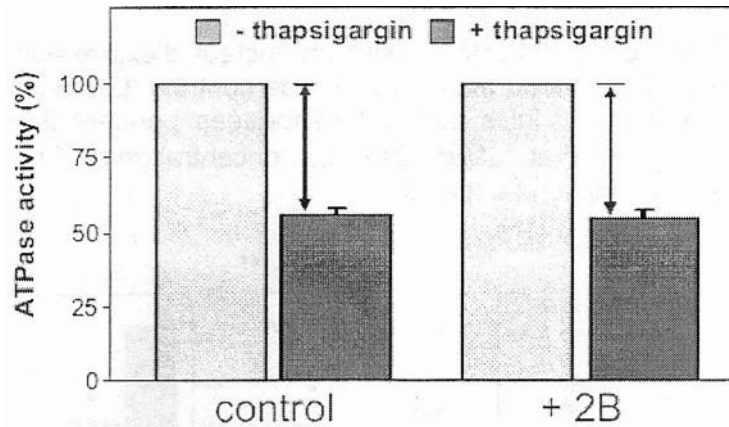
Des cellules BGM ont été transfectées avec un vecteur d'expression codant pour la protéine de fusion p2B-myc (myc=épitope) ou avec un plasmide contrôle. Les organites cellulaires sont d'abord déplétés en  $Ca^{2+}$  puis les cellules sont perméabilisées pendant 2 min avec de la saponine et perfusées avec 2.5mM d'ATP et 1 $\mu$ M de  $Ca^{2+}$ . La concentration en  $Ca^{2+}$  dans le RE et dans le golgi est ensuite mesurée en fonction du temps.



01) Parmi les propositions suivantes laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse

- A- La protéine p2B est vraisemblablement un canal ionique
- B- La saponine perméabilise la membrane plasmique mais pas la membrane du RE
- C- Dans cette expérience l'ATP est vraisemblablement hydrolysé en ADP+Pi par les cellules BGM
- D- p2B module l'homéostasie calcique du golgi et du RE
- E- En moyenne, il y a plus de  $Ca^{2+}$  dans le RE que dans le golgi dans les cellules contrôles mais pas dans les cellules transfectées avec p2B-myc

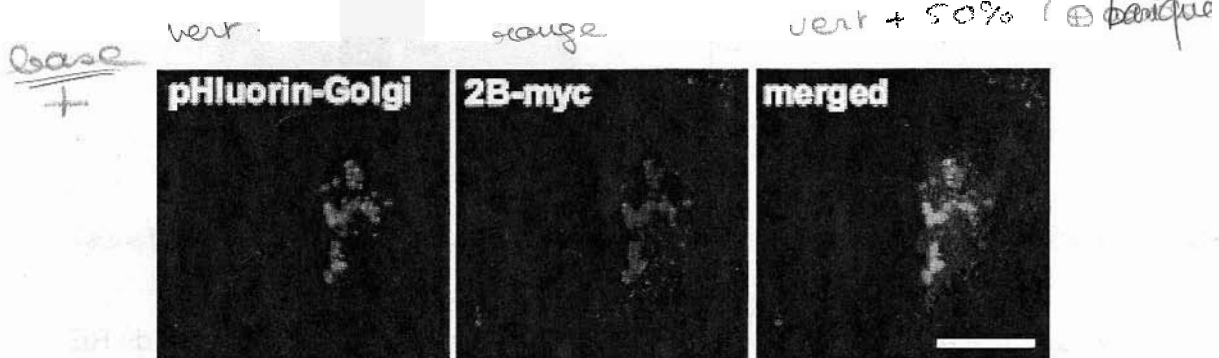
La thapsigargin est un inhibiteur spécifique de SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase). Les cellules transfectées ou non avec le vecteur d'expression p2Bmyc sont ensuite lysées et l'activité ATPase intracellulaire mesurée. (les différences sont significatives entre -thap et +thap)



02) Parmi les propositions suivantes laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse

- A- Avant traitement à la thapsigargin, l'activité ATPase des cellules est identique dans les controls et les cellules transfectées avec p2Bmyc
- B- Pour mesurer l'activité ATPase, on pourrait mesurer l'hydrolyse d'un traceur ATP radiomarqué.
- C- La protéine p2B n'inhibe pas l'activité de SERCA
- D- Le traitement à la thapsigargin permet une diminution de la  $[Ca^{2+}]$  dans le RE
- E- SERCA est une protéine transmembranaire
- C- SERCA possède plusieurs hélices  $\alpha$  amphiphiles

Une protéine chimère dont la fluorescence (vert) est sensible au pH (le signal diminue avec l'acidité) et dont l'expression est exclusivement golgienne est co-transfectée avec p2Bmyc. l'épitope myc est détecté au moyen d'un anticorps fluorescent (rouge). La colocalisation (merging) des fluorescences est réalisée par ordinateur. Par rapport à des cellules transfectées uniquement avec pHluorin-Golgi, l'intensité de fluorescence verte augmente de 50% dans les cellules co-transfectées.



03) Parmi les propositions suivantes laquelle ou lesquelles vous semble vraie ou fausse

- A- p2B est une protéine golgienne
- B- L'expression de p2B augmente le pH golgien
- C- L'acidification du golgi résulte vraisemblablement de l'activité d'une pompe à protons consommant de l'ATP.
- D- l'expression de p2B inhibe directement l'activité d'une pompe à protons.
- E- p2B pourrait inhiber le transport protéique dans le golgi

ANNALES  
QIM de 2005

1. Parmi les propositions suivantes concernant les cyclines, laquelle ou lesquelles sont **vraies** :
  - A. Elles sont en concentration variable selon les étapes du cycle cellulaire.
  - B. Elles sont synthétisées à différents moments du cycle cellulaire.
  - C. Elles s'accumulent progressivement dans la cellule.
  - D. Elles sont dégradées de façon brutale par le système ubiquitine-protéasome.
  - E. Elles utilisent le GTP comme source d'énergie.
  
2. Parmi les propositions suivantes concernant les protéines destinées à entrer dans le reticulum endoplasmique, laquelle ou lesquelles sont **vraies** :
  - A. Ces protéines sont transportées à travers la membrane une fois leur synthèse terminée.
  - B. Ces protéines sont synthétisées dans des ribosomes libres dans le cytosol.
  - C. Elles commencent à traverser la membrane en même temps qu'elles sont synthétisées.
  - D. Elles traversent la membrane en forme repliée.
  - E. Elles restent toutes dans le reticulum endoplasmique.