Banque Agro-Véto
A - 0114

BIOLOGIE
Epreuve B
Durée : 3 heures 30 minutes

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.
Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.

Les tissus minéralisés

- **Le sujet comprend trois thèmes** qui peuvent être **traités indépendamment**.
- Pour chaque thème, **vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances.**
- **Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générale**.
- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités**.
- Le plan devra faire apparaitre explicitement **les titres des thèmes abordés** ainsi que les **numéros des documents étudiés**.
- **Dans les thèmes 1 et 2, un schéma récapitulatif vous est demandé**.

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'erreur standard à la moyenne (ou écart standard). Dans certains documents, les valeurs statistiquement différentes sont repérées par un astérisque. Lorsque ce n'est pas le cas, on admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

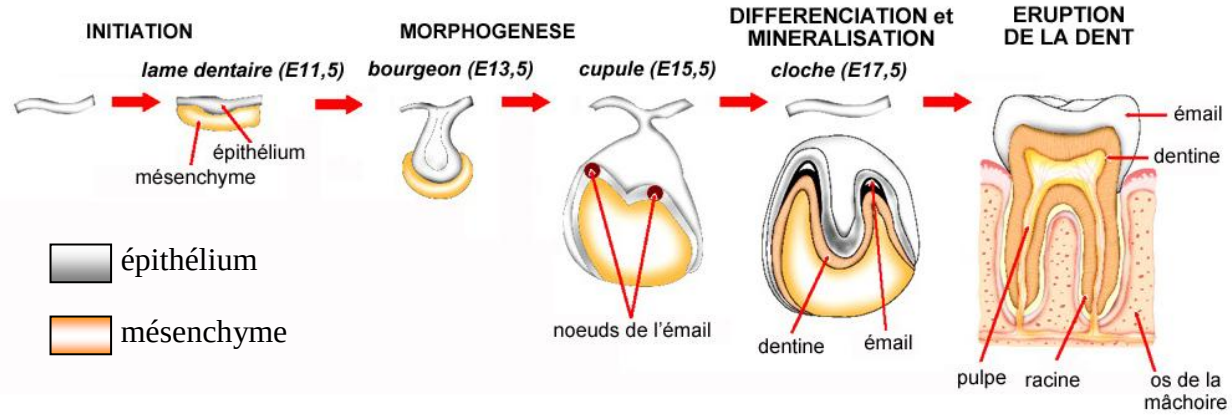
Thème 1 : Et si les poules avaient des dents

Les dents sont des organes minéralisés et durs implantés dans la muqueuse buccale. Les vertébrés forment un clade d'animaux pourvus de dents. Or, les oiseaux sont des vertébrés tétrapodes dont les espèces actuelles sont dépourvues de denture. Les recherches en biologie du développement ont conduit à comprendre certains mécanismes à l'origine de l'absence des dents chez les espèces actuelles d'oiseaux.

Le thème est organisé en deux parties. La première partie cherche à établir quelques uns des mécanismes impliqués dans la formation des dents chez la souris. La seconde partie conduit à formuler des hypothèses expliquant de l'absence de dents chez la poule.

Annexe : La formation de la dent ou odontogenèse (modèle mammifères)
Ces données n'ont pas à être étudiées pour elles-mêmes.

Deux groupes de cellules de la cavité buccale participent à la formation des dents ou **odontogenèse** : des **cellules épithéliales d'origine ectodermique** d'une part et des **cellules mésenchymateuses issues des crêtes neurales** d'autre part.



Etapes de l'odontogenèse chez la souris (modifié d'après Thesleff I., *J. Cell Science*, 2003)
Les différents stades sont indiqués au dessus des schémas de l'évolution dentaire.

- **Initiation** : les interactions entre épithélium ectodermique et mésenchyme conduisent à la formation d'un épaississement ou **lame dentaire**.
- **Morphogenèse** : la lame dentaire s'invagine, formant un **bourgeon** dentaire puis une **cupule**. Sous cette cupule de cellules épithéliales, le mésenchyme se condense préfigurant la **pulpe**. A terme, la cupule épithéliale aboutit à la formation de **l'émail**.
- **Différenciation et minéralisation** : le bourgeon mésenchymateux forme la **dentine** (ivoire) et la **racine** par la prolifération de ses cellules, les odontoblastes.

Dans tout le texte qui suit, les stades de développement embryonnaires sont mentionnés en nombre de jours à partir de la fécondation. Ils sont notés de la façon suivante entre parenthèses : (EXX) = XX jours à partir de la fécondation

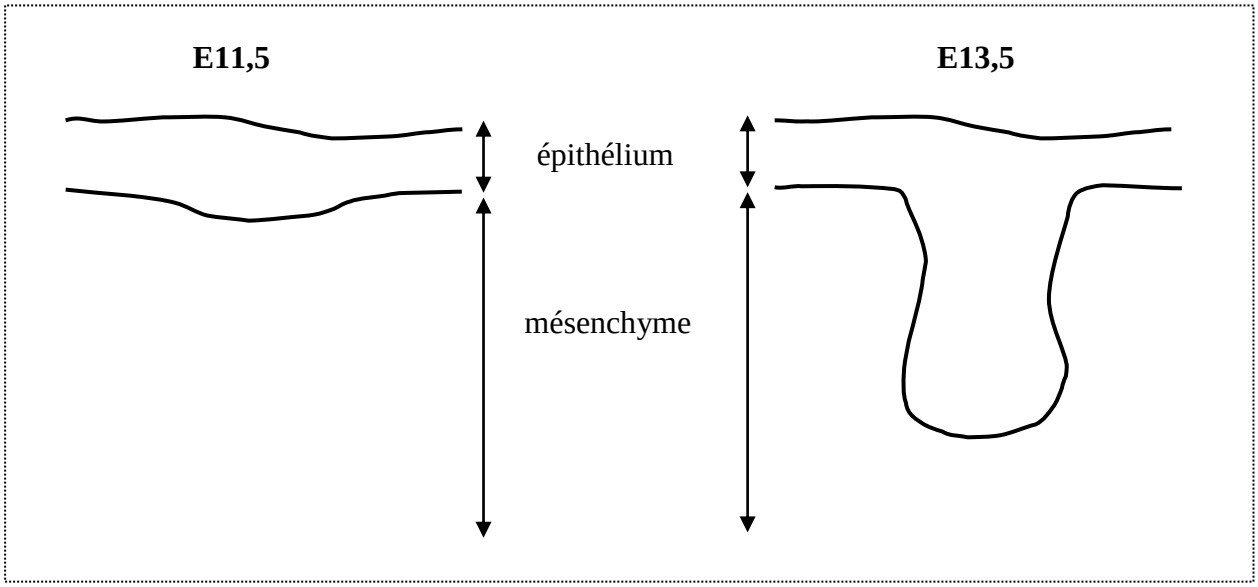
Les durées globales de développement embryonnaire des espèces étudiées sont les suivantes :

- *Souris : 19 jours à 37°C*
- *Poule : 21 jours à 38°C*

Première partie : Etude de quelques interactions moléculaires impliquées dans le développement dentaire chez la souris

La souris est un animal modèle pour lequel le programme moléculaire de développement des dents est actuellement bien décrit.

A partir des documents proposés, élaborez un modèle simple des interactions ayant lieu au début du programme de développement dentaire. Les conclusions seront résumées par un schéma-bilan en utilisant le canevas ci-dessous à compléter et à coller dans la copie.

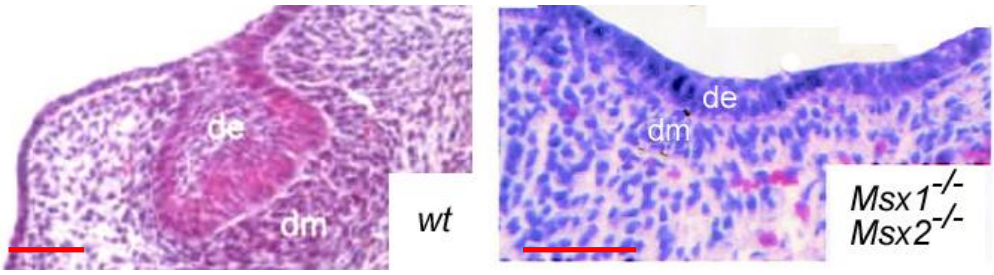


Document 1-1 : Analyse phénotypique de cavités buccales de souris sauvages et mutantes pour les gènes *Msx*

Les gènes *Msx1* et *Msx2* codent des facteurs de transcription. Ils sont exprimés **dans le mésenchyme dentaire dès le stade initiation** et **pendant toute la morphogenèse**.

Des coupes sagittales de mâchoires inférieures d'embryons de souris (**E14,5 : stade de morphogenèse**) sont réalisées et colorées à l'hématoxyline-éosine (coloration du noyau en bleu-noir, coloration du cytoplasme et de la matrice extracellulaire en rose pâle). Les embryons sont issus :

- de souris sauvages : ***wt***
- de souris doubles mutantes pour les gènes *Msx* : ***Msx1*$^{-/-}$ *Msx2*$^{-/-}$** dont les gènes *Msx1* et *Msx2* sont tous les deux inactivés.



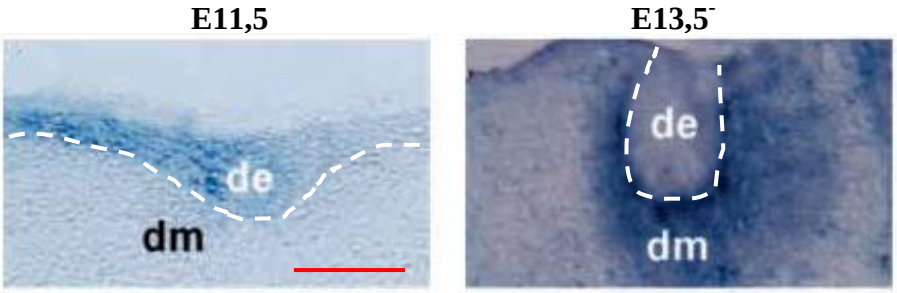
de : épithélium dentaire *dm : mésenchyme dentaire*
barre échelle (rouge) : 100 µm

Document 1-2 : Interactions entre facteurs moléculaires au cours de l'initiation et de la morphogenèse dentaires

Le gène *Bmp4* est exprimé dans la cavité buccale au cours du développement dentaire. Il code une protéine à rôle de messager paracrine au sein de l'embryon.

Document 1-2.A : Patron d'expression du gène Bmp4 du stade initiation au stade morphogenèse dentaire

Le patron d'expression du gène *Bmp4* a été analysé par hybridation *in situ* sur des sections sagittales de mâchoire inférieure de souris à deux stades : **E11,5 (initiation dentaire) et E13,5 (morphogenèse dentaire)**. La sonde s'hybridant spécifiquement à l'ARNm codant *Bmp4* est couplée à une enzyme catalysant la formation d'un produit bleu.

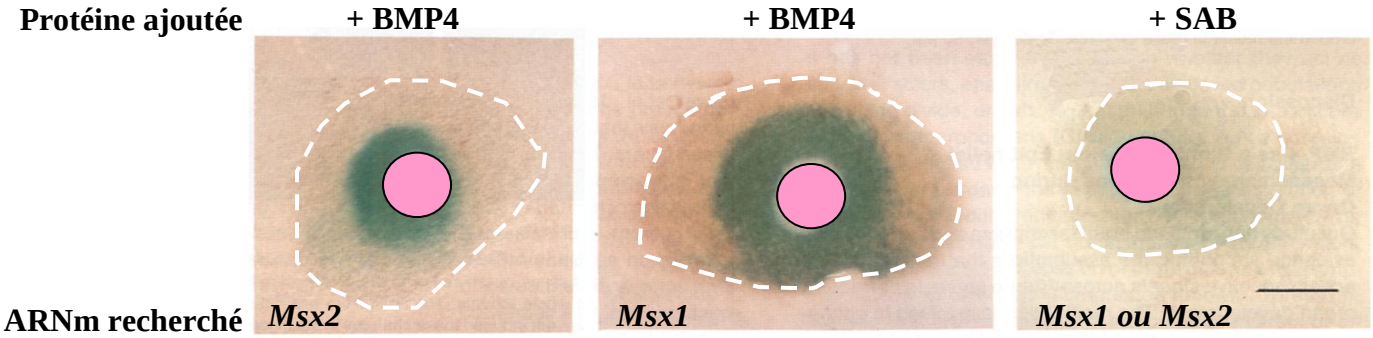


de : épithélium dentaire
dm : mésenchyme dentaire
ligne blanche : position de la lame basale séparant l'épithélium du mésenchyme
barre échelle (pour tous les clichés) : 100 µm

Document 1-2.B : Interaction entre le facteur BMP4 et les gènes Msx au stade initiation dentaire

Des fragments de mésenchyme de mâchoire d'embryon de souris sauvage sont prélevés à **E11,5 (initiation dentaire)**. Ces fragments sont associés à une bille recouverte d'une protéine diffusible puis cultivés pendant 24 h. La protéine est soit BMP4 soit SAB (protéine n'ayant aucun rôle connu dans le développement embryonnaire).

Les fragments sont ensuite fixés et des hybridations *in situ* sont réalisées avec des sondes spécifiques des ARNm codés par les gènes *Msx1* ou *Msx2*. La sonde est couplée à une enzyme catalysant la formation d'un produit bleu-vert.

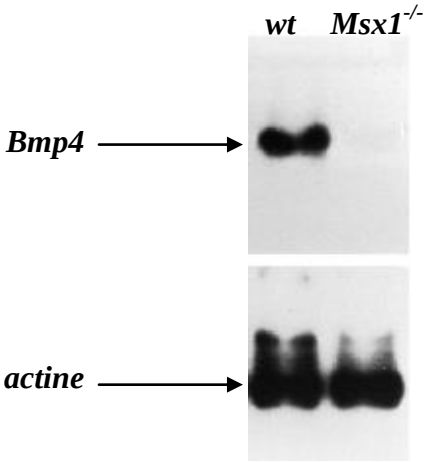


Point rose : emplacement de la bille délivrant la protéine diffusible (BMP4 ou SAB)
Trait en pointillé : limite du fragment de mésenchyme
Barre d'échelle (pour tous les clichés) : 100 µm

Document 1-2.C : Interactions entre le facteur BMP4 et le gène* Msx1 *au stade morphogenèse dentaire

Le patron d'expression du gène *Bmp4* a été analysé par northern-blot à partir d'ARN extraits de fragments de mésenchyme dentaire de souris au **stade E13,5 (morphogenèse dentaire)**. La sonde s'hybridant spécifiquement à l'ARNm codant *Bmp4* contient des nucléotides radioactifs permettant une révélation par autoradiographie. En parallèle, les mêmes ARNm sont hybridés avec une sonde spécifique de l'actine.

L'analyse est réalisée sur des sections provenant de souris sauvages (**wt**) et de souris ***Msx1***$^{-/-}$ pour lesquelles le gène *Msx1* a été inactivé.



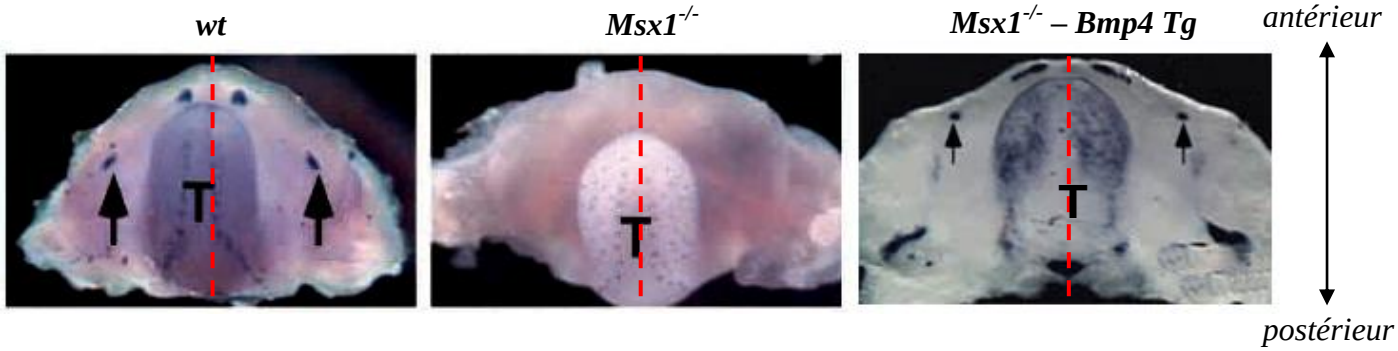
Document 1-3 : Expression de *Sonic hedgehog* lors du développement dentaire

Le gène *Sonic hedgehog* (*Shh*) est exprimé dans **les territoires épithéliaux** formant des dents chez la plupart des vertébrés. La protéine Shh est un messager paracrine.

Le patron d'expression du gène *Shh* a été analysé par hybridation *in situ* sur des mâchoires de souris au **stade E13,5 (morphogenèse dentaire)**. La sonde s'hybridant spécifiquement à l'ARNm *Shh* est couplée à une enzyme catalysant la formation d'un produit violet.

L'analyse est réalisée sur des mâchoires inférieures provenant

- de souris sauvages : ***wt*** ;
- de souris ***Msx1***$^{-/-}$ dont le gène *Msx1* est inactivé ;
- de souris ***Msx1***$^{-/-}$ **– *Bmp4 Tg*** : le gène *Msx1* est inactivé et la séquence codante du gène *Bmp4* est mise sous le contrôle du promoteur du gène *Msx1*. On vérifie que les tissus de cette souris surexpriment le gène *Bmp4*, notamment dans les zones de développement dentaire.



Les clichés sont pris à la même échelle.
La mâchoire inférieure est vue de dessus. *T : langue*
La ligne rouge en tirets marque le plan de symétrie bilatérale.
Flèches : zone de formation des molaires

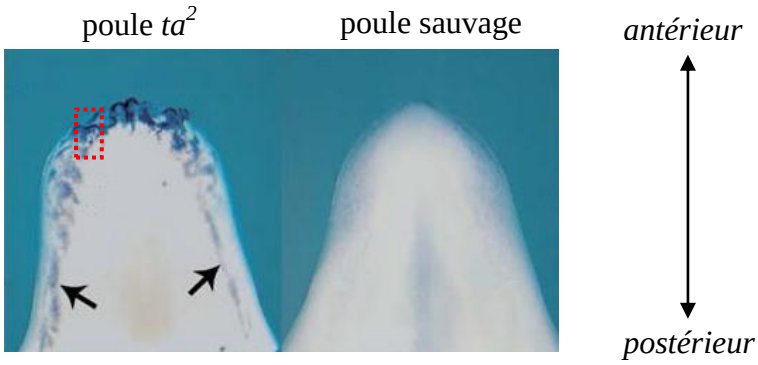
Seconde partie : Etude des potentialités odontogéniques de la poule

Dans cette seconde partie, on cherche à comprendre les mécanismes du développement dentaire éventuellement altérés chez l'embryon de poule. Le développement des dents chez la souris sert de référence pour étudier l'évolution de la cavité buccale de l'embryon de poule.

Analysez les documents afin de proposer des explications à l'absence de dents chez les oiseaux actuels.

Document 1-4 : Développement de dents chez les embryons de poule mutants *talpid*^{2}

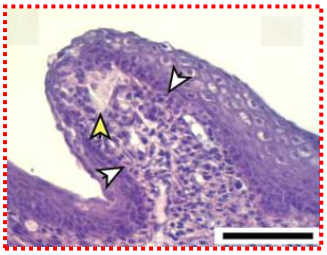
Chez la poule, la mutation naturelle *talpid*^{2} (*ta*^{2}) affecte le développement de nombreuses structures telles que les membres ou la face. La mutation *ta*^{2} provoque une **activation constitutive** (gain de fonction) de la voie de signalisation du facteur paracrine Sonic hedgehog.
La présence de l'ARNm du gène *Shh* est analysée par hybridation *in situ* sur des mâchoires inférieures d'embryons de poule sauvage et d'embryons de poule mutants *ta*^{2} au même stade
Pour cela, les mâchoires sont incubées avec une sonde d'acide nucléique s'hybridant spécifiquement avec l'ARNm *Shh*. Cette sonde est couplée à une enzyme catalysant la production d'un produit bleu.



Flèches noires : domaine de formation de la lame dentaire
Cadre rouge : voir coupe ci-dessous.

Une analyse plus détaillée des structures observables sur la mâchoire inférieure d'embryon de poule *ta*^{2} est réalisée sur des coupes transversales de mâchoires colorées à l'hématoxyline-éosine.

coloration hématoxyline – éosine



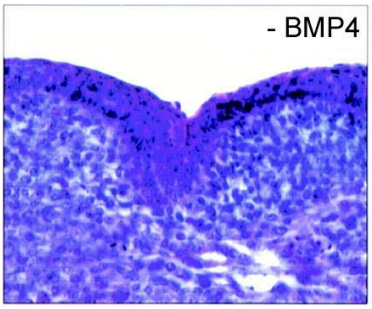
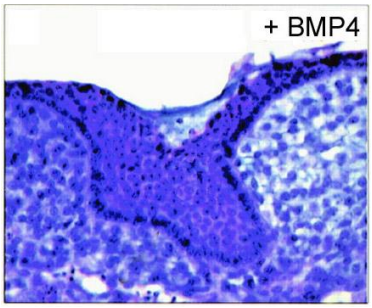
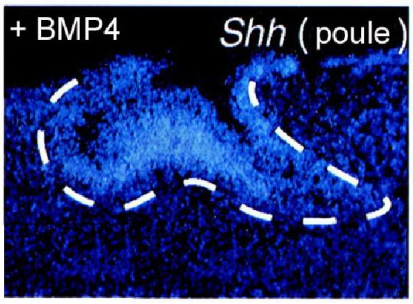
Pointe de flèche jaune : matrice extracellulaire de type dentine
Pointe de flèche blanche : odontoblastes immatures
Barre d'échelle : 50 µm

Document 1-5 : Effets du facteur BMP4 sur les tissus de mâchoires d'embryon de poule

Au stade E5, la mâchoire des embryons de poule sauvage présente un épaississement du type lame dentaire (comme au stade d'initiation dentaire chez la souris). Toutefois, la structure ne s'invagine pas et ne forme pas de dents.
Des mâchoires inférieures sont prélevées sur des embryons de poule (E5) et mises en culture en absence (– BMP4) ou en présence (+ BMP4) de BMP4 pendant 6 jours. Les tissus sont ensuite fixés et des coupes sagittales sont réalisées.
Les observations microscopiques sont effectuées sur :

- des coupes colorées à l'hématoxyline-éosine ;
- des coupes traitées par hybridation *in situ* avec une sonde reconnaissant spécifiquement l'ARNm transcrit à partir du gène *Shh.*

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

culture en absence de BMP4	**culture en présence de BMP4**	
		***coloration à l'hématoxyline - éosine***
pas de présence d'ARNm de Shh détecté.		***hybridation in situ (ARNm Shh)*** *Les points blancs matérialisent la présence de l'ARNm Shh.* *La ligne blanche indique la position de la lame basale séparant l'épithélium du mésenchyme*

Document 1-6 : Conditions d'induction du programme de développement dentaire

Des fragments d'épithélium ou de mésenchyme de mâchoire sont prélevés sur les organismes suivants :

- embryon de poule au **stade E3,5 avant l'apparition de la lame dentaire** ;
- embryon de souris au **stade E11,5 au stade d'apparition de la lame dentaire**.

➢ ***Expériences de co-cultures (conditions 1 à 4)***

Ces fragments sont utilisés pour réaliser des co-cultures entre épithélium et mésenchyme. Les deux tissus sont accolés et maintenus en culture pendant 6 jours. Des sections sagittales sont ensuite réalisées afin de mener une analyse histologique

➢ ***Expériences de cultures en présence d'un facteur diffusible (conditions 5 et 6)***

Des expériences complémentaires sont menées : du mésenchyme de poule ou de souris est mis au contact d'une bille recouverte du facteur BMP4. Les structures histologiques sont analysées dans les mêmes conditions que les expériences de co-cultures.

Les différentes cultures réalisées et leurs résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

condition	**espèce d'origine de l'épithélium**	**espèce d'origine du mésenchyme**	**proportion de co-cultures montrant des structures de type bourgeon**
1	souris	souris	6/6
2	souris	poule	8/20
3	poule	poule	0/8
4	poule	souris	0/15
5	bille recouverte de BMP4	souris	9/24
6	bille recouverte de BMP4	poule	8/25

X/Y = nombre de cultures positives / nombre total de cultures réalisées

Thème 2 : Entretien de la structure osseuse chez les mammifères

Chez les mammifères, la mise en place et l'entretien de la structure osseuse après la croissance sont réalisés par des cellules spécialisées : les ostéoblastes. La perturbation de l'activité des ostéoblastes par certains médicaments, comme les antidépresseurs, peut engendrer des anomalies de la structure osseuse Or les antidépresseurs sont décrits pour augmenter la quantité d'un neuromédiateur : la sérotonine.

Vous montrerez, à partir de l'analyse des différents documents, comment la sérotonine peut influencer la minéralisation de la matrice extracellulaire, une étape fondamentale dans la mise en place et le renouvellement de la structure osseuse. Vos conclusions seront résumées par un schéma bilan .

Annexe *(ces éléments peuvent être une aide pour la compréhension du sujet mais ne sont pas à analyser pour eux-mêmes)*
Dans cette étude, différents paramètres biochimiques sont utilisés comme marqueurs du fonctionnement des ostéoblastes :

– La **phosphatase alcaline** (ALP), enzyme synthétisée par les ostéoblastes, est indispensable à la croissance osseuse en favorisant la minéralisation du tissu osseux immature, c'est-à-dire la formation d'une matrice dense constituée de phosphate de calcium.

– **L'ostéocalcine,** hormone sécrétée par les ostéoblastes, augmente la concentration locale de calcium extracellulaire et le fixe sur le tissu osseux immature. Son taux circulant est mesuré dans le sang.

– **L'ostéopontine**, protéine d'adhérence du tissu osseux, assure la liaison du phosphate de calcium aux cellules osseuses.

Pour tous les mutants utilisés dans ce thème, la mutation entraîne une perte de fonction. Les sauvages sont notés **wt** (pour l'anglais wild type). Les mutants homozygotes portent le nom du gène muté suivi de $^{-/-}$ **(exemple : *Tph1*$^{-/-}$)**.

Document 2-1 : Implication de la sérotonine dans l'entretien de la structure osseuse chez la souris adulte

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5HT) est synthétisée à partir d'un acide aminé, le tryptophane. Cette réaction est catalysée par une enzyme (la tryptophane hydroxylase ou TPH) qui existe sous deux isoformes : TPH_1 dans tout l'organisme et TPH_2 spécifiquement dans le cerveau.
Soient deux lots de souris adultes, sauvages (wt) ou mutées homozygotes pour l'enzyme TPH_1 ($Tph_1^{-/-}$).

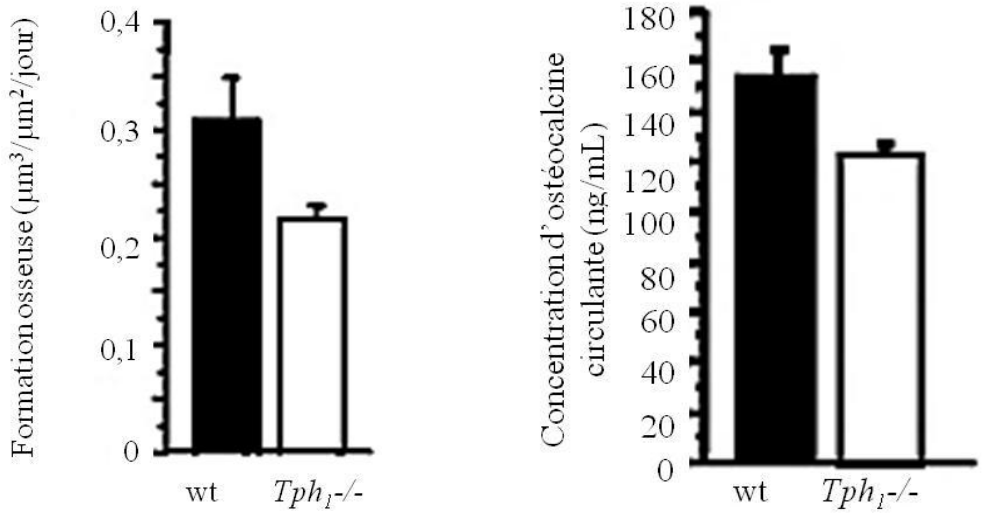
Document 2-1.A : Renouvellement osseux quotidien

La formation osseuse est le volume d'os nouvellement formé par jour rapporté au squelette (surface de tissu osseux déjà en place). La formation osseuse est évaluée chez les souris sauvages (wt) et les souris mutées $Tph_1^{-/-}$.

Document 2-1.B : Etude d'un marqueur biochimique de la formation osseuse.

La concentration d'ostéocalcine (voir annexe) a été mesurée dans la circulation sanguine des deux souches de souris : sauvages (wt) ou mutées $Tph_1^{-/-}$.

A. **B.**



Document 2-2 : Structure osseuse chez la souris adulte mutée pour un récepteur à la sérotonine

Le récepteur $5HT_2B$ (noté $5HT_2BR$) est le principal récepteur à la sérotonine exprimé dans les membranes plasmiques d'ostéoblastes.

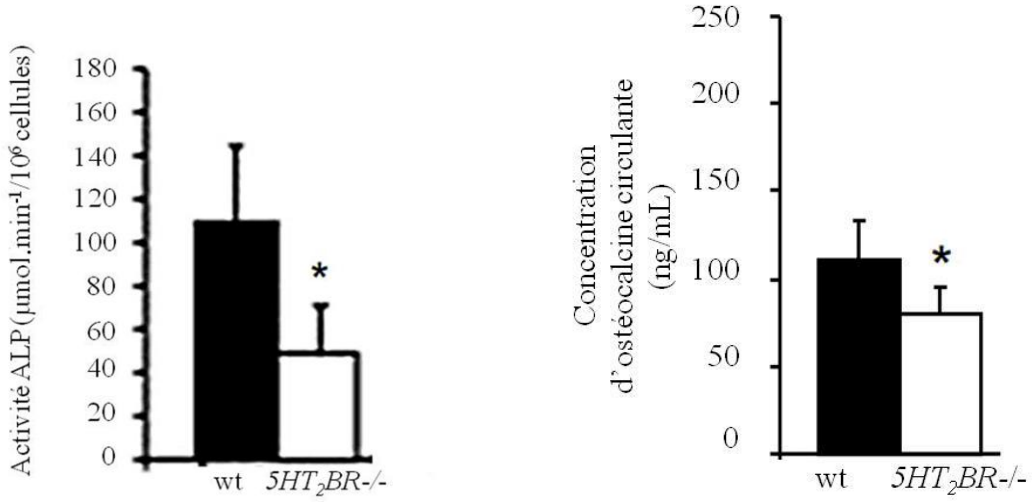
Document 2-2.A : Etude de l'activité de la phosphatase alcaline dans les ostéoblastes

L'activité de la phosphatase alcaline (ALP) a été mesurée dans les ostéoblastes de deux souches de souris : sauvages (wt) ou n'exprimant pas $5HT_2BR$ ($5HT_2BR^{-/-}$). Elle est exprimée en $\mu mole.min^{-1}/10^6$ cellules.

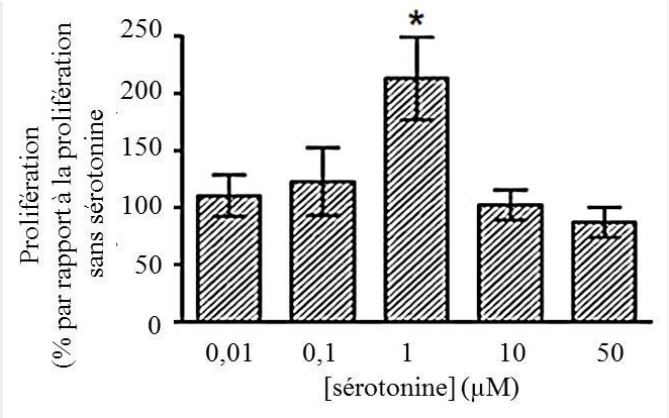
Document 2-2.B : Etude d'une hormone synthétisée par les ostéoblastes

La concentration d'ostéocalcine dans la circulation sanguine est mesurée chez les souris sauvages et mutées pour le gène codant $5\text{-}HT_2BR$.

A. **B.**

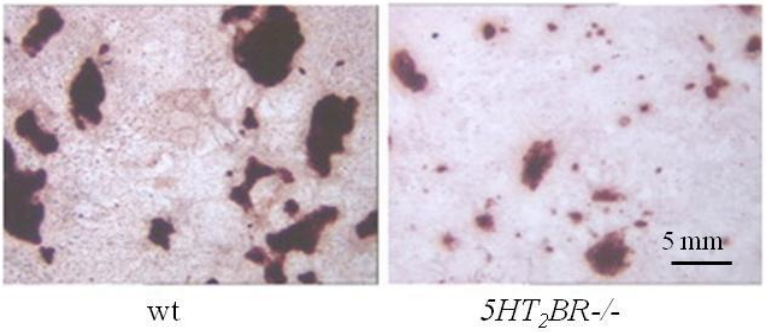


Document 2-3 : Sérotonine et prolifération des cellules ostéoblastiques
Des cellules ostéoblastiques prélevées sur des os du crâne de souris adultes sont cultivées pendant 48 h en absence et en présence de sérotonine (0,01 µM à 50 µM). La prolifération des cellules est évaluée par leur incorporation de nucléotides radioactifs (thymidine tritiée) pendant 12h.

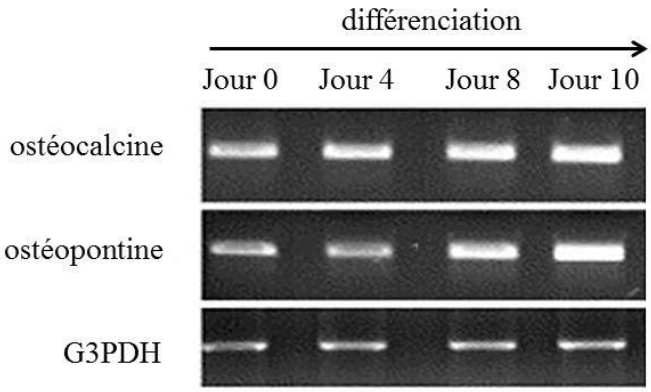


Document 2-4 : Etude *in vitro* de la mise en place de la structure osseuse à l'aide de lignées ostéoblastiques
Les lignées ostéoblastiques sont des cellules inductibles capables de récapituler *in vitro* toutes les étapes de la différenciation ostéogénique *in vivo* menant à la formation d'une matrice osseuse sous la forme de nodules de minéralisation.

Document 2-4.A : Sérotonine et différenciation des ostéoblastes
Des cellules ostéoblastiques issues de souris sauvages (wt) ou mutées $5HT_2BR^{-/-}$ sont cultivées *in vitro* pendant 21 jours. Ces cultures ont été induites à se différencier vers le programme ostéogénique. Les nodules de minéralisation obtenus à la fin de la différenciation sont colorés à l'alizarine, un colorant rouge spécifique des cristaux de phosphate de calcium.

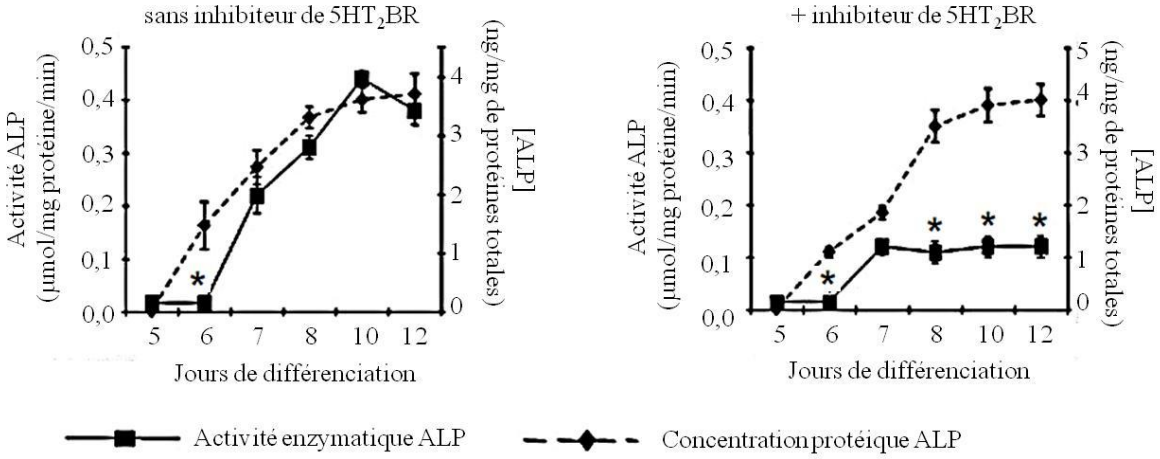


Document 2-4.B : Evolution des marqueurs biochimiques de minéralisation au cours de la différenciation des ostéoblastes
Une lignée ostéoblastique est induite à se différencier vers le programme ostéogénique pendant 10 jours. Les taux d'ARNm codant des protéines spécifiques des ostéoblastes (l'ostéocalcine, l'ostéopontine) et une enzyme du métabolisme cellulaire (la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou G3PDH dont l'expression est constante à tout stade de différenciation) sont analysés. Pour cela, les ARNm purifiés à différents stades de différenciation ostéogénique (aux jours 0, 4, 8 et 10) sont utilisés pour obtenir des ADNc par transcription inverse. Ces ADNc sont ensuite amplifiés par PCR (technique RT-PCR, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*).



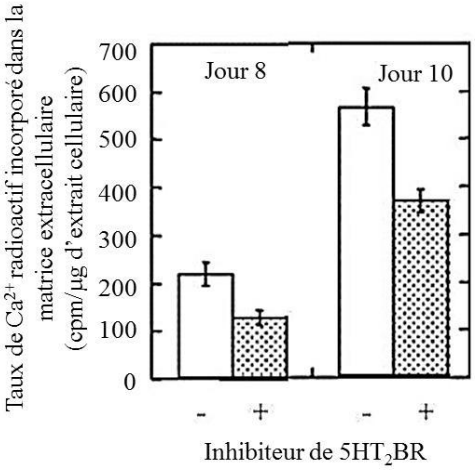
Document 2-4.C : Evolution de l'activité alcaline phosphatase au cours de la différenciation ostéogénique

La concentration et l'activité alcaline phosphatase (ALP) sont mesurées dans des ostéoblastes à différents stades de différenciation ostéogénique (des jours 5 à 12), en présence de sérotonine 5HT. Dans la moitié des cultures un inhibiteur du récepteur $5HT_2BR$ est ajouté



Document 2-4.D : Sérotonine, $5HT_2BR$ et minéralisation de la matrice extracellulaire

Du calcium radioactif a été ajouté au jour 5 de la différenciation ostéogénique dans deux cultures de cellules ostéoblastiques, cultivées en présence de sérotonine (5HT). Un inhibiteur de $5HT_2BR$ est ajouté dans l'une des cultures en même temps que le calcium radioactif. Après lavage, le taux de radioactivité est évalué aux jours 8 et 10 de la différenciation dans les nodules minéralisés.



Thème 3 : Influence des os sur le cerveau

L'exercice physique renforce le squelette ; il est aussi recommandé pour influencer positivement notre comportement. Lorsque nous vieillissons, notre masse osseuse décroit, la perte de mémoire, l'anxiété et la dépression deviennent également plus communes. En étudiant une hormone produite dans les os, l'ostéocalcine, les chercheurs ont observé qu'elle modifiait différents paramètres dont la masse adipeuse et le fonctionnement cérébral.

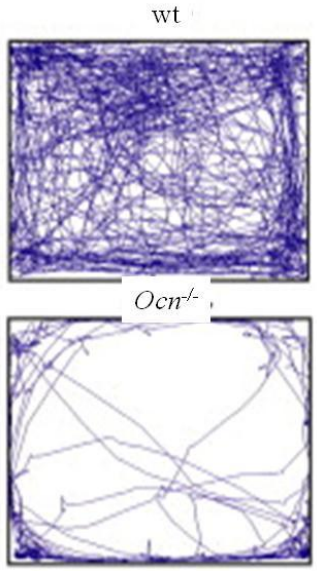
A partir des documents proposés, vous montrerez comment l'ostéocalcine peut influencer différents aspects du comportement chez la souris.

Document 3-1 : Ostéocalcine et activité motrice.
Les déplacements de six souris sauvages (wt) ou mutées (*Ocn* $^{-/-}$) sont analysés. Dans les souris *Ocn* $^{-/-}$, le gène codant l'ostéocalcine n'est plus exprimé.

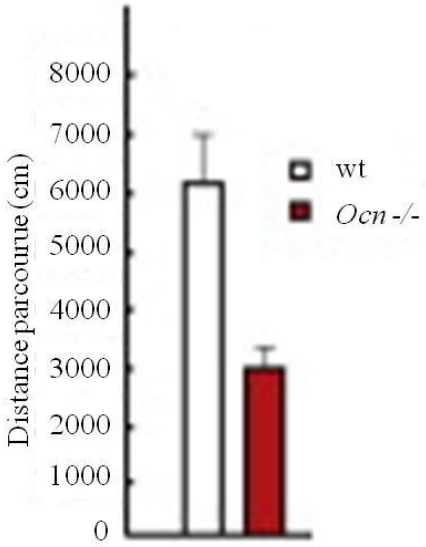
Document 3-1.A : Observation des déplacements des souris
Des souris sauvages ou mutées *Ocn*$^{-/-}$ sont placées pendant 30 minutes au centre d'une boîte éclairée par la lumière du jour. Les déplacements des souris sont suivis par une caméra vidéo.

Document 3-1.B : Quantification des déplacements des souris
Les souris se déplacent sur des surfaces quadrillées permettant d'évaluer la distance totale parcourue en 30 minutes.

A.



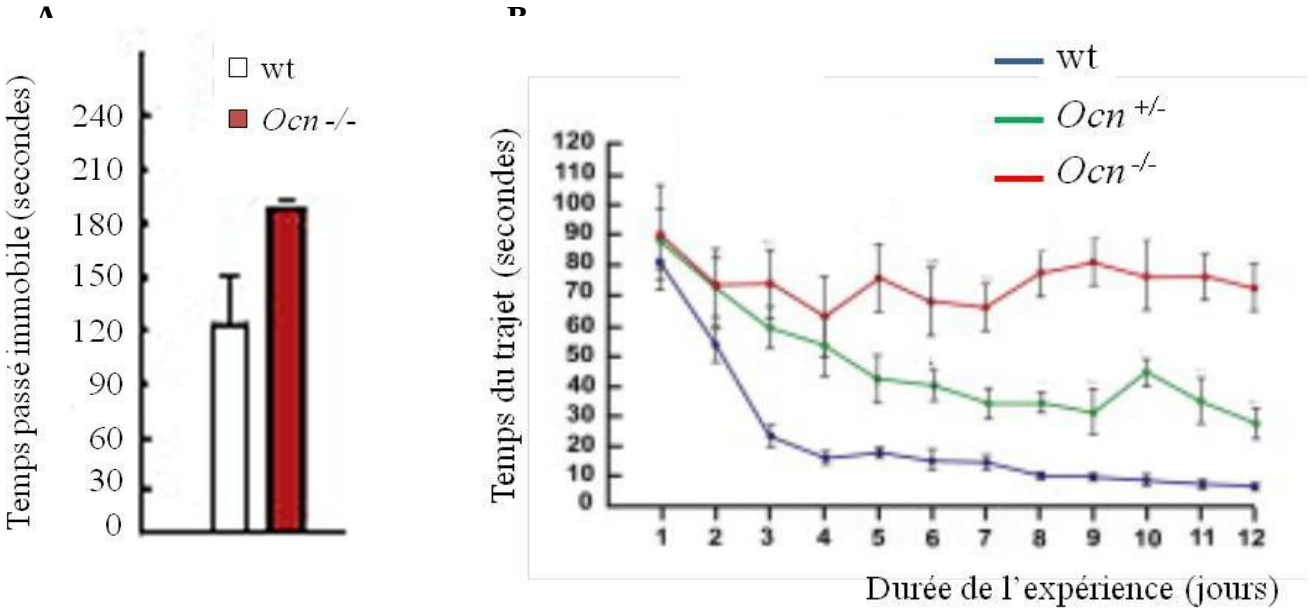
B.



Document 3-2 : Ostéocalcine et comportement
Une autre série de tests effectués sur les souris a permis de vérifier leur résistance au stress

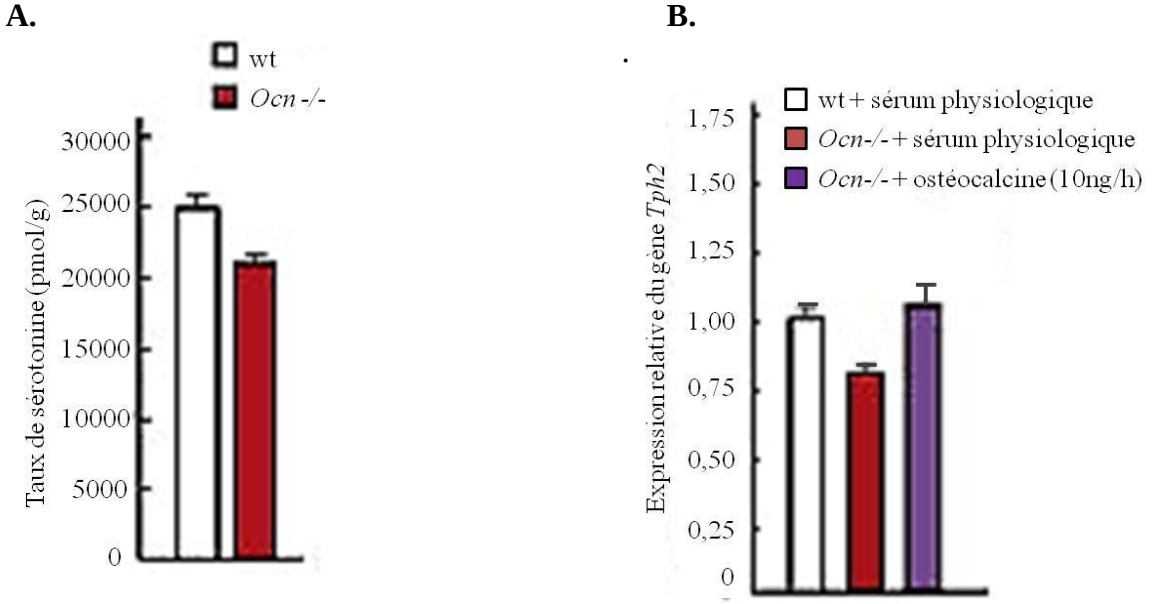
Document 3-2.A.
Le test consiste à suspendre les souris sauvages (wt) ou mutées (*Ocn*$^{-/-}$) par leur queue. Le temps qu'elles passent immobiles au lieu de tenter de se dégager est mesuré. L'immobilité est considérée comme une marque de sensibilité forte au stress engendré par le test.

Document 3-2.B.
La mémorisation spatiale est également évaluée par le test de Morris utilisant un aquarium comprenant deux plateformes immergées. Les souris sont posées sur la plateforme de départ. Le temps nécessaire pour rejoindre la plateforme d'arrivée est mesuré. Pendant 12 jours, des souris sauvages wt ou des souris mutées (homozygotes *Ocn* $^{-/-}$ ou hétérozygotes *Ocn* $^{+/-}$) sont soumises 4 fois par jour à ce test.



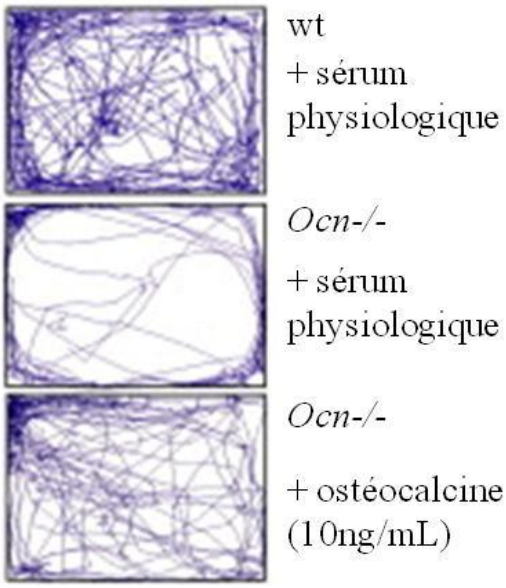
Document 3-3 : Ostéocalcine, sérotonine et comportement
Document 3-3.A
La concentration en sérotonine est mesurée dans le cerveau de souris sauvages ou mutées pour le gène codant l'ostéocalcine (*Ocn-/-*).

Document 3-3.B
L'expression du gène *Tph2* codant une des enzymes clés de la chaîne de synthèse de la sérotonine est mesurée par PCR quantitative chez des souris sauvages (wt) et des souris mutées *Ocn*$^{-/-}$. Les souris ont été préalablement injectées soit avec du sérum physiologique, soit avec de l'ostéocalcine. L'expression du gène *Tph2* pour chaque souris est standardisée par rapport à l'expression de ce même gène mesurée chez les souris sauvages injectées avec du sérum physiologique.



Document 3-3.C

Des souris sauvages (wt) ou mutées pour le gène codant l'ostéocalcine (*Ocn*$^{-/-}$) ont été injectées dans le cerveau avec du sérum physiologique ou de l'ostéocalcine. Les souris sont ensuite placées dans une boîte éclairée par la lumière du jour et leur déplacement est suivi par caméra vidéo.



FIN DE L'EPREUVE

Bibliographie

Thème 1

Bei M. and Mass R. (1998) *Development* **125**, 4325-4333

Chen Y. *et al.* (1996) *Development* **122**, 3035-3044

Chen Y. *et al.* (2000) *PNAS* **97 no 18**, 10044-10049

Harris M. P. *et al.* (2006) *Current Biology* **16**, 371-377

Vainio S. *et al.* (1993) *Cell* **75**, 45-58

Wang Y.-H. *et al.* (1998) *Developmental dynamics* **213**, 386-397

Zhang Y. *et al.* (2000) *Development* **127**, 1431-1443

Thème 2

Baudry A, et al. J Biol Chem. 2010 Aug 20;285(34):26066-73.

Chabbi-Achengli Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2567-72.

Collet C, et al.. FASEB J. 2008 Feb;22(2):418-27.

Gustafsson BI et al., J Cell Biochem. 2006 May 1;98(1):139-51.

Locker M, et al. Cell Signal. 2006 May;18(5):628-39.

Thème 3

Oury et al., Cell, 2013 Sep 26 ; 155 (1) : 228-41