ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2013

FILIÈRE BCPST

COMPOSITION DE BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Cachan, Lyon, Paris et de l'ENPC

Durée : 6 heures

L'usage des calculatrices est interdit.

Thème de l'épreuve : la fécondation

Le sujet qui vous est proposé comporte **un sujet de synthèse** et **deux sujets avec documents** identifiés par les lettres A et B. Des durées conseillées sont données :

Sujets	Pages	Durée conseillée	Thème
synthèse	3	2 h	La fécondation
A	4 à 13	2 h	Etude des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot
B	14 à 23	2 h	Identification d'acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris

Les sujets A et B sont totalement indépendants, vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix.

Il vous est fortement recommandé de bien **gérer votre temps** de composition afin de pouvoir traiter correctement les différentes parties de l'épreuve.

Lors de l'évaluation, les correcteurs attacheront une importance particulière à :

- la justification des raisonnements ;
- la clarté et la concision des réponses ;
- la qualité et la précision des schémas ;
- la construction des phrases, l'orthographe, la grammaire et la présentation.

SUJET DE SYNTHESE

La fécondation

SUJET A
Etude des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot

Le sujet se propose d'étudier quelques aspects des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot (*Papaver rhoeas*), une espèce allogame dont la reproduction dépend d'une fécondation croisée. La croissance du tube pollinique dans les tissus du pistil est contrôlée par un seul locus, le locus S, comportant deux gènes codant pour des glycoprotéines : les gènes *PrpS* et *PrsS*. Plusieurs allèles de ces gènes ont été clonés et on notera le locus S de la manière suivante : S_1 lorsqu'il comporte les allèles $PrpS_1$ et $PrsS_1$, S_2 lorsqu'il comporte les allèles $PrpS_2$ et $PrsS_2$, etc.

L'expression des gènes $PrpS_1$ et $PrsS_1$ a été suivie dans différents tissus de plantes de génotype S_1S_3 et à différents stades de développement de l'anthère ou du stigmate (Figure 1).

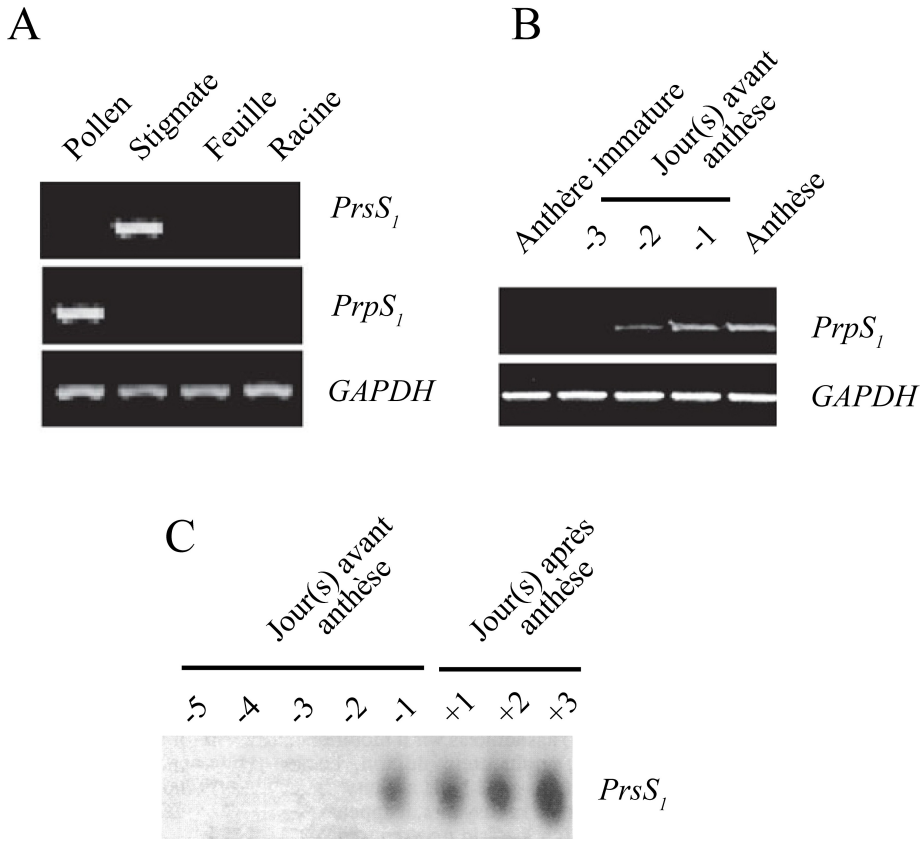


Figure 1. Expression de $PrsS_1$ et $PrpS_1$ dans différents tissus de plantes S_1S_3 (A) et à différents stades de développement de l'anthère (B) ou du stigmate (C) de ces mêmes plantes. Anthèse = ouverture de la fleur.
A et **B** : pour chaque condition, les ARN purifiés ont été convertis en ADN complémentaires (ADNc) et les ADNc d'intérêt ont été amplifiés par PCR. Ensuite, les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse en présence d'un agent intercalant de l'ADN fluorescent et visualisés sous lumière ultraviolette. *GAPDH* est un gène ubiquiste dont l'expression ne varie pas.
C : Les ARN purifiés ont été séparés par électrophorèse puis transférés sur une membrane, et les ARN $PrsS_1$ ont été détectés par hybridation avec un oligonucléotide radiomarqué de séquence complémentaire. La même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits.

***Question 1.* Analysez et interprétez ces résultats.**

La protéine $PrpS_1$ ne présente aucune homologie de séquence avec une protéine connue. Toutefois, l'analyse de sa séquence a permis d'obtenir deux modèles de structure supposée (Figure 2). Par ailleurs, une extraction des protéines de grains de pollen de plantes S_1S_3 a été effectuée en présence ou non de Triton X-100 (un détergent solubilisant les membranes cellulaires) et la protéine $PrpS_1$ a été recherchée dans ces mêmes extraits (Figure 3A). Enfin, sa localisation au niveau de grains de pollen issus d'une plante S_1S_3 mis à germer *in vitro* a été étudiée *in situ* à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement $PrpS_1$ (Figure 3B).

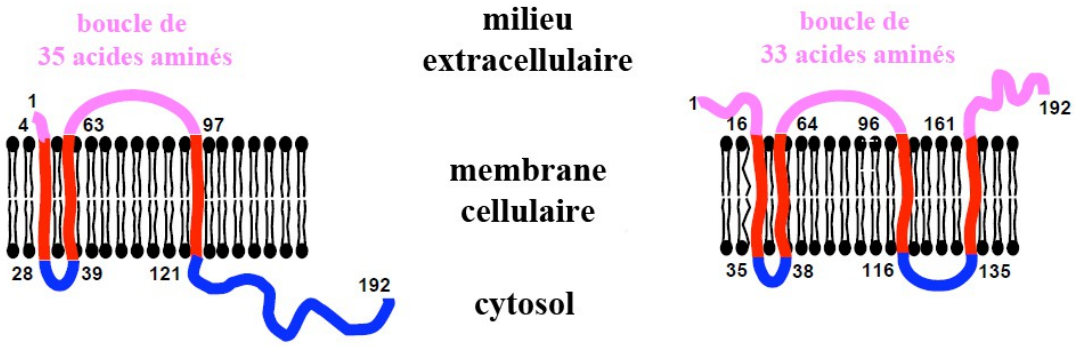


Figure 2. Deux modèles de prédiction de la structure de $PrpS_1$. Sur le schéma, une membrane cellulaire (membrane plasmique) a été représentée. Les régions intracellulaires supposées de la protéine $PrpS_1$ sont représentés en bleu, les domaines transmembranaires en rouge et les régions extracellulaires en rose. Les numéros correspondent à la position d'acides aminés le long de la séquence protéique. Une boucle supposée d'environ 35 acides aminés apparaît dans les deux modèles.

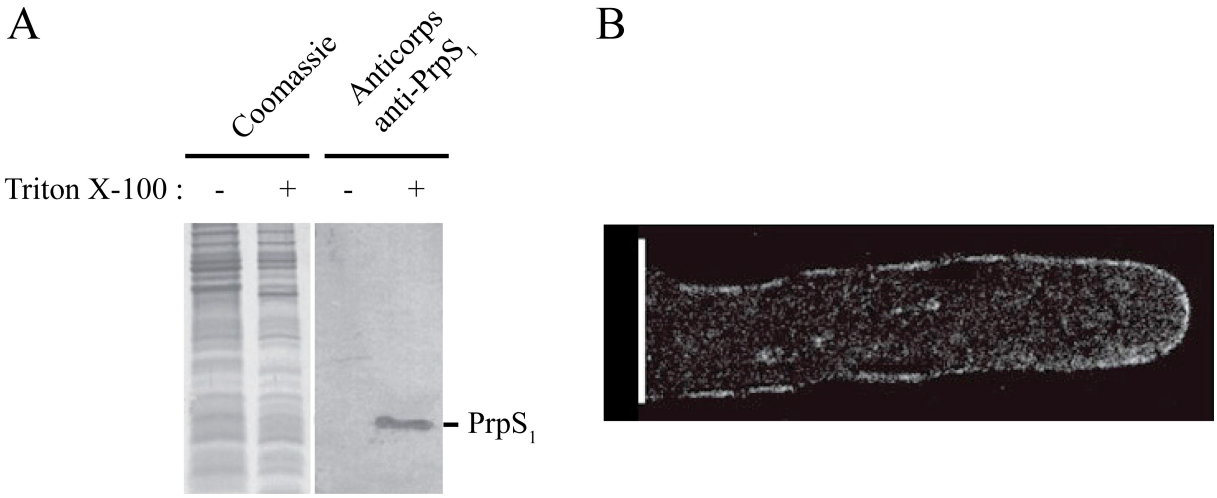


Figure 3. Localisation subcellulaire de $PrpS_1$.
A : Les protéines de grains de pollen de plantes S_1S_3 ont été extraites en absence (-) ou en présence (+) de Triton X-100, séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis colorées au bleu de Coomassie, un colorant non spécifique des protéines (panneau de gauche). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane et la protéine $PrpS_1$ a été détectée à l'aide d'un anticorps spécifique anti-$PrpS_1$ couplé à une enzyme donnant des produits colorés en présence du substrat adéquat (panneau de droite).
B : Des grains de pollen de plantes S_1S_3 mis à germer *in vitro* ont été incubés en présence d'un anticorps spécifique de $PrpS_1$ couplé à une substance fluorescente, montés sur une lame, puis observés au microscope à fluorescence. La photo présente le signal fluorescent de l'extrémité d'un tube pollinique placé sous un éclairage approprié. Barre d'échelle : 10µm.

Question 2. Quel est l'intérêt d'utiliser du Triton X-100 dans le protocole d'extraction des protéines du pollen ? A partir de l'ensemble des résultats présentés aux figures 2 et 3, discutez la localisation subcellulaire de $PrpS_1$.

Des grains de pollen issus de plantes de divers génotypes ont été mis à germer *in vitro* en présence ou en absence d'une protéine recombinante $PrsS_1$ préalablement chauffée ou non à 95°C. Après 20h d'incubation à température ambiante, le taux de germination a été déterminé dans chaque condition (Table 1). Dans une autre série d'expériences analogues, des grains de pollen issus de plantes S_1S_3 ont été mis à germer en présence de protéines recombinantes $PrsS_1$ et $PrsS_3$ et en présence ou non d'un peptide de synthèse de 15 acides aminés (peptide $PrpS_1$) de même séquence qu'une partie de la boucle supposée de 35 acides aminés de $PrpS_1$ (voir la figure 2). Les résultats sont présentés à la figure 4.

Table 1. Tests de germination *in vitro* de grains de pollen issus de plantes de divers génotypes en présence d'une protéine recombinante $PrsS_1$ préalablement chauffée ou non à 95°C. Pour chaque condition testée, le chiffre indique le pourcentage de germination obtenu en présence de $PrsS_1$ (chauffée ou non) par rapport au contrôle non traité (100% de germination). La protéine recombinante $PrsS_1$ de Coquelicot a été produite chez la Levure.

	Génotype de la plante ayant fourni le pollen			
	S_1S_3	S_1S_6	S_3S_6	S_2S_4
Traitement par $PrsS_1$	51*	50*	92	94
Traitement par $PrsS_1$ chauffée	96	100	98	97

* Différences significatives par rapport aux résultats obtenus sans traitement ou en présence de $PrsS_1$ chauffée.

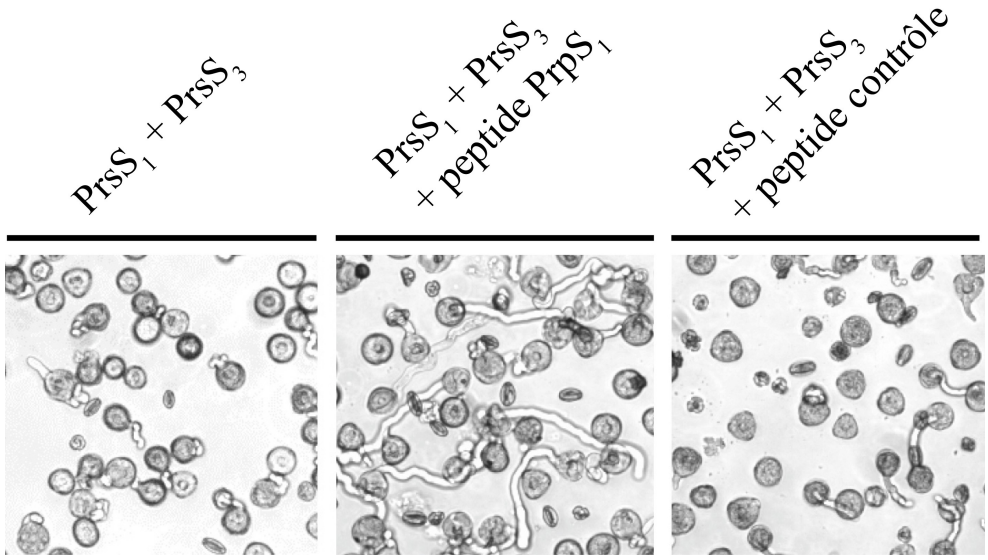
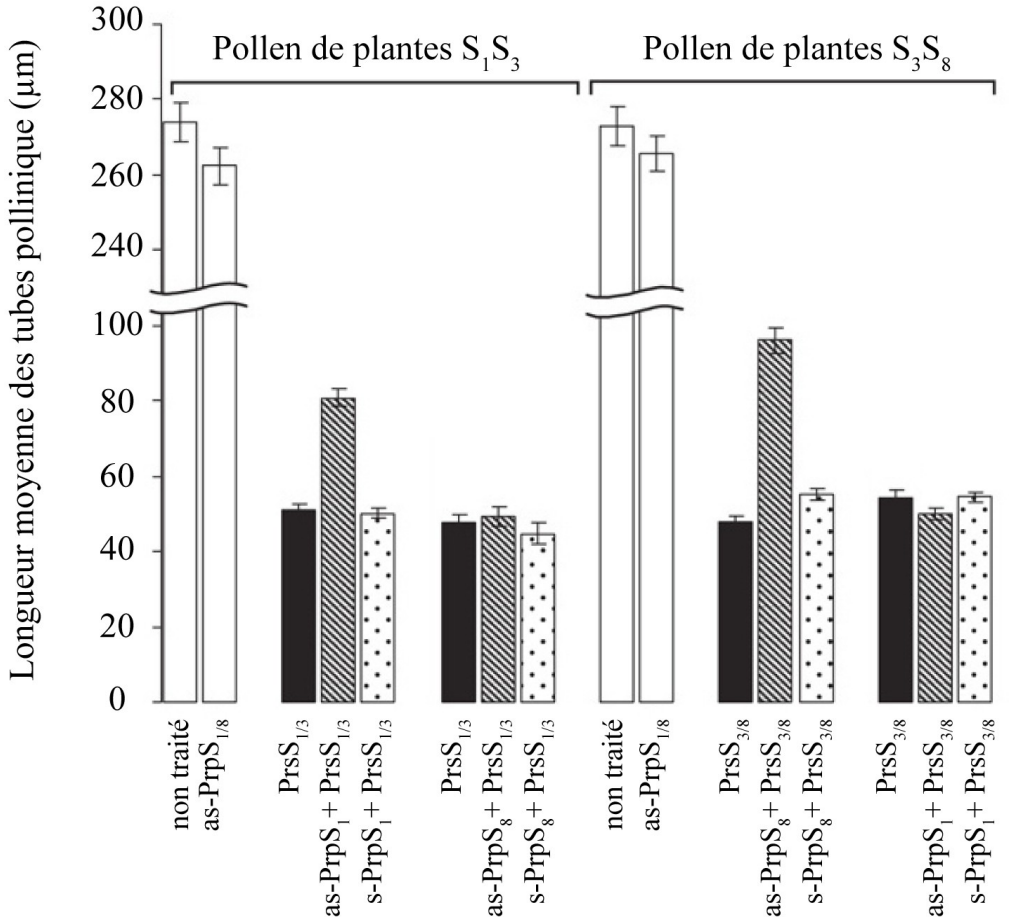


Figure 4. Tests de germination *in vitro* de grains pollen issus de plantes S_1S_3 dans différentes conditions. Les grains de pollen ont été observés au microscope après une incubation de 20h à température ambiante en présence ou en absence des protéines recombinantes $PrsS_1$ et $PrsS_3$, du peptide $PrpS_1$ et/ou d'un peptide de synthèse de 15 acides aminés dont la séquence a été établie aléatoirement (peptide contrôle). Les trois photos ont été prises au même grossissement sur un champ d'observation de même surface. En absence de toute protéine recombinante et de tout peptide de synthèse, on obtient 100% de germination (témoin non représenté). Les protéines recombinantes $PrsS_1$ et $PrsS_3$ de Coquelicot utilisées ont été produites chez la Levure.

Question 3. Quel problème méthodologique soulève l'utilisation de protéines PrsS recombinantes ? Analysez et interprétez les résultats de la table 1 et de la figure 4 en ne tenant compte que des taux de germination.

Question 4. Dans quel(s) phénomène(s) semblent être impliquées les protéines PrsS et PrpS ? Justifiez votre réponse.

Des grains de pollen de plantes S_1S_3 ou S_3S_8 ont d'abord été mis à germer *in vitro*, puis incubés pendant 1h en présence ou non d'oligonucléotides *antisens* capables de traverser la membrane cellulaire et de s'hybrider spécifiquement aux ARN messagers de *PrpS₁* (as-PrpS₁) et/ou de *PrpS₈* (as-PrpS₈). Des oligonucléotides *sens* de séquence complémentaire aux précédents (notés s-PrpS₁ et s-PrpS₈, respectivement) ont également été utilisés. Les grains de pollen ont ensuite été incubés pendant 2h à température ambiante en présence ou en absence de protéines recombinantes PrsS incompatibles, et la longueur de 15 tubes polliniques a été mesurée pour chaque condition testée. Les moyennes et écarts-types obtenus sont présentés à la <u>figure 5</u>.



<u>Figure 5.</u> Tests de germination *in vitro* de grains pollen issus de plantes S_1S_3 ou S_3S_8 dans différentes conditions. La longueur des tubes polliniques de plantes S_1S_3 a été mesurée en présence ou en absence des protéines recombinantes $PrsS_1$ et $PrsS_3$ ($PrsS_{1/3}$), des oligonucléotiques *antisens* as-$PrpS_1$ et as-$PrpS_8$ associés (as-$PrpS_{1/8}$) ou non, et des oligonucléotides *sens* s-$PrpS_1$ et s-$PrpS_8$. Des expériences semblables ont été menées sur des plantes S_3S_8 (des notations équivalentes sont utilisées en légende de figure). Les protéines recombinantes PrsS de Coquelicot utilisées ont été produites chez la Levure.

<u>Question 5.</u> Quel est l'effet cellulaire recherché des oligonucléotides* antisens *utilisés ? Analysez et interprétez ces résultats.

Des micro-injections d'une sonde (calcium green-1) dont la fluorescence dépend de la concentration en calcium libre ont été réalisées dans le cytosol des tubes polliniques de plantes S_1S_3. Les tubes polliniques (visualisés en microscopie optique à contraste de phase à la figure 6A) ont été ensuite incubés ou non en présence de protéines stigmatiques PrsS extraites de plantes S_1S_3 ou S_2S_4 et, pour chaque condition, la fluorescence a été étudiée à différents temps en microscopie (Figure 6B-D).

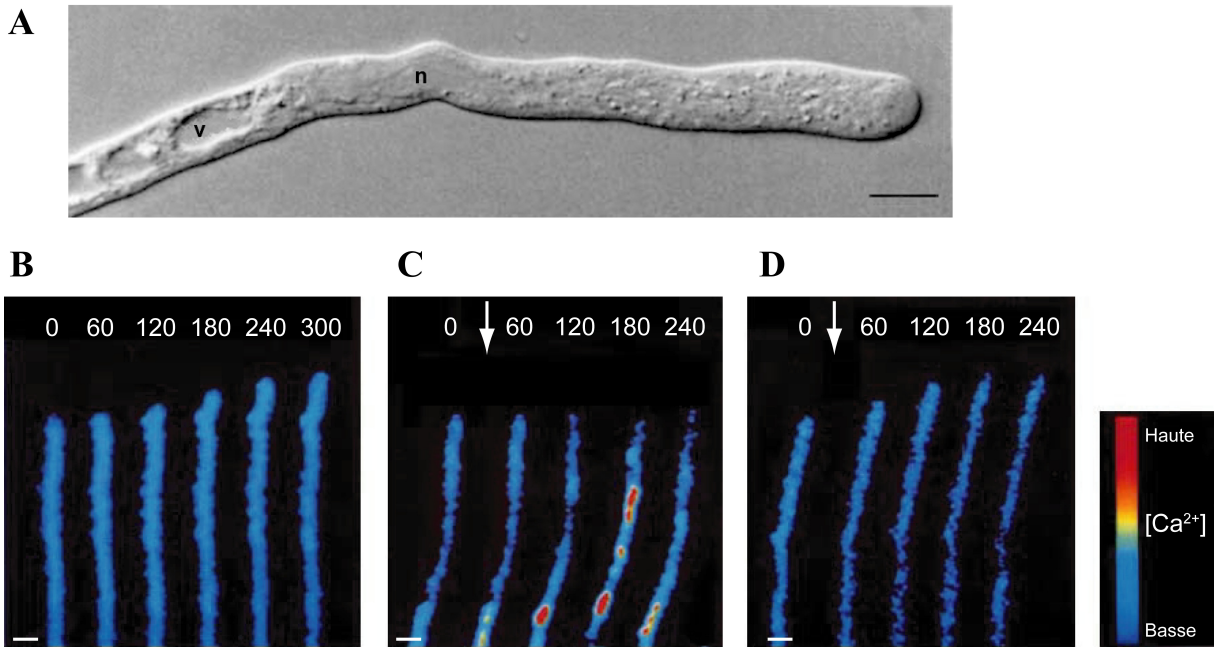


Figure 6. Visualisation d'un tube pollinique par microscopie optique à contraste de phase (A) et visualisation du calcium dans les tubes polliniques de plantes S_1S_3 par microscopie à fluorescence : absence de traitement (**B**) ; ajout (flèche) de protéines PrsS extraites de stigmates de plantes S_1S_3 (**C**) ou S_2S_4 (**D**). Les photos ont été prises à différents temps (exprimés en secondes au-dessus de chaque cliché). L'échelle artificielle de couleur choisie (à droite) permet de visualiser les variations de la concentration en calcium, allant du bleu (lorsqu'elle est faible) au rouge (lorsqu'elle est forte). Barres d'échelle : 10µm. n = région nucléaire associée à un abondant réticulum endoplasmique ; v = vacuole.

Question 6. Analysez et interprétez ces expériences. Formulez une ou des hypothèses quant au rôle du calcium dans le phénomène étudié.

Des tubes polliniques ont été micro-injectés avec la sonde fluorescente précédemment utilisée (calcium green-1) et avec une molécule inactive dérivée de l'inositol (1,4,5)-triphosphate, le caged IP_3. La photolyse de cette dernière molécule par les UV permet de libérer l'IP_3 actif et de suivre son effet dans l'espace et dans le temps en présence ou non de néomycine, un inhibiteur de la phospholipase C (Figure 7). On rappelle que la phospholipase C est une enzyme membranaire qui catalyse l'hydrolyse d'un phospholipide, le phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate (PIP_2), en diacyglycérol et en IP_3.

Question 7. Quel phénomène observe-t-on à la figure 7A ? Analysez et interprétez l'ensemble des résultats de la figure 7.

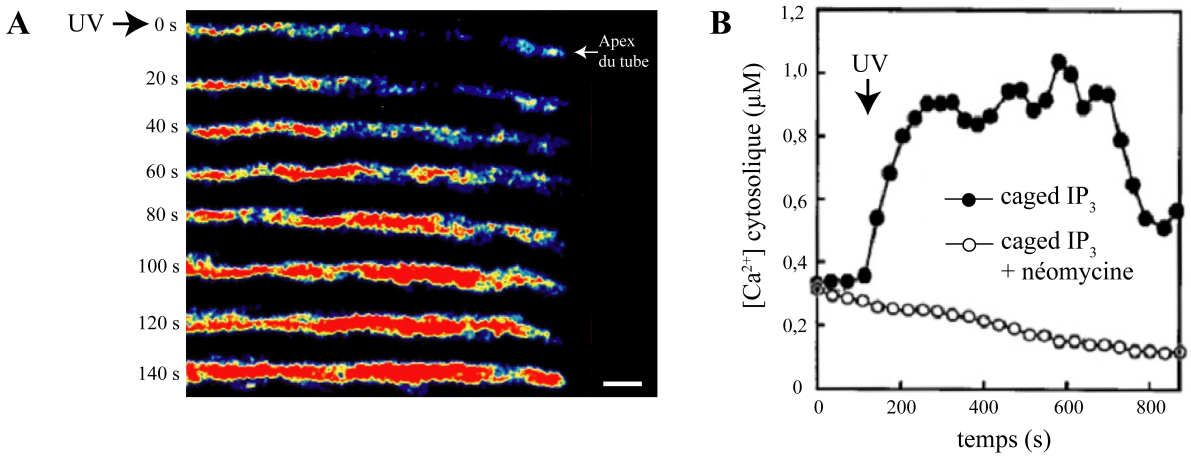


Figure 7. A : Visualisation au cours du temps du calcium cytosolique dans les tubes polliniques micro-injectés par le calcium green-1 et le caged IP_3. Un tube pollinique a été exposé à un éclairement ultraviolet (UV) pendant 20 secondes à partir de l'instant t = 0s. Des photos du même tube pollinique ont été prises toutes les 20 secondes. L'échelle de couleurs utilisée est la même qu'à la figure 6. Barre d'échelle : 10µm.
B : Evolution au cours du temps de la concentration en calcium cytosolique dans un tube pollinique préalablement traité ou non à la néomycine pendant toute la durée de l'expérience. La flèche indique le moment de la photolyse du caged IP_3 au temps t = 100 s.

Afin de mesurer l'activité de la phospholipase C, des vésicules dérivées de la membrane plasmique de grains de pollen ont été incubées dans un tube en présence de 10^{-5}M de $CaCl_2$ et de micelles contenant du PIP_2 tritié radioactif. Un échantillon de la réaction a été prélevé à différents temps d'incubation puis la fraction membranaire de chaque tube a été éliminée et la radioactivité a été mesurée dans la fraction aqueuse restante (Figure 8A). La même expérience a été reproduite pour différentes concentrations physiologiques de $CaCl_2$ (Figure 8B).

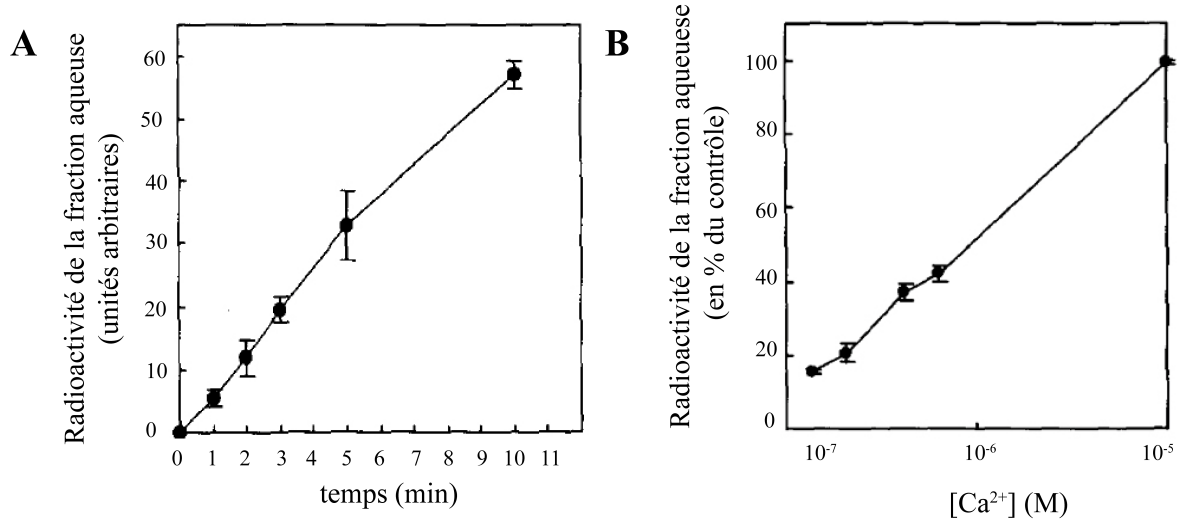


Figure 8. Activité de la phospholipase C dans les vésicules dérivées de grains de pollen. Pour chaque point des deux courbes, les écarts-types sont indiqués.
A : Cinétique d'accumulation de la radioactivité (voir texte pour détails du protocole) obtenue pour une concentration en calcium de 10^{-5}M.
B : Radioactivité obtenue pour différentes concentrations en calcium. Pour chaque concentration en calcium testée, la radioactivité a été mesurée au bout de 10 min et le résultat est exprimé en pourcentage de la condition contrôle (qui correspond à une concentration en calcium de 10^{-5}M, voir la figure 8A).

Question 8. A quoi correspond la radioactivité mesurée à la figure 8A (justifiez votre réponse) ? Que pouvez-vous déduire de ces expériences ?

Question 9. Proposez un modèle explicatif du phénomène observé à la figure 7A suite à la photolyse du caged IP_3 par les UV (vous illustrerez votre propos par un schéma).

Des grains de pollen de plantes S_3S_8 ont été débarrassés de leur paroi par incubation dans une solution enzymatique appropriée. Les cellules ainsi obtenues (protoplastes) ont alors été soumises à des expériences de patch-clamp dans la configuration dite « cellule-entière » (voir la figure 9A pour le principe de l'expérience). Le résultat de patch-clamp présenté à la figure 9B a été obtenu pour une solution ionique extracellulaire contenant 10mM de $CaCl_2$, additionnée ou non de 10µg/mL de protéines $PrsS_{3/8}$ et d'une solution ionique intracellulaire standard contenant 250nM d'ions calcium et 100mM d'ions chlorures. Pendant toute la durée de l'expérience, qui a été réalisée à 27°C, la différence de potentiel transmembranaire a été maintenue à -100mV, ce qui correspond au potentiel de repos d'une cellule végétale. La même expérience a été réalisée dans les mêmes conditions mais pour différentes concentrations en protéines $PrsS_{3/8}$ (Figure 9C), en présence de protéines $PrsS_1$ (Figure 9D) ou de protéines $PrsS_{3/8}$ préalablement chauffées à 95°C (Figure 9E).

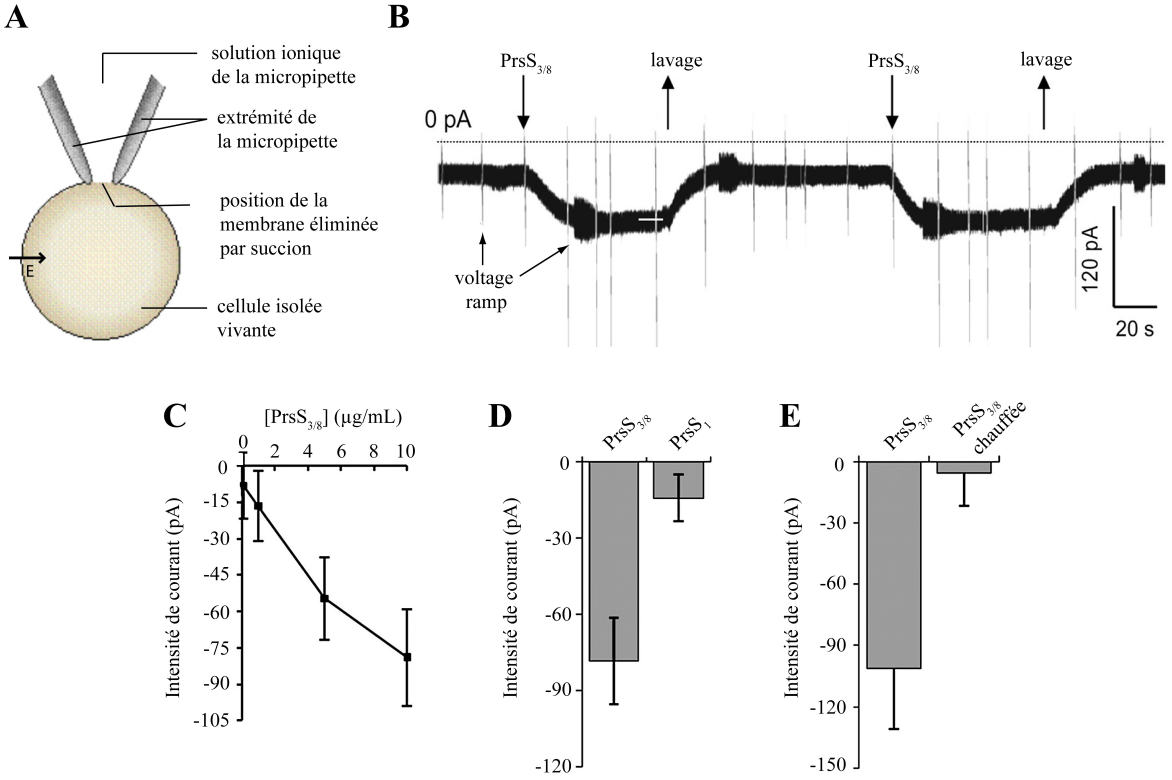
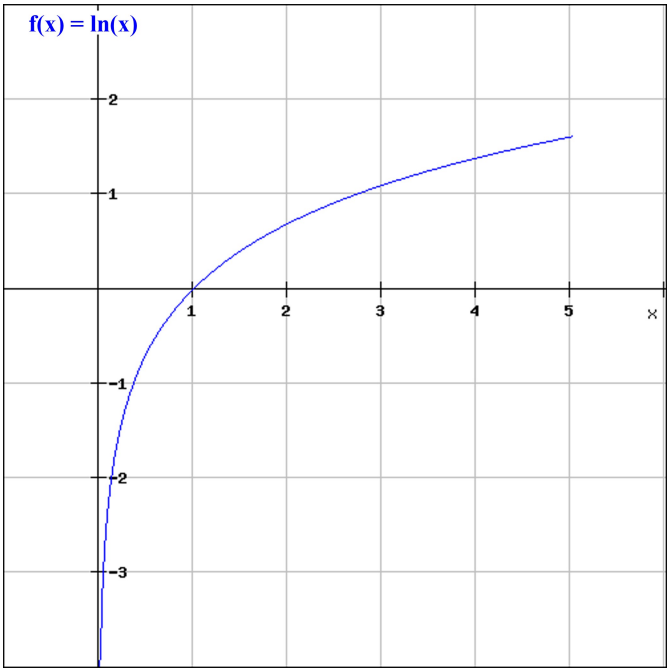
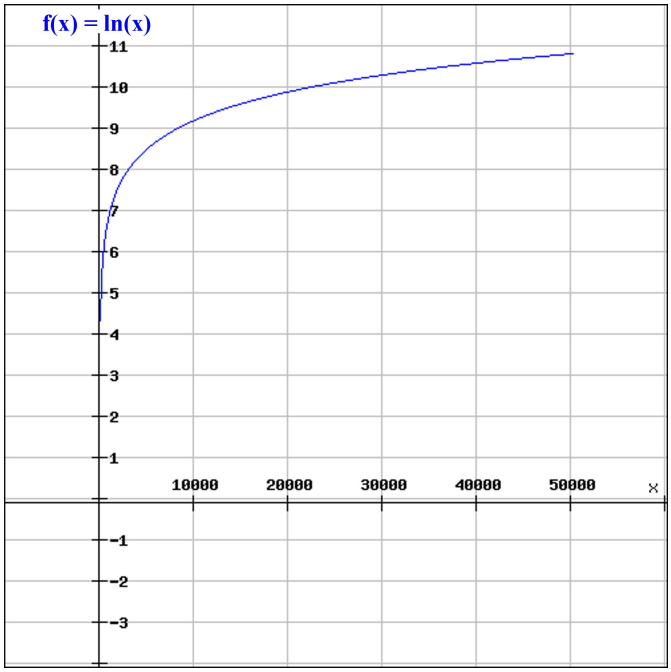


Figure 9. Expériences de patch-clamp menées sur des protoplastes de grain de pollen de plantes S_3S_8.
A : Principe du patch-clamp dans la configuration « cellule entière ». Dans cette technique, une micropipette en verre (de diamètre de contact de l'ordre de 1µm) remplie d'une solution ionique est mise en contact avec la membrane plasmique d'une cellule vivante isolée et scellée à celle-ci par une légère succion. La succion permet en outre d'éliminer la membrane au contact de la micropipette de façon à créer une continuité électrique et ionique entre la solution de la micropipette et le cytosol. La composition des solutions ioniques extracellulaire et de la micropipette est déterminée par l'expérimentateur. Une électrode d'enregistrement permet de mesurer les courants ioniques à travers la membrane de toute la cellule. Par convention, la différence de potentiel transmembranaire (E) est orientée comme indiqué par le sens de la flèche.
B : Mesure au cours du temps des courants ioniques en présence ou en absence de protéines $PrsS_{3/8}$. Des protéines recombinantes $PrsS_{3/8}$ (10µg/mL) ont été introduites dans la solution extracellulaire baignant le protoplaste ou retirées de celle-ci par des lavages aux moments indiqués par les flèches situées au-dessus de la courbe. L'intensité des courants ioniques est exprimée en picoampère (pA) et le temps en seconde (s) sur les échelles indiquées. Les moments où les expériences de voltage ramp présentées à la figure 10B ont été effectuées sont indiqués par des flèches.
C à E : Mesure des courants ioniques pour différentes concentrations en $PrsS_{3/8}$ (**C**), en présence de $PrsS_{3/8}$ (10µg/mL) ou de la même concentration en $PrsS_1$ (**D**), et en présence de $PrsS_{3/8}$ (10µg/mL) préalablement chauffées ou non à 95°C (**E**). Les courants ioniques ont été mesurés 20s après l'addition des protéines PrsS indiquées. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus à partir de plusieurs expériences.

<u>Question 10</u>. Calculez les potentiels d'équilibre des ions Ca^{2+} et Cl^- dans les conditions expérimentales indiquées (pour cela, on donne la constante des gaz parfaits $R \approx 8{,}31 J.mol^{-1}.K^{-1}$, la constante de Faraday $F \approx 96500 C.mol^{-1}$, ainsi que des courbes de logarithme népérien ci-dessous). Déduisez-en le sens de déplacement spontané de chacun des ions à travers la membrane pour une différence de potentiel transmembranaire de -100 mV.





<u>Question 11.</u> Que montrent les résultats de la figure 9 ? Comment expliquez-vous la modification de conductance membranaire induite par l'addition de $PrsS_{3/8}$? Justifiez votre réponse.

D'autres expériences de patch-clamp semblables aux précédentes ont été réalisées mais cette fois-ci en modifiant de manière linéaire le potentiel de membrane de +10mV à -180mV pendant une période d'une seconde (expériences de voltage ramp, voir la figure 10A pour l'illustration du protocole). Les courants ioniques à travers toute la membrane cellulaire ont été mesurés pendant toute la durée de l'expérience sur des protoplastes issus de plantes S_3S_8 traités ou non avec 10µg/mL de protéines $PrsS_{3/8}$ (Figure 10B), ce qui a permis d'obtenir la relation entre l'intensité de courant et le potentiel de membrane sous la forme d'une courbe Intensité-Voltage (Figure 10C). Sur le même principe, des expériences de voltage ramp ont été réalisées en remplaçant dans la solution extracellulaire le $CaCl_2$ par du gluconate de calcium, le gluconate étant un anion ne pouvant pas traverser la membrane cellulaire (Figure 10D). D'autres expériences de voltage ramp ont été menées avec une solution ionique extracellulaire standard contenant 10mM de $CaCl_2$ additionnée ou non de 500µM d'ions La^{3+}, un agent bloquant des canaux à calcium de large spectre (Figure 10E).

Question 12. Analysez et interprétez la figure 10B.

Question 13. Comment interprétez-vous le fait que la courbe Intensité-Voltage obtenue à la figure 10C ne soit pas linéaire ?

Question 14. Analysez et interprétez l'ensemble des résultats obtenus.

Question 15. Représentez dans un schéma fonctionnel les réponses physiologiques survenant lors de l'interaction d'un pollen de génotype S_1 avec un pistil d'une plante de génotype S_1S_3.

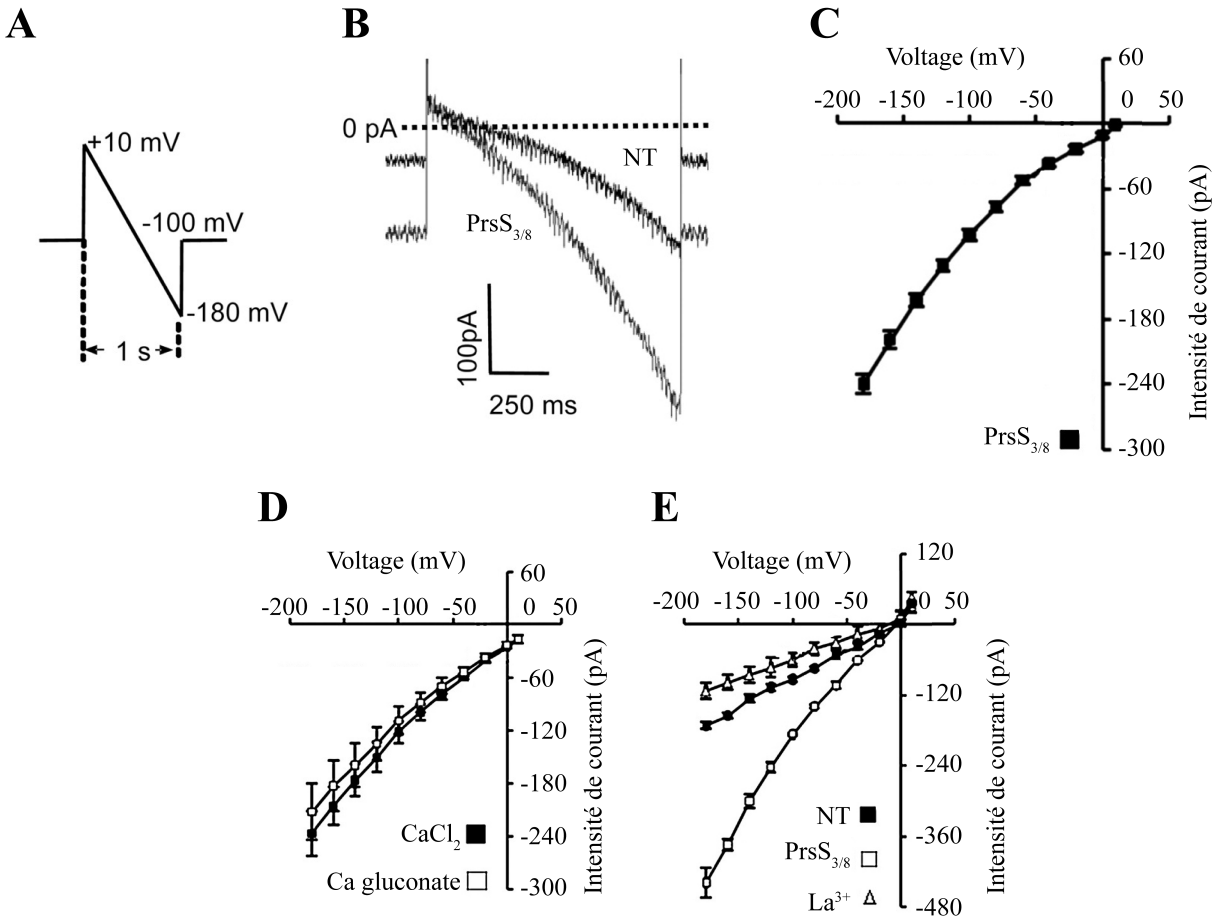


Figure 10. Expériences de voltage ramp menées sur des protoplastes de grain de pollen de plantes S_3S_8.
pA : picoampère ; s : seconde ; ms : milliseconde ; mV : millivolt.
A : Protocole de voltage ramp utilisé. Les cellules initialement maintenues à un voltage de -100mV sont brusquement soumises à un potentiel de +10mV, puis l'expérimentateur fait varier le voltage de manière linéaire de +10mV à -180mV pendant une période d'une seconde, avant de le faire brusquement revenir à -100mV.
B : Profils représentatifs de voltage ramp obtenus en présence ($PrsS_{3/8}$) ou en absence (NT) de 10µg/mL de protéines $PrsS_{3/8}$ dans la solution ionique extracellulaire. Les expériences de voltage ramp présentées ici ont été réalisées à environ 40s d'intervalle (voir la figure 9B) mais pour faciliter la comparaison, les courbes obtenues ont été représentées sur un même intervalle de temps.
C à E : Courbes Intensité-Voltage de protoplastes traités ou non (**NT**) avec 10µg/mL de $PrsS_{3/8}$. Pour chaque expérience de voltage ramp, l'intensité de courant a été mesurée à 11 points différents (-180, -160, -140, -120, -100, -80, -60, -40, -20, 0 et +10mV). Pour chaque condition testée, les courbes de courants ont été établies en soustrayant les courants de faible amplitude mesurés en absence de protéines $PrsS_{3/8}$ (**NT**) des courants obtenus en présence de $PrsS_{3/8}$, à l'exception de la figure 10E. Les expériences ont toutes été réalisées en utilisant une solution ionique extracellulaire standard contenant 10mM de $CaCl_2$, à l'exception des conditions suivantes :

- **Ca gluconate** : remplacement du $CaCl_2$ par 10mM de gluconate de calcium ;
- **La^{3+}** : addition de 500µM de La^{3+} dans la solution extracellulaire standard.

Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus à partir de plusieurs expériences.

SUJET B
Identification d'acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris

La fécondation chez les Mammifères met en jeu une série de processus cellulaires et biochimiques complexes. L'objectif des expériences qui suivent est d'identifier des acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris et d'en caractériser le(s) mode(s) d'action.

Afin d'orienter la recherche de molécules candidates, des ovocytes II de Souris dont la zone pellucide a été retirée (ovocytes dépellucidés) ont été observés au microscope électronique à balayage (MEB) en présence ou non de spermatozoïdes dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Parallèlement, la surface des ovocytes II dépellucidés en l'absence de spermatozoïdes a été observée au microscope électronique à transmission (MET). Enfin, la localisation de CD9, une protéine à domaine transmembranaire dont la fonction dans l'adhérence et la motilité cellulaires a été décrite, a été analysée par microscopie à fluorescence à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement CD9 (Figure 11).

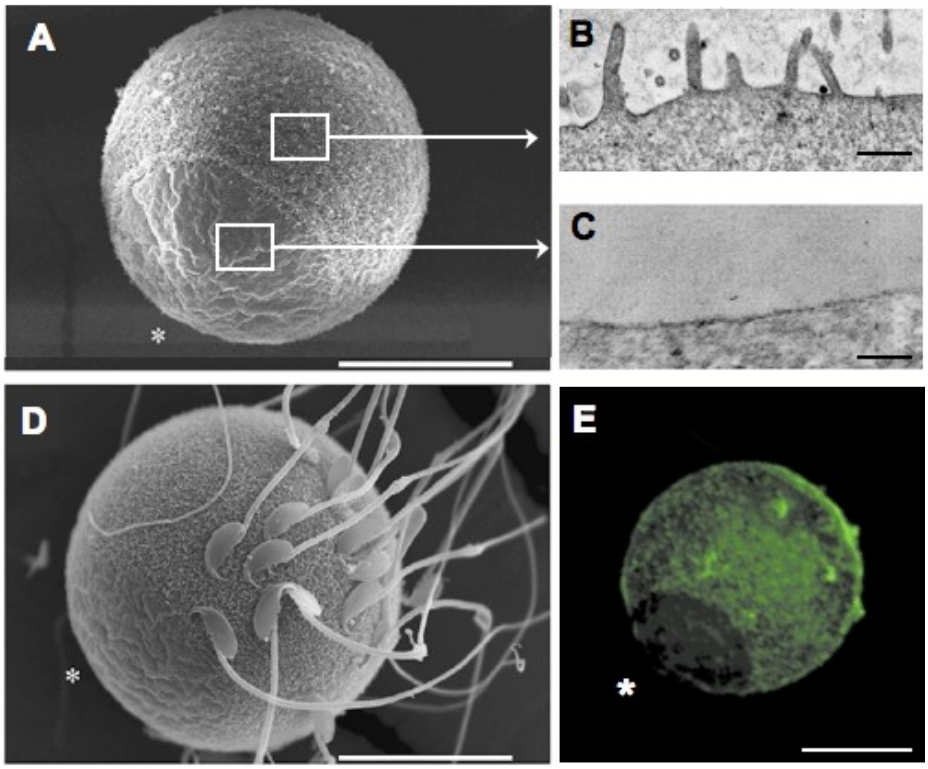


Figure 11. Observations d'ovocytes II en microscopie électronique et à fluorescence. * indique le pôle de l'ovocyte II où a été expulsé le premier globule polaire. Les images sont représentatives de l'ensemble des ovocytes observés.
A : Observation au MEB d'un ovocyte II dépellucidé en l'absence de spermatozoïdes. Barre d'échelle : 20µm.
B et **C** : Observation au MET de la surface de l'ovocyte II présenté en **A**. Les panneaux **B** et **C** ont été obtenus dans deux régions distinctes de l'ovocyte II, encadrées en **A**. Barres d'échelle : 0,5µm.
D : Observation au MEB d'un ovocyte II dépellucidé après incubation en présence de spermatozoïdes de Souris dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Barre d'échelle : 20µm.
E : Des ovocytes II dépellucidés ont été incubés en présence d'un anticorps spécifique de CD9 puis d'un anticorps secondaire couplé à une substance fluorescente (en vert), montés sur une lame, puis observés au microscope à fluorescence. Barre d'échelle : 20µm.

Question 16. Analysez la figure 11. En quoi ces données justifient-elles le fait que CD9 est un acteur potentiel de la fécondation ?

Des ovocytes II dépellucidés (en l'absence de spermatozoïdes) ont ensuite été incubés en présence d'un anticorps spécifique de CD9 puis d'un anticorps secondaire couplé à des particules d'or, avant d'être observés au MET (Figure 12).

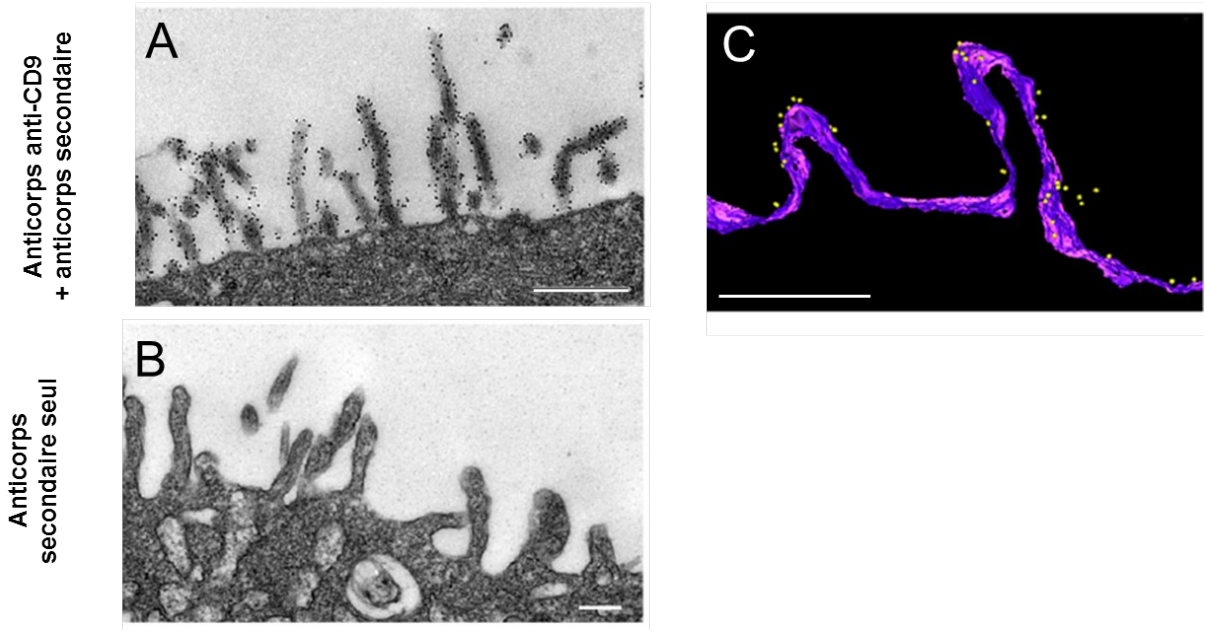
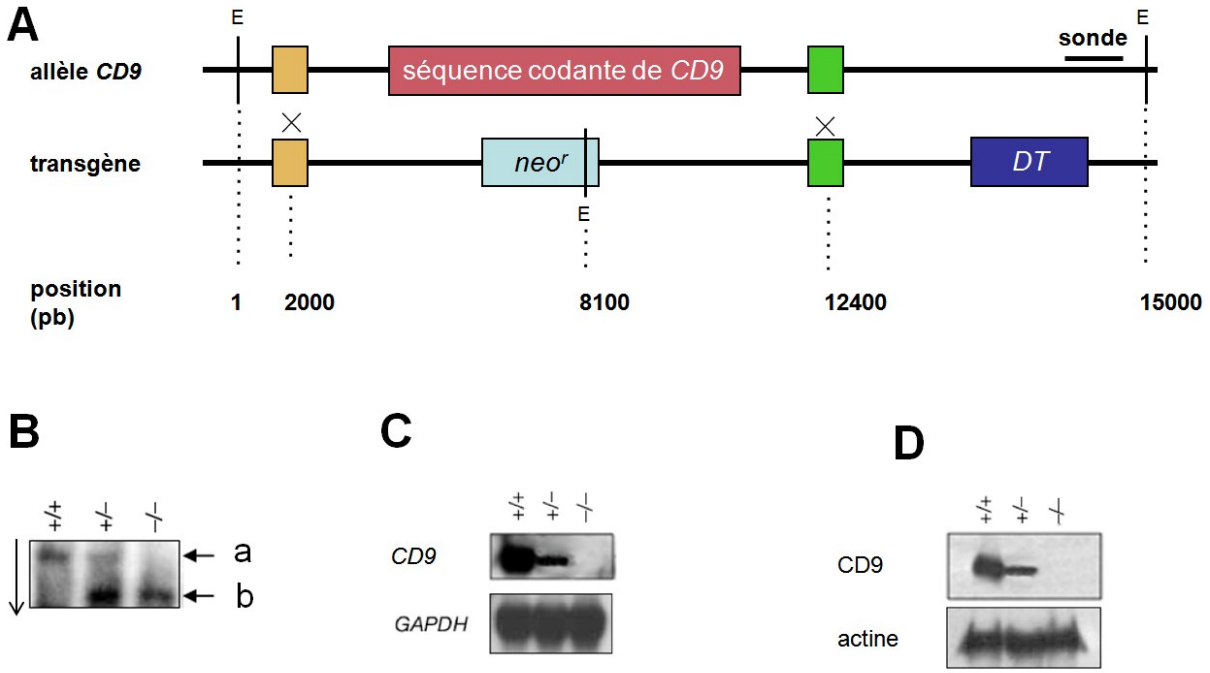


Figure 12. Analyse ultrastructurale de la localisation de CD9 dans les ovocytes II.
A : Observation au MET d'un ovocyte II incubé en présence d'un anticorps spécifique de CD9 (anticorps anti-CD9) puis d'un anticorps secondaire couplé à des particules d'or denses aux électrons visibles sous la forme de points noirs sur la figure. Barre d'échelle : 0,5µm.
B : Observation au MET d'un ovocyte II incubé en présence de l'anticorps secondaire seul. Barre d'échelle : 0,2µm.
C : Visualisation en fausses couleurs de la localisation de CD9 après analyse des clichés de MET. La membrane plasmique de l'ovocyte est représentée en dégradé de magenta et les molécules de CD9 sous forme de points jaunes. Barre d'échelle : 0,2µm.

Question 17. Analysez et interprétez les observations de la figure 12. En quoi ces résultats sont-ils en accord avec le fait que CD9 est un acteur potentiel de la fécondation ?

Des souris dont un ou les deux allèles du gène codant CD9 ont été invalidés ont été obtenues après recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires, injection des cellules souches modifiées dans des jeunes embryons, implantation des embryons modifiés chez des femelles pseudo-gestantes puis croisements des souris issues de ces embryons. La recombinaison homologue a été réalisée entre l'allèle *CD9* et un transgène, représentés à la <u>figure 13A.</u> Le transgène porte deux séquences de recombinaison (séquences non codantes identiques à des séquences situées en amont et en aval du gène *CD9*), le gène de résistance à la néomycine (un antibiotique) et un gène suicide (le gène de la toxine diphtérique), mais ne porte pas la séquence codante de *CD9*. À l'exception du locus *CD9*, toutes les souris étudiées sont génétiquement identiques.



<u>Figure 13.</u> Invalidation du gène *CD9* chez la Souris.
A : Représentation de l'allèle *CD9* et du transgène utilisé pour l'invalidation. Le transgène porte deux séquences de recombinaison (rectangles orange et vert), un gène de résistance à la néomycine (*neo*^{r}) et le gène de la toxine diphtérique (*DT*). Les positions (en paires de bases, pb) des sites de restriction *Eco*RI (E) et des sites de recombinaison homologue (croix) sont indiquées, ainsi que la séquence reconnue par la sonde utilisée en **B**.
B : L'ADN génomique de souris sauvages (+/+) ou de souris dont un (+/-) ou les deux (-/-) allèles *CD9* ont été invalidés a été purifié puis digéré par *Eco*RI. Les fragments ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse puis transférés sur une membrane. La membrane a ensuite été incubée en présence d'une sonde oligonucléotidique radiomarquée. La position des sites de restriction *Eco*RI (E) et la séquence reconnue par la sonde sont indiquées en **A**. La flèche indique le sens de migration au cours de l'électrophorèse.
C : Les ARN totaux purifiés d'ovocytes II issus de souris $CD9^{+/+}$ (+/+), $CD9^{+/-}$ (+/-) ou $CD9^{-/-}$ (-/-) ont été séparés par électrophorèse puis transférés sur une membrane. La membrane a ensuite été incubée en présence d'une sonde radiomarquée de séquence complémentaire à la séquence de *CD9* (panneau du haut) ou de séquence complémentaire à la séquence de *GAPDH* (panneau du bas). *GAPDH* est un gène ubiquiste dont l'expression ne varie pas.
D : Les protéines d'ovocytes II issus de souris $CD9^{+/+}$ (+/+), $CD9^{+/-}$ (+/-) ou $CD9^{-/-}$ (-/-) ont été extraites, séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane. La membrane a ensuite été incubée en présence d'un anticorps spécifique de CD9 (panneau du haut) ou de l'actine (panneau du bas) puis d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme donnant un produit coloré en présence du substrat adéquat. L'actine est une protéine ubiquiste dont l'expression ne varie pas.

<u>Question 18.</u> Pourquoi a-t-on introduit un gène de résistance à un antibiotique et un gène suicide dans le transgène ? Quelle est la taille attendue des fragments a et b de la figure 13B ? Justifiez votre réponse.

<u>Question 19.</u> Analysez les résultats de la figure 13.

Des ovocytes II dépellucidés issus de femelles sauvages ou *CD9*$^{-/-}$ ont été incubés en présence de spermatozoïdes issus de mâles sauvages dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Les variations de la concentration intracellulaire en ions calcium Ca^{2+} dans les ovocytes ont été suivies à l'aide du Fura-2, un composé dont les propriétés de fluorescence dépendent de la concentration en Ca^{2+} (Figure 14). On appelle F340 l'intensité d'émission de fluorescence à 510nm après excitation du Fura-2 à 340nm. De même, on appelle F380 l'intensité d'émission de fluorescence à 510nm après excitation du Fura-2 à 380nm.

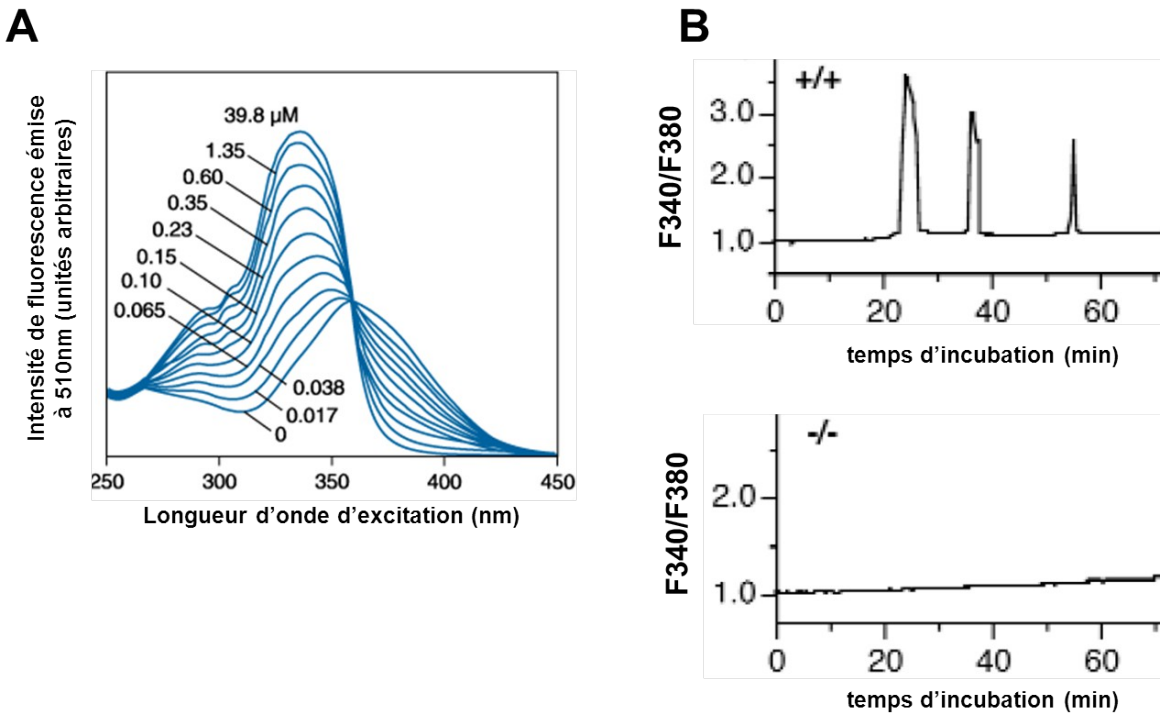


Figure 14. Variations de la concentration intracellulaire en ions calcium dans les ovocytes II sauvages et *CD9*$^{-/-}$ au cours de l'incubation avec des spermatozoïdes.
A : Variation du spectre d'émission du Fura-2 selon la concentration en Ca^{2+}. Chaque courbe correspond au suivi de l'intensité de la fluorescence émise à 510nm par le Fura-2 en fonction de la longueur d'onde d'excitation, à une concentration en Ca^{2+} donnée (indiquée en µM).
B : Variation au cours du temps du rapport F340/F380 dans les ovocytes sauvages (+/+, en haut) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-, en bas) chargés en Fura-2.

Question 20. Comment varie le rapport F340/F380 avec la concentration en Ca^{2+} ? Quel est l'intérêt d'utiliser ce rapport plutôt que la valeur de F340 seule ?

Question 21. Analysez et interprétez la figure 14B. Formulez des hypothèses quant au rôle de CD9 dans le phénomène observé.

Des ovocytes II dépellucidés issus de femelles sauvages ou *CD9*$^{-/-}$ ont été incubés en présence de spermatozoïdes issus de mâles sauvages dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. À l'issue de l'incubation, une solution de DAPI, une molécule fluorescente présentant une affinité forte pour l'ADN et à laquelle la membrane plasmique est imperméable, a été micro-injectée dans le cytosol des ovocytes II. Après observations microscopiques (Figure 15A), les spermatozoïdes fixés à chaque ovocyte et les ovocytes fécondés ont été dénombrés (Figures 15B et 15C). Dans une autre série d'expériences, des mâles sauvages ou *CD9*$^{-/-}$ ont été accouplés à des femelles sauvages ou *CD9*$^{-/-}$ et l'effectif de la portée issue de chaque accouplement a été dénombré (Figure 15D).

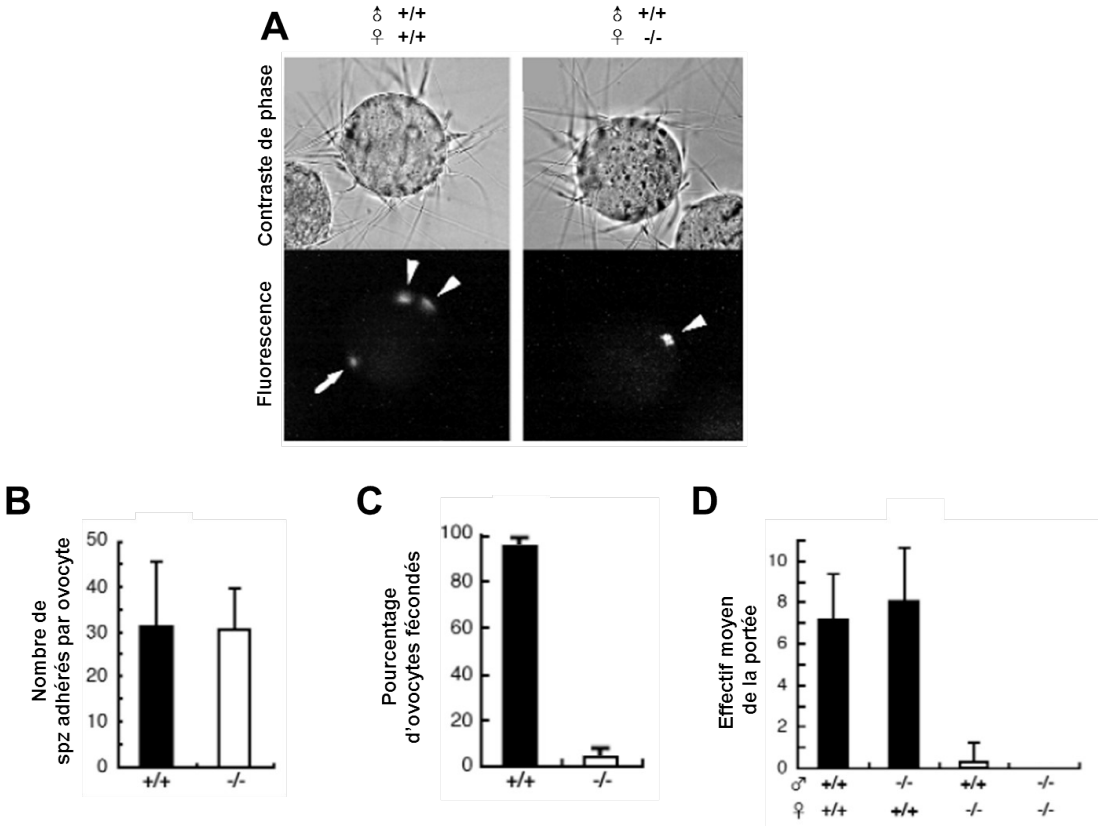


Figure 15. Efficacité de la fécondation chez des souris sauvages ou *CD9*$^{-/-}$.
A : Des ovocytes dépellucidés issus de femelles sauvages (+/+) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-) ont été incubés en présence de spermatozoïdes issus de mâles sauvages, dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Une solution de DAPI a été micro-injectée dans le cytosol des ovocytes avant observation. Les clichés ont été réalisés avant toute expulsion du globule polaire. Les panneaux de chaque colonne représentent le même champ observé en microscopie à contraste de phase ou à fluorescence, respectivement.
B et **C** : Des ovocytes dépellucidés issus de femelles sauvages (+/+) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-) ont été incubés en présence de spermatozoïdes issus de mâles sauvages, dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. À l'issue de l'incubation, les spermatozoïdes (spz) adhérés sur chaque ovocyte (**B**) et les ovocytes fécondés (**C**) ont été dénombrés. La moyenne et les écarts-types sont représentés.
D : Des souris sauvages (+/+) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-) ont été accouplées suivant les combinaisons indiquées et l'effectif de chaque portée a été dénombré. La moyenne et les écarts-types sont représentés.

Question 22. ***D'après vos connaissances et à l'aide de schémas, représentez le devenir du matériel génétique du spermatozoïde et de l'ovocyte au cours de la fécondation.***

Question 23. ***Que permet de visualiser le DAPI dans cette expérience ? Analysez et interprétez la figure 15A.***

Question 24. ***Analysez et interprétez la figure 15B à D. Concluez quant à l'étape (aux étapes) de la fécondation à laquelle (auxquelles) CD9 intervient.***

Des ARN polyadénylés codant la protéine CD9 (mCD9) ont été micro-injectés ou non dans le cytosol d'ovocytes *CD9*$^{-/-}$. Après 20h d'incubation, les ovocytes ont été dépellucidés puis incubés en présence de spermatozoïdes issus de souris *CD9*$^{+/+}$, dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. L'efficacité de la fécondation de ces ovocytes a alors été comparée à celle d'ovocytes issus de souris sauvages ou hétérozygotes *CD9*$^{+/-}$ (Figure 16). À l'issue de l'expérience, l'expression de CD9 dans chaque ovocyte analysé a été vérifiée en microscopie à fluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique de CD9 couplé à une substance fluorescente.

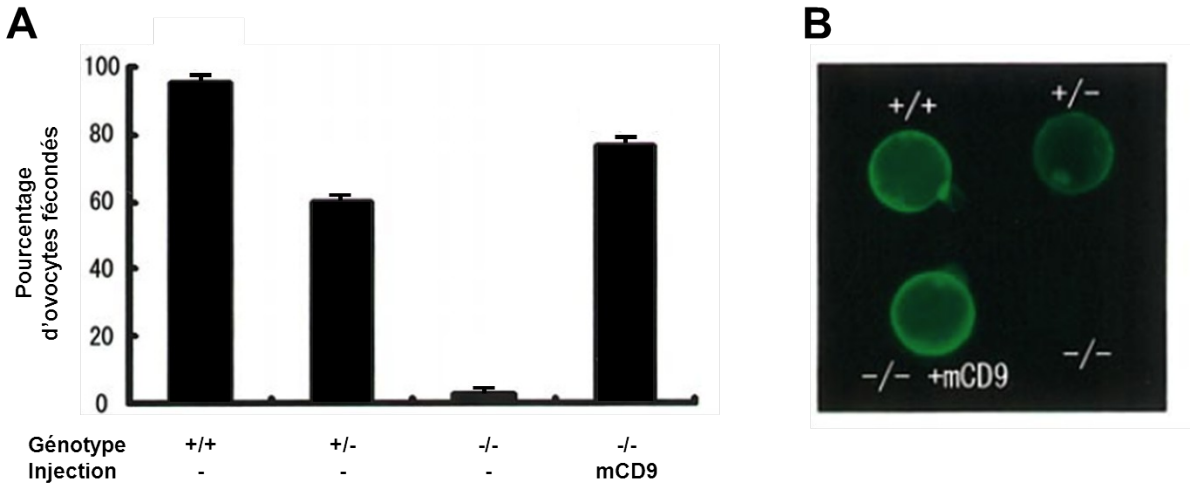


Figure 16. Efficacité de la fécondation d'ovocytes sauvages, *CD9*$^{+/-}$ ou *CD9*$^{-/-}$, avec ou sans injection d'ARN codant CD9 (mCD9).
A : Pourcentage d'ovocytes fécondés. La moyenne et les écarts-types sont représentés.
B : Expression de CD9 dans les cellules analysées en (**A**). À l'issue de l'expérience, les ovocytes sont marqués par un anticorps anti-CD9 couplé à une substance fluorescente (en vert). Chaque image est représentative de l'ensemble des cellules de l'expérience.

Question 25. Qu'est-ce qu'un ARN polyadénylé ? Quel est son devenir après injection dans le cytosol ?

Question 26. Analysez et interprétez les résultats de la figure 16.

On a alors cherché à identifier les causes moléculaires ou cellulaires des observations précédentes. Dans une première approche, la structure membranaire d'ovocytes II dépellucidés issus de souris sauvages ou *CD9*$^{-/-}$ a été analysée en microscopie électronique (Figure 17).

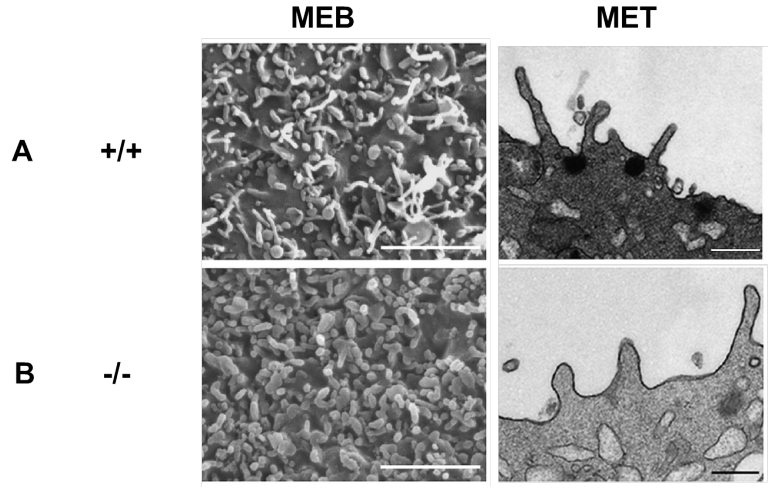


Figure 17. Structure membranaire d'ovocytes issus de souris sauvages ou *CD9*$^{-/-}$.
Observations au MEB (barres d'échelle : 2µm) et au MET (barres d'échelle : 0,5µm) de la surface d'ovocytes II dépellucidés issus de souris sauvages (+/+, **A**) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-, **B**).

Question 27. Comparez la structure membranaire des ovocytes issus de souris sauvages et CD9*$^{-/-}$. *Comment pouvez-vous relier ces observations aux données des figures 14 à 16 ?

Dans une deuxième approche, les propriétés physiques de l'interaction entre un ovocyte et un spermatozoïde ont été mesurées. La procédure expérimentale utilisée est illustrée à la figure 18A.

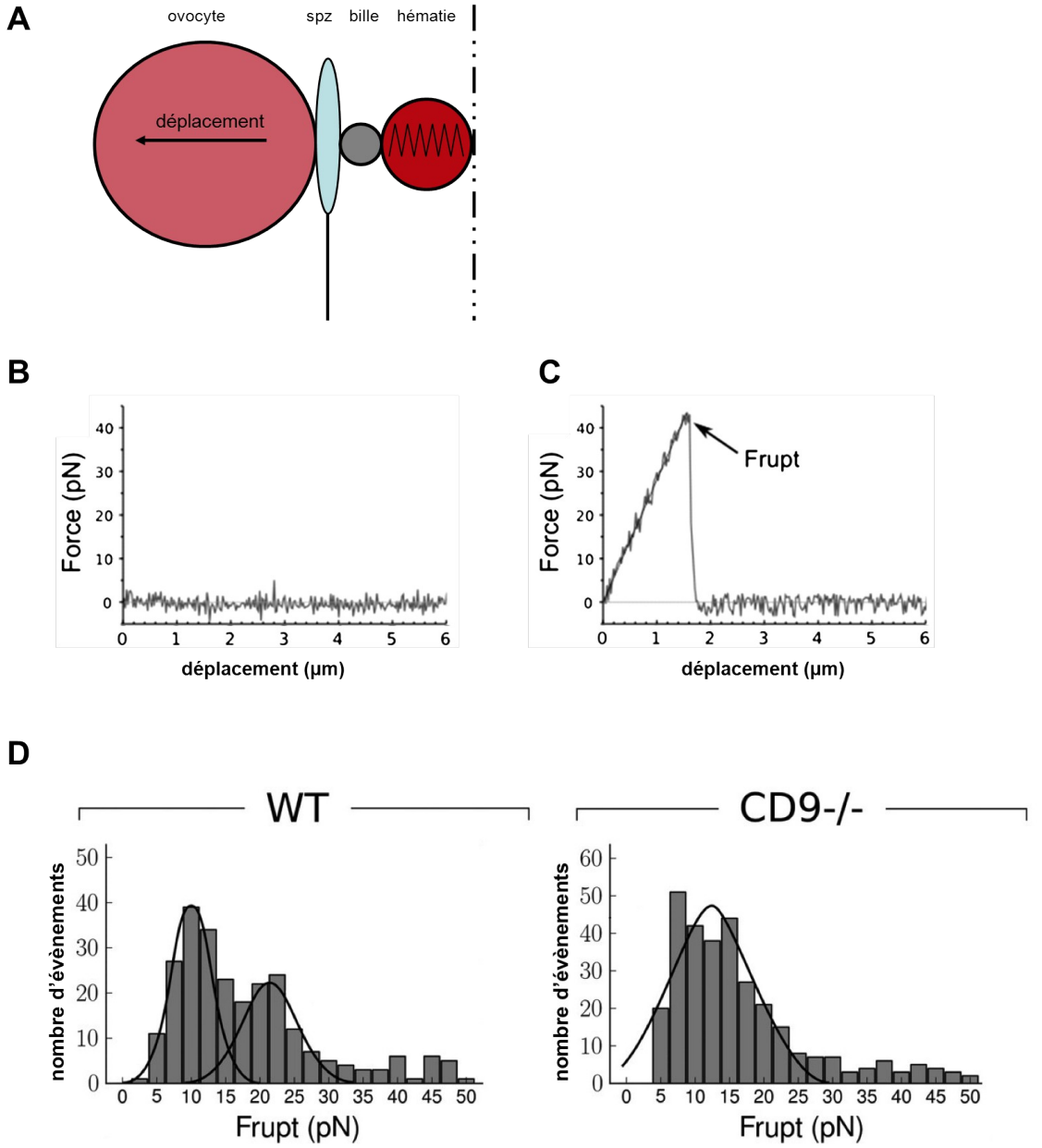


Figure 18. Propriétés physiques de l'interaction entre un spermatozoïde et un ovocyte, et rôle de CD9.
A : Procédure expérimentale. Un spermatozoïde (spz) de souris sauvages dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*, a été fixé de façon irréversible à une bille de verre elle-même fixée à une hématie dont les propriétés élastiques miment celles d'un ressort. Initialement, l'ovocyte est placé au contact du spermatozoïde puis il est éloigné de celui-ci jusqu'à séparation. La force exercée sur l'hématie est mesurée tout au long du déplacement de l'ovocyte.
B : Force mesurée (exprimée en piconewton, pN) en présence d'un ovocyte de Xénope (expérience témoin).
C : Force mesurée en présence d'ovocytes de souris sauvages. La procédure expérimentale a été appliquée 50 fois sur 10 ovocytes différents. La courbe présentée donne le résultat typique d'une de ces mesures. Sur cette courbe, on définit Frupt (exprimée en piconewton, pN) comme la valeur de la force au-delà de laquelle le spermatozoïde et l'ovocyte sont séparés.
D : Histogrammes de la distribution des 500 mesures de Frupt réalisées sur 10 ovocytes issus de souris sauvages (WT) ou 10 ovocytes issus de souris *CD9*$^{-/-}$.

Question 28. A l'aide de schémas, analysez et interprétez les courbes des figures 18B et 18C. Que montrent les résultats obtenus à la figure 18D ?

Dans une troisième approche, des ligands potentiels de CD9 ont été recherchés. Deux candidats appartenant à la superfamille des immunoglobulines ont été examinés :

- **La protéine PSG17**. Dans une première expérience, l'interaction entre PSG17 et CD9 a été analysée (Figure 19A). Dans une deuxième expérience (Figure 19B), des ovocytes II dépellucidés issus de souris sauvages (+/+) ou *CD9*$^{-/-}$ (-/-) ont été incubés en présence de protéines GFP (ou PSG17 purifiées. Dans une troisième expérience, le taux de fécondation en absence ou en présence de PSG17 purifiée en excès a été mesuré (Figure 19C). Enfin, l'expression de PSG17 n'a pas pu être détectée dans les spermatozoïdes.

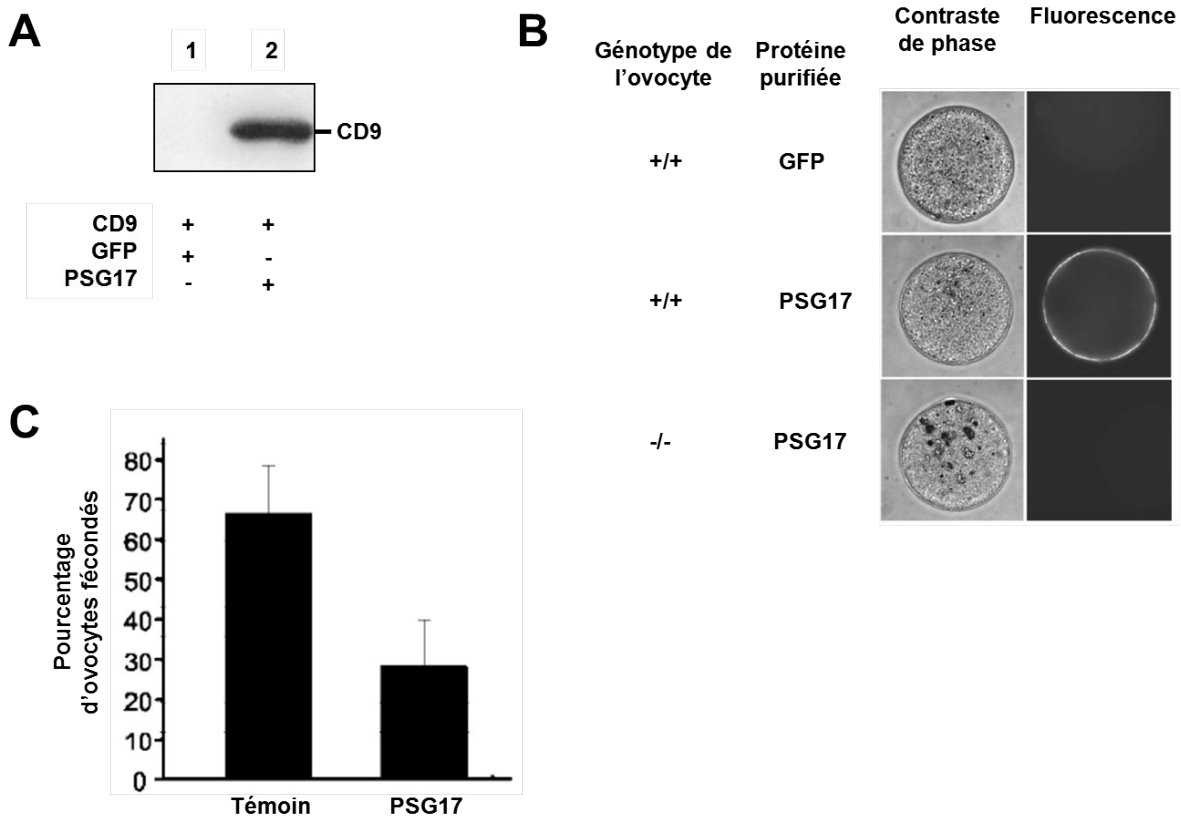


Figure 19. Rôle potentiel de PSG17 dans la fécondation.
A : Détection de CD9 par un anticorps spécifique dans chacune des conditions testées. Des billes d'agarose ont été recouvertes de GFP (une protéine dont on sait qu'elle n'interagit pas avec CD9, condition 1) ou de PSG17 (condition 2). Les billes ont ensuite été incubées en présence de protéines CD9 purifiées. Après plusieurs lavages, les protéines restées fixées ont été détachées des billes, séparées par électrophorèse et analysées en utilisant un anticorps spécifique de CD9.
B : Observation des ovocytes en microscopie à contraste de phase et à fluorescence. Les ovocytes ont été incubés en présence de la protéine purifiée indiquée, puis lavés. La présence de protéines GFP et de PSG17 fixées aux ovocytes a alors été recherchée par fluorescence.
C : Efficacité de la fécondation en absence ou en présence de PSG17 purifiée en excès. Des ovocytes II dépellucidés issus de souris sauvages ont été incubés en absence (Témoin) ou en présence de PSG17 purifiée en excès, puis en présence de spermatozoïdes issus de souris sauvages, dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Le taux de fécondation a été mesuré, et les moyennes et écarts-types sont représentés.

- **La protéine Izumo**. On a tout d'abord recherché l'expression de cette protéine dans différents tissus et organes de souris à l'aide d'un anticorps spécifique d'Izumo (Figure 20A). Ensuite, on a cherché plus spécifiquement à détecter Izumo dans les spermatozoïdes (Figure 20B). Enfin, des expériences similaires à celles présentées dans la figure 15 ont été réalisées (Figure 20C et D) : des mâles hétérozygotes *Izumo*$^{+/-}$ (+/-) ou homozygotes *Izumo*$^{-/-}$ (-/-) ont été accouplés à des femelles sauvages (+/+) ou homozygotes *Izumo*$^{-/-}$ (-/-) et l'effectif de la portée issue de chaque accouplement a été dénombré. Parallèlement, des ovocytes II dépellucidés issus de femelles sauvages ont été incubés en présence de spermatozoïdes issus de mâles hétérozygotes *Izumo*$^{+/-}$ ou homozygotes *Izumo*$^{-/-}$ dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. À l'issue de l'incubation, une solution de DAPI a été micro-injectée dans le cytosol des ovocytes II.

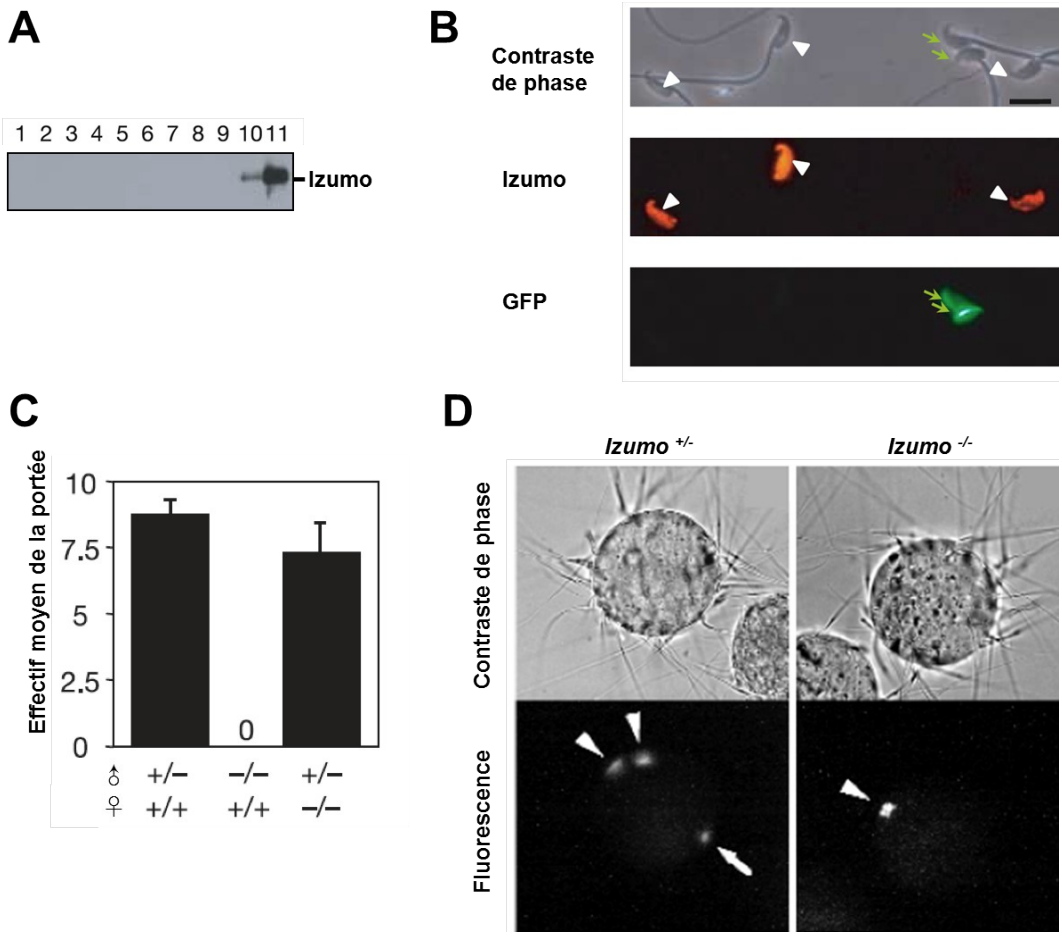


Figure 20. Rôle potentiel d'Izumo dans la fécondation.
A : Détection de la protéine Izumo dans différents tissus ou organes de souris à l'aide d'un anticorps spécifique d'Izumo. Les tissus et organes testés sont les suivants : cerveau (1), cœur (2), thymus (3), rate (4), poumon (5), foie (6), muscle (7), rein (8), ovaire (9), testicule (10), sperme (11).
B : Immunomarquage de la protéine Izumo (en rouge) dans des spermatozoïdes issus de souris transgéniques qui expriment la GFP dans les acrosomes intacts exclusivement. Un mélange de spermatozoïdes ayant ou non subi la réaction acrosomique a été incubé en présence d'un anticorps spécifique d'Izumo couplé à une substance fluorescente (rouge). Dans les conditions de l'expérience, les anticorps ne peuvent se fixer qu'à des protéines exposées à la surface des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes ont alors été observés en microscopie à contraste de phase et à fluorescence.
C : Des mâles hétérozygotes *Izumo*$^{+/-}$ ou homozygotes *Izumo*$^{-/-}$ ont été accouplés à des femelles sauvages (+/+) ou homozygotes (-/-). L'effectif de la portée issue de chaque accouplement a été dénombré et la moyenne ainsi que les écarts-types sont représentés.
D : Observation en microscopie à contraste de phase et à fluorescence d'ovocytes issus de souris sauvages dans le cytosol desquels on a micro-injecté du DAPI après incubation en présence de spermatozoïdes issus de mâles hétérozygotes *Izumo*$^{+/-}$ ou homozygotes *Izumo*$^{-/-}$, dont on a préalablement induit la capacitation et la réaction acrosomique *in vitro*. Les panneaux de chaque colonne représentent le même champ observé en microscopie à contraste de phase ou à fluorescence, respectivement.

<u>Question 29.</u> Organisez les <u>conclusions</u> que vous tirerez des figures 19 et 20 dans un tableau comparatif (une analyse détaillée des résultats n'est pas attendue) puis argumentez quant à l'implication potentielle de PSG17 et d'Izumo dans la fécondation.

<u>Question 30.</u> À l'issue de l'ensemble des expériences présentées, résumez à l'aide d'un schéma les rôles de CD9 dans la fécondation. Vous pouvez y faire figurer les hypothèses à confirmer pour valider ce modèle.

FIN DE L'EPREUVE