BCPST 2 Saint-Louis 2025-26 Devoir N°3

SVT, DOCUMENTS – Biologie : Identification d'acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris (ENS 2013 partiel).

Identifier les acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris et en caractériser le(s) mode(s) d'action.

Q16) Analysez la figure 11. En quoi ces données justifient-elles le fait que CD9 est un acteur potentiel de la fécondation ? /2

Compréhension du protocole : Le traitement des ovocytes II et des spermatozoïdes permet leur interaction physique.

Observations : La figure 11.A montre deux régions dans la surface de l'ovocyte II. C'est confirmé par les figures 11.B et 11.C. La figure 11.B montre des évaginations membranaires.

Observations & Interprétations : La figure 11.D montre que les spermatozoïdes se fixent à l'ovocyte II uniquement dans la zone présentant les évaginations membranaires.

Observations & Interprétations : La figure 11.E révèle spécifiquement la présence de la protéine CD9. Celle-ci est localisée dans la zone montrant des évaginations membranaires de l'ovocyte II et la fixation des spermatozoïdes. Accessible par un anticorps, c'est une protéine membranaire (fournie dans l'énoncé).

Bilan : Ces données laissent penser que la protéine membranaire CD9 est un acteur potentiel de la fécondation.

Remarque : Aucune certitude, car la corrélation n'a pas été vérifiée biologiquement. Ce peut être une coïncidence… même si cela ne donnerait sans doute pas lieu à la première question d'un sujet.

Q17) 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 ? /1

Compréhension du protocole : Les figures 12.A et 12.B se différencient par les particules d'or visibles sous la forme de points noirs. Seule la présence d'un anticorps anti-CD9 permet la fixation de l'anticorps secondaire anti-anticorps anti-CD9.

Observations : Les figures 12.A et 12.C montrent que la protéine CD9 est spécifiquement / uniquement localisée au niveau des évaginations membranaires.

Bilan : On propose que la protéine transmembranaire CD9 exposée vers le milieu extérieur est un acteur de la fixation des spermatozoïdes. En cela, c'est un acteur potentiel de la fécondation.

Q18) 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 13.B ? Justifiez votre réponse. /2

Si la recombinaison a eu lieu correctement, les lignées de souris expriment le gène de résistance à l'antibiotique. Traitées avec l'antibiotique, seules les cellules embryonnaires recombinantes survivent.

La recombinaison peut se produire de façon accidentelle / non spécifique dans des génomes, pas du tout à l'endroit souhaité. Il y a alors intégration du transgène avec les deux gènes, et pas que le gène de résistance à l'antibiotique. Ainsi, ces lignées produisent la toxine diphtérique et tue ces embryons.

Bilan : Grâce à ces deux gènes, les cultures de cellules souches réalisées en présence d'antibiotique permettront d'obtenir uniquement les cellules recombinées, ne comportant pas le gène CD9.

Remarque : Ce sujet a été conçu avant la technologie CRISPR-Cas9.

Compréhension du protocole : L'ADN génomique des différentes lignées est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI, et la position des sites de restriction est fourni. On calcule alors la taille moléculaire des fragments produits par cette digestion chez les lignées sauvages et les lignées recombinées.

La digestion de l'ADN d'une lignée sauvage produit des fragments de 15 kb.

La digestion de l'ADN d'une lignée recombinante produit des fragments de 2 kb, 6,1 kb et 4,3 kb.

Q19) Analysez les résultats de la figure 13. */3*

► Figure 13.B :

Observations & Interprétations : Le sauvage montre une bande ayant peu migré. C'est le fragment d'ADN de 15 kb.
Le recombinant homozygote montre une bande ayant beaucoup migré. On s'attendait à voir deux bandes. On propose que celle visible est la plus lourde (6,1 kb). L'hétérozygote présente les deux types de bandes, ce qui est attendu.

► Figure 13.C & 13.D :

Observations & Interprétations : Les bandes révélant l'ARN de GAPDH sont des témoins de charge. De même intensité, elles attestent que la quantité d'ARN déposée est la même pour les 3 puits.
La bande révélant l'ARN de CD9 est très intense chez l'homozygote sauvage, peu intense chez l'hétérozygote et absente chez l'homozygote knock-out.
On applique le même raisonnement pour le témoin de charge Actine, mais pour un dépôt de protéine.
Les observations ont la même signification : seul l'homozygote recombinant n'exprime pas la protéine CD9.

Bilan : L'inactivation d'un gène et donc des produits d'expression n'est effective que chez les homozygotes recombinants.

Q20) 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 ? */2*

Observations : La courbe témoin correspond à une absence de Ca^{2+}. On observe une valeur faible de fluorescence à 340 nm et une valeur élevée de fluorescence à 380 nm.
Lorsqu'on ajoute du Ca^{2+}, la fluorescence à 340 nm augmente et celle à 380 nm décroît par rapport au témoin. De plus, les tendances des amplitudes de ces variations augmentent au fur et à mesure que la concentration en Calcium augmente.

Interprétation : L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} induit une augmentation de la valeur du numérateur et une diminution de celle du dénominateur.

Bilan : La valeur du rapport F340 / F380 est plus grande que celle de F340 seule. C'est un élément positif lors d'une mesure expérimentale.

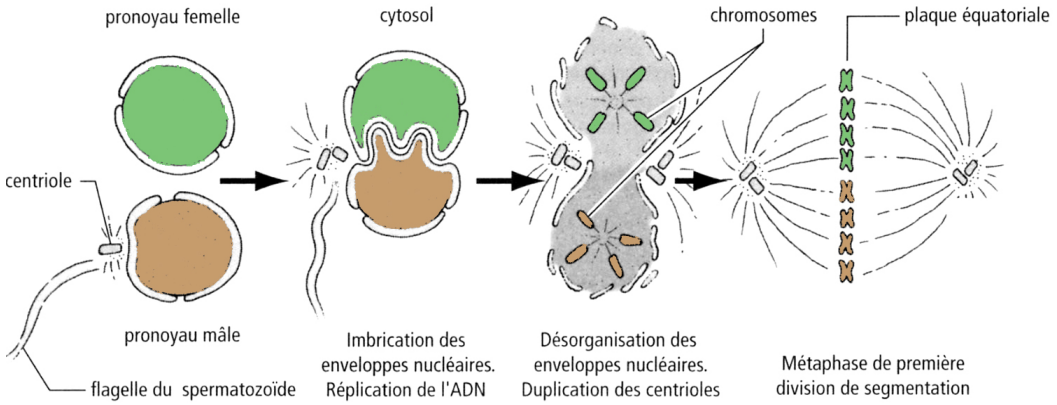
Q21) Analysez et interprétez la figure 14B. Formulez des hypothèses quant au rôle de CD9 dans le phénomène observé. */1*

Observations : Les ovocytes II exprimant la protéine CD9 montrent des pulses de Calcium à partir de 20 minutes de mises en présence de spermatozoïdes. Ils se répètent toutes les 15 minutes environ. Les pics de Ca^{2+} sont absents des homozygotes recombinants.

Interprétation : CD9 est nécessaire à l'induction des pics de Calcium dans le cytosol ovocytaire.

Bilan : Le métabolisme de l'ovocyte II est activé (pics de Ca^{2+}) grâce à la présence de la protéine CD9.

Q22) 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. */2*



Devenir du matériel génétique du spermatozoïde et de l'ovocyte au cours de la fécondation

Q23) Que permet de visualiser le DAPI dans cette expérience ? Analysez et interprétez la fig 15A. /1

Le DAPI se fixant spécifiquement à l'ADN, il révélera la localisation de molécules d'ADN.

Observations : La mise en contact de gamètes sauvages montre deux taches, correspondant aux deux pronoyaux. On observe une seule tache lorsque l'ovocyte est recombinant CD9 $^{-/-}$.

Interprétation : La fusion des membranes des gamètes ne s'est pas produite et l'ADN mâle n'a pu être internalisé dans le cytosol de l'ovocyte II.

Bilan : On établit que la protéine membranaire CD9 est un acteur indispensable à la fécondation.

Q24) Analysez et interprétez la figure 15B à D. Concluez quant à l'étape (aux étapes) de la fécondation à laquelle (auxquelles) CD9 intervient. /3

► Figure 15.B :

Observations & Interprétations : Le nombre de spermatozoïdes fixés à un ovocyte est sensiblement le même chez l'ovocyte sauvage et l'ovocyte *CD9* $^{-/-}$. La protéine CD9 n'intervient pas dans la fixation spermatozoïde – ovocyte.

► Figure 15.C :

Observations & Interprétations : Le pourcentage d'ovocytes *CD9* $^{-/-}$ fécondés est proche de 0, alors que les ovocytes sauvages constituent le témoin à 100 %. La protéine membranaire CD9 est un acteur indispensable à la fécondation.

► Figure 15.D :

Observations & Interprétations : Les ovocytes sauvages constituent la référence. Ils permettent la formation de portée de 7 souriceaux. Leur mise en présence avec des spermatozoïdes *CD9* $^{-/-}$ n'a pas d'effet significatif sur l'effectif de la portée. Les ovocytes *CD9* $^{-/-}$ mis en présence de spermatozoïdes sauvages ne permettent la formation d'aucun souriceau. Donc la protéine CD9 est ovocyte-spécifique et est un acteur indispensable à la fécondation.

Q25) Qu'est-ce qu'un ARN polyadénylé ? Quel est son devenir après injection dans le cytosol ? /1

Un ARN polyadénylé est un ARN auquel a été ajouté, **à son extrémité 3'**, une longue série de ribonucléotides A. Cela confère allonge sa durée de vie, du fait de la présence de RNAses dans le cytosol des cellules eucaryotes. En conséquence, cela augmente sa probabilité d'être traduit en peptide.

Q26) Analysez et interprétez les résultats de la figure 16. /3

► Figure 16.A :

Observations & Interprétations : Les ovocytes sauvages et hétérozygotes sont fécondés. L'hétérozygotie montre que la quantité de protéine CD9 exprimée est un facteur positif à la fécondation.
Les ovocytes *CD9* $^{-/-}$ ne permettent aucune fécondation et constituent le témoin négatif.
Les ovocytes *CD9* $^{-/-}$ ayant reçu une injection d'ARNm *mCD9* présentent un pourcentage de fécondation proche du sauvage. Le phénotype sauvage a presque été restauré par l'injection.
La protéine CD9 est donc indispensable à la fécondation.

► Figure 16.B :

La fluorescence révèle la présence de protéine CD9. On observe une fluorescence dans l'embryon de génotype *CD9* $^{-/-}$ *mCD9*, preuve qu'il y a traduction de l'ARNm injecté.

Bilan : La protéine CD9 intervient directement dans la fécondation.
Le défaut de fécondation était bien dû au défaut d'expression de CD9 et non à une conséquence indirecte de l'invalidation de CD9 dont on aurait vu ici l'effet.

Q27) 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 ? */2*

Observations : Les évaginations membranaires/ microvillosités ovocytaires semblent de diamètre plus grand et moins longues chez les ovocytes *CD9* $^{-/-}$.

Interprétation : La mise en place de microvillosités de dimensions spécifiques est indispensable à la fécondation.

Bilan : La fécondation repose sur une étape structurale – entre autre – permise par la présence (figure 15.C) de la protéine CD9 au niveau des microvillosités ovocytaires (figure 12). Elle pourrait intervenir dans une fusion des membranes, rendue impossible si les microvillosités sont trop courtes.

Q28) À l'aide de schémas, analysez et interprétez les courbes des figures 18.B et 18.C. Que montrent les résultats obtenus à la figure 18.D ? */3*

La figure 18.B est un témoin négatif. L'ovocyte de Xénope n'adhère pas au spermatozoïde de souris.

La figure 18.C montre qu'il existe une adhérence entre ovocytes et spermatozoïdes.

La figure 18.D montre que des ovocytes sauvages adhèrent à des spermatozoïdes. Mais on observe deux lots : une rupture pour une force faible (10 pN) et une rupture pour une force plus importante (22 pN, soit × 2,5). On associe chaque lot à une interaction faible (non spécifique ?) et une adhérence forte, spécifique.
Des ovocytes *CD9* $^{-/-}$ adhèrent à des spermatozoïdes et la force nécessaire à la rupture est de 10 pN. Cette force de rupture de 10 pN correspond à une interaction faible (non spécifique?).

Bilan : La protéine CD9 est nécessaire à une adhérence « forte » du spermatozoïde à l'ovocyte.

Q29) Organisez les conclusions 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. */4*

► 19.A : La protéine PSG17 interagit avec la protéine CD9 de façon spécifique (prouvée par le lot GFP).
► 19.B : La protéine PSG17 n'interagit qu'avec la protéine CD9 (prouvée par le lot *CD9* $^{-/-}$).
► 19.C : On effectue une expérience de compétition, en ajoutant la protéine PSG17 en excès. La diminution du pourcentage d'ovocytes confinés par rapport au témoin montre que la protéine PSG17 en excès s'est fixé aux récepteurs ovocytaires CD9. La protéine PSG17 interagit spécifiquement avec la protéine CD9.
► 20.A : La protéine Izumo est exprimée dans le testicule, au niveau du sperme (ce qui explique la bande plus intense pour ce dernier cas).
► 20.B : La fluorescence verte n'est pas localisée aux mêmes endroits que la couleur rouge. Donc la protéine Izumo est localisée au niveau de la membrane interne de l'acrosome. Seuls les spermatozoïdes ayant effectué une réaction acrosomique peuvent être révélés par l'anticorps anti-Izumo.
► 20.C : Le lot 1 montre que la portée est maximale pour un mâle hétérozygote *Izumo* $^{+/-}$. Si le mâle est homozygote *Izumo* $^{-/-}$, alors il n'y a aucune fécondation. L'absence d'expression de la protéine Izumo chez la femelle n'a aucune incidence sur la fécondation (lot 3 *vs* lot 1). Donc, la protéine Izumo est exprimée uniquement par les spermatozoïdes et est indispensable à la fécondation.
► 20.D : La fusion des membranes des gamètes ne s'est pas produite chez les mâles *Izumo* $^{-/-}$ et l'ADN mâle n'a pu être internalisé dans le cytosol de l'ovocyte II. Donc, la protéine Izumo est un acteur indispensable à la fécondation.

Caractéristiques de la protéine	**PSG17**	**Izumo**
Localisation	non détectée dans spermatozoïdes	membrane interne de l'acrosome
Fixation avec	CD9	?
Fonction	fusion ovocyte – spermatozoïde ? (19.C)	Fusion ovocyte – spermatozoïde (20.D)

Q30) 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. /5

Éléments attendus :

1. rôle de CD9 dans l'architecture microvillaire (hypothèse selon laquelle CD9 exercerait un rôle direct de protéine d'ancrage du cytosquelette d'actine ou un rôle indirect par l'interaction avec des protéines d'ancrage du cytosquelette) ;

2. lien (à confirmer) entre architecture microvillaire et fusion des membranes ;

3. rôle de CD9 dans la mise en place d'interactions fortes avec les spermatozoïdes (hypothèses : effet direct par l'interaction avec un ligand présent à la surface du spermatozoïde ou indirect par le contrôle de l'architecture membranaire) ;

4. lien (à confirmer) entre la mise en place d'interactions fortes et la fusion ;

5. rôle de CD9 dans l'interaction avec un ligand présent à la surface du spermatozoïde nécessaire à la fusion (les candidats étant Izumo et PSG17).