

L'épreuve de biologie est constituée de 3 parties totalement indépendantes.

Partie	Page	Thème	Durée conseillée
Synthèse	3	Interactions entre les cellules voisines	2 heures
A	4	Régénération	2 heures 30
B	19	Croissance du tube pollinique	1 heure 30

Chacune des parties A et B comporte deux sous-parties (A1 et A2 ; B1 et B2) largement indépendantes.

SUJET DE SYNTHESE

Les interactions entre cellules voisines

Des cellules sont considérées comme voisines si la distance entre elles est inférieure à 100 micromètres.

L'étude se limitera à quelques exemples significatifs pris chez les organismes de Vertébrés aussi bien lors de leur développement embryonnaire que lors de leur fonctionnement à l'état adulte.

PARTIE A : Etude histologique, cellulaire et moléculaire de la régénération

Partie A1

Les questions 1 à 11, 12 à 18 et 19 à 23 forment trois ensembles indépendants.

La régénération est le phénomène physiologique défini par la repousse d'une structure anatomique complexe après son amputation. Cette propriété a été étudiée de façon intensive chez les amphibiens qui peuvent régénérer un membre ou une queue à l'âge adulte.

Nous allons nous attacher au cours des différentes expériences suivantes à comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce mécanisme.

Dans une première expérience, des têtards provenant de 11 femelles ont été soumis à l'amputation de 50% de leur queue aux stades 42, 46 et 48 (de 3 à 7 jours après la ponte). Des images représentatives sont données figure 1.



Figure 1 : Des têtards ont été soumis à l'amputation de 50% de leur queue après la naissance à différents stades de développement et ont été observés après 7 jours. Stade 42 (A), stade 46 (B) et stade 48 (C). Les têtes de flèches blanches montrent le niveau de l'amputation subit par la queue.

Quand toutes les données ont été rassemblées et les erreurs standards calculées, 68% des queues au stade 42 ont été régénérées ($\pm 6\%$, $N = 299$), 7% au stade 46 ($\pm 2\%$, $N = 392$) et 67% au stade 48 ($\pm 8\%$, $N = 270$), où N représente le nombre de têtards mesurés.

Question 1. Interprétez cette expérience.

Les mécanismes génétiques impliqués dans la mise en place de la queue lors du développement embryonnaire font intervenir les voies de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein) pour la formation des somites au stade bourgeon caudal. La voie de signalisation du BMP active plusieurs gènes cibles en aval, dont le gène codant le facteur de transcription *Msx1*. L'expression du gène *Msx1* lors de la régénération après amputation et lors du développement de la queue a été analysée par hybridation *in situ* (Figure 2).

L'hybridation *in situ* (HIS) permet de détecter l'expression, grâce à une sonde ADN complémentaire, de l'ARNm du gène *Msx1* dans des cellules ou des tissus fixés. Le marquage de la sonde est ensuite révélé par une réaction enzyme-substrat faisant apparaître un produit bleu foncé à l'endroit où la sonde s'est hybridée.

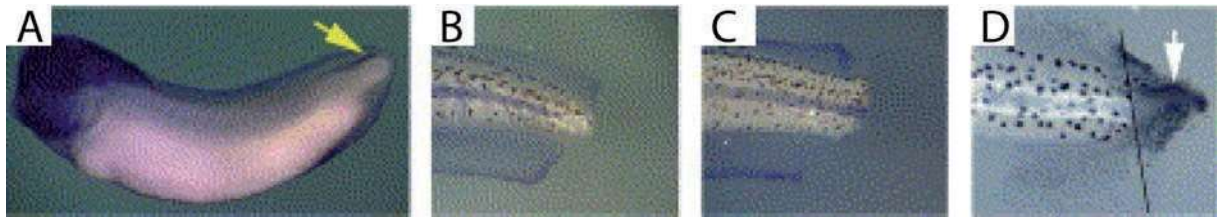


Figure 2 : Hybridations *in situ* du gène *Msx1*. Les flèches indiquent les zones du marquage spécifique de *Msx1*. A. Vue latérale de l'embryon au stade 30 orienté avec l'extrémité antérieure à gauche. B. Queue de têtard amputée à 50% au stade 46 et fixée 3 jours plus tard. C. Queue de têtard amputée à 50% au stade 48 et fixée immédiatement. D. Queue de têtard amputée à 50% au stade 48 et fixée 3 jours plus tard. Le niveau d'amputation est indiqué par la ligne noire. La sonde utilisée pour effectuer l'hybridation sur ces 4 photographies est révélée avec un substrat enzymatique faisant apparaître un produit bleu foncé.

Question 2. Commentez les résultats de cette expérience.

Une approche transgénique a ensuite été utilisée. Le promoteur du gène *HSP70* de xénope, induit quand la température atteint 34°C, a été utilisé pour contrôler l'expression d'un transgène. On utilise comme contrôle des têtards transgéniques dans lesquels le promoteur du gène *HSP70* permet l'expression d'une protéine rapporteur (Figure 3). On dispose d'un anticorps spécifique contre cette protéine.

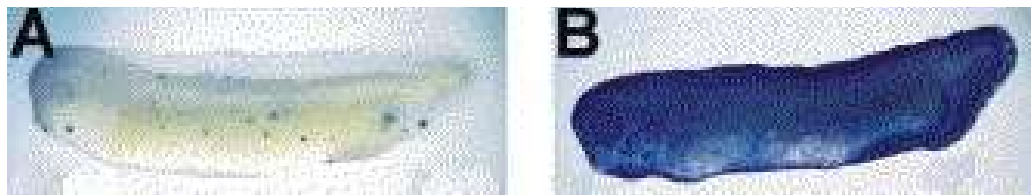


Figure 3 : Embryons transgéniques exprimant une protéine étiquetée Myc sous le contrôle du promoteur du gène *HSP70*, et ayant subi (B) ou non (A) un traitement à 34°C pendant 30 minutes au stade 14. L'expression du transgène est visualisée par immunomarquage à l'aide d'un anticorps spécifique dont la présence est révélée à l'aide d'une réaction enzymatique faisant apparaître un produit bleu foncé sur les photographies.

Question 3. Décrivez les résultats obtenus dans cette expérience.

Question 4. Quel est l'intérêt de placer les gènes dont on veut analyser l'expression sous le contrôle d'un promoteur inducible ?

Des animaux transgéniques ont été engendrés portant deux transgènes l'un à côté de l'autre intégrés dans le génome. Le premier transgène comporte une forme active du récepteur BMP (appelé *Alk3*) sous le contrôle du promoteur du gène *HSP70*. Le second transgène porte un marqueur qui exprime une protéine fluorescente, la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur de la *Crystalline*. Ce promoteur permet l'expression des gènes dans le cristallin au niveau de l'œil.

Question 5. Quel est l'intérêt du transgène *GFP-Cristalline* ?

On obtient à partir de la même ponte un mélange d'embryons ayant ou non intégré le transgène. Les têtards non transgéniques sont utilisés pour la suite des expériences comme contrôle de chaque expérience.

Question 6. Quel est l'intérêt d'utiliser ce contrôle ?

Les têtards sont placés 3 heures à 34°C avant l'amputation de 50% de la queue au stade 46. Des traitements supplémentaires de 3 heures à 34°C sont effectués chaque jour pendant 3 jours après l'amputation. Après 7 jours, l'étendue de la régénération a été mesurée et les

mesures regroupées en trois classes. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Transgène	Régénération			N
	Aucune	Partielle	Totale	
<i>HSP70-Alk3- Cry-GFP</i>	3	18	11	32
Aucun	46	14	3	63

Tableau 1 : Résultats du comptage des processus de régénération parmi l'ensemble des N têtards analysés.

Question 7. Pourquoi continuer à traiter les têtards plusieurs fois 3 heures à 34°C une fois l'amputation effectuée ?

Question 8. Interpréter les résultats présentés dans le tableau 1.

La protéine Msx1 est un répresseur transcriptionnel pour lequel une forme constitutivement active appelée *eveMsx1* existe. On dispose d'une construction *HSP70-eveMsx1- Cry-GFP* sous le contrôle du promoteur du gène *HSP70* où le transgène *eveMsx1* remplace *Alk3*. On effectue la même expérience que précédemment. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Transgène	Régénération			N
	Aucune	Partielle	Totale	
<i>HSP70-eveMsx1- Cry-GFP</i>	4	10	9	23
Aucun	36	5	2	43

Tableau 2 : Résultats du comptage des processus de régénération parmi l'ensemble des N têtards analysés.

Question 9. Interpréter les résultats obtenus dans le tableau 2.

Un autre transgène a été construit avec la une forme tronquée de Msx1 dans lequel le domaine N-terminal a été supprimé (*ΔMsx1*). La même expérience que précédemment a été reproduite. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Transgène	Régénération			N
	Aucune	Partielle	Totale	
<i>HSP70- ΔMsx1- Cry-GFP</i>	28	0	0	28
Aucun	53	0	0	53

Tableau 3 : Résultats du comptage des processus de régénération parmi l'ensemble des N têtards analysés.

Question 10. Interpréter les résultats obtenus dans le tableau 3.

Question 11. Quels mécanismes pourriez-vous proposer pour expliquer le phénomène observé au stade 46 ?

À l'échelle cellulaire, lors de la régénération d'un membre, les cellules musculaires multinuclées sont capables de se fragmenter en des cellules mononucléaires viables qui vont ensuite contribuer à la régénération. Ce processus est appelé la cellularisation. Un système de culture a été établi, dans lequel des myofibres striées sont dissociées à partir du membre de la salamandre et déposées sur un support de culture auquel elles adhèrent et où elles peuvent être observées au microscope (Figure 4).



Figure 4 : Photographie d'une myofibre striée dissociée à partir de la musculature d'un membre d'une larve de salamandre et qui a adhéree sur le fond d'une boîte de culture.

Question 12. Décrivez la figure 4.

Les myofibres en culture sont suivies à l'aide d'un marqueur cytoplasmique fluorescent après dissociation. Quelques fibres sont ensuite injectées à l'aide d'une micropipette dans le bourgeon en régénération d'un membre amputé de salamandre. Les membres en régénération sont ensuite sectionnés 3 jours plus tard et observés au microscope à fluorescence (Figure 5).

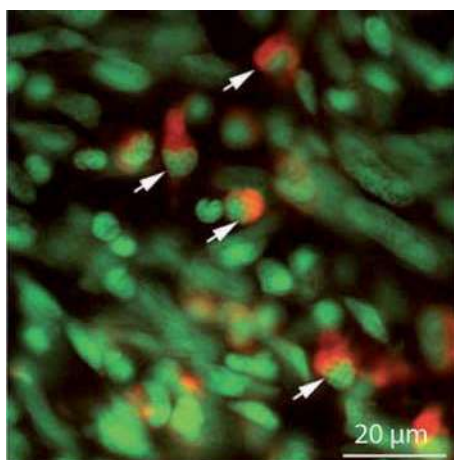


Figure 5 : Section de membre observée 72h après l'implantation de myofibres marquées avec un marqueur cyto-plasmique orange. La section de membre a également été marquée avec un colorant qui marque les noyaux en vert. Certaines cellules doublement marquées sont indiquées par une flèche blanche.

Question 13. Décrivez la figure 5. Que pouvez-vous en conclure sur les phénomènes cellulaires intervenant au niveau des cellules musculaires lors de la régénération d'un membre amputé chez la salamandre ?

Après 48h, les myofibres en culture dissociées montrent plusieurs changements dans leur morphologie. Ces changements ont été observés en micro-injectant, dès le début de la mise en culture, à l'intérieur de myofibres individuelles un traceur du lignage cellulaire le « Texas red (TR)-dextran ». Ce traceur est composé du Dextran, une molécule de 70 kDa qui n'est pas transféré à travers les jonctions communicantes, associé de façon covalente au marqueur fluorescent rouge le « Texas Red ». Les structures observées sont visibles sur la figure 6.

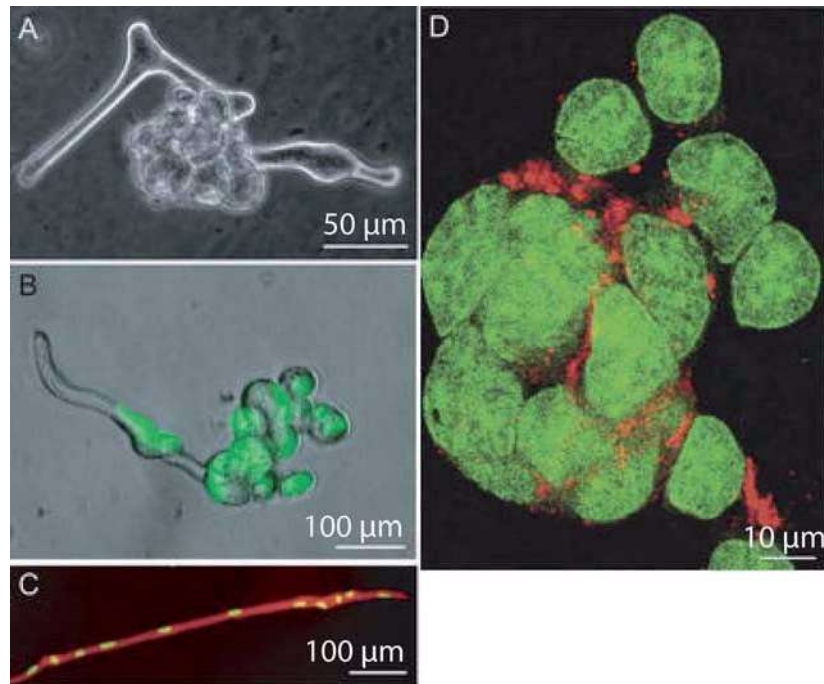


Figure 6 : A. Photographie d'une myofibre 48 heures après son adhérence à la surface de la boîte de culture. B. Photographie prise au microscope d'une myofibre 72 heures après son adhésion. La cellule a été marquée avec un marqueur fluorescent vert qui colore le noyau. C. Photographie prise au microscope à fluorescence 24 h après la microinjection du « TR-dextran ». La cellule a été marquée avec le marqueur fluorescent vert qui colore les noyaux. D. Photographie prise au microscope à fluorescence d'une colonie formée à partir d'une seule myofibre injectée 48 h plus tôt avec le marqueur « TR-dextran ». Les cellules ont été marquées avec le marqueur fluorescent vert qui colore les noyaux.

Question 14. Décrivez les résultats de la figure 6.

Les cultures de myofibres sont analysées 48 h après leur adhérence sur la boîte de culture par hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde marquée, complémentaire de l'ARNm du gène *Msx1* de salamandre. Les résultats obtenus sont présentés figure 7.

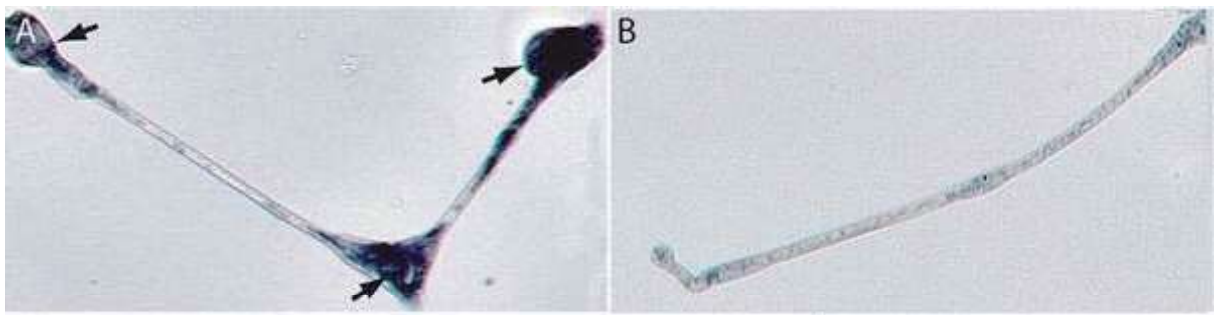


Figure 7 : Photographie après 48 h de cultures de myofibres dissociées. L'expression de l'ARNm du gène *Msx1* est détecté par hybridation *in situ*. La sonde utilisée pour effectuer l'hybridation est révélée avec un substrat enzymatique faisant apparaître un produit bleu foncé. A. Vue d'une myofibre qui montre des parties en forme d'amas globulaire (flèches). B. Photographie d'une myofibre qui conserve un aspect normal. Les deux images proviennent de la même culture.

Question 15. Interprétez les résultats obtenus dans cette expérience.

Une approche utilisant des morpholinos a été employée. Un morpholino est une courte séquence d'ADN complémentaire d'un ARN messager et qui va bloquer sa traduction. Ici, les

cultures de myofibres sont mises en présence de trois types de morpholinos différents. Le premier est un morpholino contrôle qui cible un gène non essentiel du génome de la salamandre, appelé « oligo standard ». Le second est un morpholino anti-sens dont la séquence est complémentaire du site d'initiation de la traduction de *Msx1*, appelé « oligo anti-sens *Msx1* » et le troisième est le même morpholino que le second mais dont la séquence a été inversée, il est appelé « oligo *Msx1* inversé ». Après 24 h, on comptabilise le nombre de myofibres « normales » et le nombre de myofibres « actives » qui présentent des agrégats nucléaires. Les résultats sont donnés figure 8.

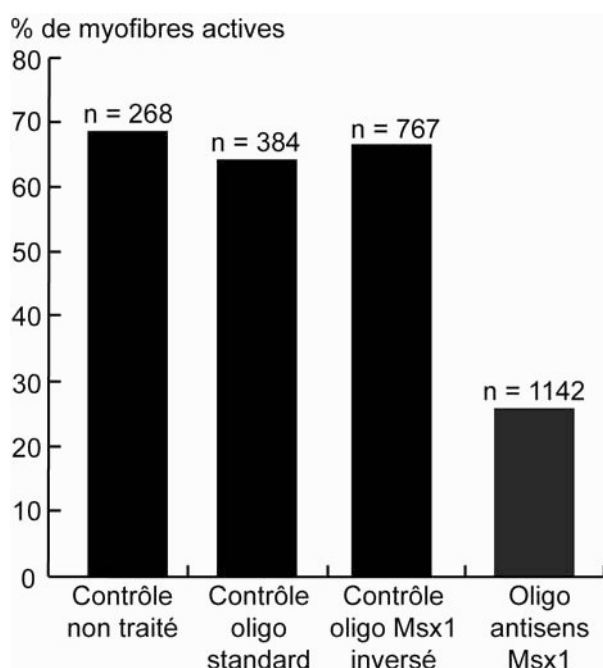


Figure 8 : Effets de différents morpholinos sur le nombre de myofibres présentant des formes d'agrégats nucléaires (actives). La première barre de l'histogramme représente la culture de myofibre en absence de morpholino. La seconde barre en présence du morpholino « oligo standard ». La troisième barre est représentative des résultats en présence du morpholino dont la séquence anti-sens est inversée « oligo *Msx1* inversé ». Enfin la dernière barre correspond aux mesures effectuées avec le morpholino antisens de *Msx1* « oligo anti-sens *Msx1* ». Chaque barre mesure le pourcentage de myofibres sous forme « active » par rapport aux myofibres totales « actives » et « normales ». La valeur n au-dessus de chaque barre indique le nombre de myofibres prises en compte dans le calcul.

Question 16. Expliquez à quoi servent les deux morpholinos contrôles utilisés.

Question 17. Décrivez les résultats apportés par cette expérience.

Question 18. Quelle conclusion tirez-vous de ces expériences ?

La protéine codée par le gène *Msx1* est connue pour inhiber la différenciation du muscle squelettique au cours du développement. Cette activité s'effectue par un phénomène de répression transcriptionnelle. Des cellules C2C12, qui sont capables de se différencier en cellules musculaires en culture, ont été produites dans lesquelles s'exprime le gène *Msx1* fusionné ou non à une étiquette (Flag). Les protéines interagissant avec *Msx1* sont isolées par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-Flag. Pour cela on utilise un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag, on incube un extrait cellulaire avec cet anticorps et on réalise une précipitation de la protéine contre laquelle cet anticorps est dirigé. On peut ensuite séparer les protéines purifiées lors de la co-immunoprécipitation par électrophorèse en conditions dénaturantes, les transférer sur une membrane, puis les détecter à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence du substrat adéquat (Figure 9).

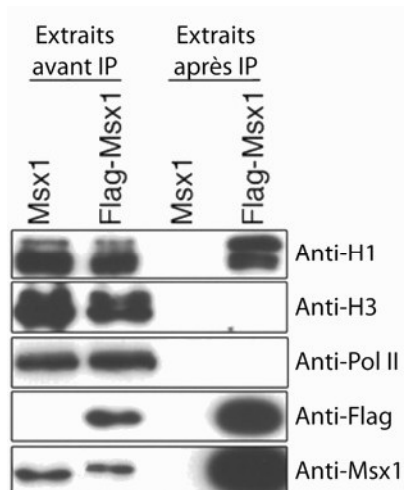


Figure 9 : Des extraits nucléaires obtenus à partir de cellules C2C12 exprimant Msx1 ou Flag-Msx1 sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-Flag et les protéines obtenues sont révélées avec les anticorps dirigés contre les protéines marquées à droite de la figure. H1 pour histone H1, H3 pour histone H3 et Pol II pour désigner les molécules de l'ARN polymérase II qui sont abondantes dans le noyau. Les colonnes « extrait avant IP » correspondent aux protéines avant immunoprécipitation. Les colonnes « extraits après IP » correspondent aux protéines après immunoprécipitation.

Question 19. Interprétez les résultats obtenus avec cette expérience.

Le rôle physiologique de cette interaction a été étudié en examinant les régulations transcriptionnelles présentes au niveau du gène *MyoD*, qui contrôle la différenciation des muscles. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été effectuées pour analyser différentes régions du promoteur du gène *MyoD*.

La méthode ChIP consiste à effectuer sur des cellules en culture une fixation des protéines liées à l'ADN. Ensuite après lyse des cellules, fragmentation de l'ADN en segments de 1 kilobase et centrifugation, on récupère le surnageant qui contient la chromatine ainsi que les protéines qui y sont fixées. Des immunoprécipitations sont alors réalisées avec des anticorps dirigés contre les protéines qui se fixent à l'ADN, puis la liaison protéine-ADN est cassée pour ne conserver que l'ADN. On quantifie par amplification des régions précises de l'ADN parmi la fraction immunoprécipitée.

Les résultats de cette expérience sont décrits figure 10.

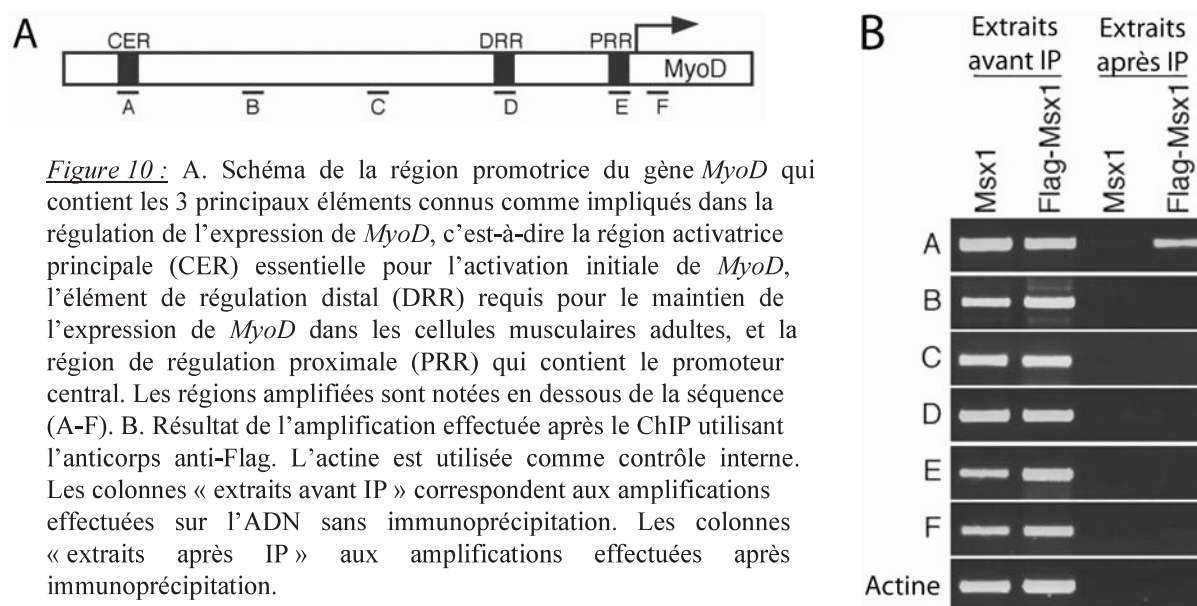


Figure 10 : A. Schéma de la région promotrice du gène *MyoD* qui contient les 3 principaux éléments connus comme impliqués dans la régulation de l'expression de *MyoD*, c'est-à-dire la région activatrice principale (CER) essentielle pour l'activation initiale de *MyoD*, l'élément de régulation distal (DRR) requis pour le maintien de l'expression de *MyoD* dans les cellules musculaires adultes, et la région de régulation proximale (PRR) qui contient le promoteur central. Les régions amplifiées sont notées en dessous de la séquence (A-F). B. Résultat de l'amplification effectuée après le ChIP utilisant l'anticorps anti-Flag. L'actine est utilisée comme contrôle interne. Les colonnes « extraits avant IP » correspondent aux amplifications effectuées sur l'ADN sans immunoprécipitation. Les colonnes « extraits après IP » aux amplifications effectuées après immunoprécipitation.

Question 20. Interprétez l'expérience réalisée.

D'autres expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été effectuées à l'aide d'un anticorps anti-Flag dans des cellules où une protéine Flag-H1 a été surexprimée en présence ou en absence de Msx1. Les amplifications ont été quantifiées. L'histogramme figure 11 présente le rapport de la quantité de protéine histone H1 fixée, sur chaque région précisée figure 10A (A-F), en présence de Msx1 comparée à la même fixation en absence de Msx1.

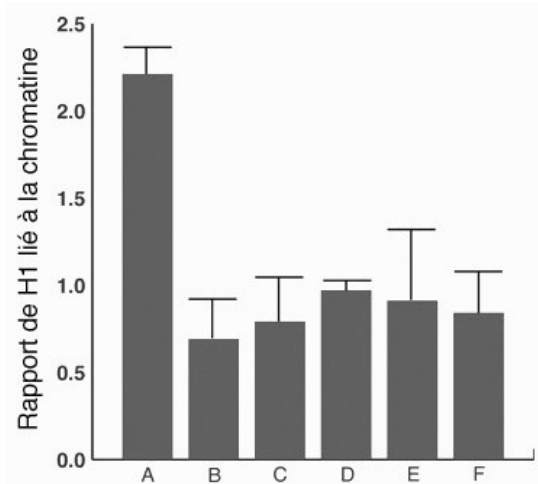


Figure 11 : Rapport de la quantité de protéine histone H1 fixée dans chaque région analysée du gène *MyoD* en présence de Msx1 comparée à la même fixation en absence de Msx1. Une moyenne de 4 expériences indépendantes a été effectuée, les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Question 21. Décrivez les résultats obtenus.

Une approche par mutation a été conduite sur la protéine Msx1 pour supprimer par délétion certaines parties. Les conséquences de ces délétions ont été évaluées à l'aide de plusieurs critères : la répression transcriptionnelle (à l'aide de la mesure de l'expression de *MyoD*), l'inhibition de la différenciation (en mesurant la quantité de chaînes lourdes de la myosine, MHC, dans les cellules C2C12), l'interaction avec l'histone H1 (par coimmunoprécipitation) et la liaison à la région CER de Msx1 (par la méthode ChIP). Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 4.

		Répression transcriptionnelle	Inhibition de la différenciation	Interaction avec H1	Liaison au CER
Msx1		+	+	+	+
Msx1(43-303)		+	+	+	+
Msx1(74-303)		+	+	+	+
Msx1(105-303)		+	+	+	+
Msx1(139-303)		—	—	—	—
Msx1(1-172)		—	—	—	—
Msx1-A		—	—	+	—

Tableau 4 : À gauche, représentation des différents mutants de Msx1 obtenus par délétion.

L'homéodomaine (domaine de fixation à l'ADN) est indiqué en noir. La région de la protéine conservée est indiquée entre parenthèse. La protéine Msx1-A présente plusieurs acides aminés mutés en alanine au sein de l'homéodomaine. La partie droite du tableau résume les résultats obtenus pour les différentes mesures effectuées. Un signe + indique que l'effet est observé, un signe — que l'effet est absent.

Question 22. Interprétez les résultats présentés dans ce tableau. Quelle(s) région(s) semble(nt) déterminante(s) pour la fixation de Msx1 à l'ADN ?

Pour comprendre les conséquences de l'interaction Msx1-Histone H1 sur la différenciation des cellules musculaires, on inactive l'expression de la protéine H1 dans des cellules C2C12 exprimant ou non la protéine Msx1 exogène (Figure 11). Cette méthode permet de dégrader spécifiquement un ARNm via la production d'un ARN anti-sens (appelé RNAi).

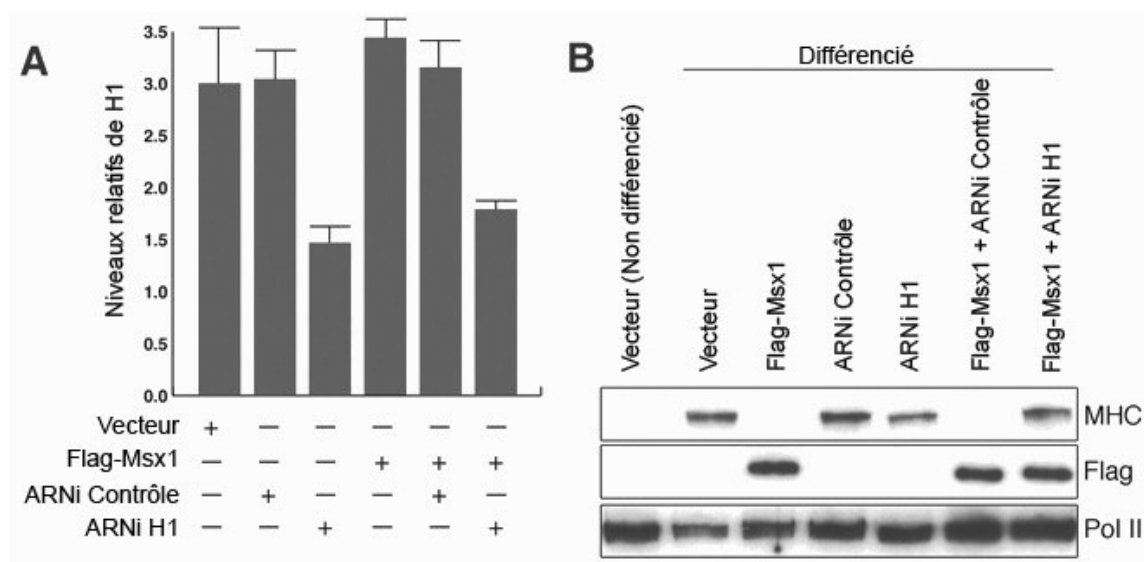


Figure 11. Des cellules C2C12 exprimant la protéine Flag-Msx1 et l'ARN interférent de l'histone H1 (ARNi H1) ou un vecteur contrôle ont été mises en culture dans des conditions permettant ou non la différenciation. A. Quantification de l'ARN codant pour l'histone H1 par PCR. Les histogrammes montrent la moyenne obtenue sur six expériences. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures. Pour chaque barre sont indiquées en dessous de l'histogramme les différentes constructions exprimées dans les cellules C2C12. B. Résultats obtenus après la migration des protéines par électrophorèse de différents extraits cellulaires de cellules C2C12 exprimant les constructions indiquées en colonnes et révélés par les anticorps indiqués en ligne.

Question 23. Analysez les résultats de ces expériences.

Question 24. Représentez sur un schéma ce qu'apporte l'ensemble de ces expériences à la compréhension des mécanismes impliqués dans la régénération des membres ?

Partie A2

Un muscle strié squelettique adulte est capable de régénérer, y compris après de multiples lésions. Les cellules satellites sont les principales cellules capables d'assurer la croissance et la régénération des muscles squelettiques après la naissance. Elles sont localisées autour des myofibres différenciées entre la membrane plasmique myocytaire et la lame basale et expriment le facteur de transcription Pax7, contrairement aux cellules musculaires différenciées.

Myf5 est un facteur de transcription impliqué dans la détermination du lignage musculaire squelettique strié au cours de l'embryogenèse. D'autres facteurs de transcription tels que MyoD peuvent compenser son absence durant l'embryogenèse. Les expériences présentées ici cherchent à connaître le rôle de Myf5 lors de la régénération chez l'adulte.

Les questions 25 à 29 sont indépendantes des questions 30 à 33.

On réalise des coupes histologiques transversales de muscle antérieur du tibia (MAT) de souris sauvages ou mutantes homozygotes perte-de-fonction *Myf5*^{-/-} âgées de 7 mois (Figure1). Le diamètre moyen des fibres musculaires du MAT est de 38 μm pour les souris sauvages et de 52 μm pour les souris *Myf5*^{-/-}.

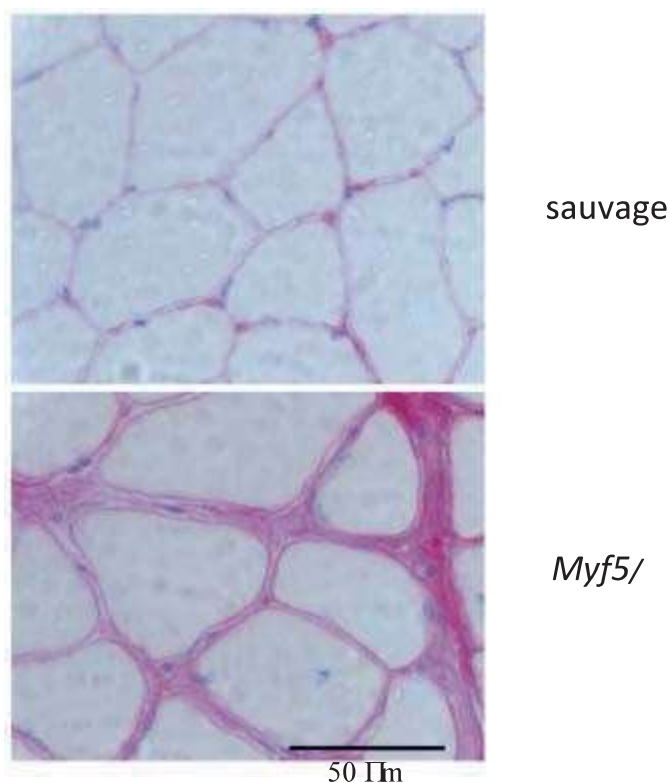


Figure 1 : Coupes transversales de MAT de souris sauvages ou mutantes *Myf5*^{-/-} traitées par le rouge Sirius qui colore en rose la matrice extracellulaire (collagène de type I et III) et par le DAPI qui colore en bleu-violet les noyaux cellulaires. L'échelle est la même pour les deux images.

Question 25. Quels sont les conséquences sur le tissu musculaire de l'absence de Myf5 ?

Les mêmes coupes réalisées sur des MAT de souris de 6 semaines ne montrent pas de différences significatives entre les souris sauvages et les souris *Myf5*^{-/-}.

Question 26. Que peut-on en conclure quant à l'origine des défauts du tissu musculaire chez les souris *Myf5*^{-/-} ?

Le MAT de souris sauvages ou mutantes âgées de 6 à 10 semaines est endommagé par l'application d'un tube métallique préalablement trempé dans de l'azote liquide (-196°C). Les souris sont anesthésiées durant l'opération. La structure musculaire est ensuite analysée 5 semaines plus tard. Une accumulation d'adipocytes est observée à l'endroit de la lésion chez certaines souris. On classe les souris selon la quantité relative d'adipocytes trouvée (Tableau 1).

Accumulation d'adipocytes	Très importante	Importante	Moyenne	Faible	Nulle
sauvage	0	0	0	2	8
<i>Myf5</i> ^{-/-}	2	4	2	5	2

Tableau 1.

On mesure également le diamètre des fibres musculaires de la région lésée 5 semaines après la lésion. La moyenne est de 44 μm pour les souris sauvages et de 72 μm pour les souris *Myf5*^{-/-}. On compte le nombre de cellules exprimant la protéine myogénine par coupe de MAT dans la région lésée 3, 4 ou 7 jours après la lésion (Figure 2). La myogénine est exprimée dans les fibres musculaires en train de se différencier.

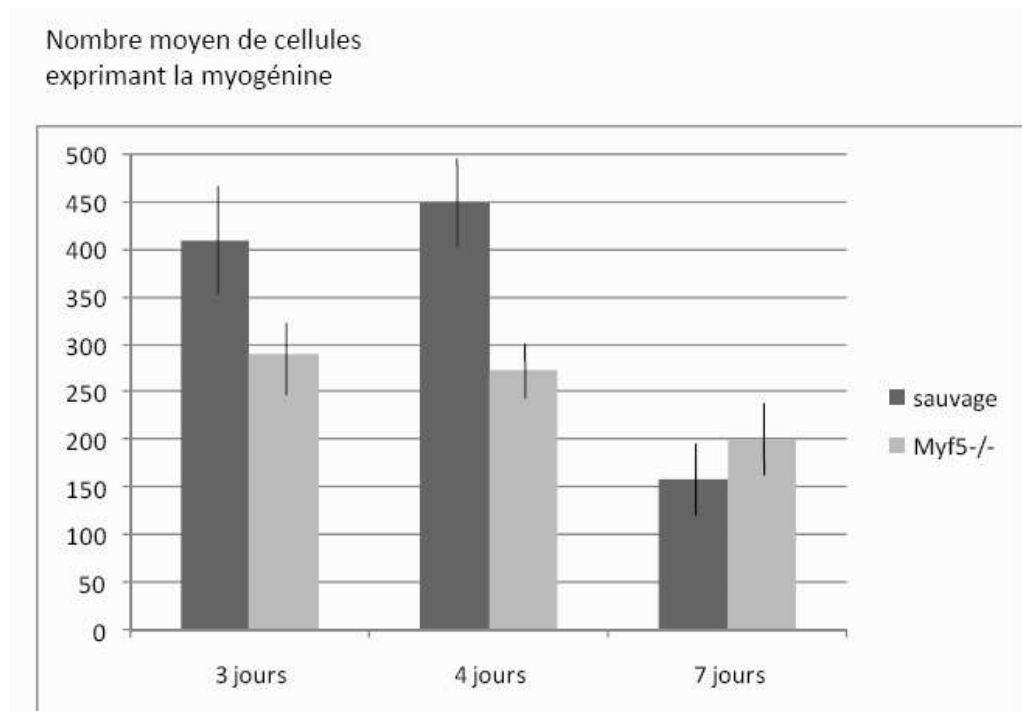


Figure 2 : On détermine par immunofluorescence le nombre moyen de cellules exprimant la myogénine par coupe de MAT dans la région lésée 3, 4 ou 7 jours auparavant par l'application d'un objet métallique à -196°C. Les traits verticaux représentent l'écart-type.

Question 27. Caractérisez les différences observées entre les souris sauvages et mutantes et proposez des hypothèses pour les expliquer.

On compte les cellules exprimant Pax7 dans les fibres musculaires du MAT de souris sauvages ou mutantes *Myf5*^{-/-} âgées de 6 semaines (Figure 3).

Nombre moyen de cellules
exprimant Pax7

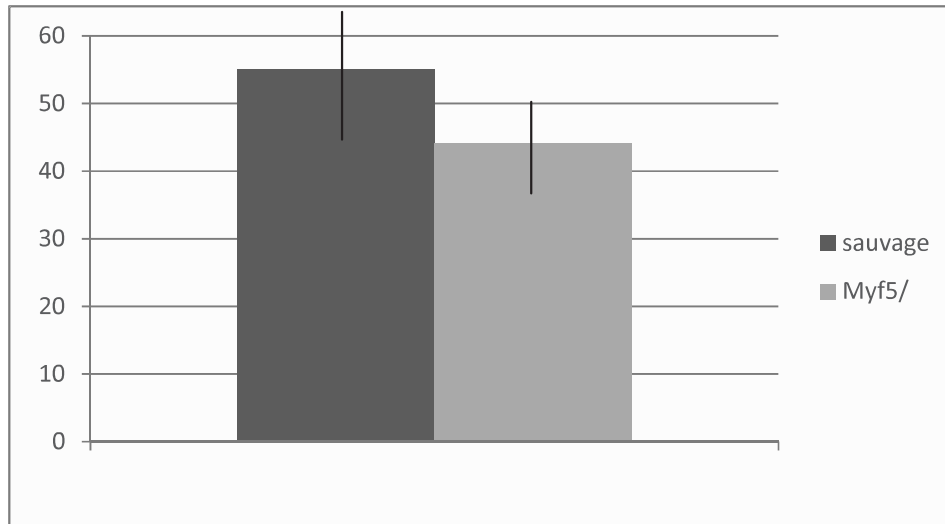


Figure 3 : On détermine par immunofluorescence le nombre moyen de cellules exprimant Pax7 par coupe de MAT de souris sauvages ou mutantes *Myf5*^{-/-} âgées de 6 semaines. Les traits verticaux représentent l'écart-type.

Question 28. Que conclure de ces expériences quant à l'origine des différences observées précédemment entre souris sauvages et mutantes ?

On met en culture *in vitro* des fibres musculaires provenant du MAT de souris sauvages ou mutantes âgées de 6 semaines. On récolte le même nombre de cellules dans les deux cas et notamment le même nombre de cellules exprimant Pax7. Les seules cellules à proliférer dans les conditions utilisées sont les cellules satellites. Les cellules sont mises en présence de BrdU, un analogue de nucléoside qui s'incorpore dans l'ADN en cours de synthèse, pendant 2 heures puis fixées. La présence de BrdU est révélée par des anticorps spécifiques anti-BrdU.

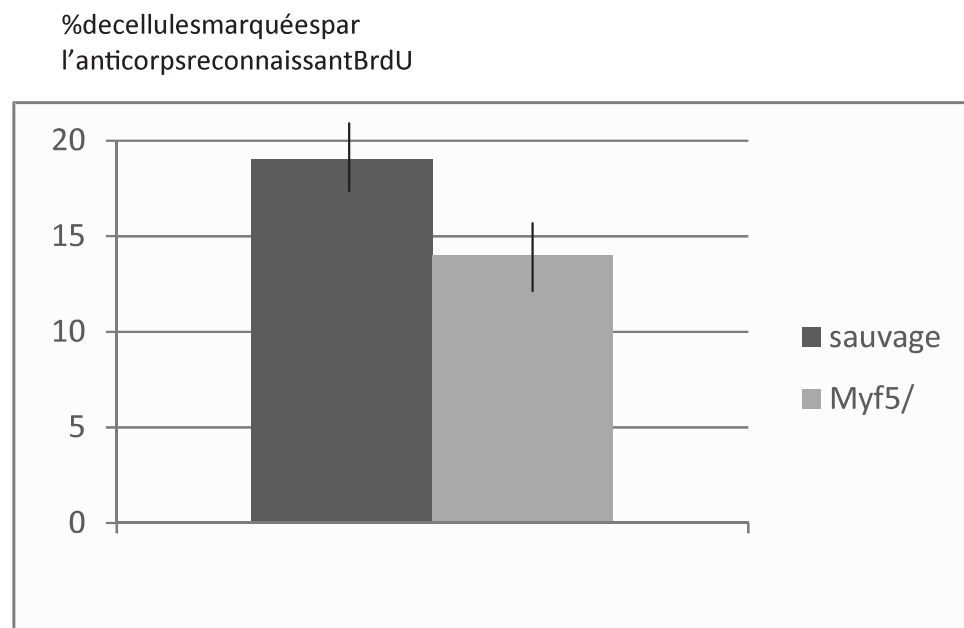


Figure 4 : On détermine le pourcentage de cellules reconnues par l'anticorps anti-BrdU après quelques jours de culture *in vitro* de fibres musculaires dissociées de MAT de souris sauvages ou mutantes *Myf5*^{-/-} âgées de 6 semaines dans un milieu favorisant la prolifération des cellules satellites. Les traits verticaux représentent l'écart-type.

Question 29. Que permet de suivre le marquage BrdU ? Quels éléments apportent le résultat de cette expérience ?

On étudie l'expression par double immunofluorescence de Pax7 et de la E-galactosidase dans des souris hétérozygotes *Myf5*^{LacZ}/*Myf5*⁺ contenant un allèle où le gène *LacZ* (codant la E-galactosidase) a été introduit dans le locus de *Myf5*, l'autre allèle étant sauvage. Les souris hétérozygotes ont le même phénotype que les souris sauvages de la partie précédente (questions 23 à 26). On obtient le marquage de la figure 5A pour 89% des cellules marquées par Pax7 et le marquage de la figure 5B pour 11% de ces cellules.

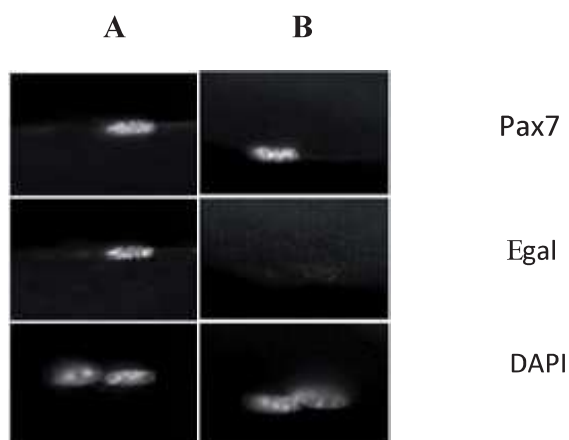


Figure 5 : Immunofluorescences réalisées sur des coupes de MAT de souris hétérozygotes *Myf5*^{LacZ}/*Myf5*⁺ âgées de 6 semaines. Sur une colonne (A ou B) on observe les mêmes cellules avec des marquages différents (Pax7 sur la première ligne, E-galactosidase sur la deuxième ligne et DAPI (qui marque l'ADN) sur la dernière ligne). Les colonnes A et B présentent les résultats pour

deux champs d'observation différents sur un même muscle.

Question 30. Quelles conclusions peut-on tirer de ces marquages quant à la population de cellules marquées par Pax7 ?

La recombinaise Cre est une enzyme d'un bactériophage qui reconnaît spécifiquement des séquences appelées LoxP et par recombinaison homologue excise le fragment d'ADN se trouvant entre deux sites LoxP. On croise une souris transgénique *Myf5-Cre* exprimant le gène codant Cre sous le contrôle du promoteur de *Myf5* avec une souris transgénique ROSA-YFP qui exprime le gène codant la protéine fluorescente YFP **à condition qu'une séquence flanquée de deux sites LoxP soit excisée**. La recombinaise Cre excise cette séquence de manière irréversible. On observe l'expression de Pax7 par immunofluorescence et la fluorescence YFP dans les muscles des souris issues du croisement. Dans 90% des cellules marquées par Pax7 on obtient un marquage comme sur la figure 6A et dans 10% des cellules on obtient un marquage comme sur la figure 6B.

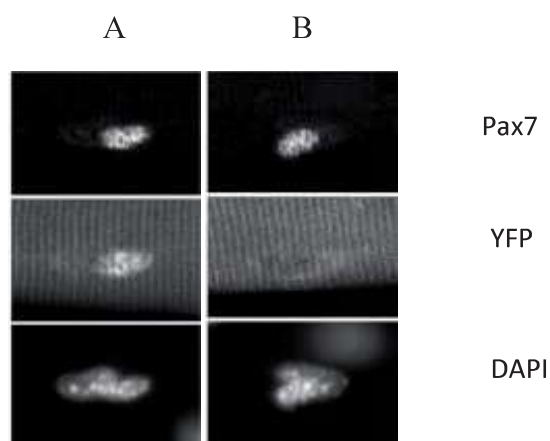


Figure 6 : Immunofluorescences réalisées sur des coupes de MAT de souris *Myf5-Cre; ROSA-YFP* âgées de 6 semaines. Sur une colonne (A ou B) on observe les mêmes cellules avec des marquages différents (Pax7 sur la première ligne, YFP sur la deuxième ligne et DAPI (qui marque l'ADN) sur la dernière ligne). Les colonnes A et B présentent les résultats pour deux champs d'observation différents sur un même muscle.

Question 31. Quelles informations complémentaires apportent ces marquages par rapport aux précédents ?

On réalise des cultures cellulaires en suspension pendant 3 jours à partir de cellules isolées provenant du tissu musculaire de souris *Myf5-Cre; ROSA-YFP*. Dans ces conditions, chaque cellule satellite (Pax7+) prolifère et forme un agrégat de 4 à 8 cellules. On observe que 10% des agrégats sont constitués d'un mélange de cellules Pax7+ exprimant ou non YFP ; 90% des agrégats sont constitués uniquement de cellules Pax7+ exprimant YFP.

Question 32. Interprétez le résultat obtenu.

On lèse le muscle MAT des souris *Myf5-Cre; ROSA-YFP* à 6 semaines et on réalise des marquages Pax7 et des observations de la fluorescence de YFP durant la régénération.

On s'intéresse aux cas où deux cellules satellites (Pax7+) se trouvent côte à côte et sont deux cellules filles issues d'une même mitose. On étudie tout particulièrement les couples de cellules où au moins une cellule n'exprime pas YFP. Les résultats sont représentés de manière schématique sur la figure 7.

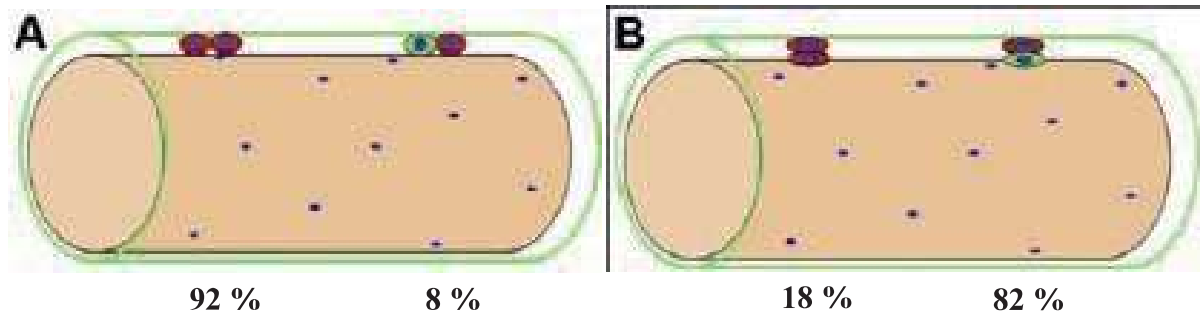


Figure 7 : Schémas résumant les résultats des immunofluorescences Pax7 et YFP sur des fibres musculaires en régénération. On ne représente les résultats que pour des cellules Pax7+ côte à côte, qui sont les deux cellules filles d'une même mitose. Les cellules en rouge n'expriment pas YFP, les cellules vertes expriment YFP. On classe en A ou en B, les cellules filles d'après leur position relative par rapport à la membrane basale (ligne verte) et la fibre musculaire (beige). Dans chacune de ces catégories (A ou B) on montre les proportions des couples où les deux cellules n'expriment pas YFP et où l'une des cellules expriment YFP. On ne tient pas compte dans ces statistiques des cas où les deux cellules expriment YFP.

Question 33. Que peut-on conclure de ces résultats ? Formulez des hypothèses pour expliquer l'activation de Myf5 ?

Question 34. En rassemblant l'ensemble des résultats, faites un schéma permettant de résumer l'expression et le rôle de Myf5 au cours de la régénération musculaire.

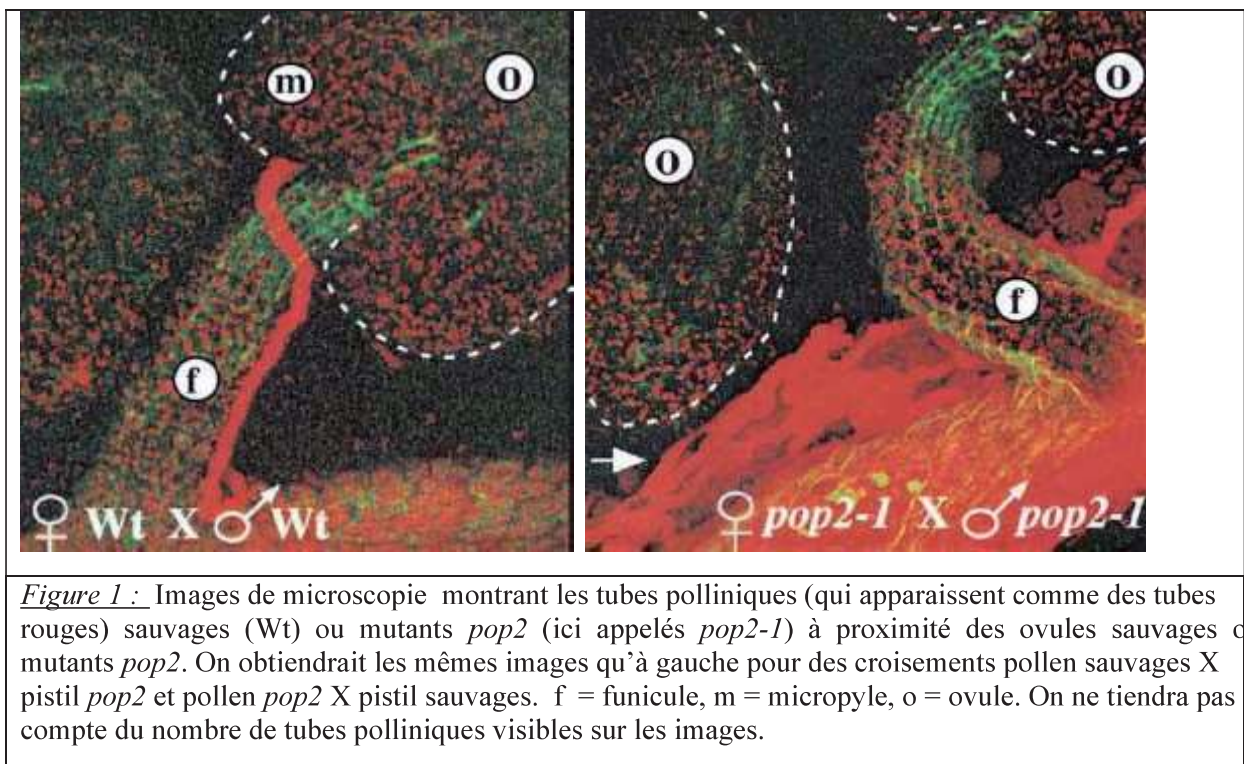
PARTIE B : Contrôle de la croissance et du guidage du tube pollinique des Angiospermes

Partie B1

Question 35. Décrivez en quelques lignes et faites un ou plusieurs schéma(s) légendé(s) montrant le déroulement de la double fécondation chez les Angiospermes.

La mutation récessive *pop2* a été isolée et étudiée chez *Arabidopsis thaliana*. Lorsqu'on croise des femelles mutantes *pop2/pop2* avec du pollen de plantes sauvages, on obtient une quantité normale de graines et la double fécondation se passe normalement. Lorsqu'on utilise du pollen produit par des plantes *pop2/pop2*, on obtient un nombre normal de graines uniquement si la plante réceptrice est sauvage. Dans le cas où la femelle est *pop2/pop2* on obtient très peu de graines.

Des coupes sont réalisées après dépôt des grains de pollen sur les stigmates et les trajectoires des grains de pollen sont observées (Figure 1). Le nombre de tubes polliniques qui se développent est similaire dans tous les croisements.



Question 36. A partir de l'analyse de la figure 1, comment expliquer le nombre de graines obtenues lors des différents croisements ?

Question 37. Quelles hypothèses peut-on poser pour expliquer les phénotypes des différents croisements ?

Le gène dont un des allèles est responsable du phénotype a été cartographié, cloné et appelé POP2. La protéine prédite d'après la séquence est une transaminase (enzyme qui transfère un groupement amine d'un acide aminé à un acide Δ -cétonique). La mutation *pop2* décrite précédemment aboutit à une protéine non fonctionnelle à la suite d'une erreur d'épissage. On compare la composition en divers acides aminés d'extraits de fleurs sauvages ou mutantes *pop2*. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Acides aminés	Concentration dans les extraits sauvages	Concentration dans les extraits mutants <i>pop2/pop2</i>
Alanine	1,4 +/- 0,45	1,6 +/- 0,79
Asparagine	1,6 +/- 0,76	2,4 +/- 1,9
GABA	0,2 +/- 0,06	22 +/- 0,45
Glutamate	3,4 +/- 0,73	2,6 +/- 0,6
Serine	2,5 +/- 0,82	2,1 +/- 0,66

Tableau 1 : Concentration de différents acides aminés (en μ mol/g de poids sec) dans des extraits floraux sauvages ou *pop2/pop2*. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- erreur standard. Les autres acides aminés donnent des résultats similaires à ceux obtenus pour l'alanine. GABA est l'abréviation de l'acide γ -amino butyrique.

Question 38. Quelles hypothèses peut-on poser sur la fonction de la protéine POP2 ?

On dose la concentration de GABA dans différents tissus des organes reproducteurs femelles sauvages ou *pop2/pop2*. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Tissu	Concentration du GABA dans les tissus sauvages	Concentration du GABA dans les tissus mutants <i>pop2/pop2</i>
Stigmate	20 +/- 10	1200 +/- 300
Style	60 +/- 30	1700 +/- 500
Ovule	160 +/- 20	1900 +/- 300

Tableau 2 : Concentration du GABA dans différents tissus des organes reproducteurs femelles de fleurs sauvages ou mutantes *pop2/pop2*. Les concentrations sont données en μ M. Ce sont les moyennes de trois expériences indépendantes +/- erreur standard.

Question 39. Qu'observe-t-on concernant les concentrations du GABA dans les différentes parties des organes reproducteurs femelles des plantes sauvages ?

Question 40. Quelles sont les conséquences de la mutation *pop2* sur les concentrations en GABA dans les différentes parties des organes reproducteurs femelles ?

On dépose des grains de pollens sauvages ou mutants *pop2/pop2* sur des gels d'agarose contenant des concentrations variées de GABA. On mesure ensuite la taille des tubes polliniques obtenus au bout de quelques heures (Figure 2).

Longueur dutube pollinique

(μm)

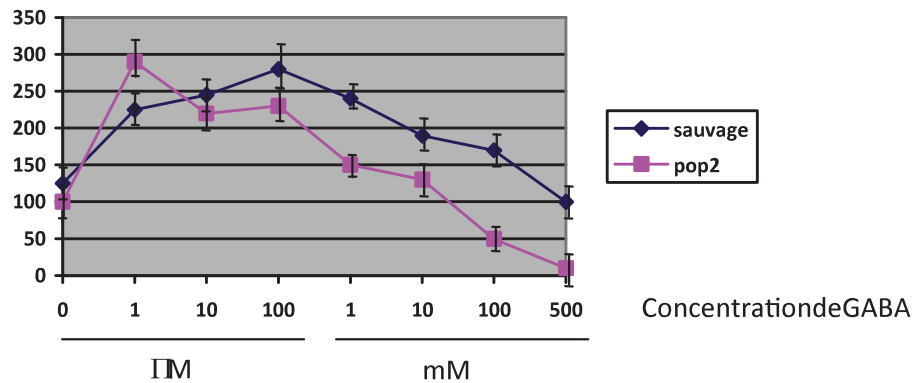


Figure 2 : La longueur des tubes polliniques est mesurée après 16 heures de croissance dans des gels d'agarose dans lesquels on a déposé une concentration donnée de GABA. Les barres verticales représentent les écart-types.

Question 41. Quelles conclusions peut-on tirer de ces expériences ?

Question 42. Proposez un modèle permettant de rendre compte des phénotypes observés lors des différents croisements.

Partie B2

Les phospholipases C (PLC) sont des enzymes capables de faire le lien entre les phénomènes de signalisation au niveau des membranes lipidiques et des éléments incluant la dynamique du cytosquelette, la variation de concentration en Ca^{2+} et donc la croissance. Nous allons donc nous attacher à regarder plus en détail les relations qui existent entre la croissance du tube pollinique et les PLC, mécanismes requis pour la fertilité de la plante.

Dans un premier temps, des ADN complémentaires (ADNc) candidats pour coder des PLC spécifiques des phosphoinositides (PI-PLC) ont été obtenus dans une banque d'ADNc construite à partir de grains de pollen et de tubes polliniques chez la plante *Petunia inflata*. Ces ADNc ont été recherchés à l'aide d'une sonde obtenue par PCR contenant les régions codantes correspondants aux domaines catalytiques très conservés X et Y chez *Arabidopsis thaliana*. Une seule catégorie de clones a été isolée avec cette méthode de criblage, et le clone contenant le plus long insert code pour une PLC de taille complète, que nous appellerons « PLC1 » par la suite.

Question 43. Si vous disposiez de la séquence complète du génome de *P. inflata*, comment feriez-vous pour trouver les gènes codant des PLC ?

L'expression du gène *PLC1* est analysée par la technique du northern blot dont les résultats sont observés figure 1.

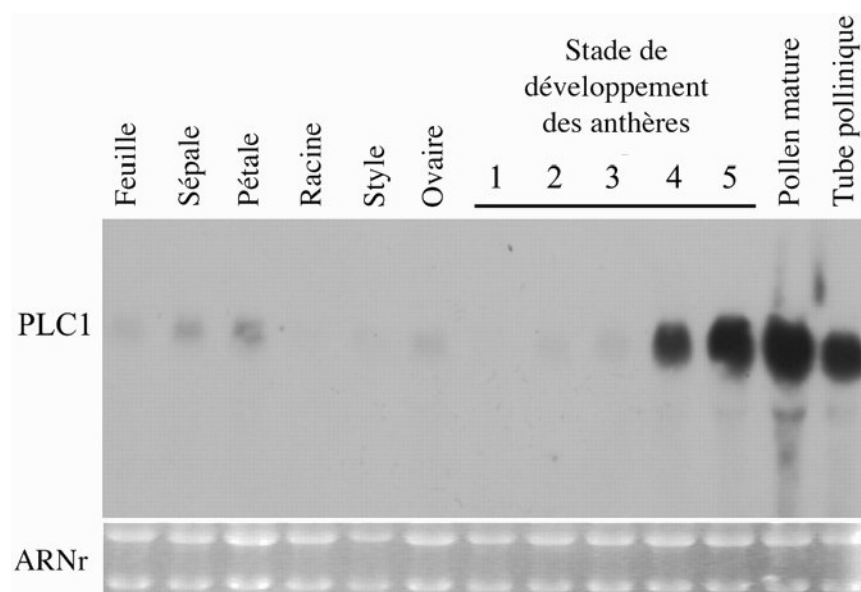


Figure 1 : Analyse par Northern blot du gène *PLC1*. Vingt microgrammes d'ARN total de *Petunia* ont été isolé de chaque tissu indiqué en haut de la photographie ainsi qu'à partir de grains de pollen et de tubes polliniques. Ces ARN ont ensuite été chargés dans chaque puits. Les ARN ont ensuite été transféré sur une membrane en nylon et une sonde radiomarquée provenant de l'ADNc *PLC1* a été utilisée pour la révélation. La coloration au bromure d'éthidium du gel (tâches claires) montre les bandes qui correspondent aux ARN ribosomiaux (ARNr). Différents stades de développement des anthères ont également été utilisés : développement des microspores dans la configuration en tétrade (1), microspores uninuclées libres (2), microspores binuclées (3), microspores trinucées (4) et pollen mature (5).

Question 44. Expliquez dans quel but la technique du northern blot est utilisée. À quoi servent ici les bandes d'ARNr ?

Question 45. Décrivez les résultats obtenus sur la figure 1.

Un vecteur permettant l'expression d'une protéine de fusion entre la protéine fluorescente verte (GFP) et la région N-terminale de la PLC1 et utilisée après transfection pour être exprimée de façon transitoire dans les grains de pollens et le tube pollinique. L'expression de cette construction ne crée pas de phénotypes en relation avec la croissance parmi plus de 150 tubes polliniques analysés. L'observation de l'extrémité des tubes polliniques au microscope à fluorescence donne les résultats présentés figure 2.

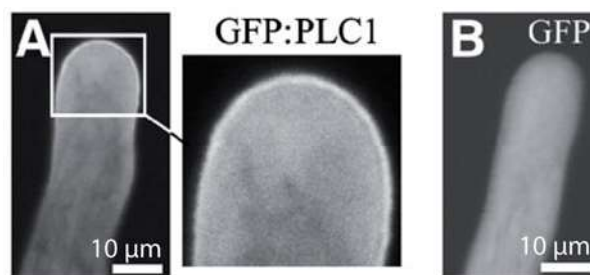


Figure 2 : A et B. Expression de la protéine de fusion GFP:PLC1 (A) ou de la GFP seule (B) dans des grains de pollens après transfection. L'extrémité du tube pollinique est grossie dans la photographie centrale. Les images montrées sont représentatives de plus d'une centaine de tubes polliniques individuels.

Question 46. Décrivez les résultats observés sur ces photographies.

La technique de récupération de la fluorescence après photoblanchiment consiste à illuminer avec un laser puissant une petite région particulière dans une cellule. Ce blanchiment a pour but d'éteindre la fluorescence émise par les fluorophores présents dans la région visée. On étudie ensuite la vitesse à laquelle la fluorescence réapparaît dans la région blanchie. Dans notre étude, la protéine de fusion GFP:PLC1 a été inactivée à deux endroits du cône de croissance du tube pollinique : (1) dans la région du cytoplasme où un grand nombre de vésicules sont observées et (2) au niveau de la membrane plasmique latérale. Les résultats observés sont donnés figure 3.

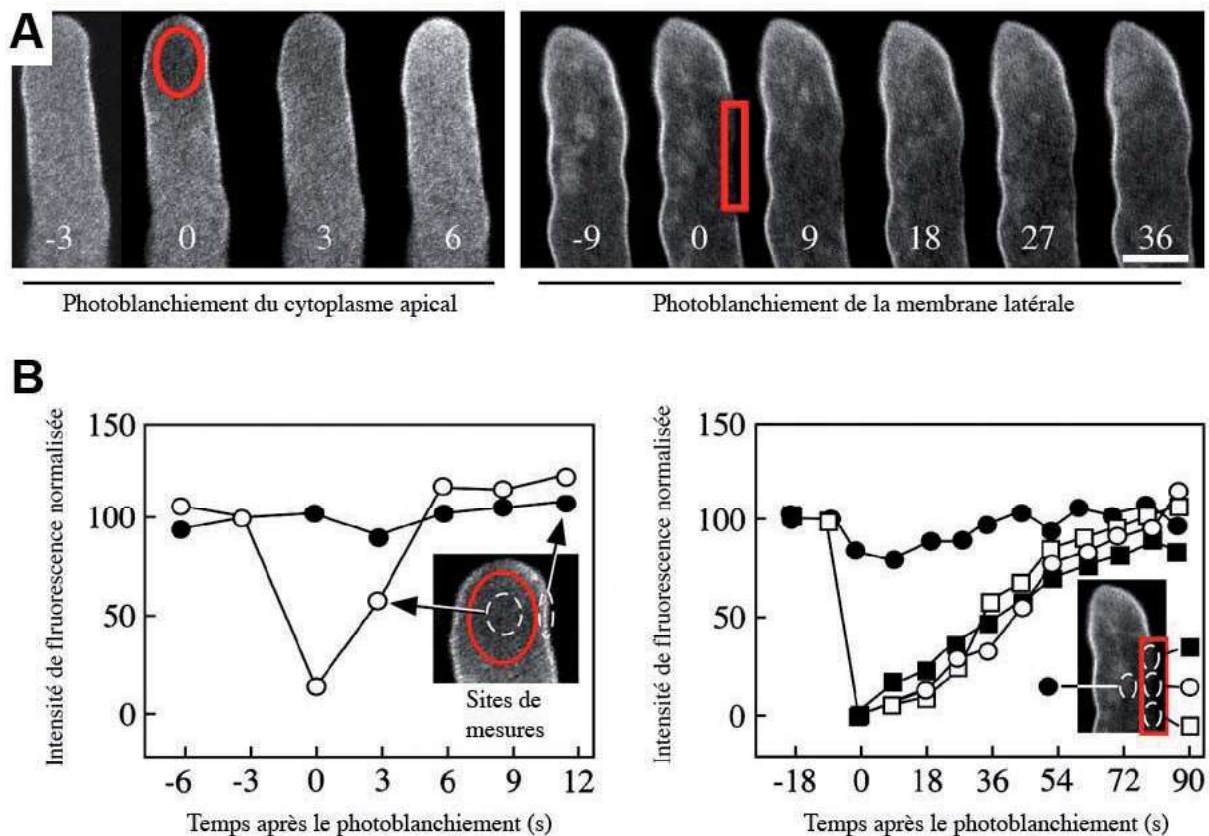


Figure 3 : A. Analyse avec la méthode de photoblanchiment de tubes polliniques exprimant la protéine GFP:PLC1. Les nombres représentent le temps (en seconde) après le photoblanchiment, qui a été effectué dans les zones indiquées en rouge. La série d'images montrée est représentative de 9 expériences indépendantes. La barre indique l'échelle de la photographie et représente 10 μm . B. Analyse quantitative de la récupération après le photoblanchiment. L'intensité de fluorescence a été mesurée dans les régions indiquées (lignes pointillées dans les photographies insérées) avant et après le photoblanchiment des régions définies par les cadres rouges. Les intensités ont été normalisées par rapport à la mesure effectuée juste avant le photoblanchiment.

Question 47. Expliquez quel est l'intérêt d'utiliser la méthode de photoblanchiment.

Question 48. Décrivez les résultats observés figure 3.

La phospholipase C est une enzyme transmembranaire. Suite à son activation par un récepteur couplé aux protéines G, l'hydrolyse du PIP2 membranaire provoque une augmentation de la concentration intracellulaire du second messager inositol-1-4-5-triphosphate (IP3).

Afin d'étudier les propriétés biochimiques de la PLC1 découverte chez le Pétunia, une mutagenèse a été effectuée sur la PLC1 afin de remplacer l'His-126 requise dans l'activité catalytique hypothétique d'un des domaines de la PLC1 en une Ala-126. Cette construction sera appelée par la suite PLC1-H126A. L'activité catalytique possible de cette protéine a été comparée à celle de la forme sauvage et à celle de la forme fusionnée à la GFP en mesurant son activité de clivage du Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate (PIP2). Les résultats sont présentés sur la figure 4.

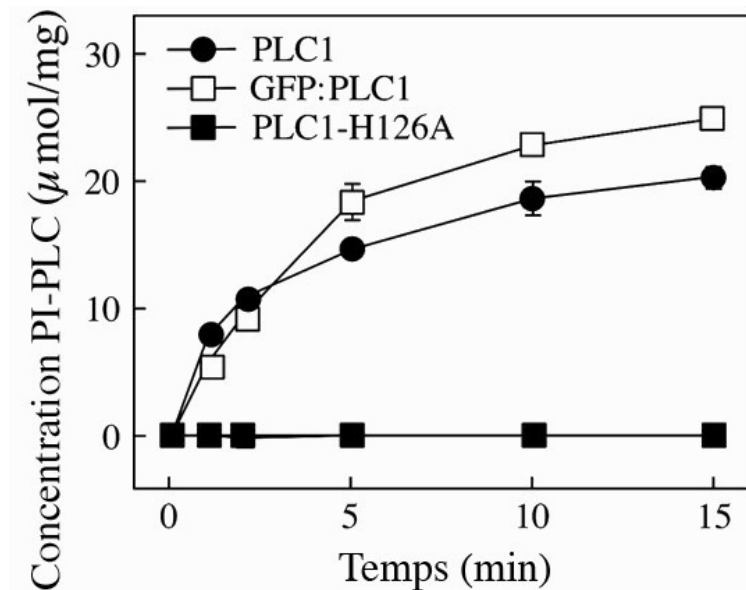


Figure 4 : Dosages biochimiques pour déterminer l'activité d'hydrolyse du PIP2 des protéines PLC1, GFP:PLC1 et PLC1-H126A. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences et les barres d'erreurs l'écart-type des mesures.

Question 49. Analysez les résultats obtenus par ce dosage enzymatique.

L'expression de cette protéine PLC1-H126A dans les grains de pollen conduit à l'arrêt de la croissance du tube pollinique et à l'apparition d'un renflement à l'extrémité du tube. La dynamique du cytosquelette jouant également un rôle dans la croissance du tube pollinique, la protéine PLC1-H126A a été co-exprimée avec une protéine de fusion à la GFP qui se fixe à l'actine (GFP:mTalin). Les résultats observés sont présentés figure 5.

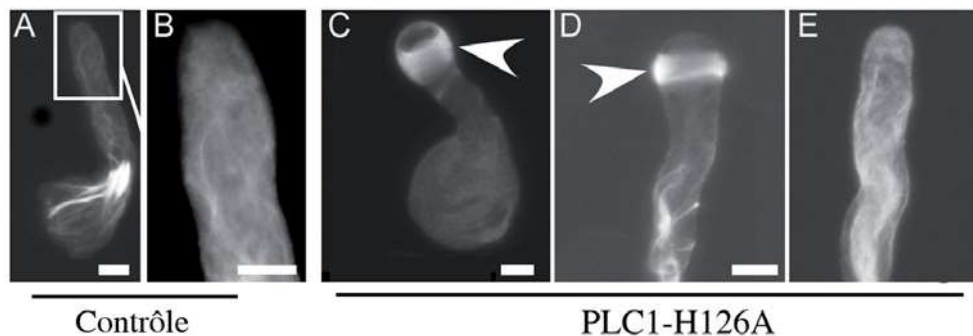


Figure 5 : La distribution de l'actine est suivie à l'aide de la protéine GFP:mTalin dans des tubes polliniques contrôles (A, B) et dans des tubes polliniques qui expriment la construction PLC1-H126A de façon transitoire (C, D). La flèche blanche pointe une structure que l'on observe avec PLC1-H126A mais pas chez le contrôle. La dernière figure de droite (E) correspond à la visualisation du réseau d'actine quand les grains de pollens exprimant la PLC1-H126A ainsi que la GFP:mTalin sont mis à germer sur un milieu contenant 5 nM d'une drogue capable de désorganiser l'actine. La barre indique l'échelle de la photographie et représente 10 μm.

Question 50. Décrivez la localisation du réseau des filaments d'actine dans cette expérience. Que pouvez-vous en conclure sur le rôle de PLC1 ?