

BIOLOGIE **Épreuve B**

Durée : 3 heures 30 minutes

L'usage de la calculatrice, d'abaques et de tables est interdit pour cette épreuve.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

À partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, étudiez quelques aspects du développement du cœur et de son adaptation aux besoins de l'organisme.

- Une introduction et une conclusion générale sont attendues.
- Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés ou exploités. Des croquis légendés peuvent également être proposés.
- L'exposé doit se limiter aux deux thèmes abordés par les documents, qui font l'objet de deux parties indépendantes.

Thème I : Le poisson zèbre, organisme modèle pour l'étude du développement cardiaque

DOCUMENT I.1 : Formation du tube cardiaque chez des individus sauvages et mutants *nat*

Yelon et al., *Dev.Biol* **214**, 23-37 (1999) – Trinh et Stainier, *Dev. Cell* **6**, 371-382 (2004) – Schoenebeck et Yelon, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **18**, 27-35 (2007)

Des embryons de poisson zèbre sont utilisés comme modèle d'étude du développement cardiaque des Vertébrés, en particulier car les structures internes de ces embryons sont facilement visibles par transparence.

Le développement cardiaque débute par la migration et la fusion de cellules-précurseurs qui forment un tube cardiaque. Le tube cardiaque est ensuite cloisonné en cavités cardiaques.

Les mutants *nat* présentent des anomalies du développement cardiaque.

I.1a- Expression du gène codant la chaîne légère n°2 de la myosine spécifique des cellules cardiaques (gène *CMLC2*) chez des embryons sauvages et des mutants *nat*.

L'expression est suivie par hybridation *in situ* avec une sonde complémentaire d'une séquence spécifique de l'ARNm de *CMLC2*. Le marquage dû à la sonde correspond aux régions bleu foncé ou violet sur les clichés.

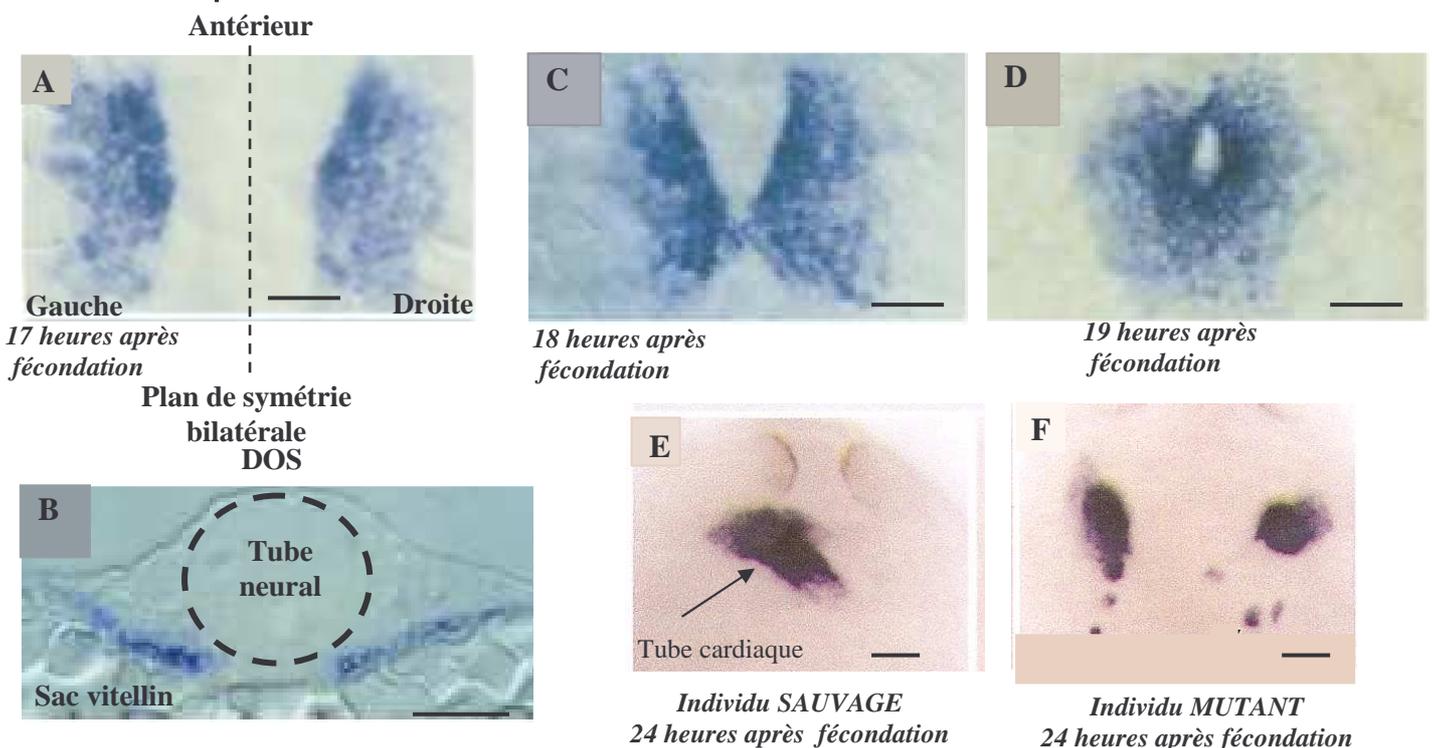
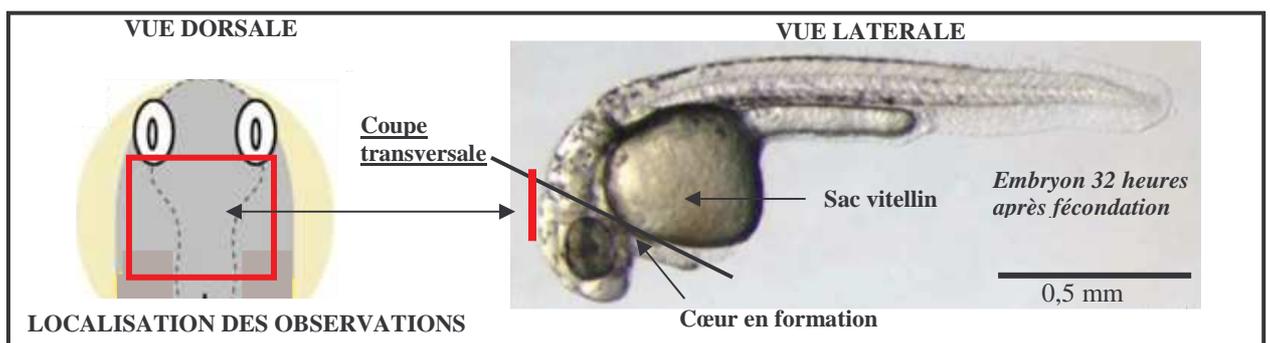
A, C, D, E: Vues dorsales d'embryons sauvages dans la région antérieure.

B : Coupe transversale d'embryon sauvage (région dorsale) au même stade que A.

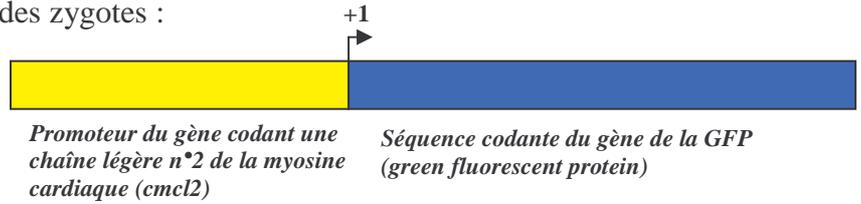
F : Vue dorsale d'embryon mutant *nat*.

Barre d'échelle des clichés A à F : 60 µm

La localisation des observations est présentée dans l'encadré ci-dessous.



I.1b- Une lignée transgénique « **cmlc2-gfp** » de poisson zèbre a été obtenue après introduction de la construction génétique ci-contre dans des zygotes :



Coupes transversales (région dorsale) d'embryons **cmlc2-gfp** sur lesquelles certaines protéines ont été spécifiquement localisées. La GFP est repérée par sa fluorescence naturelle. Les autres protéines sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à une molécule fluorescente.

Les clichés sont présentés en couleurs artificielles.

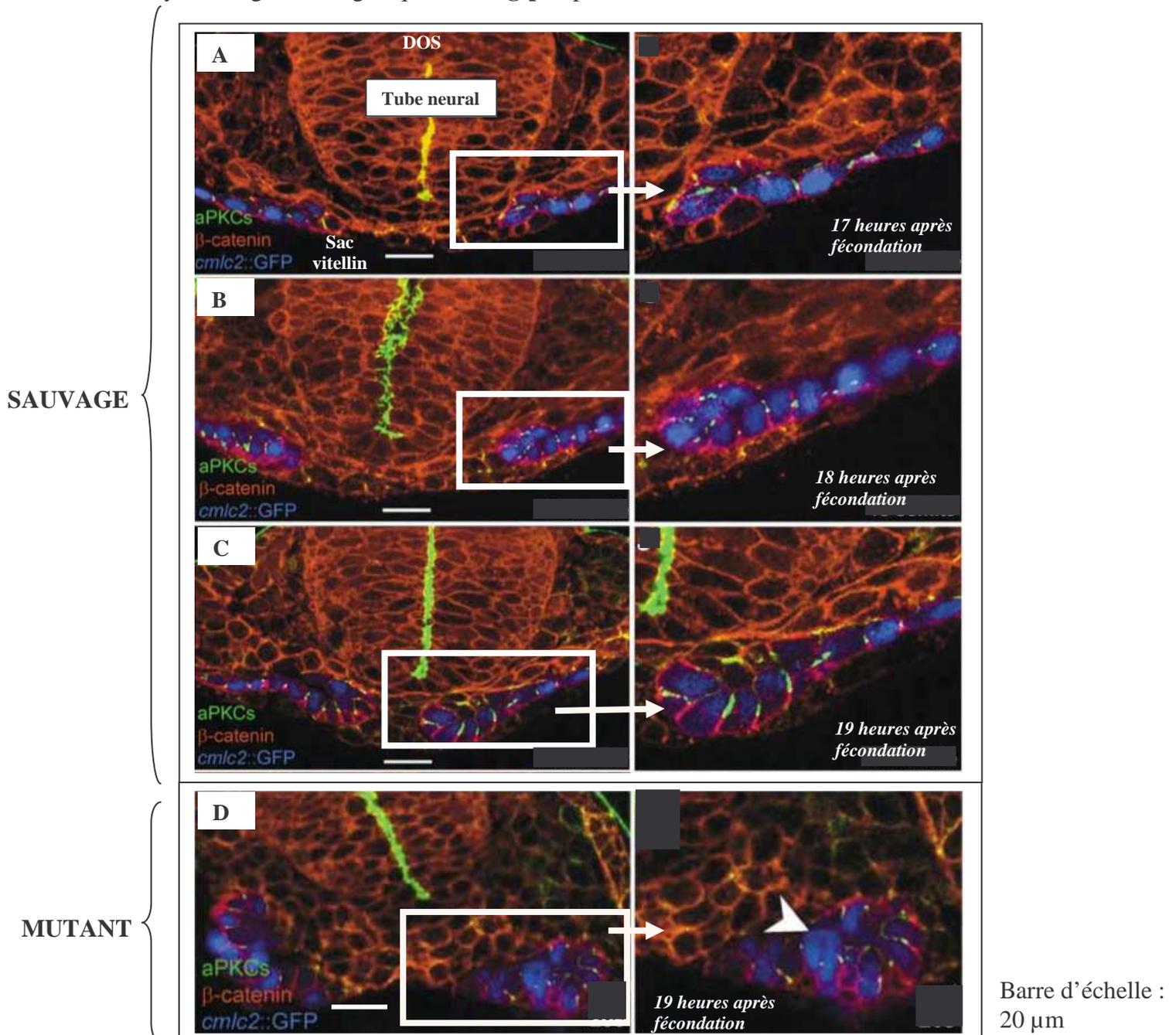
GFP : couleur bleue

β-caténine (protéine présente dans certaines jonctions adhérentes) : couleur rouge

Protéines kinases C caractéristiques des jonctions adhérentes dans les tissus embryonnaires : couleur verte

A, B, C : embryons de lignée transgénique **cmlc2-gfp**

D : embryon de lignée transgénique **cmlc2-gfp** et portant la mutation *nat*



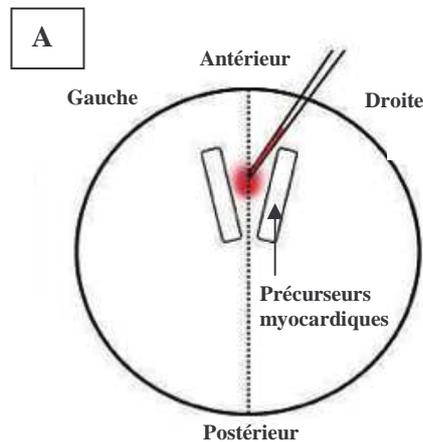
DOCUMENT I.2 : Identification du gène NAT

Trinh et Stainier, *Dev.Cell* 6, 371-382 (2004) – Matsui et al., *Nature Clinical Practice* 4, 77-82 (2007)

Le gène touché par la mutation *nat* a été isolé. Il s'agit d'un gène homologue au gène codant la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire.

I.2a- On injecte de la fibronectine ou des peptides RGD correspondant au motif de reconnaissance de la fibronectine par l'intégrine, dans des embryons de poisson zèbre à différents stades de développement.

A : Localisation de l'injection sur les embryons.

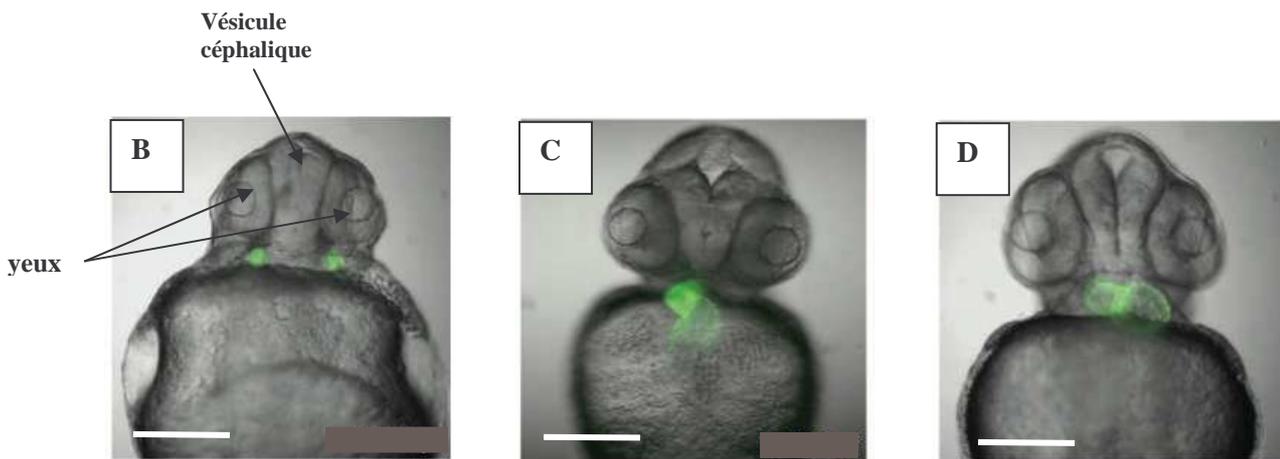


Les embryons sont ensuite incubés jusqu'à 30 heures après fécondation. Les structures cardiaques, révélées à l'aide de marqueurs spécifiques, apparaissent en vert sur les clichés microscopiques. Les embryons sont observés sur leur face ventrale.

B : Embryon injecté avec des peptides RGD, 14-16 heures après fécondation

C : Embryon injecté avec des peptides RGD, 18-19 heures après fécondation

D : Embryon témoin injecté avec du liquide physiologique, 14-16 heures après fécondation.



Remarque : Les structures cardiaques ne montrent pas de différence significative entre les clichés C et D.

Barre d'échelle des clichés B, C et D : 0,2 mm

I.2b- L'expression du gène de la fibronectine est bloquée dans des embryons de poisson zèbre à l'aide d'ARN antisens qui se lient spécifiquement à l'ARNm de la fibronectine et empêchent ainsi sa traduction.

Différentes concentrations d'ARN antisens spécifiques de l'ARNm de la fibronectine (*anti-fib*) sont injectées dans des zygotes.

Le phénotype des embryons est ensuite étudié 30 heures après fécondation (entre 120 et 200 embryons sont étudiés dans chaque cas).

Un témoin est réalisé par injection d'autres ARN ne bloquant pas la synthèse de fibronectine (ARN *contrôle*).

Quantité d'ARN injecté	% d'embryons ayant un phénotype identique au mutant <i>nat</i>
7,5 ng ARN <i>contrôle</i>	0
2,5 ng ARN <i>anti-fib</i>	5,3
5,0 ng ARN <i>anti-fib</i>	10,7
7,5 ng ARN <i>anti-fib</i>	21,3

DOCUMENT I.3 : Mise en évidence d'un lien entre la mutation *nat* et la mutation *mil*

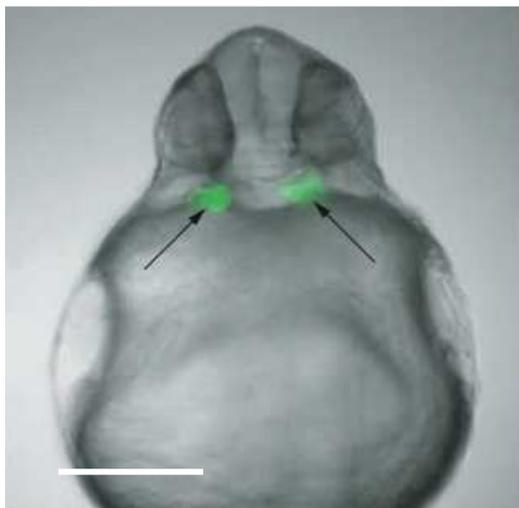
Matsui et al., *Nature Clinical Practice* 4, 77-82 (2007)

Un autre mutant présentant exactement le même phénotype que le mutant *nat* a été isolé : il s'agit du mutant *mil*.

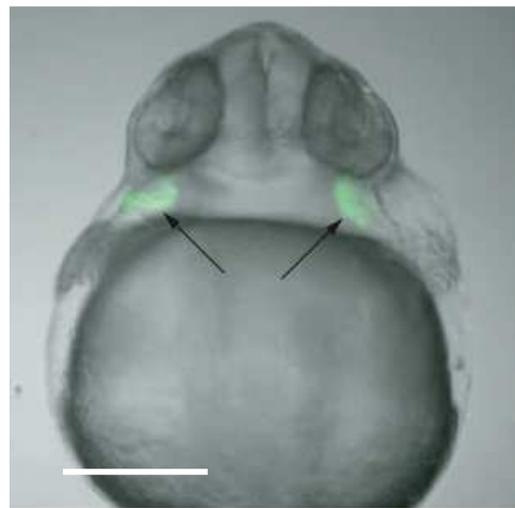
I.3a- Des poissons zèbre sauvages ou hétérozygotes pour la mutation *mil* sont croisés entre eux. Les embryons issus des croisements sont injectés avec l'ARN *anti-fib* qui bloque la synthèse de fibronectine ou avec l'ARN témoin *contrôle*, au stade zygote. 30 jours après la fécondation, la fréquence des phénotypes mutants de type *nat* ou *mil* est étudiée.

	Quantité d'ARN injecté	Pourcentage d'embryons de phénotype mutant
Croisement entre 2 individus hétérozygotes pour la mutation <i>mil</i> : <i>mil/+</i> x <i>mil/+</i>	2,5 ng ARN <i>contrôle</i>	24,8
	2,5 ng ARN <i>anti-fib</i>	32 (dont 80% sont <i>mil/mil</i>)
Croisement entre un individu hétérozygote pour la mutation <i>mil</i> et un individu sauvage : <i>mil/+</i> x <i>+/+</i>	2,5 ng ARN <i>contrôle</i>	0
	2,5 ng ARN <i>anti-fib</i>	15,1 (dont 81,3 % sont <i>mil/+</i>)

I.3b- Phénotypes d'embryons mutants *mil/mil*, après injection d'ARN au stade zygote. Les embryons sont observés sur leur face ventrale 30 heures après fécondation. Les structures cardiaques, révélées à l'aide de marqueurs spécifiques, apparaissent en vert.



Injection d'ARN *contrôle*



Injection d'ARN *anti-fib*

Mutant *mil/mil*

Barre d'échelle : 0,2 mm

DOCUMENT I.4 : Rôle des gènes *NAT* et *MIL* à l'échelle cellulaire

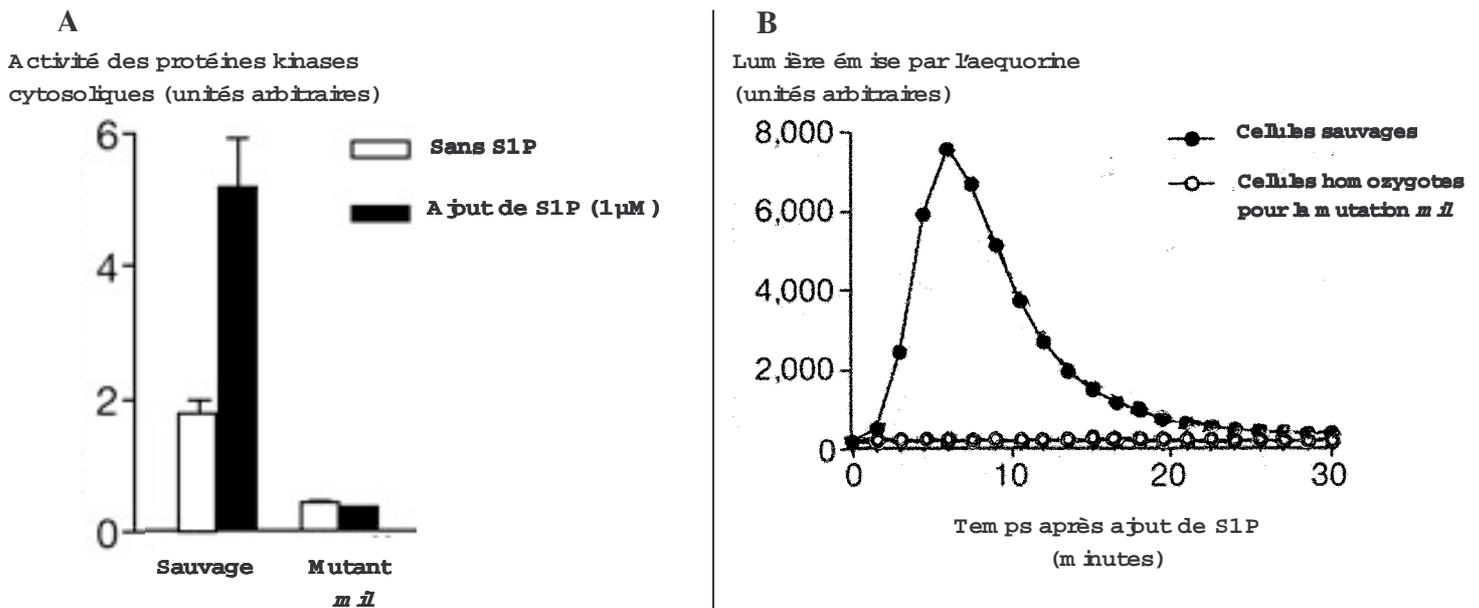
Matsui et al., *Nature Clinical Practice* 4, 77-82 (2007) – Kupperman et al., *Nature* 406, 192-19 (2000)

Le gène touché par la mutation *mil* a été isolé. Il s'agit d'un gène homologue aux gènes codant les récepteurs à la sphingosine-1-phosphate (molécule-signal de nature lipidique, couplée à une voie calcique).

I.4a- Des cellules exprimant l'allèle sauvage ou l'allèle muté du gène *MIL* sont cultivées avec ou sans sphingosine-1-phosphate (S1P).

A- Mesure de l'activité protéine kinase cytosolique.

B- Les cellules utilisées dans cette expérience produisent de l'aéuorine, protéine luminescente qui émet de la lumière en se liant au calcium. On mesure la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .

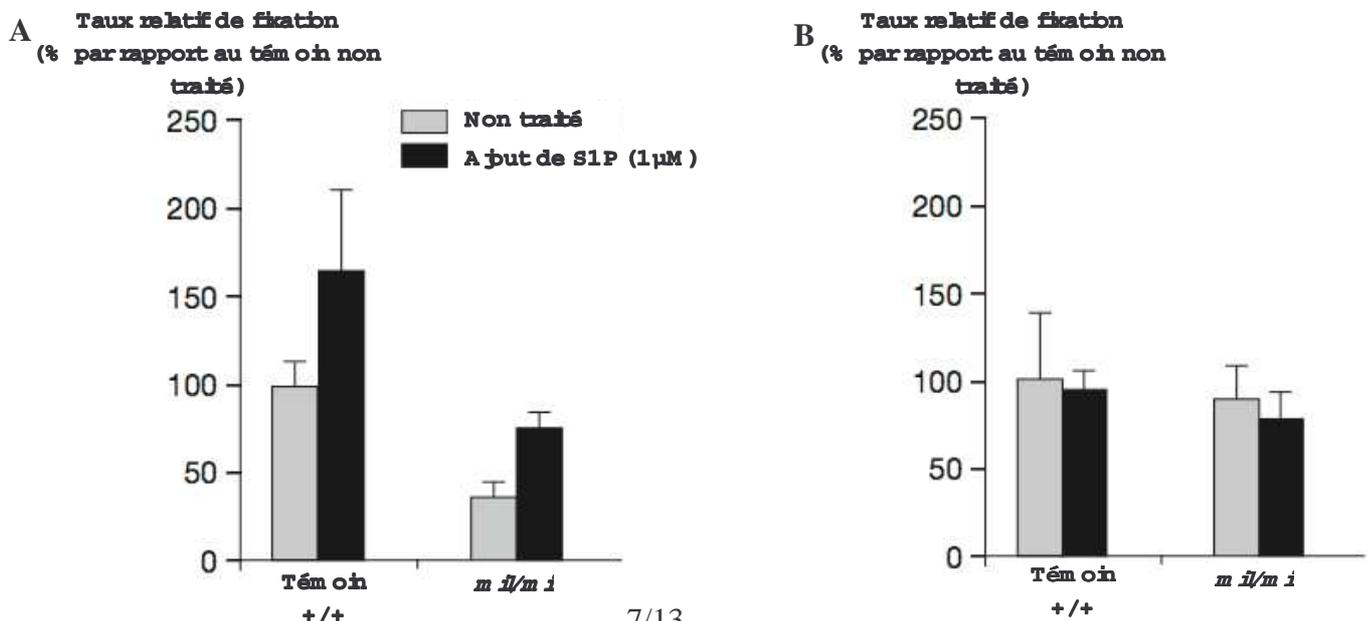


I.4b- Des cellules embryonnaires de poisson zèbre sont cultivées dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de fibronectine (A) ou de laminine (B).

La quantité de cellules fixées sur le fond de la boîte est évaluée avec ou sans ajout de S1P dans le milieu de culture.

Témoin : cellules provenant d'embryons de poisson zèbre sauvages

***mil* :** Cellules provenant d'embryons de poisson zèbre homozygotes pour la mutation *mil*.



Thème II : Le python, organisme modèle pour l'étude du remodelage cardiaque

Le cœur est un organe qui possède la capacité de se remodeler en réponse à des variations des besoins physiologiques. Ainsi, l'entraînement chronique à l'effort induit, chez les Mammifères, une hypertrophie ventriculaire, bénéfique. Le remodelage cardiaque peut aussi être pathologique : c'est le cas dans certaines cardiomyopathies hypertrophiques entraînant la mort subite de jeunes athlètes.

Or aujourd'hui, aucun des Mammifères modèles habituels (rat, souris, lapin) ne permet d'étudier de façon satisfaisante l'hypertrophie cardiaque. Le python constitue un organisme modèle possible pour étudier le remodelage cardiaque.

Dans toutes les expériences suivantes, on travaille sur de jeunes pythons birmans (*Python molurus*) âgés de 2 ans, commercialisés légalement et bien moins dangereux que leurs congénères adultes.

Document II. 1 : La réponse cardiovasculaire du python en situation post-prandiale

Secor & al, *J. Exp. Biol.* 203, 2447-2454 (2000)

L'être humain consomme, plusieurs fois par jour, de petits repas équivalents à seulement quelques % de sa masse corporelle. Au contraire, le python effectue des repas importants, représentant 25 à 65 % de sa masse corporelle et espacés d'un à deux mois, voire de plus d'un an. Il faut cinq à quatorze jours pour que le serpent digère complètement un tel repas. L'animal est donc en situation post-prandiale pendant les quelques jours qui suivent son repas.

Six jeunes pythons, pesant entre 1,160 et 1,600 kg, sont placés en situation de jeûne pendant quatre semaines. Au terme de cette période, au temps zéro de l'expérience, chaque serpent consomme un repas de rats, représentant 25% de sa masse corporelle.

L'évolution de quatre paramètres physiologiques est alors suivie pendant 72 heures. Lorsque c'est nécessaire, les mesures sont ramenées au poids des animaux (kg^{-1}).

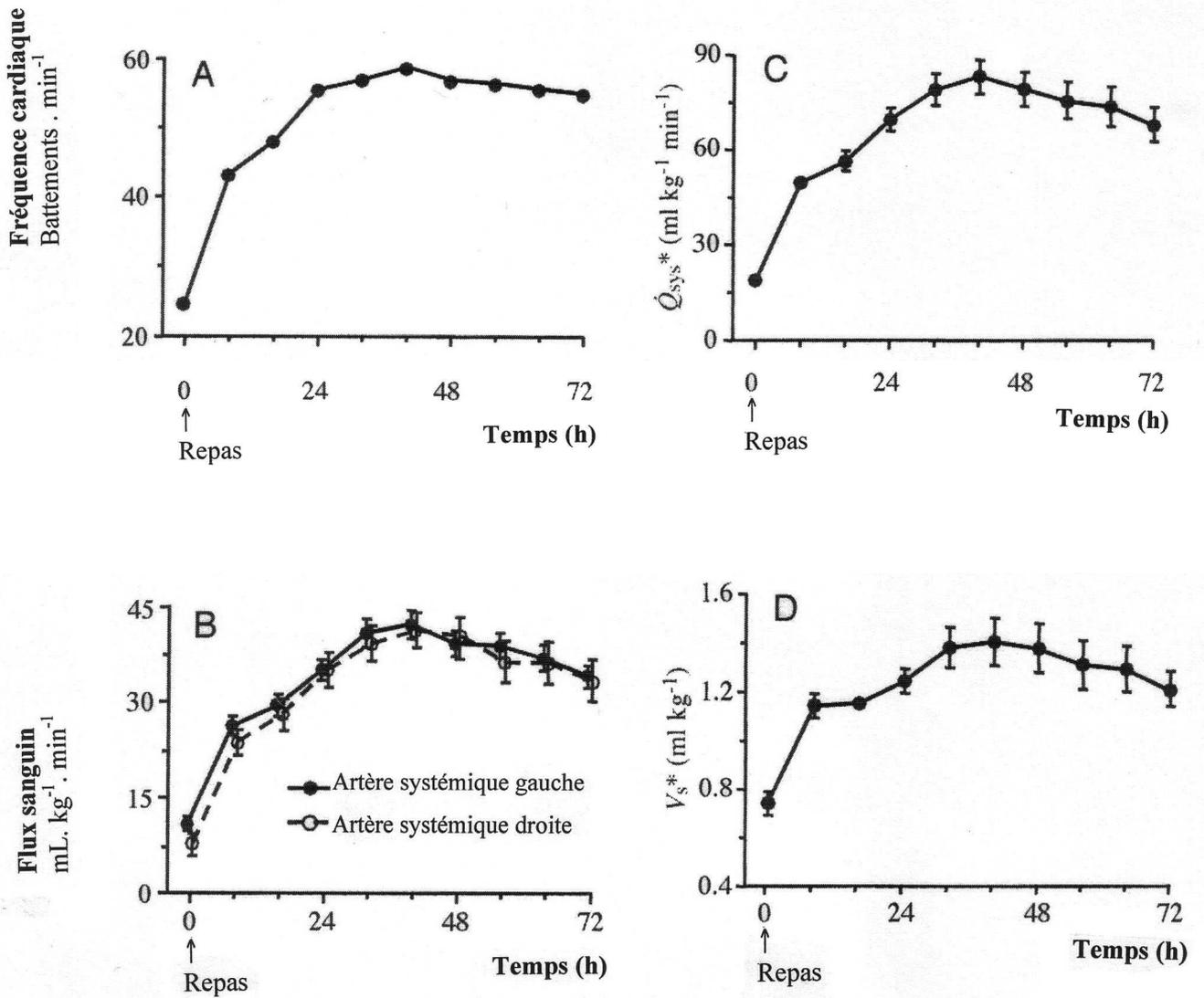
Les paramètres mesurés sont :

- la fréquence cardiaque (en battements $\cdot \text{min}^{-1}$)
- le flux sanguin (en $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) dans les artères systémiques droite et gauche

Ces paramètres permettent de calculer Q_{sys}^* et V_s^* :

- Q_{sys}^* est le débit cardiaque systémique, exprimé en $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Ce paramètre donne une estimation sous-évaluée du débit cardiaque réel, puisqu'il ne prend pas en compte le sang allant dans les carotides, les coronaires et les vaisseaux vertébraux.
- V_s^* est le volume d'éjection systolique, exprimé en $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ et calculé à partir de Q_{sys}^* .

Les courbes obtenues sont reportées sur le graphique ci-après. Les barres verticales représentent l'erreur standard à la moyenne. Elles ne sont pas indiquées lorsqu'elles sont plus petites que le symbole utilisé pour repérer les points expérimentaux.



Évolution de quelques paramètres physiologiques en situation post-prandiale

Document II. 2 : Variations de la masse des organes du python en situation post-prandiale

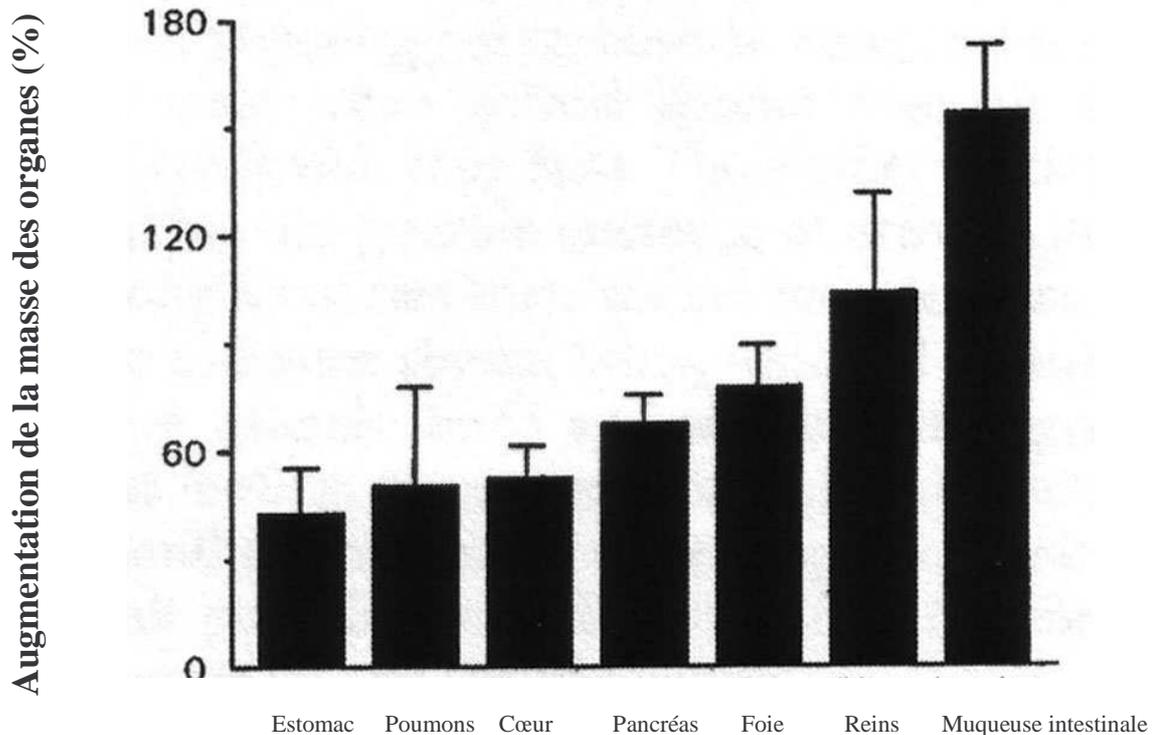
Secor & Diamond, Nature 395, 659-662 (1998)

Douze jeunes pythons, pesant entre 0,503 et 1,286 kg sont placés en situation de jeûne pendant quatre semaines. Ils sont alors divisés en deux groupes de six individus :

- Le premier groupe (animaux en situation de jeûne) est immédiatement sacrifié.
- Le deuxième groupe est nourri, chaque python absorbant l'équivalent de $25,0 \pm 0,1$ % de sa masse corporelle. Ces serpents sont sacrifiés deux jours après (animaux en situation post-prandiale).

Différents organes sont prélevés et pesés. On calcule l'augmentation de la masse de chacun des organes des pythons en situation post-prandiale, augmentation exprimée en pourcentage de la masse moyenne de l'organe provenant des animaux à jeun.

Les résultats obtenus sont indiqués sur le graphe suivant :



Document II. 3 : Étude de l'évolution du cœur au cours de la digestion

Andersen & al., *Nature* 434, 37-38 (2005)

Dix-huit jeunes pythons, pesant entre 0,503 et 1,286 kg sont placés en situation de jeûne pendant quatre semaines. Ils sont alors divisés en trois groupes de six individus. Avant de sacrifier les animaux, on mesure leur consommation en dioxygène :

- Groupe 1 : animaux en situation de jeûne (immédiatement sacrifiés).
- Groupe 2 : animaux en situation post-prandiale (chaque python absorbe l'équivalent de $25,0 \pm 0,1$ % de sa masse corporelle puis est sacrifié 2 jours après).
- Groupe 3 : animaux en situation post-digestive (chaque python absorbe l'équivalent de $25,0 \pm 0,1$ % de sa masse corporelle puis est sacrifié 28 jours après).

Le cœur de chaque animal est prélevé, les ventricules sont isolés et divers paramètres cardiaques sont mesurés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

L'astérisque * suit les valeurs statistiquement différentes de la valeur référence correspondant à la situation de jeûne.

	<i>Groupe 1</i>	<i>Groupe 2</i>	<i>Groupe 3</i>
Poids corporel avant le repas (kg)	0,702 ± 0,045	0,783 ± 0,126	0,721 ± 0,070
Consommation d'O ₂ (mL O ₂ min ⁻¹ kg ⁻¹)	0,67 ± 0,056	4,49 ± 0,385*	0,54 ± 0,070
Masse ventriculaire (g de matière humide)	0,95 ± 0,070	1,34 ± 0,202*	1,07 ± 0,062
Masse ventriculaire (% du poids corporel)	0,136 ± 0,006	0,168 ± 0,004*	0,137 ± 0,007
Masse sèche / masse humide des ventricules (%)	22,4 ± 1,470	23,1 ± 1,91	20,3 ± 0,06
Protéines totales (µg par mg de ventricule)	236 ± 17	208 ± 10	249 ± 24
ADN (ng par mg de ventricule)	2,93 ± 0,11	2,54 ± 0,12*	3,09 ± 0,12
ARN (µg par mg de ventricule)	0,96 ± 0,064	1,11 ± 0,080	1,08 ± 0,080
Protéines myofibrillaires (µg par mg de ventricule)	32,9 ± 2,25	34,8 ± 3,78	30,7 ± 2,89
ARNm (Mhc ventriculaire) (Mhc/18S) Cf notes sous le tableau	0,97 ± 0,163	2,11 ± 0,221*	0,78 ± 0,139
ARNm (Mhc ventriculaire) (intensité) Cf notes sous le tableau	2,320 ± 0,526	31,650 ± 5,280*	5,140 ± 1,020*

Notes :

- Mhc : chaîne lourde de myosine cardiaque.
- La quantité d'ARN ventriculaires codant la Mhc a été déterminée par deux méthodes :
 - Par une méthode d'amplification des ARNm, dérivée de la PCR (Polymerase Chain Reaction). La quantité d'ARN(Mhc) est alors ramenée à celle de l'ARN_r 18S, supposée constante.
 - Par une méthode de quantification après électrophorèse des ARN sur gel et Northern blot, en mesurant l'intensité des bandes obtenues.

Document II. 4 : Phylogénie des squamates et cloisonnement du cœur

Caldwell & Lee, *Nature* 386, 705-709 (1997) - Wang & al., *J. Exp. Biol.* 205, 2715-2723 (2002)

Le cœur des Squamates (taxon monophylétique regroupant les serpents, les lézards et les amphibènes) est formé de deux oreillettes surmontant un unique ventricule, qui peut être partiellement cloisonné en deux cavités ventriculaires.

Des études physiologiques montrent que le cloisonnement du cœur des pythons est particulièrement développé et efficace, autorisant la coexistence d'une circulation basse pression vers les poumons et d'une circulation systémique à haute pression. Cette circulation à haute pression assure au serpent l'apport considérable d'O₂ qui lui est nécessaire en période post-prandiale.

Parmi les Squamates, seuls les lézards varanoïdes présentent aussi cet important cloisonnement ventriculaire.

Cette ressemblance cardiaque trouve-t-elle son origine dans une proche parenté entre les serpents et les lézards varanoïdes ? Ou bien s'agit-il d'une simple convergence fonctionnelle de deux groupes ayant des exigences métaboliques aérobies élevées ?

II.4a- Établissement d'un arbre phylogénétique des Squamates

Quelques spécimens fossilisés d'un Squamate aujourd'hui disparu, *Pachyrhachis problematicus*, ont été trouvés dans des carrières de roches carbonatées datées du Crétacé moyen.

Une analyse minutieuse des pièces anatomiques fossilisées a été effectuée, permettant de réaliser des comparaisons avec les lézards varanoïdes actuels (*Varanus komodoensis*) et les deux principaux groupes monophylétiques de serpents actuels (les scolecophidiens dont *Leptotyphlops columbi* et les alethinophidiens dont *Python molurus*).

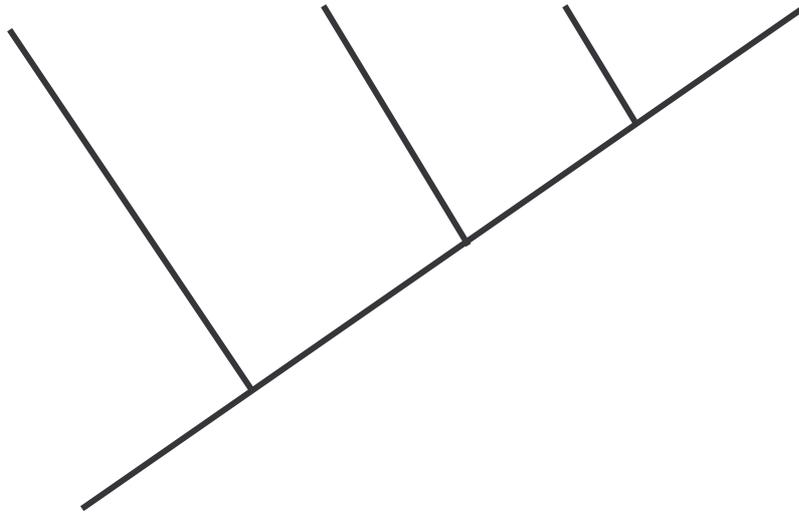
Quelques-unes des données obtenues sont rassemblées dans la matrice de caractères suivante :

	<i>Python molurus</i>	<i>Varanus komodoensis</i>	<i>Leptotyphlops columbi</i>	<i>Pachyrhachis problematicus</i>
Corps allongé	Oui	Oui	Oui	Oui
Nombre de vertèbres précloacales	Plus de 140	Moins de 140	Plus de 140	Plus de 140
Yeux	Bien développés	Bien développés	Rudimentaires	?
Nombre de foramen dentaires	Au plus 2	Au moins 3	Au plus 2	Au plus 2
Membre postérieur	Réduit ou absent	Développé	Réduit ou absent	Développé

Les états dérivés des caractères sont indiqués en caractères maigres, les états primitifs en caractères gras, un point d'interrogation indique un critère non identifiable.

À partir de ces informations, construire l'arbre exprimant les relations de parenté entre les quatre espèces considérées.

Attention : Pour répondre à cette question, vous utiliserez le document suivant que vous complèterez en y plaçant les espèces étudiées et les caractères dérivés. **Vous collerez ce document sur votre copie.**



Arbre à compléter et à coller sur la copie

II.4b- Origine évolutive du cloisonnement cardiaque des Squamates

On admettra que cet arbre a été validé par de nombreux autres caractères.

Parmi les espèces étudiées précédemment, seuls *Python molurus* et *Varanus komodoensis* ont le cœur efficacement cloisonné. Il n'y a pas de données concernant le cœur de *Pachyrhachis problematicus*.

En considérant que le caractère « cœur efficacement cloisonné » est à l'état dérivé, indiquez, en justifiant votre réponse, si ce caractère est apparu une ou plusieurs fois au cours de l'évolution des Squamates, et placez son ou ses apparitions sur l'arbre phylogénétique.

En déduire, en justifiant votre réponse, si les animaux à cœur efficacement cloisonné constituent un groupe monophylétique.