Banque « Agro-Véto »

A – 0106

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.

A partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, étudiez quelques aspects de la différenciation des cellules musculaires striées squelettiques et de leur fonctionnement.

- L'exposé sera encadré par une introduction et une conclusion, et sera structuré par un plan faisant apparaître explicitement les thèmes abordés et la progression suivie.
- L'exposé doit se limiter aux trois thèmes abordés. Les trois parties sont indépendantes.
- Le candidat ne doit pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le sujet indépendamment de l'exploitation des documents.
- Les documents peuvent être découpés et intégrés à la copie, à condition d'être exploités.

THEME I- UNE ETAPE DE LA MYOGENESE : TRANSFORMATION DE MYOBLASTES EN MYOTUBES

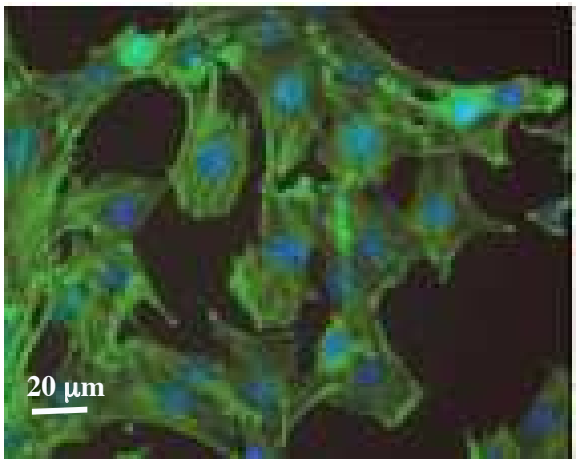
DOCUMENT I.1- Modifications d'une culture de myoblastes dans un milieu de différenciation

D'après Zeschnigk et al, J.Cell Sci., 108, 2973-2981, 1995 - Mege et al., J.Cell.Sci, 103, 897-906, 1992 - Travaglione et al., Cell Death and Differentiation, 12, 78-86, 2005

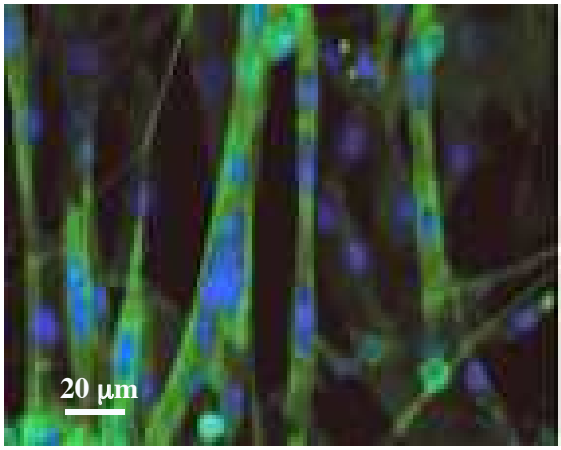
Des cultures *in vitro* de cellules musculaires embryonnaires de souris, les myoblastes, sont utilisées comme modèle pour étudier la myogenèse.

- Dans un milieu de culture dit « de prolifération », les cellules se multiplient.
- Lorsqu'elles sont transférées du milieu de prolifération vers un milieu de différenciation (= induction de la différenciation), des modifications sont observées. Néanmoins, **le nombre total de noyaux de la culture ne change pas.**

Les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Les noyaux sont colorés en bleu, les molécules d'actine sont colorées en vert.



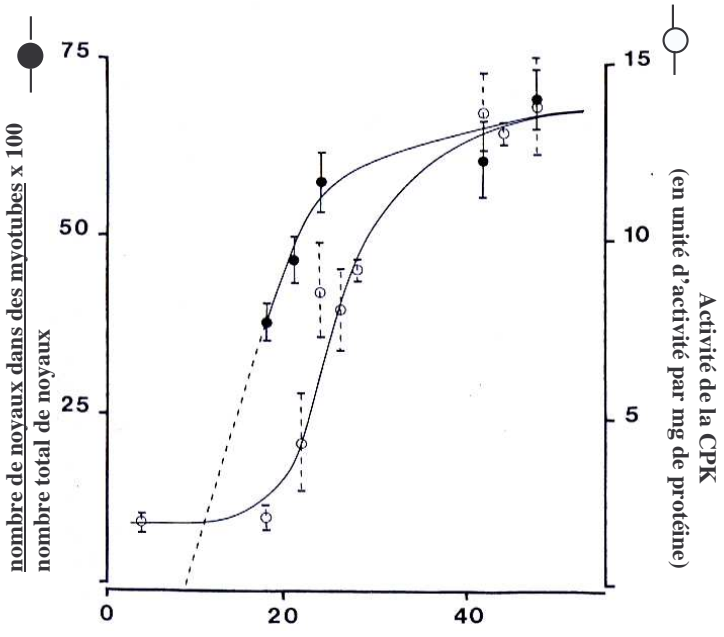
A- Culture des myoblastes en milieu de prolifération



B - Après 72 heures de culture en milieu de différenciation, les cellules se contractent spontanément et sont appelées des myotubes.

C- Le pourcentage des noyaux qui sont présents dans des myotubes est déterminé en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation et exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux (●) .

L'enzyme créatine phosphokinase (CPK) s'exprime de façon spécifique chez les cellules musculaires différenciées. Son activité est mesurée (en unité d'activité par mg de protéine) en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation (○).



DOCUMENT I-2 – Cadhérines et formation de myotubes

D'après Zeschnigk et al, J.Cell Sci., 108, 2973-2981, 1995 - Mege et al., J.Cell.Sci, 103, 897-906, 1992

Chez les vertébrés, le processus d'adhérence cellulaire fait intervenir une famille de molécules, les cadhérines. Ce sont des glycoprotéines membranaires qui, en présence d'ions calcium, adhèrent spécifiquement aux cadhérines d'une autre surface cellulaire.

Des cadhérines musculaires ont été identifiées à la surface des myoblastes. L'implication de ces molécules dans la myogenèse est recherchée.

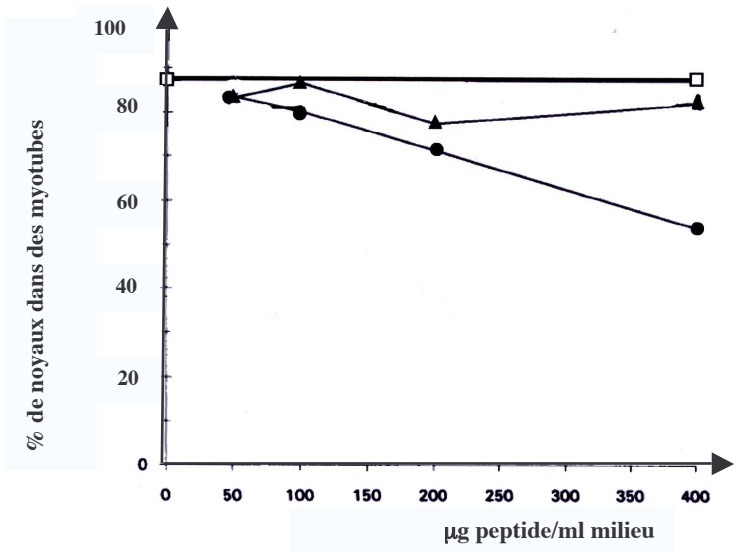
Une culture témoin de myoblastes de Poulet est effectuée dans le milieu de différenciation appelé **milieu DMEM** contenant 2 mM de Ca^{2+}.

D'autres cultures cellulaires sont effectuées dans des milieux de différenciation modifiés :

- **milieu SMEM** : milieu de différenciation à faible concentration de calcium 0,2 mM de Ca^{2+},
- **milieu DMEM + anticorps anti-cadhérine musculaire** à divers taux de dilution (1/500, 1/100 , 1/50),
- **milieu DMEM + diverses concentrations de peptides synthétiques** :
  - * **peptide 1** : peptide synthétique de 10 acides aminés, identique à une zone de la région extracellulaire d'une cadhérine musculaire.
  - *** peptide 2 :** peptide synthétique de 10 acides aminés, de même composition en acides aminés que le peptide 1 mais de séquence différente, n'existant pas dans la cadhérine.

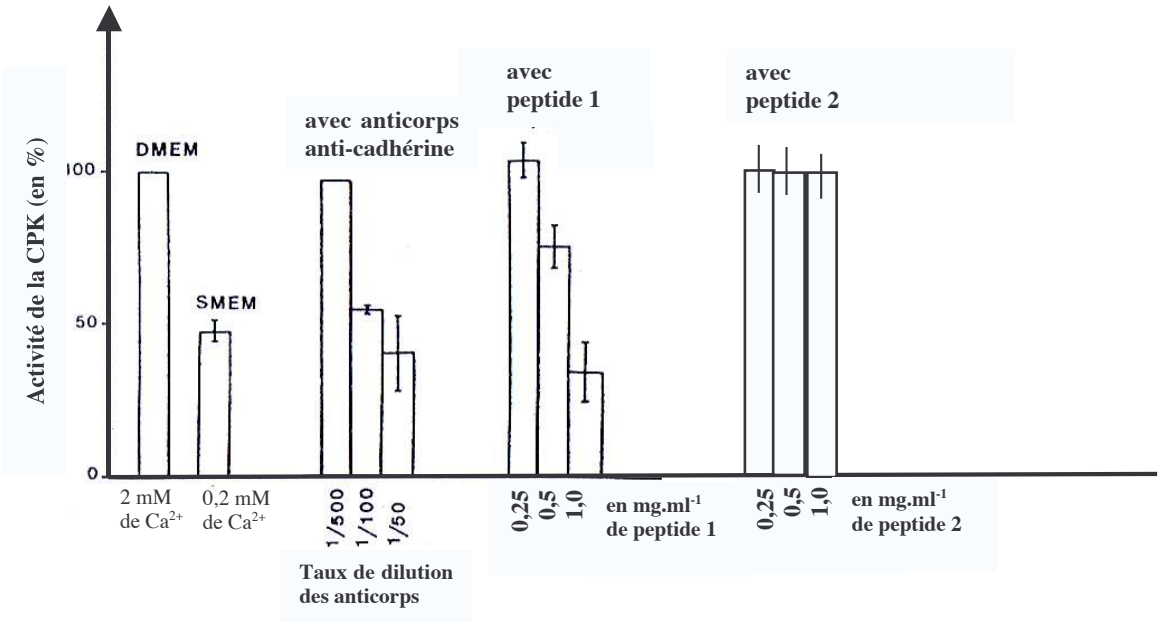
Graphique A : Le pourcentage des noyaux qui sont présents dans des myotubes, exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux, est déterminé 48 heures après le déclenchement de la différenciation en présence ou pas de peptides synthétiques.

- en absence de peptides synthétiques dans le milieu DMEM
- ● milieu DMEM + peptide 1
- ▲ milieu DMEM + peptide 2

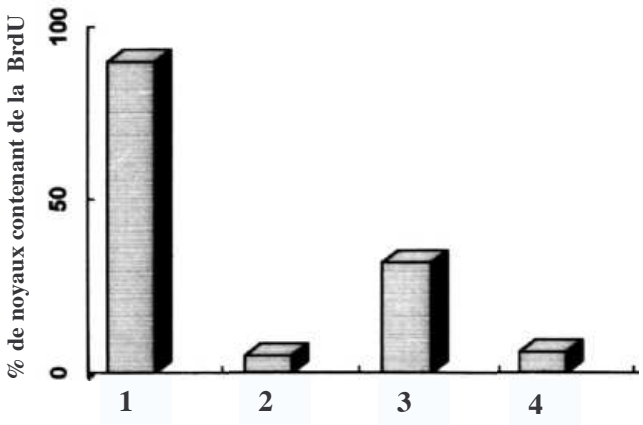


Les résultats représentent la moyenne de trois cultures indépendantes dans lesquelles 1000 noyaux ont été comptés.

Graphique B : Des myoblastes sont mis en culture dans divers milieux de différenciation. L'activité de l'enzyme créatine phosphokinase (CPK) est mesurée après 48 heures de culture. Cette activité est exprimée en pourcentage de l'activité présentée par l'enzyme dans les cellules de la culture témoin DMEM.



Graphique C : La 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU), est un nucléotide analogue de la thymidine dans lequel la base azotée thymine est remplacée par la bromo-uracile. La BrdU se substitue à la thymidine lors de la réplication de l'ADN. La BrdU est ajoutée dans différentes conditions de culture et on mesure le pourcentage de noyaux contenant de la BrdU dans l'ADN.



Ajout de la BrdU:

1 : dans le milieu de prolifération, avant induction de la différenciation,

2 : 36 heures après l'induction de la différenciation sans addition de peptides,

3 : 36 heures après l'induction de la différenciation + 400 mg/ml de peptide 1,

4 : 36 heures après l'induction de la différenciation +400 mg/ml de peptide 2.

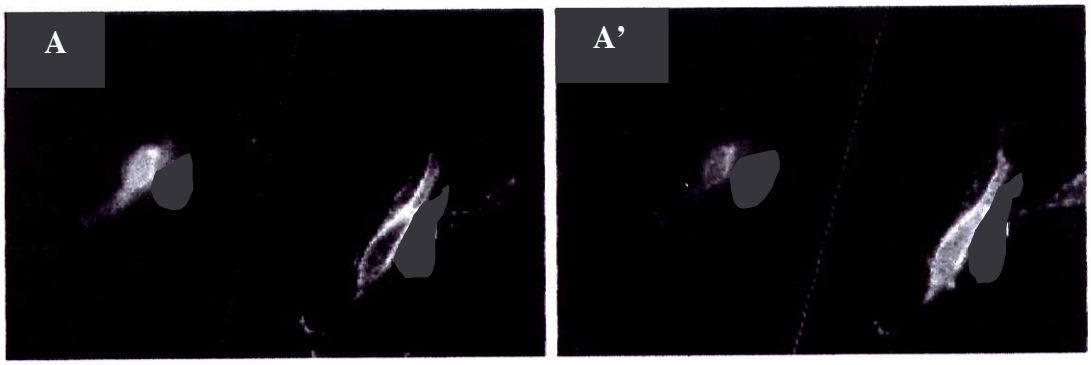
DOCUMENT I-3- Localisation des cadhérines musculaires au cours d'une culture myogénique

D'après Mege et al., J.Cell.Sci, 103, 897-906, 1992

Des cellules en culture sur milieu de différenciation DMEM (contenant 2 mM de calcium) sont fixées et traitées pendant 1 heure avec des anticorps anti-cadhérine musculaire (photographies A et B) et des anticorps dirigés contre un marqueur membranaire présent sur la surface des myoblastes et des myotubes (photographies A' et B'). Les deux types d'anticorps sont marqués par un fluorochrome différent. L'observation est effectuée avec un microscope à fluorescence. Le même champ est observé en A / A' et en B / B'. En A et B, on visualise les cadhérines de la membrane plasmique; en A' et B', on visualise les marqueurs de la membrane plasmique.

A- Cellules en culture depuis 15 heures sur milieu de différenciation + anticorps anti-cadhérine

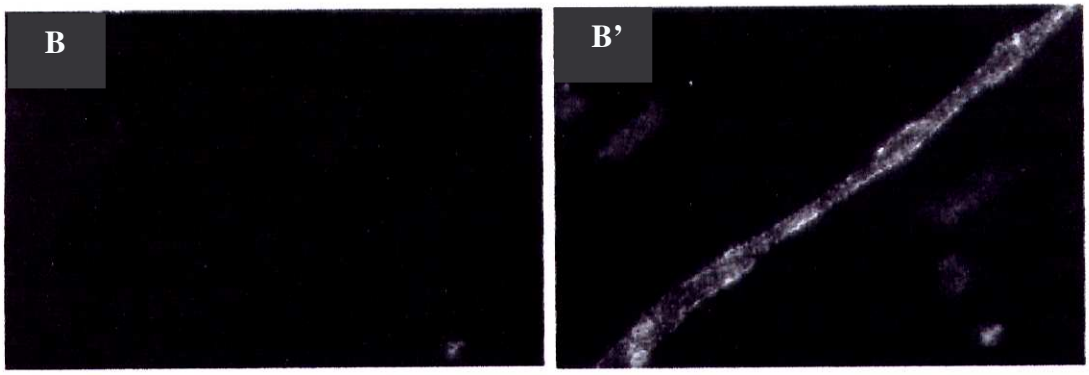
A'- Cellules en culture depuis 15 heures sur milieu de différenciation + anticorps anti-marqueur membranaire



20 µm

B- Cellules en culture depuis 7 jours sur milieu de différenciation + anticorps anti-cadhérine

B'- Cellules en culture depuis 7 jours sur milieu de différenciation + anticorps anti-marqueur membranaire



20 µm

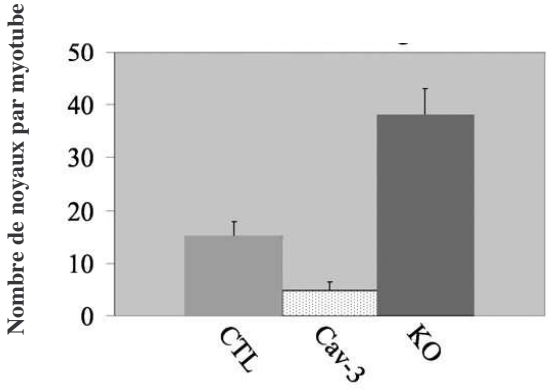
DOCUMENT I-4- Rôle de la cavéoline

Volonte et al., Mol. Biol. Cell, 14, 4075-4088, 2003

Les caveolae sont de petites invaginations de la membrane plasmique, très riches en lipides et en une protéine intrinsèque, la cavéoline. La cavéoline-3 est spécifique de la membrane plasmique des cellules musculaires.
L'observation d'un nombre important de caveolae dans les membranes des cellules de muscles squelettiques de patients atteints de myopathie de Duchenne a amené des chercheurs à étudier leur intervention et le rôle particulier de la cavéoline-3 lors de la différenciation des myoblastes.

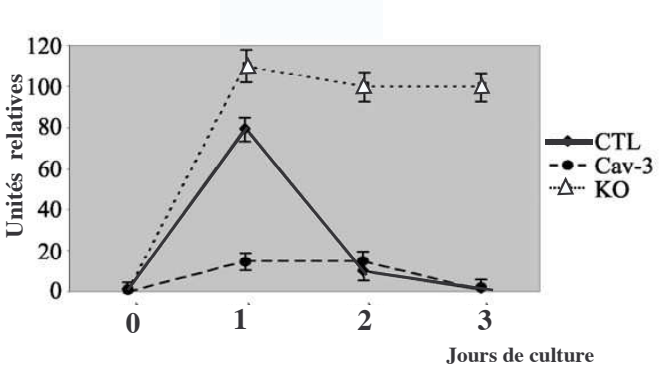
* Des souris transgéniques présentant une surexpression du gène cavéoline-3 servent de source pour des cultures de myoblastes possédant une quantité de cavéoline-3 supérieure à la normale (**Cav-3**).
* Des souris présentant un gène *Cav-3* non fonctionnel (souris « knocked-out ») servent de source pour des cultures de myoblastes ne possédant pas de protéines cavéoline-3 (**KO**).
* Des myoblastes possédant une quantité normale de cavéoline-3 servent de témoins (**CTL**).

A- Des myoblastes issus de souris **CTL**, **Cav-3** et **KO** sont mis en culture sur un milieu de différenciation. Après 3 jours, le nombre moyen de noyaux présents par myotube est déterminé. Au moins 50 myotubes de chaque type sont analysés.

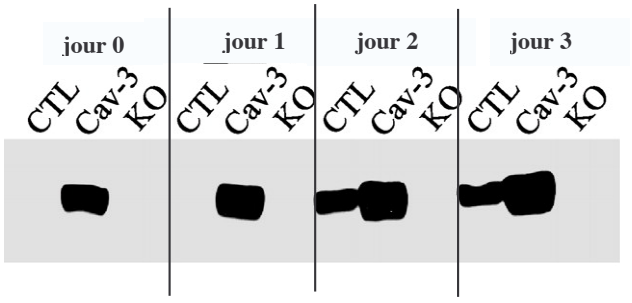


B- On recherche la présence de cadhérine et de cavéoline-3 dans des membranes plasmiques purifiées après 0, 1, 2 et 3 jours de culture sur milieu de différenciation.
Les protéines de ces membranes plasmiques sont extraites et analysées par électrophorèse sur gel. La présence de cadhérine et de cavéoline-3, dans le gel, est visualisée par incubation avec des anticorps spécifiques marqués par un colorant.

B1- Quantité de cadhérine à la surface des cellules en fonction de la durée de culture



B2- Recherche de la cavéoline-3 dans le gel d'électrophorèse après immuno-marquage

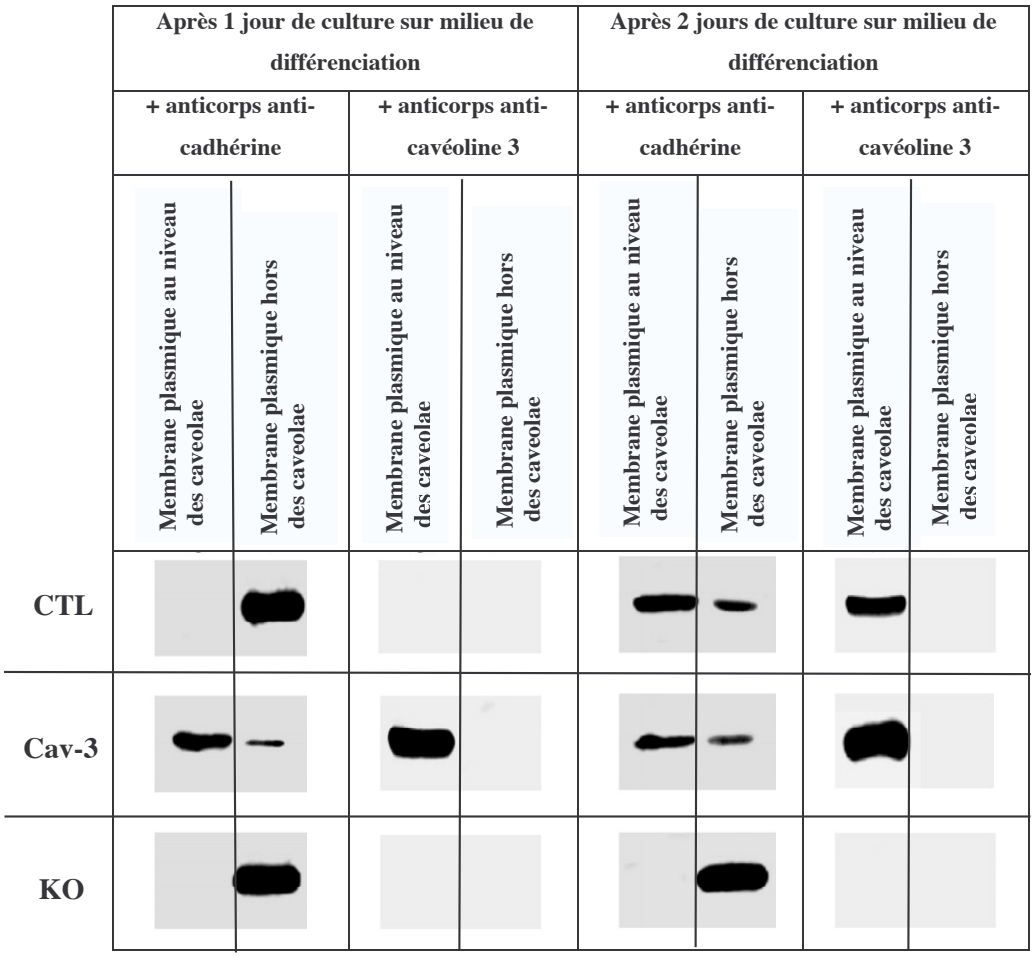


C- La membrane des caveolae présente une densité plus importante que le reste de la membrane plasmique et peut en être séparée grâce à une centrifugation sur un gradient de densité de saccharose.

Les caveolae sont isolées à partir de cellules témoins (**CTL**), de cellules présentant une surexpression du gène cavéoline-3 (**Cav-3**) et de cellules dont le gène *Cav-3* est non fonctionnel (**KO**).

Les protéines de la membrane plasmique sont extraites, analysées par électrophorèse sur gel et visualisées par incubation avec des anticorps anti-cavéoline-3 ou anti- cadhérine après 1 ou 2 jours de différenciation.

La composition protéique de la membrane des caveolae et celle de la membrane plasmique non située dans les caveolae (« membrane plasmique hors des caveolae ») sont comparées.

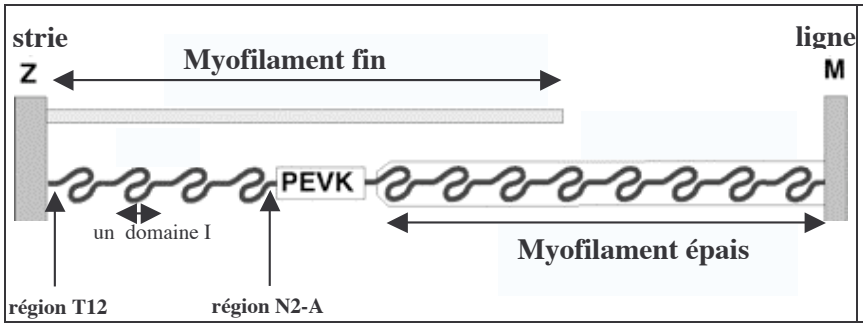


THEME II : FONCTIONNEMENT D'UNE PROTEINE DU SARCOMERE DIFFERENCIE, LA TITINE, LORS D'UN ETIREMENT

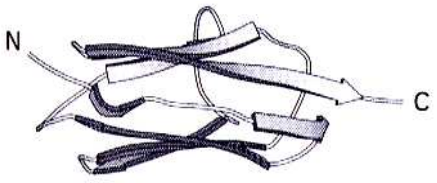
D'après Linke et al., J. Cell Science, 111, 1567-1574, 1998 - Rief et al., Science, 276, 1109-1112, 1997

Li et al., PNAS, 97, 6527-6531, 2000

La titine est une protéine filiforme de poids moléculaire 3.10^6 contenant 30 000 acides aminés. Il s'agit du plus gros polypeptide découvert jusqu'à présent. Chaque molécule mesure 1 µm dans le sarcomère.
La molécule de titine est intégrée dans le myofilament épais et s'étend de la strie Z jusqu'à la ligne M.
Elle est constituée d'une séquence riche en proline, glutamate, valine et lysine (la région PEVK) et d'un grand nombre de domaines repliés, appelés domaines I, numérotés en fonction de leur position par rapport à la strie Z.



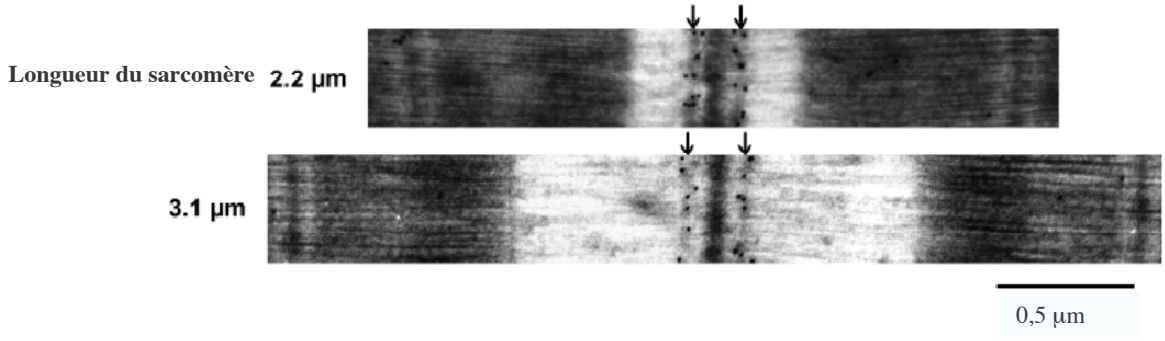
Chaque domaine I contient 89 acides aminés, mesure 4 nm de long et présente la structure tridimensionnelle suivante :



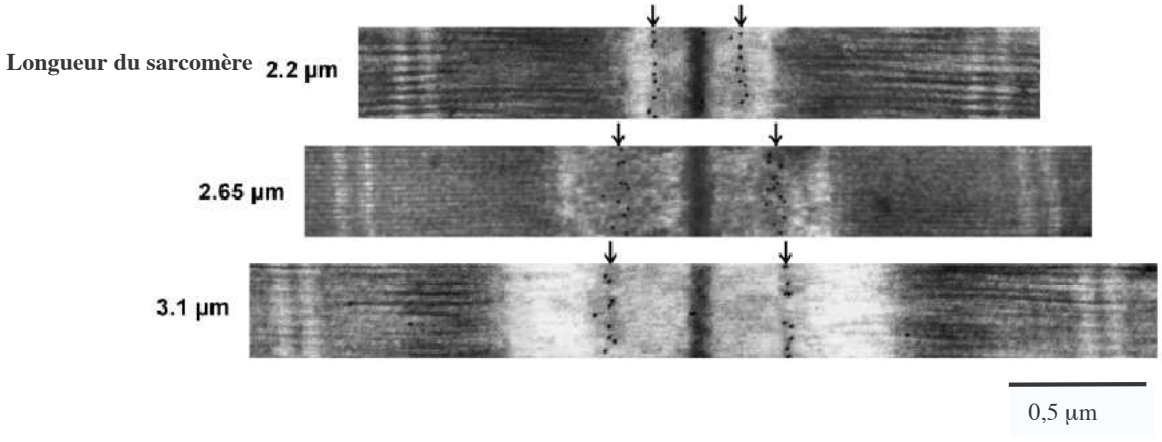
DOCUMENT II 1- Localisation de deux régions de la titine au cours de l'étirement d'un sarcomère

Des myofibrilles sont isolées à partir d'un muscle squelettique de rat. Des anticorps sont créés contre deux régions particulière de la titine : la région T12 et la région N2-A (voir schéma ci-dessus pour leur localisation). Les sarcomères sont observés au microscope électronique à transmission lors d'un étirement.
Les anticorps sont marqués par des particules d'or et leur localisation est indiquée par des flèches sur les clichés ci-dessous.

Myofibrilles + anticorps anti-T12

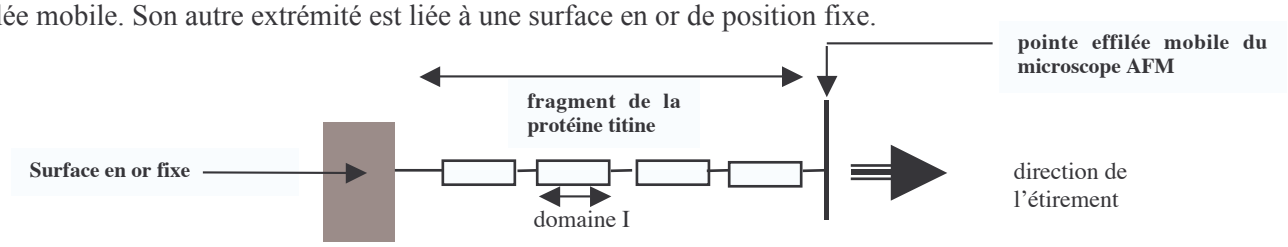


Myofibrilles + anticorps anti-N2-A



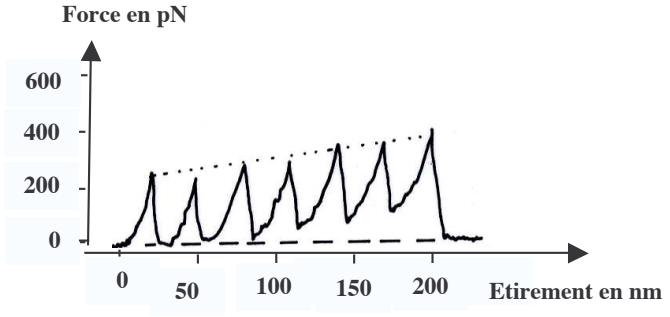
DOCUMENT II-2- Etude de l'étirement de la titine grâce au microscope à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM) est un microscope spécial qui possède une pointe effilée montée sur une tige flexible susceptible de se raccourcir. Une extrémité d'un fragment de molécule de titine est fixée à cette pointe effilée mobile. Son autre extrémité est liée à une surface en or de position fixe.

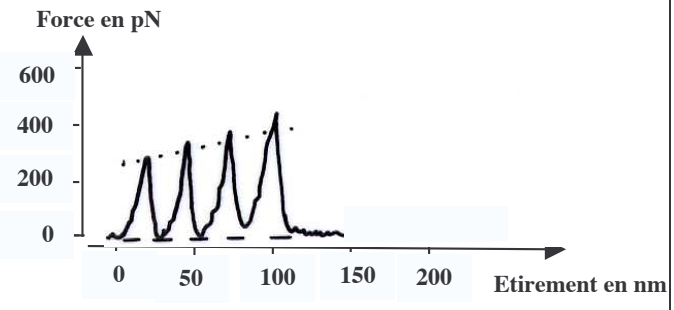


Quand la pointe du microscope AFM se déplace, la protéine subit une traction dont la force est mesurée très précisément. Les graphiques ci-dessous représentent l'enregistrement de la force exercée (en ordonnée et exprimée en piconewtons pN) en fonction de l'intensité de l'étirement imposé par l'expérimentateur (en abscisse et exprimée en nm).

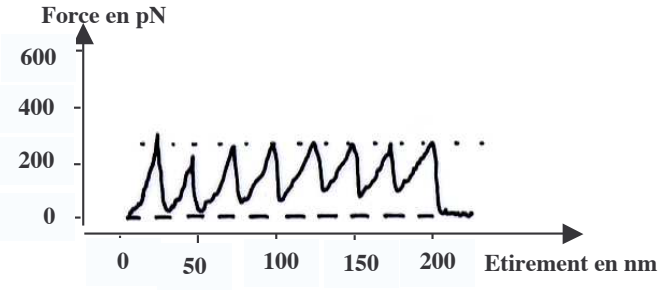
a- Expérimentation effectuée avec un fragment de titine contenant 7 domaines I (du domaine I 27 au domaine I 33)



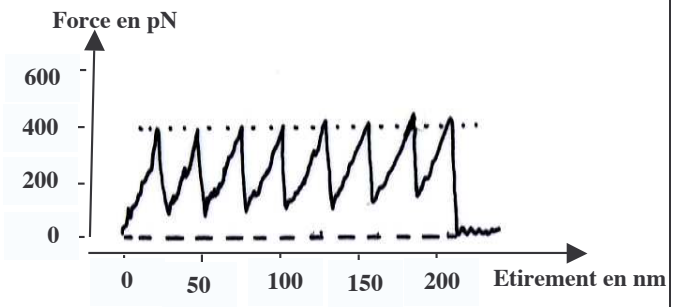
b- Expérimentation effectuée avec un fragment de titine contenant 4 domaines I (du domaine I 27 au domaine I 30)



c- Expérimentation effectuée avec un fragment constitué artificiellement de 8 domaines I 27 identiques, en tandem

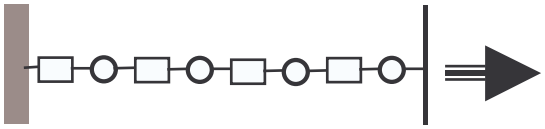


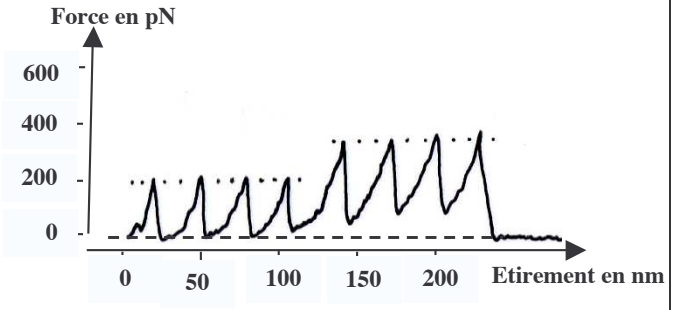
d- Expérimentation effectuée avec un fragment constitué artificiellement de 8 domaines I 28 identiques, en tandem



e- Expérimentation effectuée avec un fragment chimère constitué de 4 domaines I 27 et de 4 domaines I 28

Disposition des domaines dans la protéine chimère:
- les rectangles représentent les domaines I 27
- les cercles représentent les domaines I 28





f- L'incubation d'un fragment I27 dans une solution contenant de l'urée (un dénaturant protéique) à la concentration de 6,6 M élimine l'aspect en dent de scie de l'enregistrement. La force à exercer pour un étirement déterminée est plus faible qu'en absence d'urée.

Document III 1- Les myosines des fibres musculaires

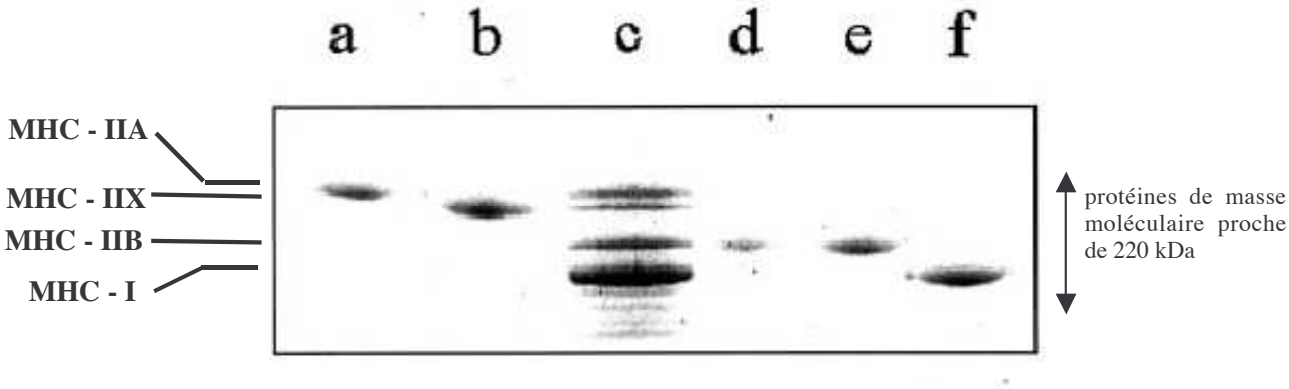
Weiss et al., J.Biol.Chem, 276, 45902-45908 , 2001

A- Electrophorèse sur gel de la chaîne lourde de la myosine de diverses fibres musculaires

Diverses fibres musculaires de 15 mm de long sont isolées à partir de muscles de rats. Les molécules de chaînes lourdes de myosine (MHC pour « Myosin Heavy Chain ») en sont extraites et subissent une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-page) suivie d'une coloration argentique.

Chacune des pistes a, b, d, e, f révèle les molécules MHC extraites d'une seule fibre musculaire isolée.

La piste c révèle les molécules MHC extraites à partir d'un mélange de fibres issues de divers muscles de rats.



B- Activité ATPasique des chaînes lourdes de myosine et vitesse maximale de contraction des fibres musculaires correspondantes

Type de chaîne lourde de myosine présente dans la fibre musculaire	Activité ATPasique de la chaîne lourde de myosine en $nmol.mm^{-3}.s^{-1}$	Vitesse maximale de contraction de la fibre (en unité de $longueur.s^{-1}$)
MHC-I	0,045 ± 0,006	1,05 ± 0,37
MHC-IIA	0,168 ± 0,026	2,33 ± 0,29
MHC-IIX	0,178 ± 0,023	3,07 ± 0,7
MHC-IIB	0,230 ± 0,01	3,69 ± 1,01

Document III 2- Vitesses de contraction de fibres musculaires chez un organisme, la carpe

D'après Eckert , Animal Physiology, Ed. Freeman, 2002

Chez la carpe, les différents types de fibres sont anatomiquement séparés. On distingue :

- **une couche superficielle de fibres de couleur rouge** (contenant de la myosine MHC I) située juste sous la peau,
- **une masse importante de fibres de couleur blanche** (contenant de la myosine MHC IIB) plus profondes.

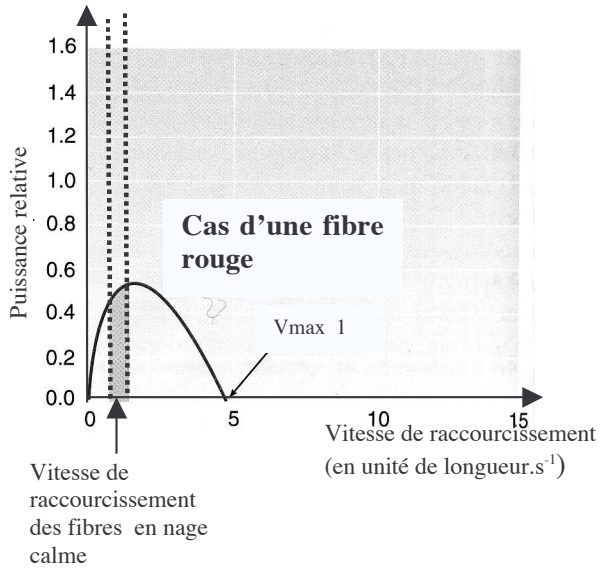
La carpe possède deux types de nage :

- **une nage calme** durant laquelle le corps s'incurve peu et où seuls les muscles rouges périphériques sont sollicités
- **une nage de fuite**, rapide durant laquelle le corps s'incurve beaucoup et dans laquelle interviennent les muscles rouges et les muscles blancs.

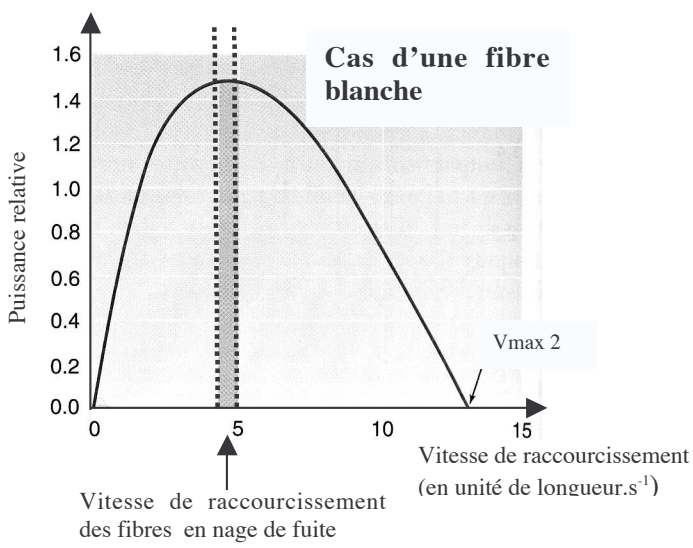
Graphiques a et b

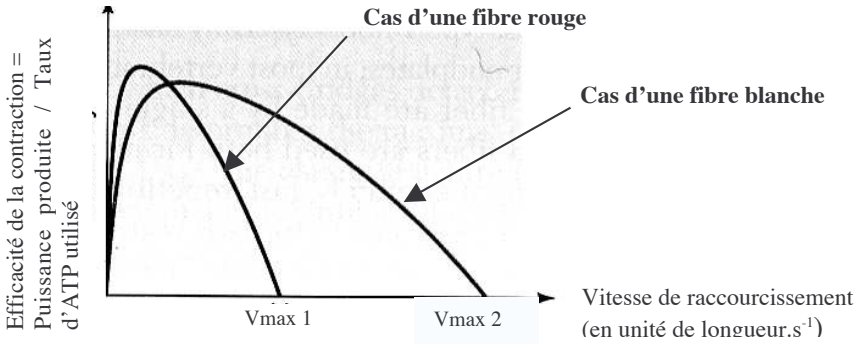
La puissance mécanique générée par la contraction d'une fibre de muscle rouge périphérique (**graphique a**) et d'une fibre de muscle blanc interne (**graphique b**) est mesurée en fonction de la vitesse de raccourcissement de la fibre. La puissance est exprimée en unités relatives.

a-



b-



Graphique c

L'efficacité de la contraction (c'est-à-dire le rapport entre la puissance produite et le taux d'ATP utilisé) est représentée en fonction de la vitesse de contraction.