Concours « Agro – Véto »
A - 0110

BIOLOGIE

Épreuve B
Durée : 3 heures 30 minutes

_____

L'usage d'une 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 de la motilité du spermatozoïde de Mammifère.

- L'exposé sera précédé par une **introduction** et suivi par une **conclusion**. Il sera structuré par un **plan** faisant apparaître explicitement les thèmes abordés et la progression suivie.

- L'exposé doit se limiter aux **trois thèmes abordés**, qui sont tous les trois **indépendants**.

- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités**.

- Il est demandé de réaliser un **schéma bilan** pour le **thème 2 en complétant l'annexe** fournie en page 9 qui devra être **découpée et collée sur la copie**.

- Dans les thèmes 2 et 3, les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'erreur standard de la moyenne (ou écart standard). Les valeurs statistiquement différentes sont parfois indiquées par un astérisque. Lorsque ce n'est pas le cas, on admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

Bibliographie

Berkaloff et al (1977) Biologie et physiologie cellulaires I, Éditions Hermann
*Burgess et al. (2003) Nature **421**, 715-718*
*Miji et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 16501-16506*
*Mukai et Okuno (2004) Biology of Reproduction **71**, 540-547*
*Ni et al. (2009) Molecular Reproduction and Development **76**, 984-993*
*Zhou et al. (2008) PLoS ONE **3**, 3-12*

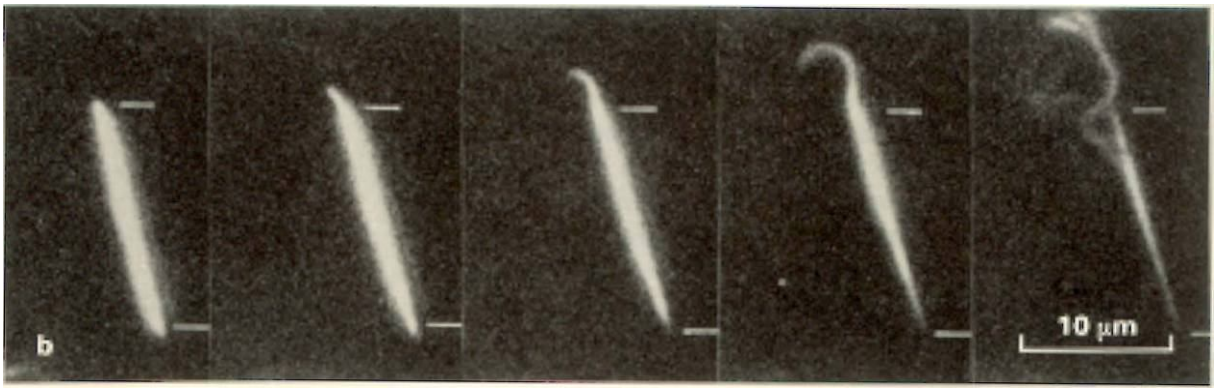
Thème 1 : Utilisation de l'ATP dans le flagelle du spermatozoïde

Les documents de ce thème visent à caractériser les déformations de l'axonème du flagelle et à déterminer le rôle de l'ATP dans ce phénomène. Il est demandé au candidat de veiller à ***orienter les mouvements étudiés****, selon l'extrémité plus ou moins des microtubules, et* ***à quantifier l'amplitude de ces mouvements****.*

1-1 : Analyse du mouvement relatif des microtubules

Des spermatozoïdes sont mis à macérer dans du glycérol froid pendant plusieurs semaines, ce qui a pour conséquence de détruire toutes les structures cellulaires, à l'exception des axonèmes. Les axonèmes ainsi mis à nu sont capables d'onduler comme des flagelles, si l'on ajoute de l'ATP.

➢ Des fragments d'axonèmes dénudés sont soumis à une hydrolyse ménagée par la trypsine, traitement qui rompt les ponts de nexine et les fibres rayonnantes maintenant les microtubules. Ces fragments trypsinisés sont transférés dans un milieu qui assure leur stabilité. Au temps 0, de l'ATP est ajouté au milieu et l'évolution des fragments d'axonèmes est suivie par vidéo-microscopie.

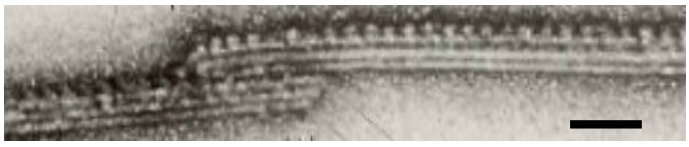


0s 10s 20s 30s 40s

Document 1-1A : Micrographies d'un fragment d'axonème

Observation au microscope à fond noir. Les photographies ont été prises toutes les dix secondes. Les barres blanches horizontales indiquent la position des extrémités du fragment d'axonème au temps 0.

➢ Une extrémité d'un fragment d'axonème est prélevée au temps 30s et observée au microscope électronique après coloration négative.



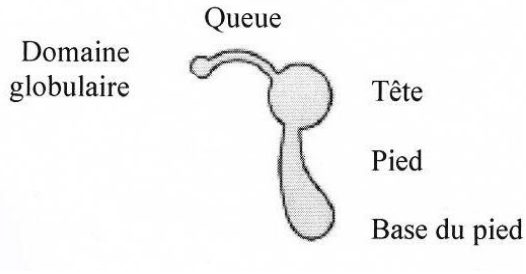
Document 1-1B : Électronographie d'une coupe longitudinale de fragment d'axonème
(Coloration négative – Barre d'échelle : 60 nm)

1-2 : La dynéine, moteur moléculaire

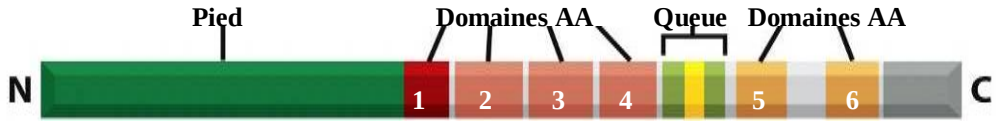
Annexe 1 : La chaîne lourde de la dynéine de l'axonème
Ces données n'ont pas à être étudiées pour elles-mêmes

Les dynéines axonémales sont des protéines multimériques complexes, composées de chaînes lourdes, légères et intermédiaires. On s'intéresse ici aux chaînes lourdes, qui permettent l'interaction entre les microtubules de doublets voisins.

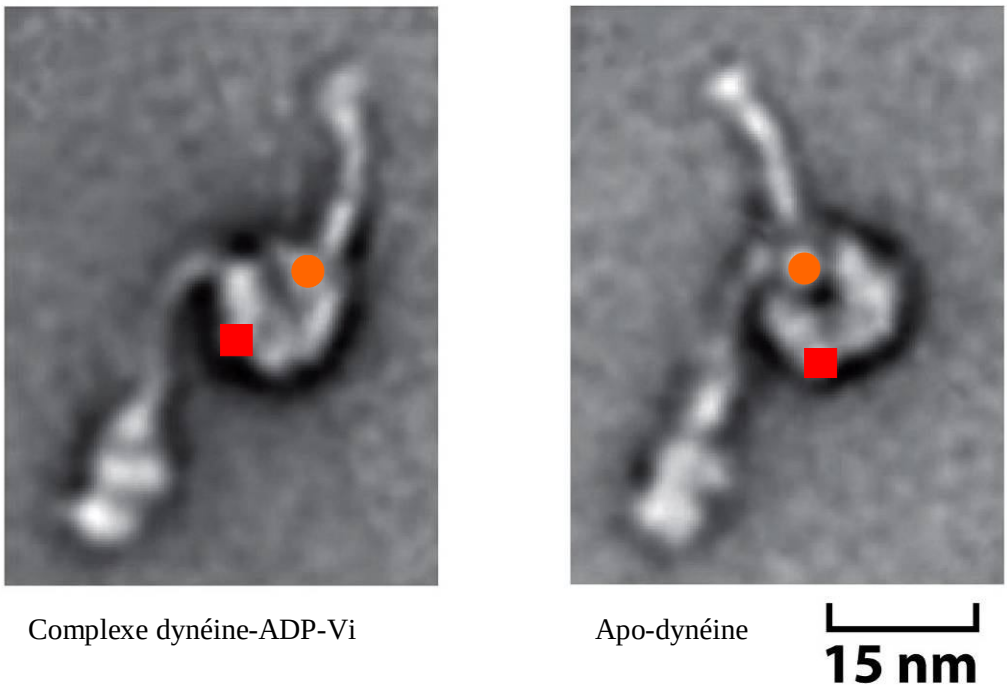
Une chaîne lourde est organisée en trois régions. Le pied interagit par sa base avec les autres chaînes et ancre la dynéine sur le microtubule. La queue possède un domaine globulaire terminal portant le site de liaison transitoire au microtubule du doublet voisin. La tête forme un anneau plan qui comporte 6 domaines ATPasiques (AA) et le domaine C terminal. Le domaine AA1 est le site privilégié de fixation et d'hydrolyse de l'ATP



La structure de la chaîne lourde est la suivante :



La dynéine flagellaire, purifiée en absence de nucléotide, est nommée apo-dynéine. Incubée avec de l'ATP et du vanadate (Vi), elle forme un complexe stable dynéine-ADP-Vi qui a la même conformation que le complexe physiologique dynéine-ADP-Pi.
Apo-dynéine et dynéine-ADP-Pi sont les deux conformations liant le microtubule du doublet voisin. L'apo-dynéine perd son affinité pour ce microtubule en se liant à l'ATP.



Complexe dynéine-ADP-Vi

Apo-dynéine

Document 1-2 : Électronographies de molécules de dynéine
Le domaine AA1 est repéré par un carré rouge.
Le domaine AA5 est repéré par un rond orange.

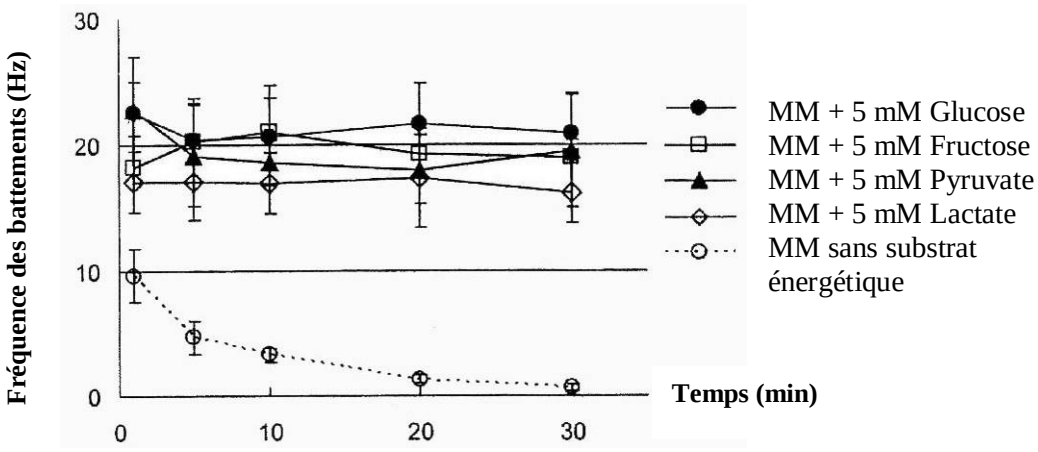
Thème 2 : Régionalisation du métabolisme et substrats énergétiques permettant la motilité du spermatozoïde

Il a été longtemps admis que la pièce intermédiaire fournissait l'ATP utilisé dans l'ensemble du flagelle. Des résultats récents, illustrés par les documents suivants, vous amèneront à reconsidérer les processus cataboliques mis en oeuvre dans les différentes régions du flagelle.
***Un schéma bilan** est attendu : il sera construit en **complétant l'annexe fournie en page 9**.*

2-1 : Substrats utilisables par le spermatozoïde *in vitro*

Des spermatozoïdes parfaitement mobiles sont prélevés dans la région caudale de l'épididyme de souris mâles adultes. Ils sont séparés en 5 lots, incubés à 37°C dans un milieu de culture minimum (noté MM) contenant ou non différents substrats métaboliques normalement présents dans les sécrétions des tractus génitaux mâle ou femelle.

On détermine la fréquence des battements flagellaires de chaque spermatozoïde à partir du temps 0 correspondant au premier contact entre le spermatozoïde et le milieu de culture.



Document 2-1 : Fréquence des battements du flagelle en fonction du temps d'incubation

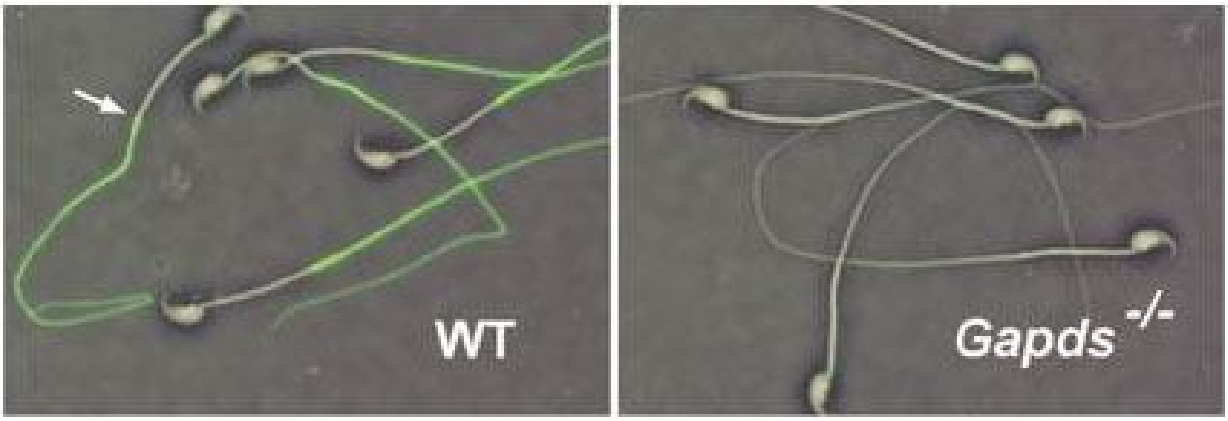
2-2 : Localisation fonctionnelle de la GAPDS, une des enzymes de la glycolyse

La GAPDS est la seule isoforme produite par les spermatozoïdes de la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPD), l'enzyme catalysant l'oxydation du glycéraldéhyde-3-P.

- **<u>Localisation de l'enzyme</u>**

Des anticorps sont préparés contre la GAPDS et ajoutés à des spermatozoïdes murins préalablement perméabilisés. La présence de ces anticorps est révélée par l'ajout d'anticorps secondaires couplés à un marqueur fluorescent en vert.

Cette manipulation est réalisée sur des spermatozoïdes de souris sauvages (WT) et de souris dont l'expression du gène *Gapds* codant la GAPDS est totalement inhibée ($Gapds^{-/-}$) et chez lesquelles aucune activité GAPD n'est détectable.



Document 2-2A : Immuno-localisation de la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (x 1000)

Superposition de clichés de microscopie photonique à épifluorescence et à contraste de phase
La flèche indique la jonction entre la pièce intermédiaire et la pièce principale du flagelle

➢ Rôle de l'isoenzyme GAPDS dans le spermatozoïde

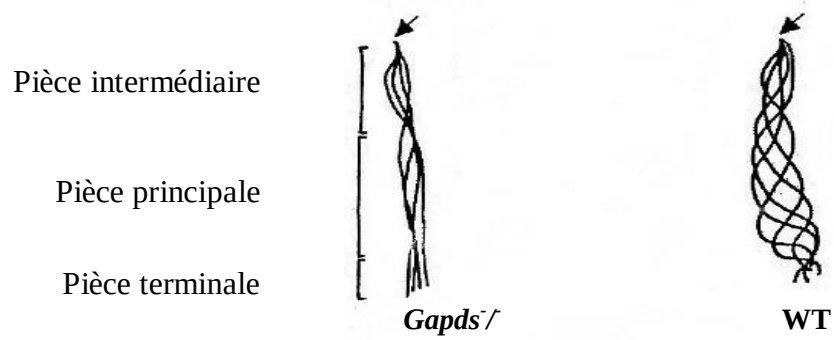
Des spermatozoïdes sont prélevés dans la région caudale de l'épididyme de chaque type de Souris et sont placés séparément dans le milieu de culture **M16** permettant leur survie et contenant comme seule source de substrat énergétique du **pyruvate (0,33 mM) et du lactate (23,28 mM)** à concentrations physiologiques. Plus de 50% des spermatozoïdes provenant des deux types de Souris sont mobiles immédiatement après leur prélèvement.

Le flagelle des spermatozoïdes de Souris WT ondule sur toute sa longueur permettant d'effectuer des déplacements de grande longueur à la vitesse de 63 $\mu m.s^{-1}$.
Le déplacement des spermatozoïdes de Souris *Gapds*$^{-/-}$ est faible et se réalise à une vitesse maximale de 8,2 $\mu m.s^{-1}$. On constate de plus que le battement flagellaire, parfaitement normal, de la pièce intermédiaire, ne se propage pas le long de la pièce principale.

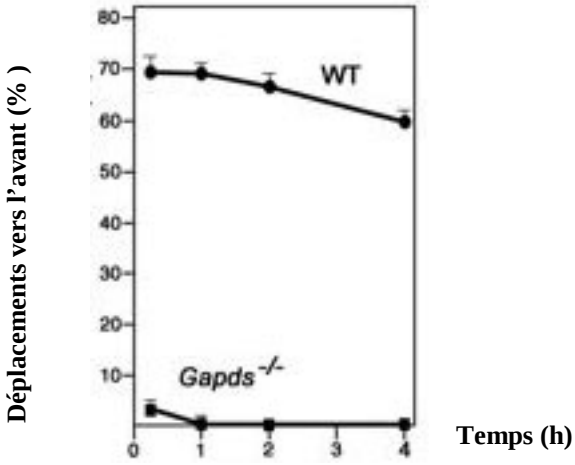
Les différences de battements sont illustrées par la figure suivante obtenue en superposant des tracés correspondant chacun à une position du flagelle au cours d'un même cycle de battement. La flèche indique la position du sommet de la tête du spermatozoïde.

Annexe 2 – Battement du flagelle chez les deux types de Souris

Cette annexe n'est pas à étudier pour elle-même

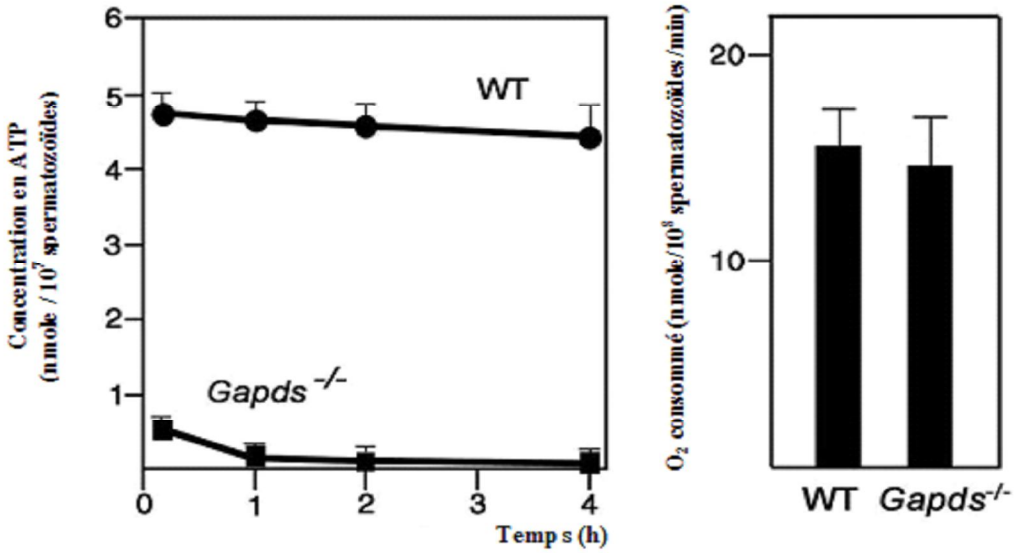


On suit, pendant quatre heures d'incubation dans le milieu **M16**, l'évolution de la motilité efficace des spermatozoïdes en quantifiant leur pourcentage de déplacements **vers l'avant**.



Doc 2-2B – Évaluation de la motilité des spermatozoïdes

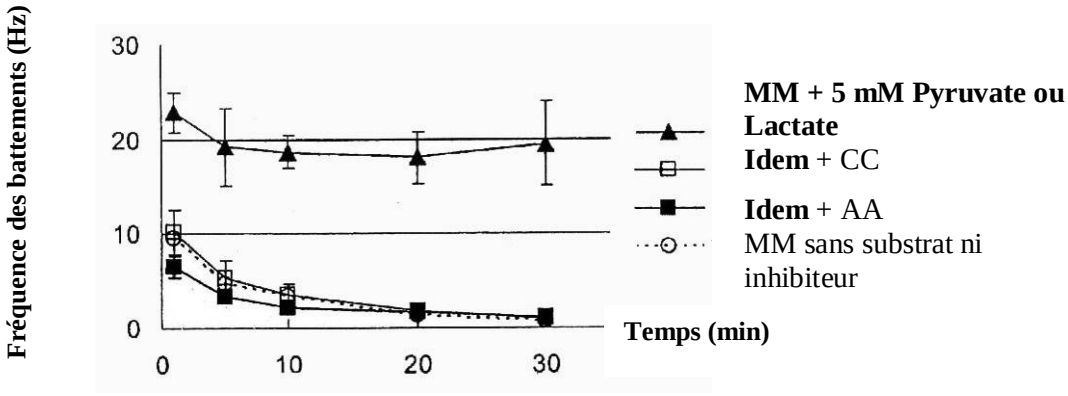
➢ On suit aussi l'évolution de la concentration intracellulaire totale d'ATP ainsi que la consommation en dioxygène de ces spermatozoïdes pendant ces quatre heures d'incubation dans le milieu **M16 contenant du lactate et du pyruvate** comme seule source de substrats énergétiques. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :



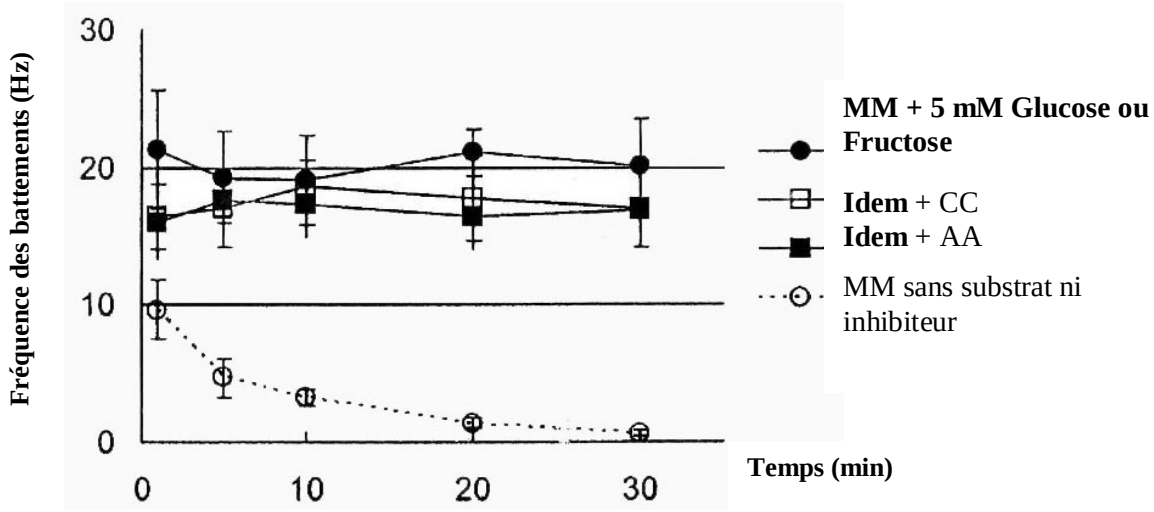
Document 2-2C : Évolution de la concentration en ATP (graphe de gauche)
et de la consommation en O_2 (graphe de droite)

2-3 : Effet d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire sur la motilité du spermatozoïde

➢ On répète les expériences du document 2-1, en rajoutant dans le milieu d'incubation MM différents substrats métaboliques ainsi que l'un des deux inhibiteurs de la chaîne respiratoire : le CC (carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone), ionophore à protons ou l'AA (antimycine), bloquant l'oxydation du complexe III.



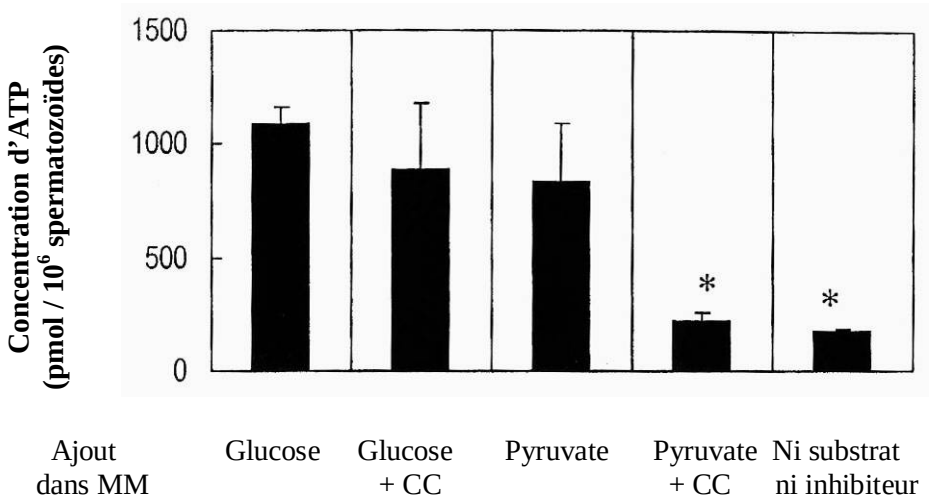
Document 2-3A : Fréquence des battements du flagelle en fonction du temps d'incubation



Document 2-3B : Fréquence des battements du flagelle en fonction du temps d'incubation

➢ Des spermatozoïdes sont répartis en plusieurs lots, incubés à 37°C dans le milieu de culture MM contenant ou non différents substrats métaboliques et du CC. Après 20 minutes d'incubation, la quantité d'ATP qu'ils contiennent est mesurée en picomoles d'ATP par million de spermatozoïdes.

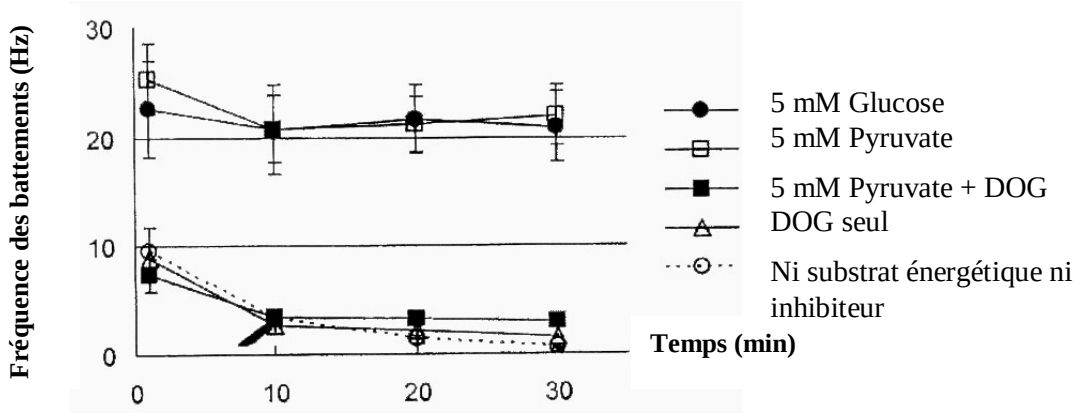
Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, chaque barre correspondant à 3 mesures effectuées chacune sur un mélange de spermatozoïdes provenant de 8 souris différentes.



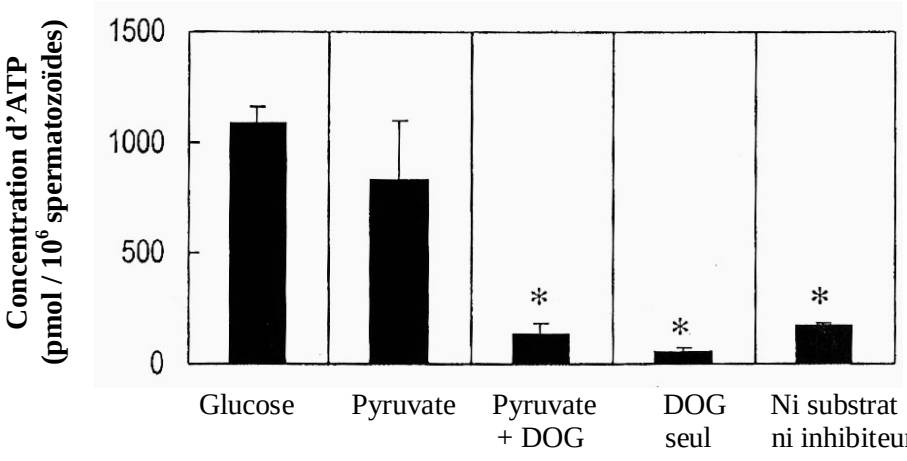
Document 2-3C : Concentration d'ATP dans les spermatozoïdes
Les astérisques signalent les résultats statistiquement différents de la concentration d'ATP en milieu glucosé.

2-4 : Effet d'un inhibiteur de la glycolyse sur la motilité du spermatozoïde

On teste la motilité des spermatozoïdes de Souris et leur production d'ATP en reprenant les expériences exposées en 2-3, en présence ou non de différents substrats et d'un inhibiteur de la glycolyse, le DOG (2-désoxy-D-glucose) qui n'affecte pas la respiration mitochondriale.



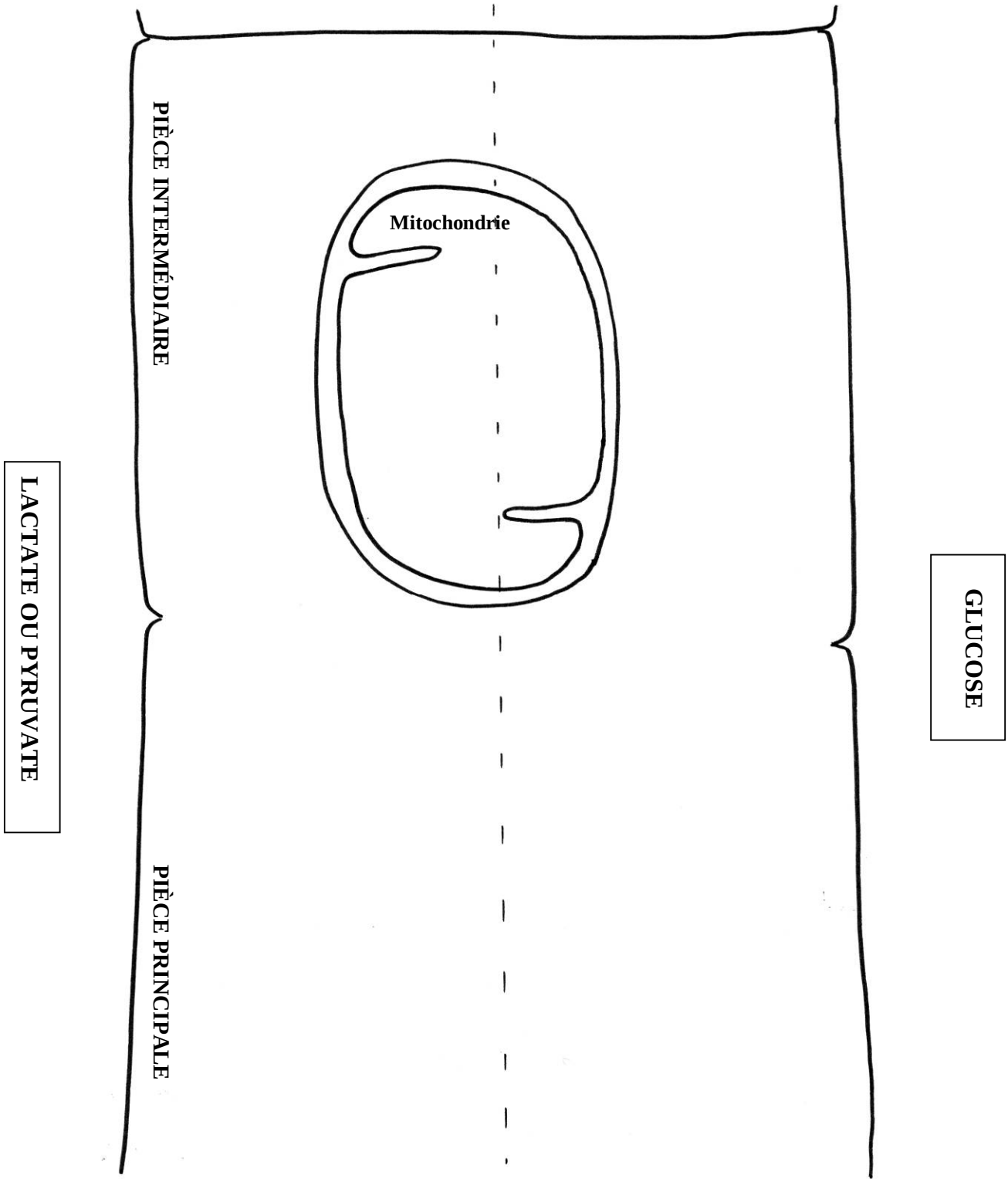
Document 2-4A : Fréquence des battements en présence d'inhibiteurs



Document 2-4B : Concentration d'ATP dans les spermatozoïdes
Les astérisques signalent les résultats statistiquement différents de la concentration d'ATP en milieu glucosé.

Réalisez un schéma bilan reprenant les conclusions issues de l'étude des documents du thème 2 et récapitulant les voies métaboliques mises en jeu dans les différentes régions du spermatozoïde ainsi que la façon dont elles sont connectées les unes aux autres.
Seul le nom des voies, de leurs substrats et de leurs produits finaux est attendu. La succession des réactions chimiques des différentes voies ne doit pas être détaillée.

Ce schéma bilan sera réalisé en complétant l'annexe suivante et <u>en la découpant et la collant sur votre copie</u>. Vous envisagerez sur chaque moitié du schéma les voies mobilisées lorsque le substrat fourni est le glucose ou le lactate et le pyruvate.



Thème 3 : Capacitation et état hypermotile du spermatozoïde

L'objet de cette dernière partie est d'élucider le rôle d'une protéine épididymaire, HongrES1, dans la capacitation et dans l'acquisition de l'état hypermotile du spermatozoïde.

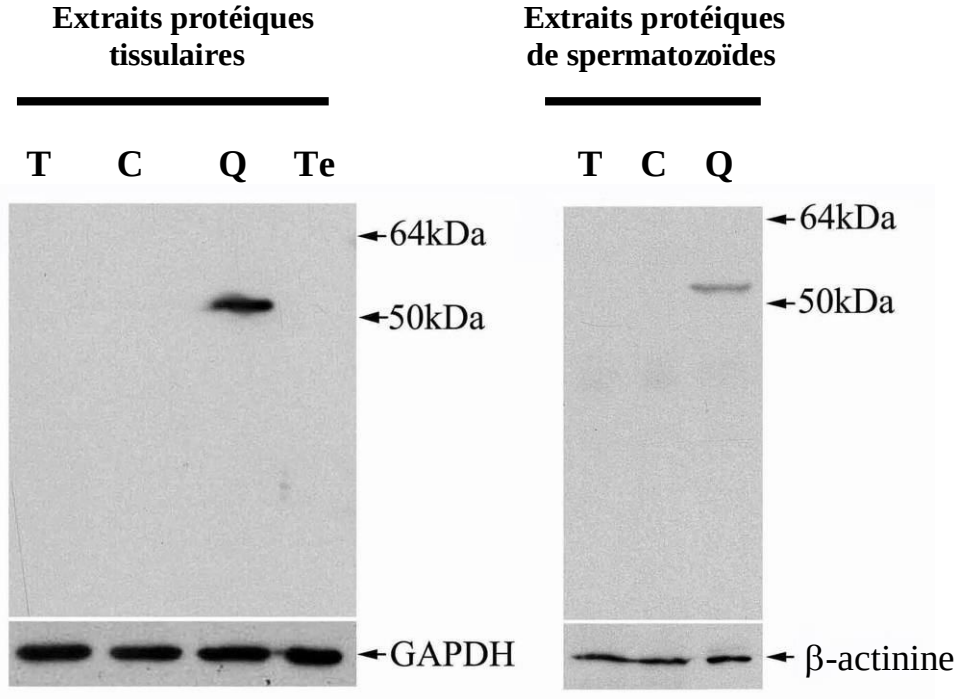
3-1 : Localisation de la protéine HongrES1

HongrES1 est une protéine identifiée en 2002. Des analyses par Northern blot et par hybridation *in situ* ont montré que le gène codant HongrES1 était **transcrit uniquement dans des cellules somatiques de l'épididyme**.

➢ Un **extrait protéique tissulaire total** est réalisé à partir de chaque région de **l'épididyme** (T = tête, C = corps et Q = queue) et du **testicule** (= Te) puis soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). De la même façon, on réalise un **extrait protéique total** à partir de **spermatozoïdes** prélevés dans les trois régions de l'épididyme.

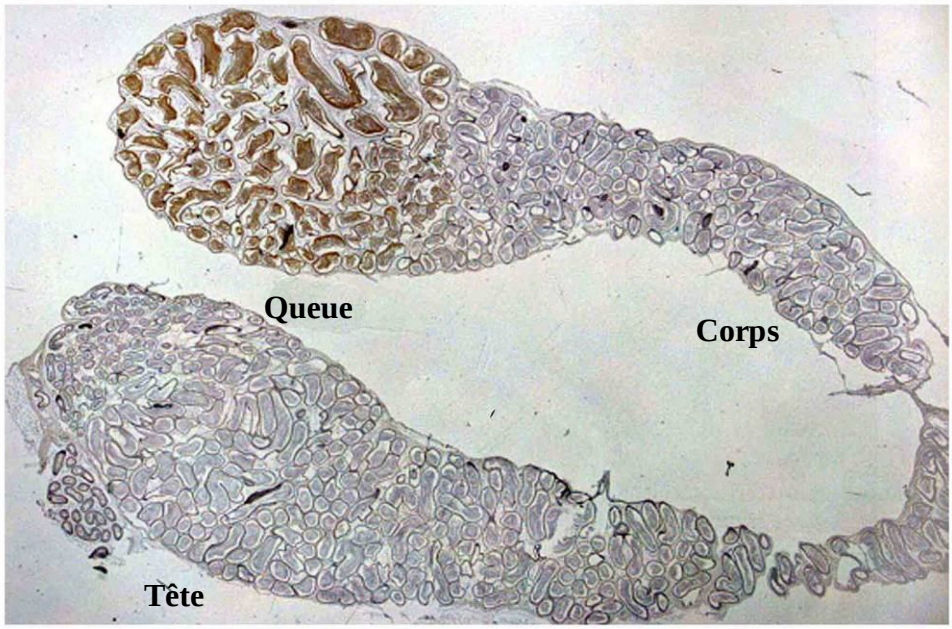
Les résultats des électrophorèses sont analysés par *Western blot* en utilisant :

- un sérum immun réalisé chez le lapin et contenant des anticorps dirigés contre HongrES1
- des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ou la β-actinine.

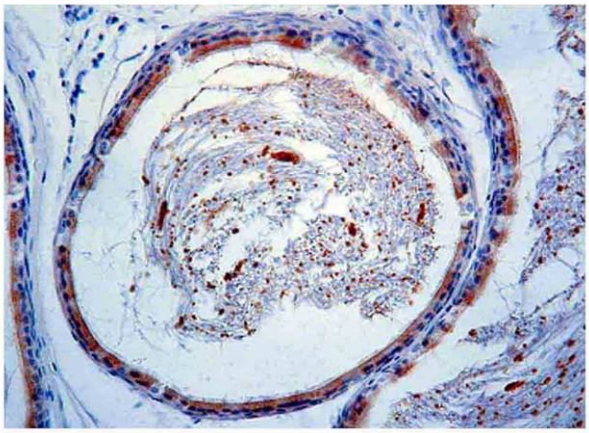


Document 3-1A : Résultats des Western blots

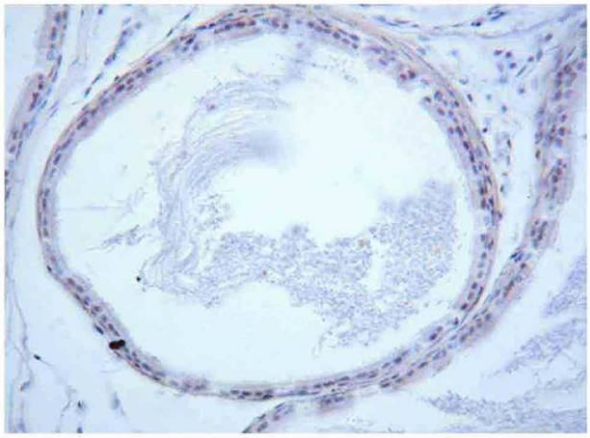
➢ Des coupes d'épididyme sont traitées par immunohistochimie avec l'immunsérum dirigé contre HongrES1 (révélation donnant une coloration rouge-brun) et une coloration de fond hématoxyline-éosine (coloration bleutée et rosée) révélant l'ensemble des structures tissulaires. Les résultats sont indiqués sur les clichés suivants :



Coupe réalisée dans l'épididyme *in toto* (x 20)



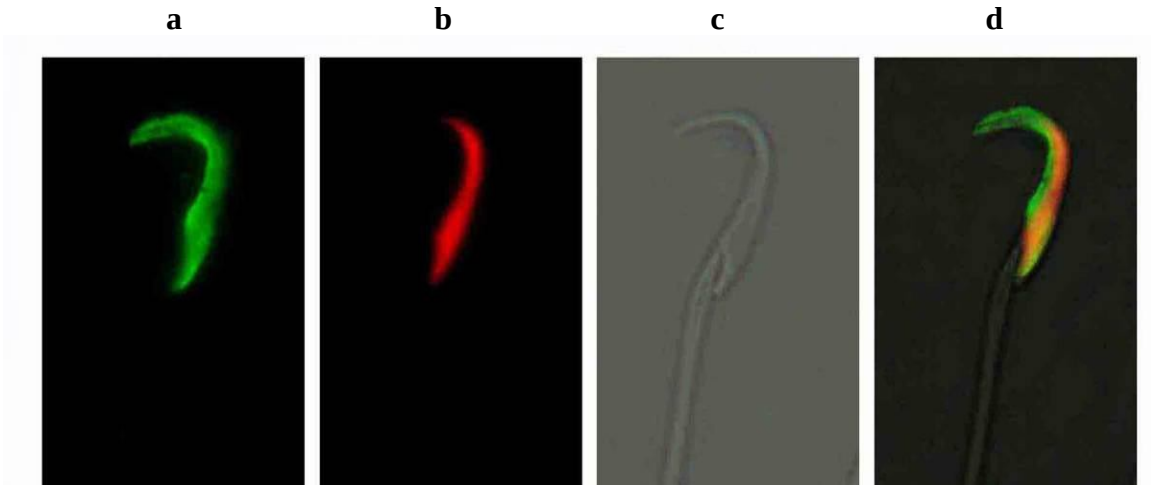
Coupe réalisée dans la queue de l'épididyme (x 100)



Coupe réalisée dans la tête ou le corps de l'épididyme (x 100)

Document 3-1B : Localisation de la protéine HongrES1 par immunohistochimie

➢ Des spermatozoïdes récupérés dans la région caudale de l'épididyme sont fixés et leur membrane plasmique est rendue perméable à de petites molécules comme l'iodure de propidium, un agent intercalant qui fluoresce en rouge lorsqu'il interagit avec les acides nucléiques.
Les spermatozoïdes sont aussi incubés avec des anticorps dirigés contre HongrES1, marqués à la fluorescéine verte et trop volumineux pour franchir la membrane plasmique ainsi perméabilisée.



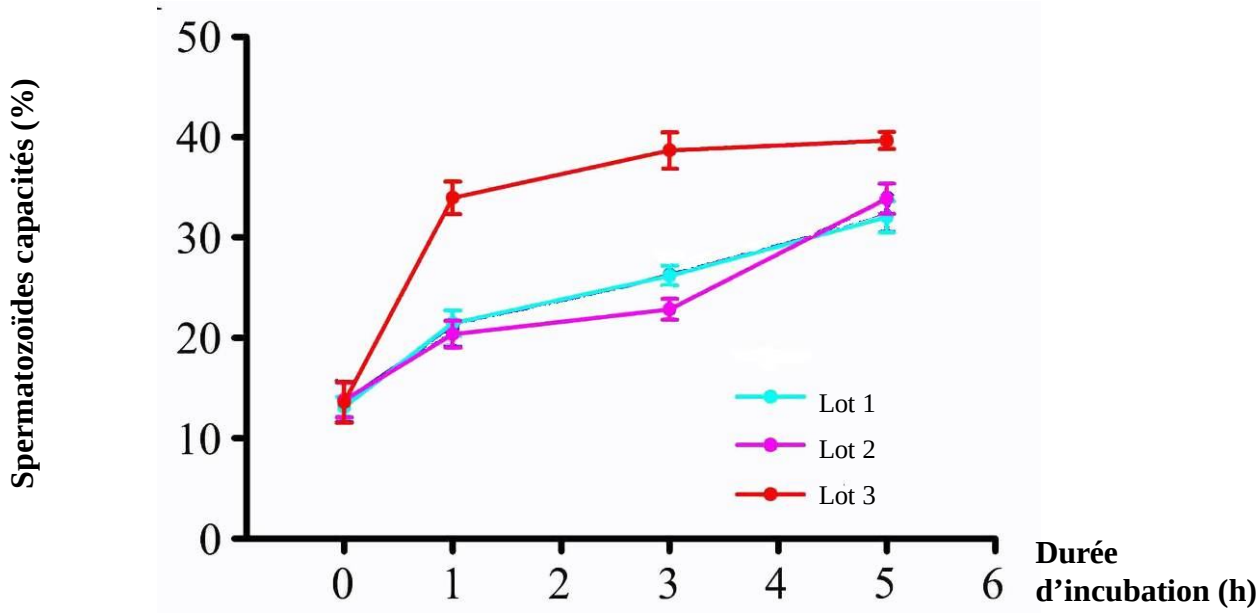
Document 3-1C : Micrographies d'un même spermatozoïde (x 4 000)
a : Microscope confocal, jeu de filtres spécifique de la fluorescéine
b : Microscope confocal, jeu de filtres spécifiques de l'iodure de propidium
c : Microscope à contraste de phase
d : Superposition des clichés a, b et c

3-2 : Effet de HongrES1 sur la capacitation

➢ Des spermatozoïdes, prélevés **dans la queue de l'épididyme**, sont lavés, séparés en quatre lots et sont placés dans le milieu **M1**, milieu qui favorise la capacitation des spermatozoïdes. On suit, au cours du temps, le pourcentage de spermatozoïdes capacités dans différentes conditions :

- Lot 1 : pas de traitement supplémentaire.
- Lot 2 : traitement par un sérum pré-immun *ie* un sérum de lapin non immunisé contre HongrES1.
- Lot 3 : traitement par le sérum dirigé contre HongrES1.

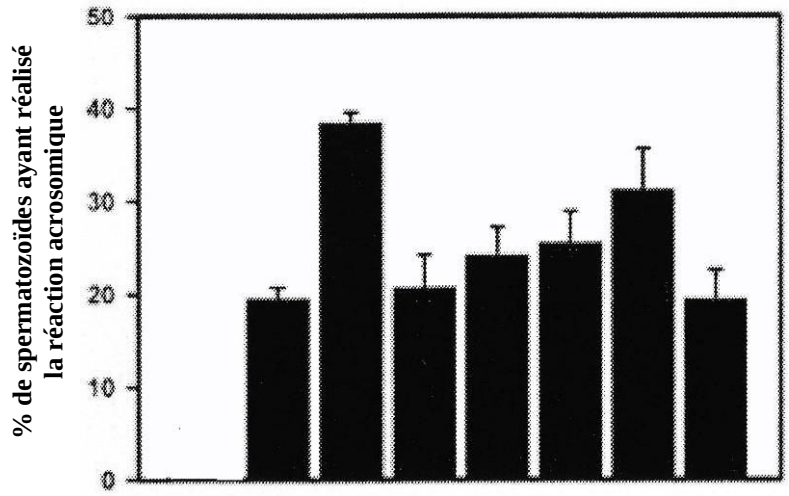
On détermine le nombre de spermatozoïdes capacités en fonction de la durée d'incubation. Les résultats sont reportés sur le graphe suivant :



Document 3-2A : Évolution de la capacitation de spermatozoïdes en fonction du temps

➢ Des spermatozoïdes sont prélevés dans la queue de l'épididyme, lavés et placés dans le milieu M1. Ils y sont incubés pendant 6 heures en présence ou non de concentrations variables de protéine HongrES1 soluble.

Les spermatozoïdes sont ensuite lavés et resuspendus dans du milieu M1 frais, ne contenant pas de HongrES1, mais contenant 2 mM Ca^{2+} qui rend la réaction acrosomique possible. Ils sont incubés 15 minutes en présence d'extraits solubles de zone pellucide (protéines ZP). On dénombre alors les spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique (résultat exprimé en %). Ce pourcentage **reflète le nombre de spermatozoïdes ayant réalisé préalablement la capacitation**.



Conditions	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	
ZP (1 ZP/µl)	-	+	+	+	+	+	-	
HongrES1 (1 µg/ml)	-	-	**1,0**	**0,5**	**0,25**	**0,1**	**1,0**	**en µl**

Document 3-2B : Premier effet de la protéine HongrES1 sur la capacitation des spermatozoïdes

➢ Des spermatozoïdes sont prélevés dans la queue de l'épididyme, lavés et incubés dans le milieu M1 pendant 6 heures.

Ils sont ensuite lavés et incubés pendant 30 minutes dans du milieu M1 frais contenant ou non la protéine HongrES1 (1 µg/ml) soluble.

Puis 2mM de Ca^{2+} sont ajoutés ainsi que des extraits solubles de zone pellucide (protéines ZP). Au bout de 15 minutes, on dénombre les spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique, indiquant le nombre de spermatozoïdes ayant **préalablement effectué la capacitation** :

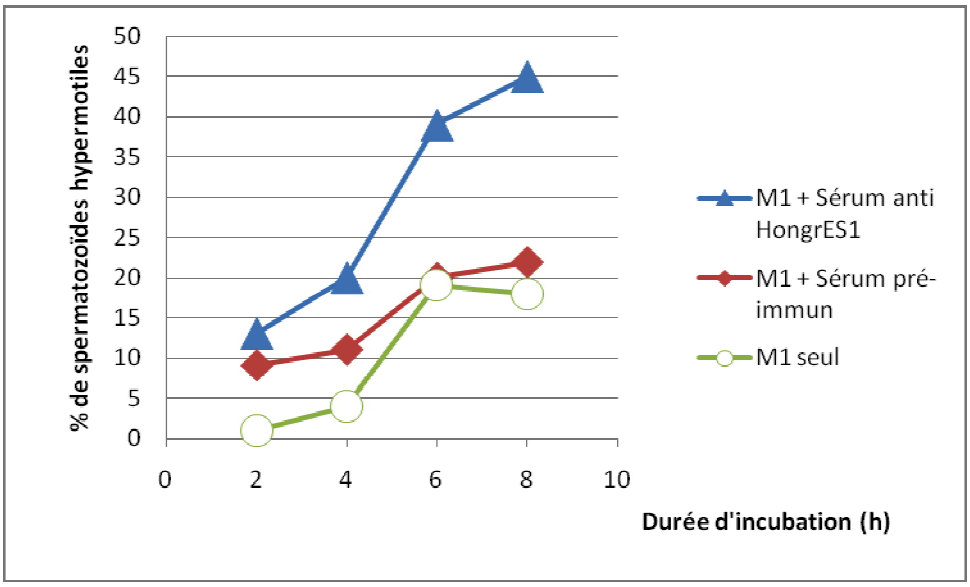
Condition d'incubation	**% de spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique**
Sans HongrES1	**38,2 ± 4,6 %**
Avec HongrES1	**19,6 ± 2,8 %**

Document 3-2C : Second effet de la protéine HongrES1 sur la capacitation des spermatozoïdes

3-3 : Effet de HongrES1 sur l'hypermotilité des spermatozoïdes

Des spermatozoïdes sont prélevés dans la **queue de l'épididyme**, lavés et incubés dans le milieu M1 additionné ou non de sérum dirigé contre HongrES1 ou bien de sérum pré-immun *ie* de sérum de lapin non immunisé contre HongrE1S.

Après des durées variables d'incubation, les spermatozoïdes sont lavés et resuspendus dans du milieu M1 frais contenant 2mM Ca^{2+}. Au bout de 15 minutes, on dénombre les spermatozoïdes hypermotiles.



Document 3-3 : Évolution de l'hypermotilité des spermatozoïdes en fonction du temps

FIN DE L'ÉPREUVE