

DEVOIR D'ENTRAINEMENT

BIOLOGIE

Epreuve sur support de documents

Durée 3 h

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

LE MÉSODERME

Le sujet comporte **deux parties indépendantes**, consacrées chacune à un thème.

Le candidat ne devra pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le thème abordé, indépendamment de l'exploitation des documents.

Il n'est pas nécessaire de rédiger une introduction et une conclusion.

Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés et exploités ; des croquis légendés peuvent également être proposés.

Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction (orthographe, grammaire, précision de l'expression) et à la présentation des différents schémas.

Attention : Il n'est demandé **ni** introduction **ni** conclusion générale pour **l'ensemble** du sujet.

Bibliographie

- Agius et al. (2000) Development* **127**, 1173-1183
Bessho et al. (2003) Genes Dev. **17**, 1451-1456
Boucaut et al. (1985) J. Embryol.exp. Morph. **89**, 211-227
De Vos et al. (1980) Atlas d'embryologie des Vertébrés, Masson
Evrard et al. (1998) Nature **394**, 377-381
Forsberg et al (1998) Curr. Biol. **8**, 1027-1030
Hirata et al. (2004) Nature Genetics **36**, 750-754
Zang et al (1998) Nature **394**, 374-377

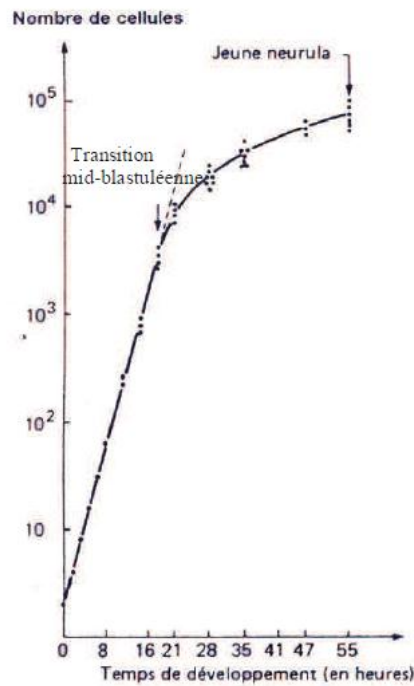
Le sujet comporte 12 pages.

Partie 1 : La formation du mésoderme

→ A partir de l'exploitation des documents proposés, montrez quels sont les processus cellulaires essentiels à la mise en place du mésoderme.

Un schéma bilan est attendu.

Document 1.1. Nombre et devenir des cellules au début du développement.



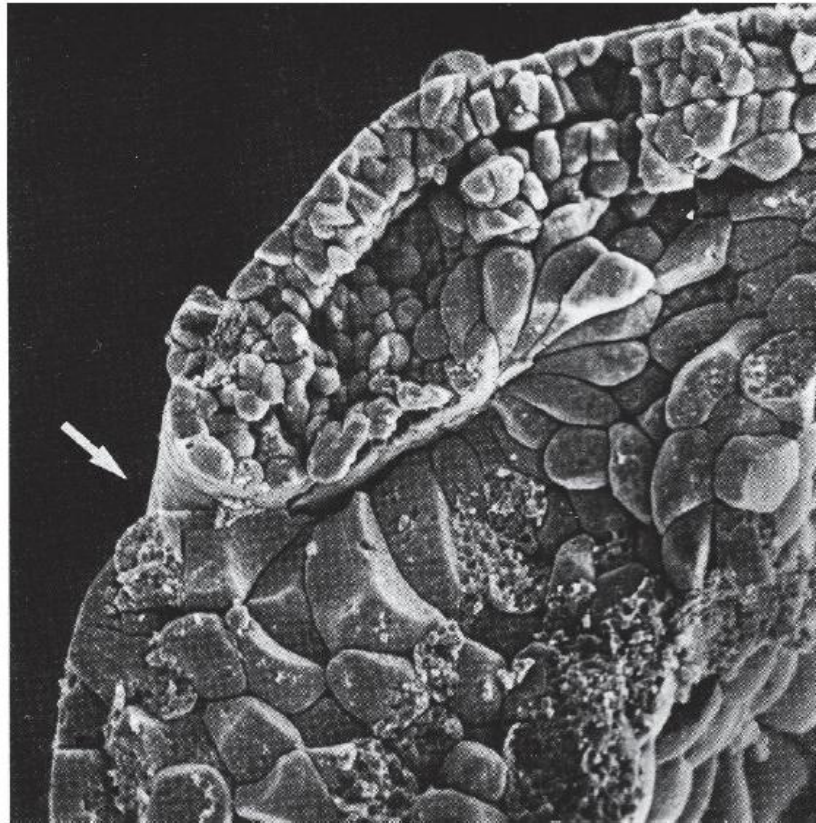
Document 1.1A – Multiplication cellulaire au début du développement embryonnaire

Carte pour l'ectoderme	Carte pour le mésoderme	Carte pour l'endoderme
<p>Pôle animal</p> <p>V D</p> <p>Pôle végétatif</p>	<p>Pôle animal</p> <p>V D</p> <p>Pôle végétatif</p>	<p>Pôle animal</p> <p>V D</p> <p>Pôle végétatif</p>

Document 1.1B - Cartes des territoires présomptifs chez le Xénope (morula, stade 32 cellules)

Sur ces cartes, la couleur d'un blastomère est d'autant plus intense que sa contribution à former le feuillet considéré est grande.

Document 1.2. Quelques cellules remarquables lors de la gastrulation chez le Xénope.



Document 1.2A - Gastrula fracturée au niveau du blastopore (MEB x 180)



Document 1.2B - Vue interne du toit du blastocèle (MEB)

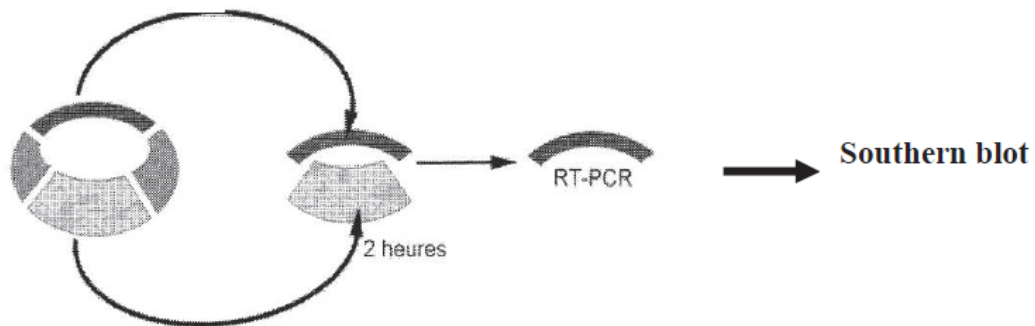
Barre d'échelle blanche : 1,4 μ m

Document 1.3. Analyse d'expériences de recombinaison.

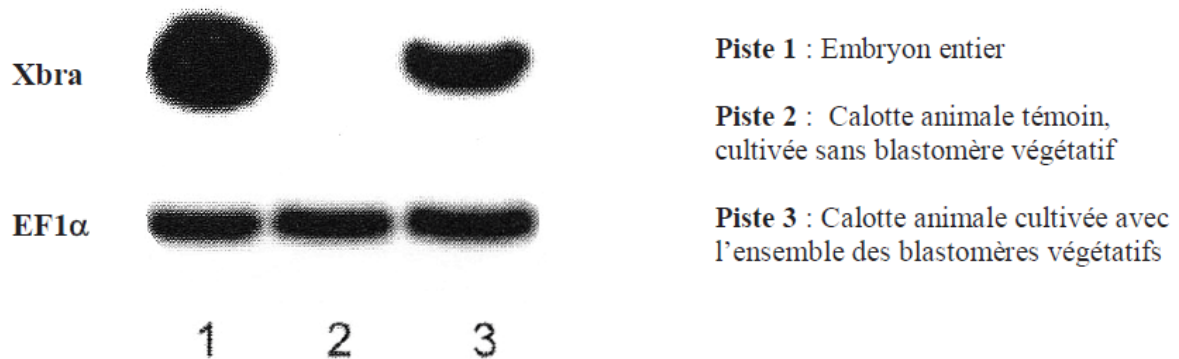
On réalise une série d'expériences de co-culture *in vitro* de calottes animales et de blastomères végétatifs.

• **Expérience 1 :**

La calotte animale d'une blastula est associée (ou non) à l'ensemble des blastomères végétatifs prélevés sur la même blastula. Après deux heures de culture, les ARN messagers de la calotte animale sont extraits et amplifiés par RT-PCR afin d'analyser l'expression des gènes *Xbra* (*brachyury*, gène exprimé spécifiquement dans l'ensemble des cellules du mésoderme) et *EF1 α* (gène exprimé uniformément dans l'ensemble des cellules de l'embryon).



Les résultats après Southern blot sont indiqués sur la figure suivante :



• **Expérience 2 :**

La calotte animale d'une blastula est associée (ou non) à des blastomères végétatifs provenant d'œufs préalablement injectés (ou non) avec différents **ARN messagers** :

- ou bien l'ARNm **A** codant un peptide inhibant sélectivement les TGF- β de la famille Nodal (*Xnr*). Il empêche la fixation des protéines Nodal sur leurs récepteurs.
- ou bien l'ARNm **B** codant un peptide inhibant sélectivement les TGF- β de la famille BMP et l'activine.

Les co-cultures sont réalisées avec l'ensemble de la région végétative ou bien seulement les blastomères de la région végétative dorsale ou ceux de la région ventrale.

Comme précédemment, après deux heures de co-culture et extraction des ARN messagers de la calotte animale, des analyses par RT-PCR sont réalisées. Un Southern blot permet de suivre l'expression de plusieurs gènes :

- gènes marqueurs du mésoderme dorsal : Gsc (*Goosecoid*), Chd (*Chordin*),
- gène marqueur du mésoderme ventro-latéral : Xwnt8,
- gène présent dans tout le mésoderme : Xbra (*Brachyury*)
- gène présent dans toutes les cellules de l'embryon : *EF1α*

Les résultats du Southern blot réalisé à partir de la calotte animale sont indiqués dans la figure suivante :

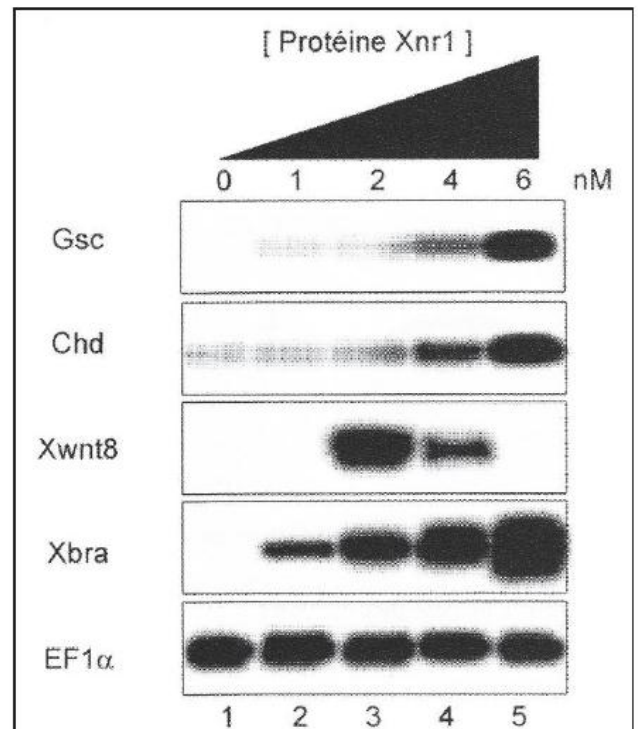
Origine des blastomères associés à la calotte animale	Pas de blastomère	Ensemble de la région végétative		Région végétative dorsale		Région végétative ventrale			
ARNm injecté	-	-	B	A	-	A	-	A	
Gène testé									
Gsc									
Chd									
Xwnt8									
Xbra									
EF1α									
		1	2	3	4	5	6	7	8
Présence de structures mésodermiques dans les recombinants	-	+	+	-	+	-	+	-	

• **Expérience 3 :**

Des calottes animales sont cultivées seules, sans blastomère végétatif, dans un milieu contenant des concentrations croissantes de la protéine Xnr1.

L'expression de différents marqueurs du mésoderme est analysée par RT-PCR après deux heures de culture.

Les résultats obtenus en Southern blot sont rassemblés dans la figure ci-contre :

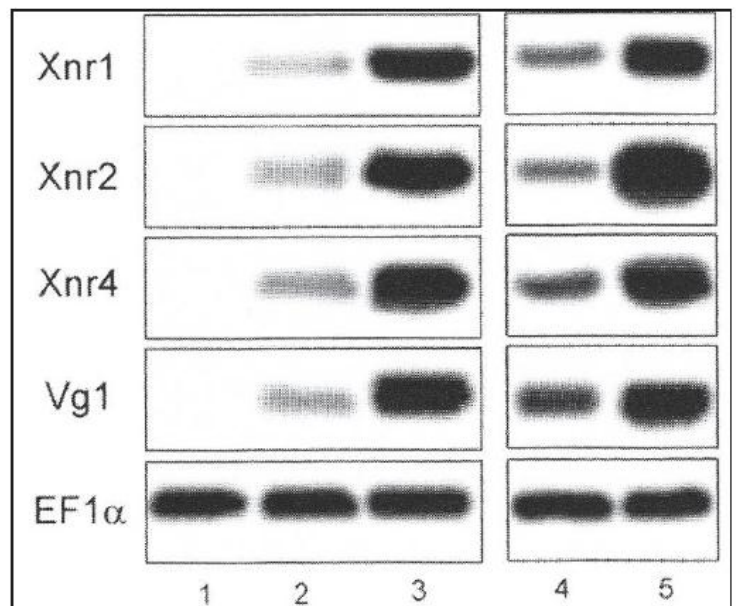


• **Expérience 4 :**

Une blastula au stade 9, après la transition mid-blastuléenne, est disséquée.

Dans les différentes régions disséquées, on analyse par RT-PCR l'expression des différents Xnr et de Vg 1, un autre membre de la famille des TGF-β.

Les résultats du Southern blot sont rassemblés sur la figure ci-contre :



- Piste 1 : calotte animale
- Piste 2 : zone marginale
- Piste 3 : région végétative
- Piste 4 : région végétative ventrale
- Piste 5 : région végétative dorsale

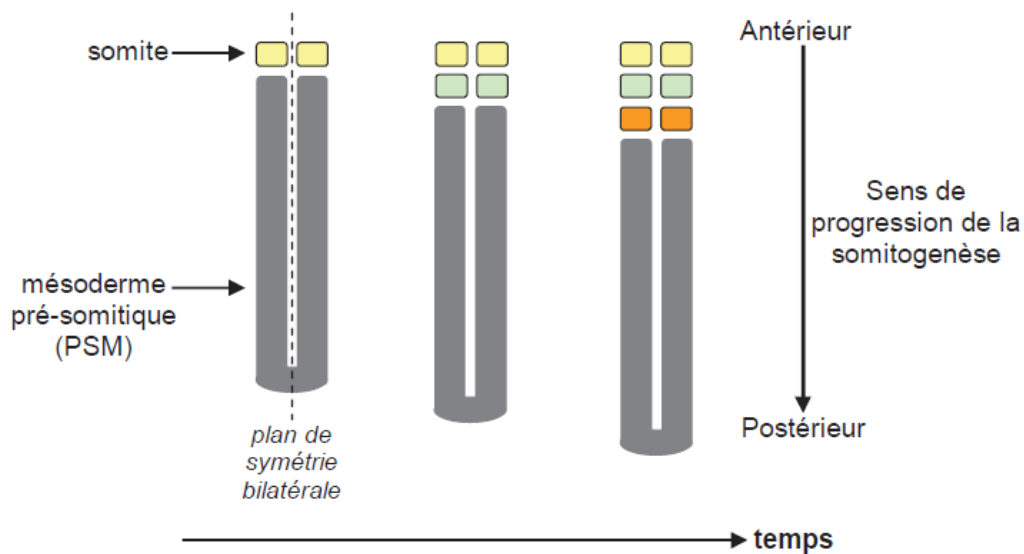
Partie 2 : Du mésoderme aux somites

→ A partir de l'exploitation des documents proposés, établissez, sous la forme d'un schéma-bilan, un modèle fonctionnel rendant compte du contrôle génétique de la segmentation du mésoderme en somites.

Chez les vertébrés amniotes, les somites apparaissent à partir d'un ensemble mésenchymateux situé dans la partie postérieure de l'embryon : le mésoderme présomitique (que l'on notera PSM).

L'axe antéro-postérieur de l'embryon s'allonge au cours de la somitogenèse. Le PSM garde donc une longueur constante.

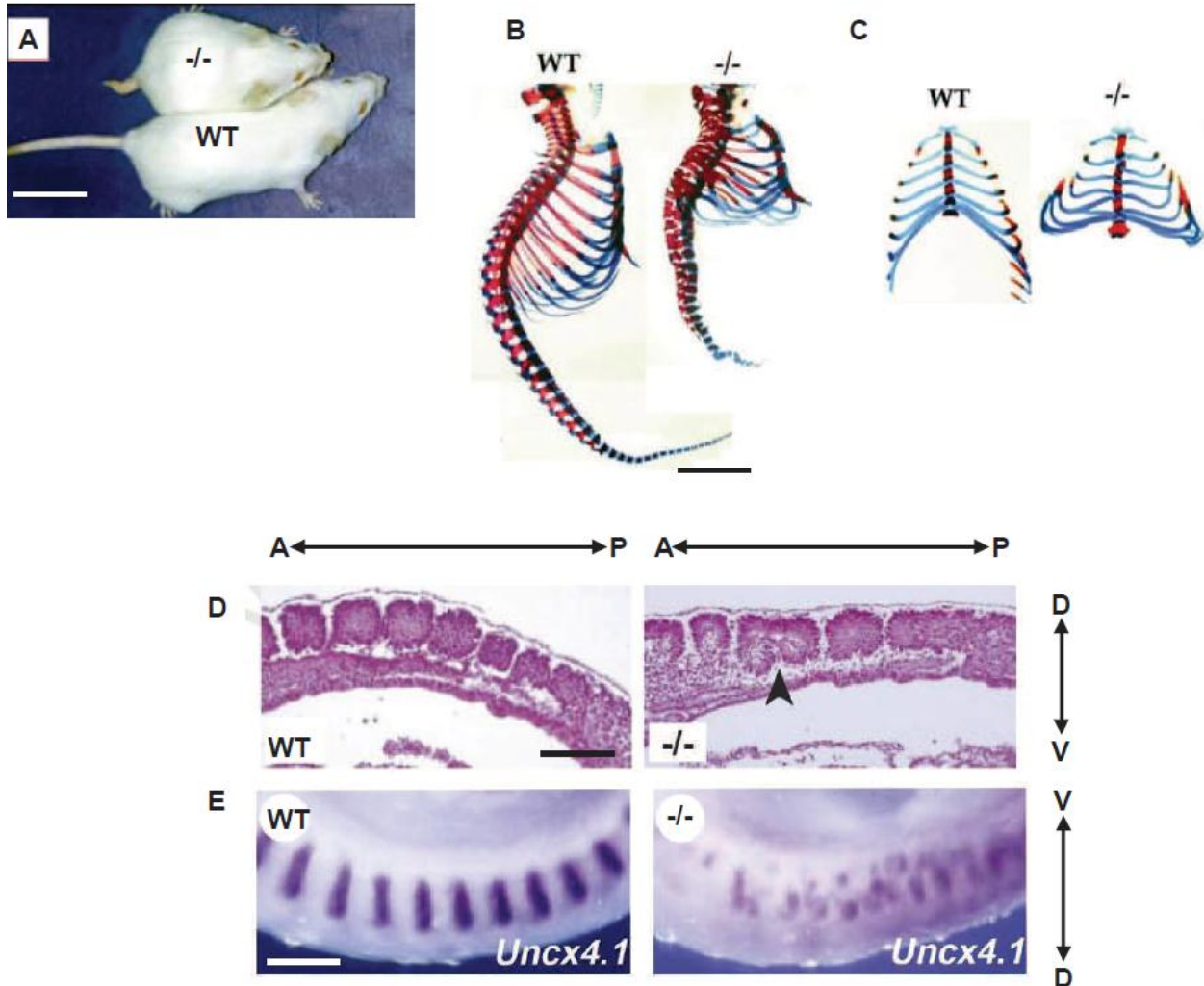
La formation des somites ou somitogenèse s'effectue selon une séquence antéro-postérieure : chaque nouveau segment somitique émerge dans une position postérieure par rapport au précédent.



Dans cette partie, on analysera l'effet de deux gènes : *Lfng* (*lunatic fringe*) et *Hes7* (*Hairy and enhancer-of-split related 7*).

Document 2.1. Analyse du phénotype de souris déficientes pour *Lfng*.

On réalise une lignée de souris, dans laquelle la séquence codante de *Lfng* a été interrompue : *Lfng*^{-/-}. On compare le phénotype de souris de lignée *Lfng*^{-/-} (notée -/-) avec une lignée sauvage (notée WT pour *wild-type*) pendant le développement embryonnaire et après la naissance.



A. Souris WT et -/- âgées de 8 semaines (barre d'échelle : 2 cm).

B et C. Colorations de squelettes de souris nouveau-nées (barre d'échelle : 0,5 cm)
(Bleu alcian : tissus osseux ; Rouge Alizarine : tissus cartilagineux).

D. Sections sagittales colorées (hématoxyline/éosine) d'embryons de souris à 9,5 jours après fécondation (E9,5).

La pointe de flèche désigne une figure caractéristique des embryons *Lfng*^{-/-}.

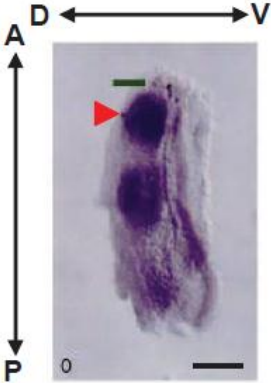


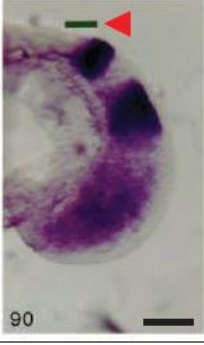
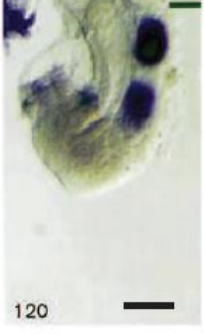
E. Hybridation *in situ* sur les régions caudales d'embryons de souris E9,5 (sonde dirigée contre les ARNm de *Uncx4.1* ; ce dernier est un gène exprimé dans les parties postérieures des somites au cours du développement).

Les flèches AP et DV désignent les axes antéro-postérieurs et dorsaux-ventraux des embryons présentés en D et E.

Barres d'échelle en D et E : 200 μm.

Document 2.2. Patron d'expression cyclique du gène *Lfng*.

Par hybridation *in situ*, on analyse le patron d'expression du gène *Lfng* au cours du temps dans le mésoderme pré-somitique (PSM) de l'embryon âgé de 8,5 jours après la fécondation. Le mésoderme pré-somitique est séparé selon le plan de symétrie bilatérale. Une moitié est directement fixée alors que l'autre moitié est mise en culture pendant 30, 60, 90 et 120 minutes avant d'être fixée.

Moitié de PSM directement fixée (t = 0 min)	Moitié de PSM mise en culture avant d'être fixée
<p>Les demi-embryons sont présentés en vue latérale.</p> <p>A : vers l'extrémité antérieure de l'embryon P : extrémité postérieure de l'embryon V : face ventrale de l'embryon D : face dorsale de l'embryon</p>  <p>Barre horizontale verte : limite du dernier somite formé (somite le plus postérieur).</p> <p>Triangle rouge : position du groupe de cellules le plus antérieur exprimant <i>Lfng</i> à t=0.</p> <p>Barre d'échelle : 200 µm</p>	<p>V ← → D</p>  <p>t = 30 min</p>
	 <p>t = 60 min</p>
	 <p>t = 90 min</p>
	 <p>t = 120 min</p>

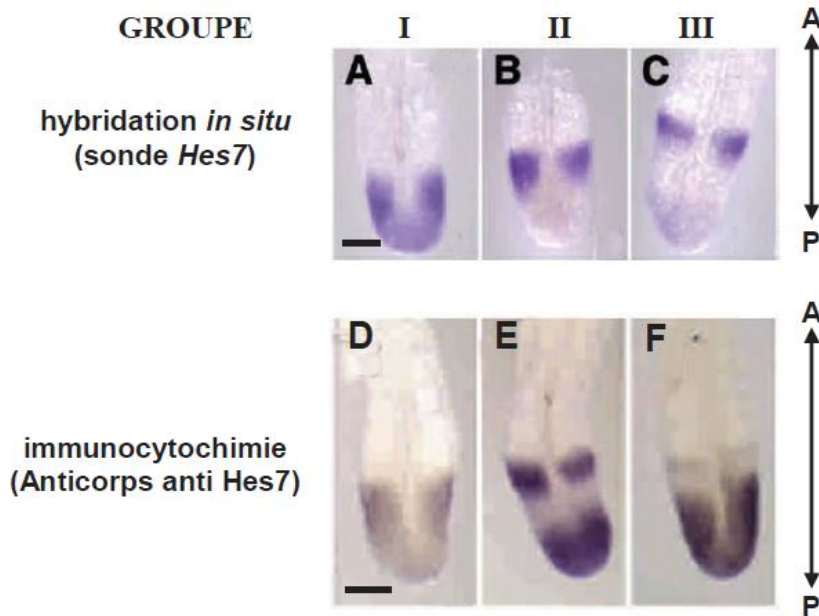
Document 2.3. Effets de *Hes7* sur l'expression de *Lfng*.

La recherche de gènes exprimés dans le mésoderme présomitique a conduit à isoler le gène *Hes7*.

Document 2.3.A

On analyse l'expression du gène *Hes7* au niveau de régions caudales d'embryons âgés de 10,5 jours après la fécondation (E10,5) par hybridation *in situ* (figures A, B, C) et par immunocytochimie (figures D, E, F).

Un nombre significatif d'embryons est analysé, ce qui permet de les classer en trois grands groupes : I (38% des embryons), II (38 % des embryons) et III (24% des embryons). Les embryons sont présentés en vue dorsale.



A et D : embryons du groupe I ; B et E : embryons du groupe II ; C et F : embryons du groupe III
 Flèche : A = vers la partie antérieure de l'embryon ; P = extrémité postérieure de l'embryon
 Échelle (200 µm)

Document 2.3.B

Des parties caudales d'embryons E10,5 appartenant aux trois groupes sont mises en culture pendant 2h dans un milieu de culture contenant ou pas 100 µM d'un inhibiteur du protéasome. Le protéasome est un complexe enzymatique de dégradation des protéines.

On quantifie l'expression du gène *Hes7* (ARN et protéines) et du gène *Lfng* (ARN). Quel que soit le groupe auquel appartient l'embryon, on obtient le résultat suivant :

	Milieu de culture	Milieu de culture + inhibiteur
Quantité de protéines <i>Hes7</i>	+	+++
Quantité d'ARN de <i>Hes7</i>	+++	0
Quantité d'ARN de <i>Lfng</i>	+++	0

+ / +++ : quantité relative de protéines ou d'ARN, quelque soit le stade I, II ou III
 0 : pas de protéines ou d'ARN

Document 2.4. Modifications de l'expression de *Hes7*.

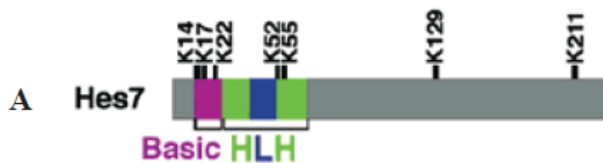
Document 2.4.A: Contrôle du promoteur du gène *Hes7*

Par mutagenèse dirigée, on réalise une série de vecteurs d'expression codant des protéines *Hes7* mutées : les résidus lysines (K) ont été substitués par des résidus arginine (R). Les différentes protéines diffèrent par la position de la mutation (figure A).

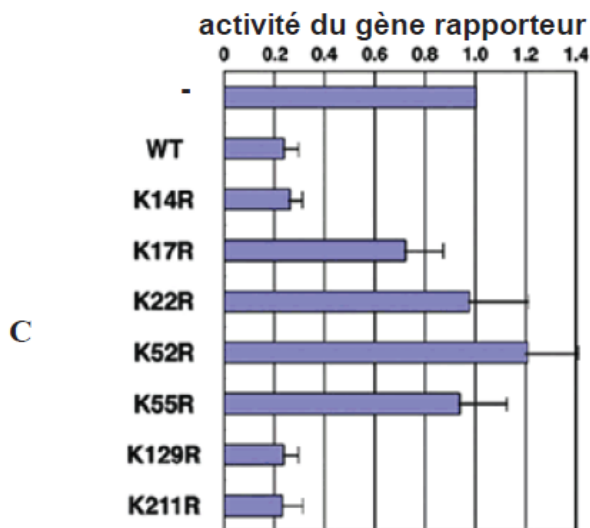
Chacun de ces vecteurs d'expression codant la protéine sauvage (WT) ou mutée est transfecté dans des cellules en culture qui contiennent une construction mettant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *Hes7* (figure B).

On mesure le niveau d'expression du gène rapporteur. Les résultats sont présentés en unités arbitraires (figure C).

L'activité du gène rapporteur est de 1,0 en l'absence de protéine *Hes7* (1^{ère} ligne : -).



Basic HLH : domaine hélice tour hélice basique.



Document 2.4.B: Analyse de lignées de souris mutées dans le gène *Hes7*

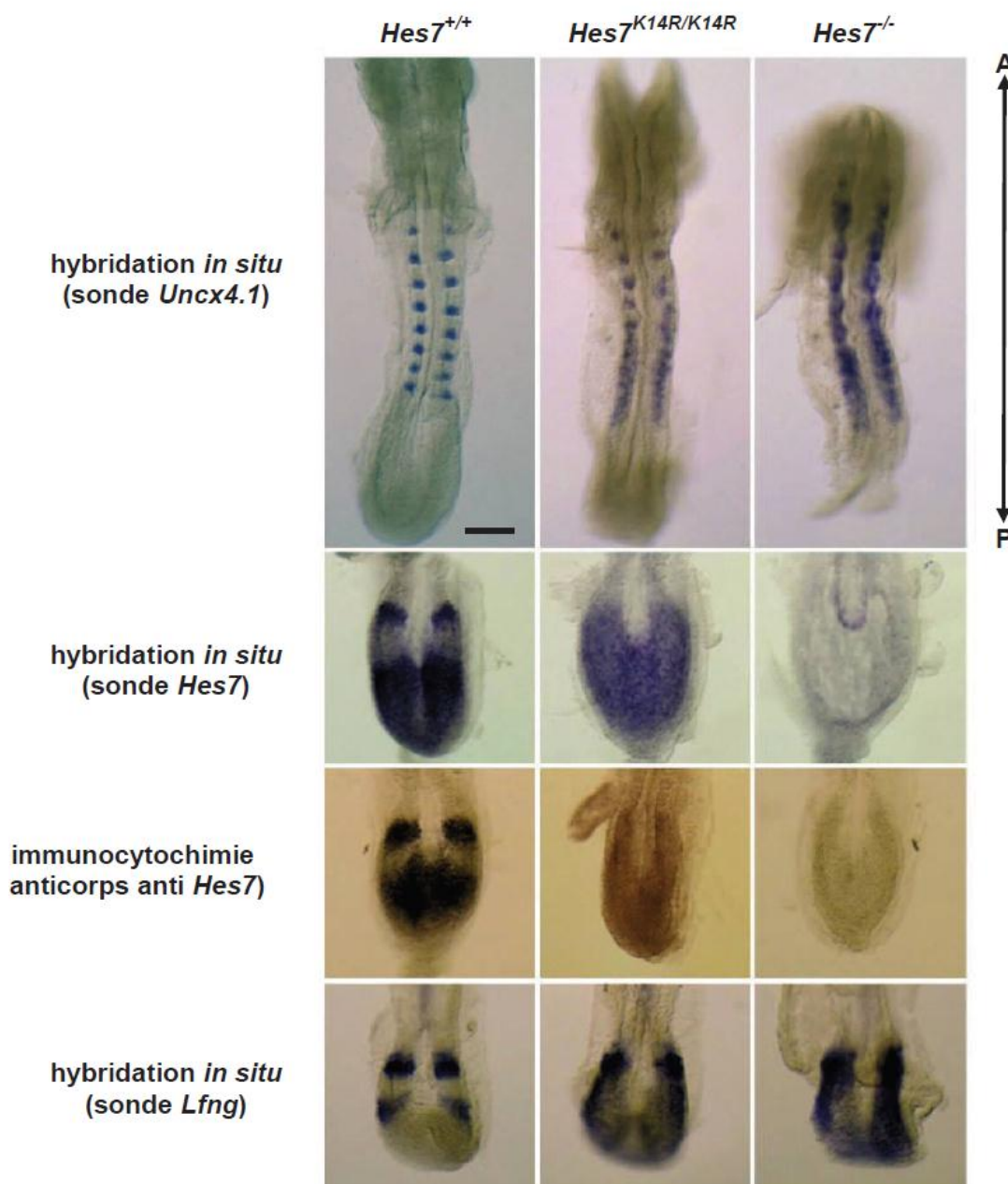
On réalise deux lignées de souris :

- une lignée dans laquelle le gène *Hes7* a été inactivé : *Hes7*^{-/-}
- une lignée dans laquelle une mutation ponctuelle a été introduite dans le gène *Hes7* de façon à produire le variant protéique K14R : *Hes7*^{K14R/K14R}. Ce variant protéique présente une durée de demi-vie de 30,3 minutes (durée de demi-vie de la protéine sauvage : 22,3 min).

On analyse le phénotype de la région caudale des embryons des souris sauvages (*Hes7*^{+/+}), des souris *Hes7*^{-/-} et des souris *Hes7*^{K14R/K14R} au stade E8,5 (embryons âgés de 8,5 jours après la fécondation).

Les hybridations *in situ* avec les sondes *Hes7* et *Lfng* ainsi que l'immunocytochimie contre *Hes7* sont réalisées sur le mésoderme présomitique des embryons.

Les embryons sont présentés en vue dorsale.



Barre d'échelle : 200 μ m.