

<i>DEVOIR SURVEILLE DE SVT N°5</i> <i>Biologie</i>

- Ce devoir comporte deux parties. Le même nombre de points est affecté à chacune des deux parties. Il est attendu que vous consacriez 2 heures à chacune, mais la gestion du temps vous est confiée. Les deux parties sont traitées sur deux jeux de copies, numérotées à la suite les unes des autres et remises ensemble en fin d'épreuve.
- Le plus grand soin sera apporté à la présentation et l'orthographe, ainsi qu'à la clarté et la concision de vos réponses. Aucune abréviation non conventionnelle ne sera utilisée sans que n'en soit mentionnée la signification.
- Les calculatrices en sont pas autorisées.

Synthèse

Durée conseillée de l'épreuve : 2 heures

La diversité des phénotypes : origines et conséquences à l'échelle de la population

Sujet sur support de documents

Durée conseillée de l'épreuve : 2 heures

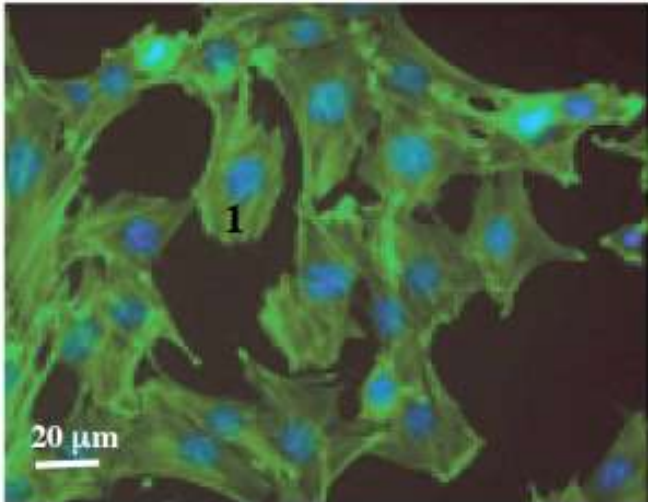
- Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances et en adéquation avec les consignes explicites propres à chaque question. Les réponses seront précises, concises et structurées.

DOCUMENT 1

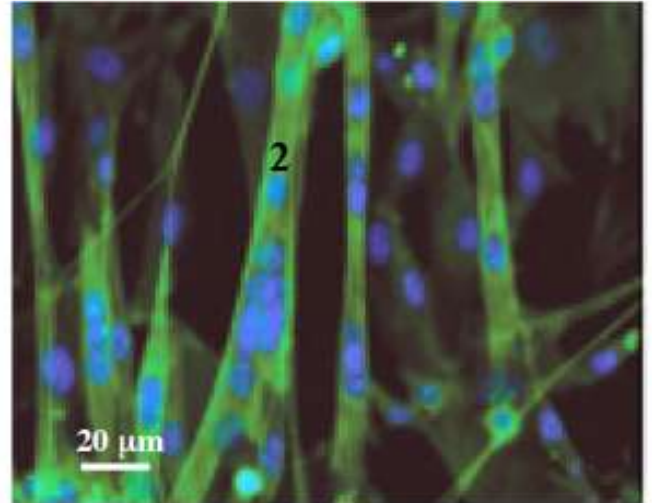
Des cellules de somites de souris sont cultivées in vitro sur deux milieux successivement :

- d'abord sur un milieu de culture de prolifération où les cellules se multiplient ;
- puis sur un milieu de différenciation où 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.

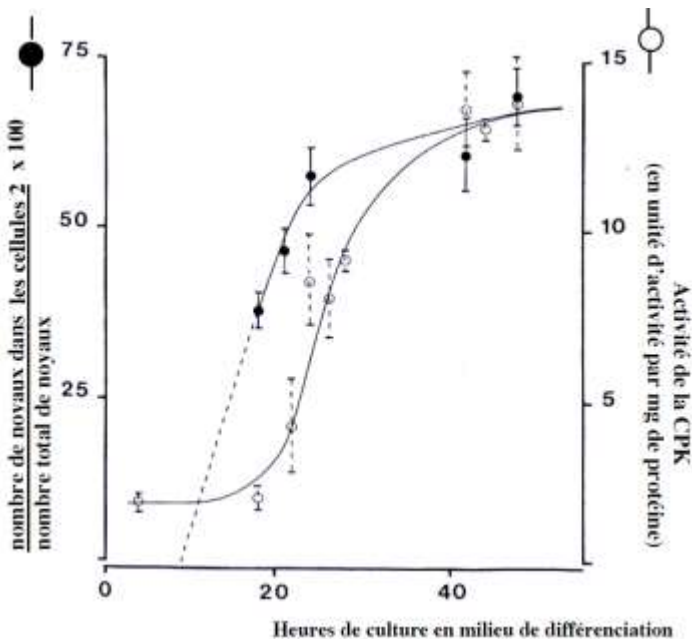


1A- Culture en milieu de prolifération



1B- Culture après 72 h sur milieu de différenciation

Ces deux documents sont reproduits sur l'annexe en couleur



1C- Le pourcentage des noyaux qui sont présents dans les cellules 2 visibles sur le document 1B est déterminé en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation et exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux (●).

L'activité d'une enzyme, la CPK (créatine phosphokinase) est mesurée (en unité d'activité par mg de protéine) en fonction de la durée de culture en milieu de différenciation (○).

Q1.1 Nommer les cellules 1 et 2 des documents 1A et 1B.

Q1.2 De quels processus cellulaires, les paramètres étudiés par le document 1C sont-ils des indicateurs ?

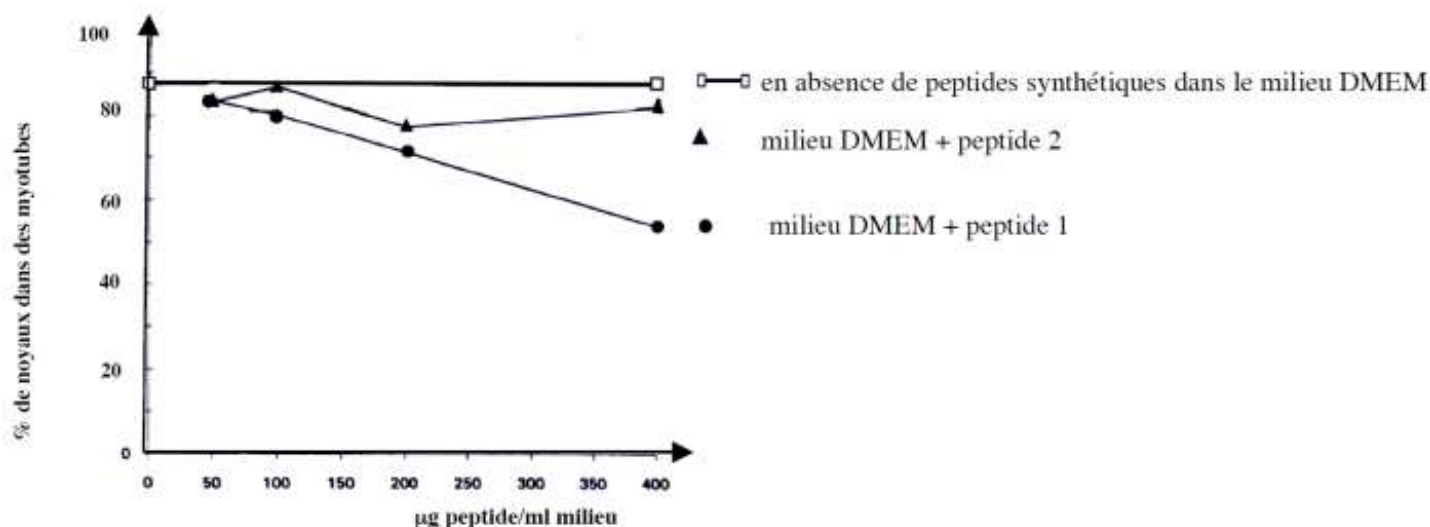
Q1.3 Analyser et interpréter les résultats du document 1.

DOCUMENT 2

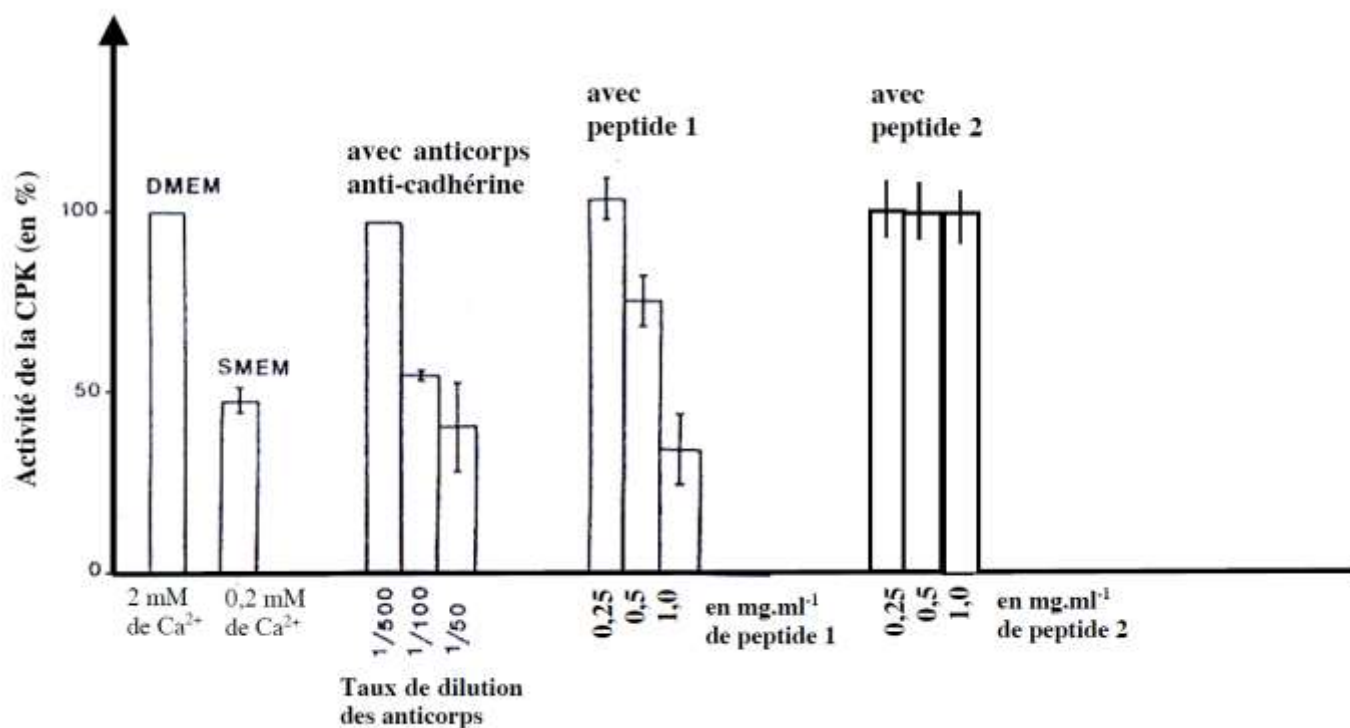
Des myoblastes de poulet sont cultivées dans différents milieux de différenciation :

- milieu DMEM contenant 2 mM de Ca^{2+} ;
- milieu SMEM, contenant 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.

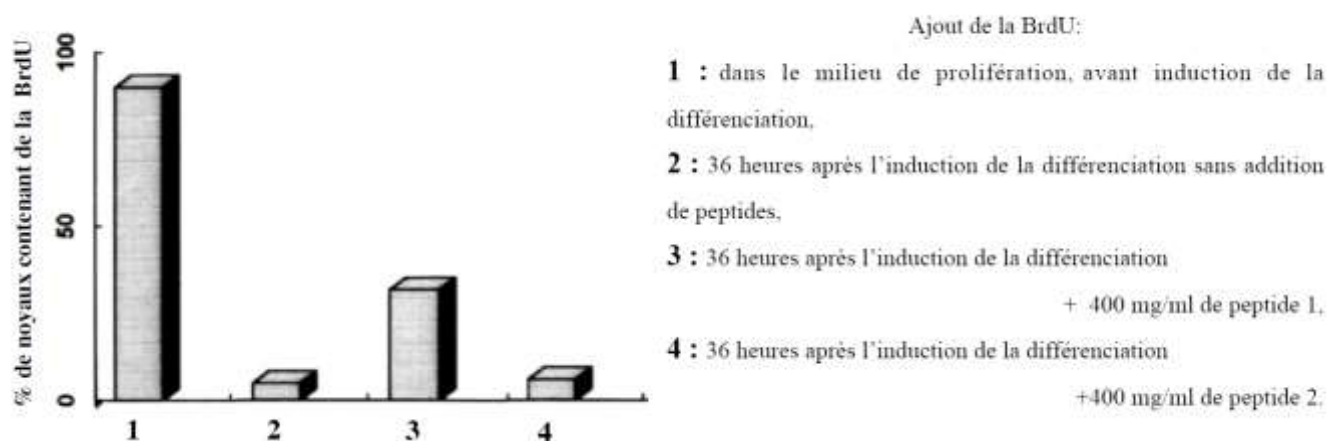
2A - Le pourcentage des noyaux présents dans des myotubes, exprimé en pourcentage du nombre total de noyaux, est déterminé 48 heures après le déclenchement de la différenciation en présence ou pas de peptides synthétiques. Les résultats représentent la moyenne de trois cultures indépendantes dans lesquelles 1000 noyaux ont été comptés.



2B - 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.



2C - 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.



Q2.1 Pourquoi rajoute-t-on les peptides synthétiques 1 et 2 au milieu de culture DMEM ?

Q2.2 Analyser et interpréter les résultats du document 2A.

Q2.3 Pourquoi rajoute-t-on des anticorps anti-cadhérines au milieu de culture DMEM ?

Q2.4 Analyser et interpréter les résultats des documents 2B.

Q2.5 À quel processus cellulaire s'intéresse-t-on lorsqu'on étudie l'incorporation de la BrdU dans les noyaux ?

Q2.6 Analyser et interpréter les résultats des documents 2C.

Q2.7 Résumer en quelques lignes les interprétations dégagées de l'étude de l'ensemble du document 2.

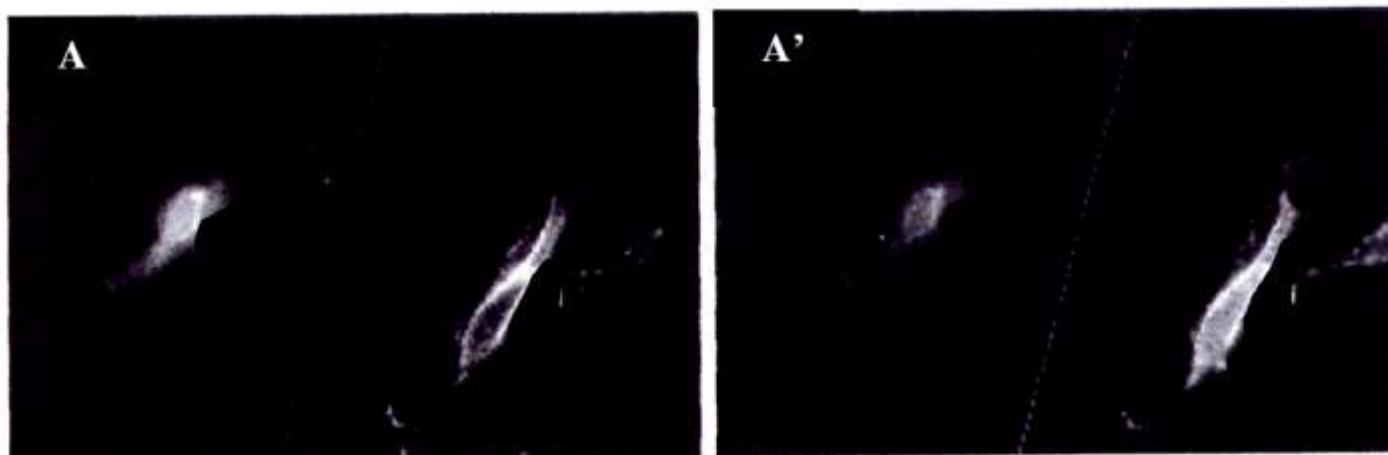
DOCUMENT 3

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'.

3A - Cellules en culture depuis 15 heures sur milieu de différenciation + anticorps anti-cadhérine

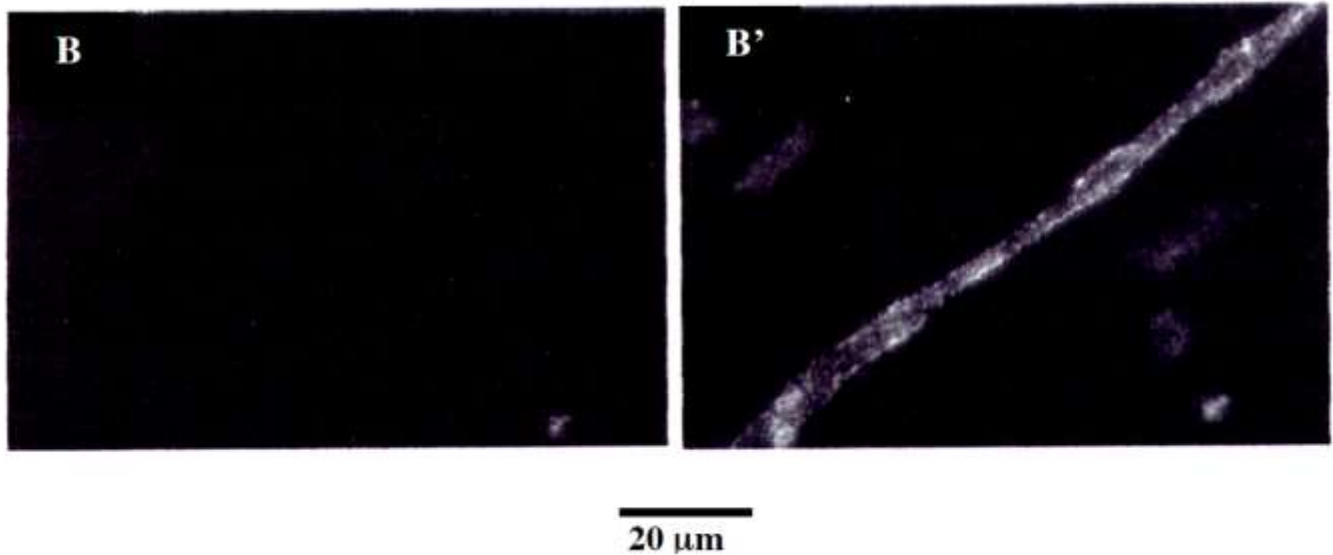
3A' - Cellules en culture depuis 15 heures sur milieu de différenciation + anticorps anti-marqueur membranaire



20 μ m

3B - Cellules en culture depuis 7 jours sur milieu de différenciation + anticorps anti-cadhérine

3B' - Cellules en culture depuis 7 jours sur milieu de différenciation + anticorps anti-marqueur membranaire



Q3.1 Nommer la technique utilisée dans cette expérience.

Q3.2 Dédurre des documents 3 le profil spatial et temporel d'expression des cadhérines dans les cellules étudiées.

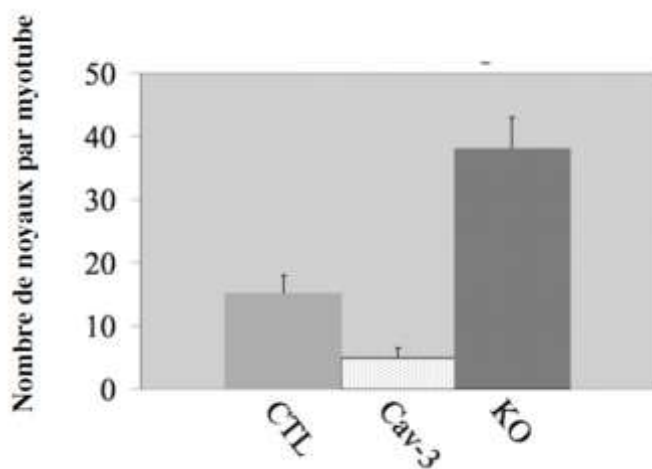
DOCUMENT 4

Les cavéoles 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 cavéoles 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.

On dispose de différentes souches de souris :

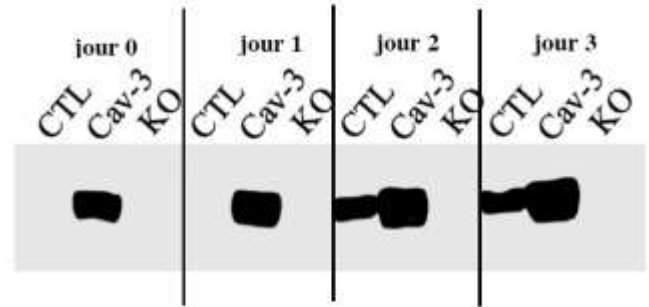
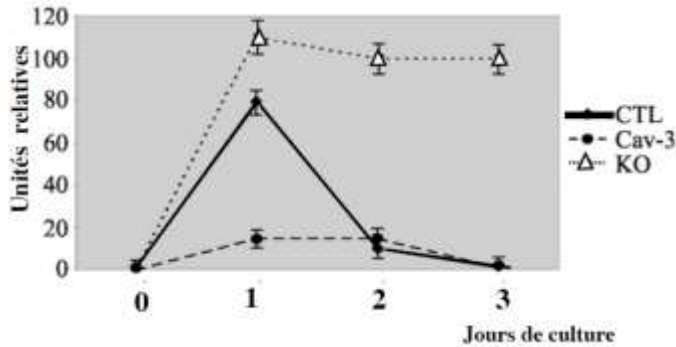
- souris transgéniques présentant une surexpression du gène de la cavéoline-3 (*Cav-3*) ;
- souris présentant un gène *Cav-3* non fonctionnel (souris « knocked-out » KO) ;
- souris témoins (CTL).

4A - Des myoblastes issus de souris CTL, *Cav-3* et KO sont mis en culture sur un milieu de différenciation. Après 3 jours de culture, le nombre moyen de noyaux présents par myotube est déterminé. Au moins 50 myotubes de chaque type sont analysés.



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.

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



Les cavéoles 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).

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

	Après 1 jour de culture sur milieu de différenciation				Après 2 jours de culture sur milieu de différenciation			
	+ anticorps anti-cadhérine		+ anticorps anti-cavéoline 3		+ anticorps anti-cadhérine		+ anticorps anti-cavéoline 3	
	Membrane plasmique au niveau des caveolae	Membrane plasmique hors des caveolae	Membrane plasmique au niveau des caveolae	Membrane plasmique hors des caveolae	Membrane plasmique au niveau des caveolae	Membrane plasmique hors des caveolae	Membrane plasmique au niveau des caveolae	Membrane plasmique hors des caveolae
CTL								
Cav-3								
KO								

Q4.1 Préciser l'intérêt d'utiliser chacune des trois souches de souris.

Q4.2 Analyser et interpréter les résultats du document 4A.

Q4.3 Analyser les résultats du document 4B et proposer au moins une hypothèse explicative de ces résultats.

Q4.4 Préciser l'intérêt du protocole de l'expérience rapporté au 4C par rapport à celui du 4B.

Q4.5 Analyser et interpréter les résultats du document 4C.

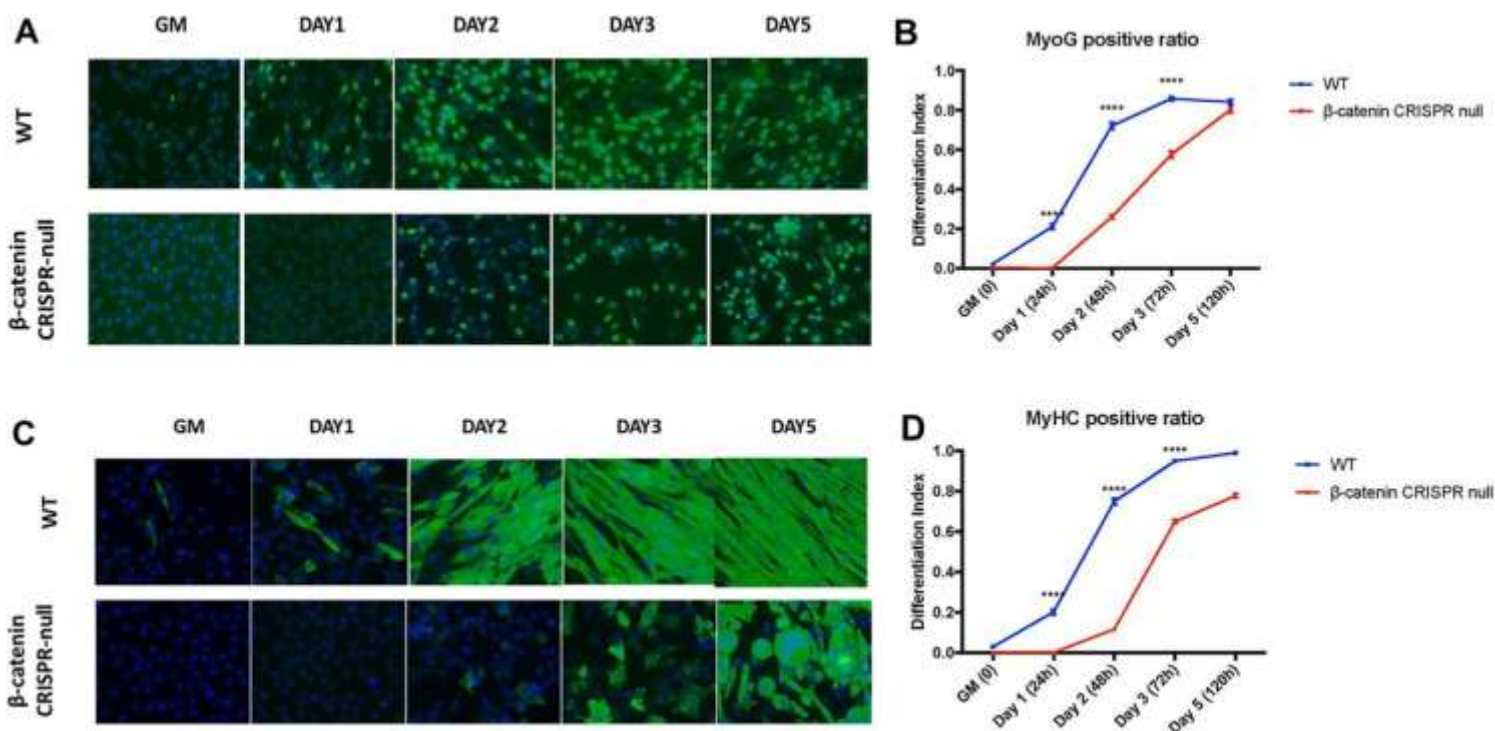
Q4.6 Résumer sur un schéma bilan la chronologie des événements mise en évidence par l'étude des documents 1 à 4.

DOCUMENT 5

Des myoblastes primaires (extraits de souris nouveau-nés) sont cultivés in vitro dans un milieu qui favorise la différenciation pendant plusieurs jours (Day1, Day2, Day3, Day5) alors qu'avant ils avaient été cultivés dans un milieu permettant leur prolifération mais pas leur différenciation (GM). Les myoblastes ont soit un génotype sauvage (WT), soit une mutation « perte-de-fonction de β -caténine » obtenue grâce à CRISPR/Cas9 (β -catenin CRISPR null). La β caténine est une protéine cytoplasmique qui joue un rôle de coactivateur transcriptionnel en se liant à des facteurs de transcription et qui peut aussi participer à l'adhérence cellulaire en se fixant sur des molécules du cytosquelette.

On réalise une immunofluorescence avec un anticorps anti-myogénine 5 (MyoG, documents A et B) et un anticorps anti-MyHC (la chaîne lourde de la myosine musculaire, documents C et D).

La fluorescence bleue (méthode DAPI) est celle émise par les noyaux.



Ces 4 documents sont reproduits sur l'annexe en couleur

Q5.1 Quel est l'objectif de cette expérience ?

Q5.2 Quel est l'intérêt d'utiliser des anticorps anti-MyHC et anti-myogénine ?

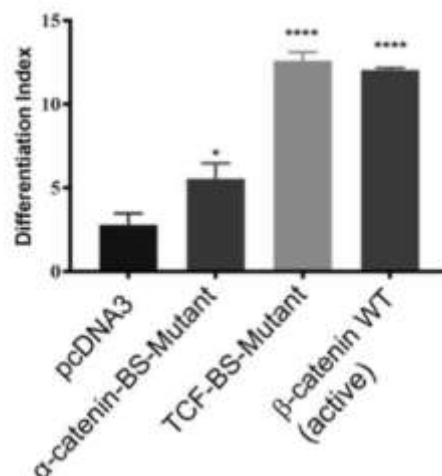
Q5.3 Interpréter les résultats obtenus.

DOCUMENT 6

La même expérience que précédemment est réalisée avec des myoblastes porteurs d'une mutation perte-de-fonction totale de β -caténine mais on les transfecte avec différents vecteurs :

- pcDNA3 : vecteur vide ;
- β -catenin WT : vecteur permettant la synthèse de la β -caténine sauvage ;
- α -catenin-BS-Mutant : vecteur permettant la synthèse de la β -caténine avec une délétion de son domaine de liaison à l' α -caténine, une molécule du cytosquelette ;
- TCF-BS-Mutant : vecteur permettant la synthèse de la β -caténine avec une délétion de son domaine de liaison à TCF, un facteur de transcription.

On détermine un indice de différenciation des myoblastes en myofibres en fonction d'un certain nombre de critères (forme des cellules, expression de MyHC,...)



Q6.1 Préciser les objectifs du protocole expérimental et interpréter les résultats obtenus.

Q6.2 Compléter alors le schéma proposé en Q4.6

FIN DE L'ÉPREUVE