

## CONCOURS G2E

### BIOLOGIE

Durée : 3 heures

---

Les calculatrices programmables et alphanumériques sont interdites.

Les téléphones portables et autres "smartphones" doivent être éteints au cours de l'épreuve et ne doivent en aucun cas être utilisés même à titre de montre.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

La rédaction se fera uniquement à l'encre bleue ou noire et l'utilisation du blanc correcteur est interdite. Les découpages et collages sur la copie sont interdits. Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas.

---

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

Attention : le sujet de biologie est composé de deux parties indépendantes dont la numérotation est continue afin d'éviter toute confusion lors de vos réponses. Le jury vous conseille de les composer en 1h30 chacune afin de répondre à toutes les questions.

Remarque importante : les questions suivent une problématique progressive, le jury vous conseille donc de les aborder dans l'ordre du sujet.

### BIOLOGIE 1

(Durée conseillée 1h30)

## ÉTUDE DE LA PROTÉINE ZP3

Les ovocytes des Mammifères sont entourés d'une matrice extracellulaire nommée zone pellucide (ZP). On se propose d'étudier ZP3, l'une des protéines de la zone pellucide.

<b>Partie 1 (2 points)</b>
----------------------------

<b>Effet de l'inactivation de ZP3</b>
---------------------------------------

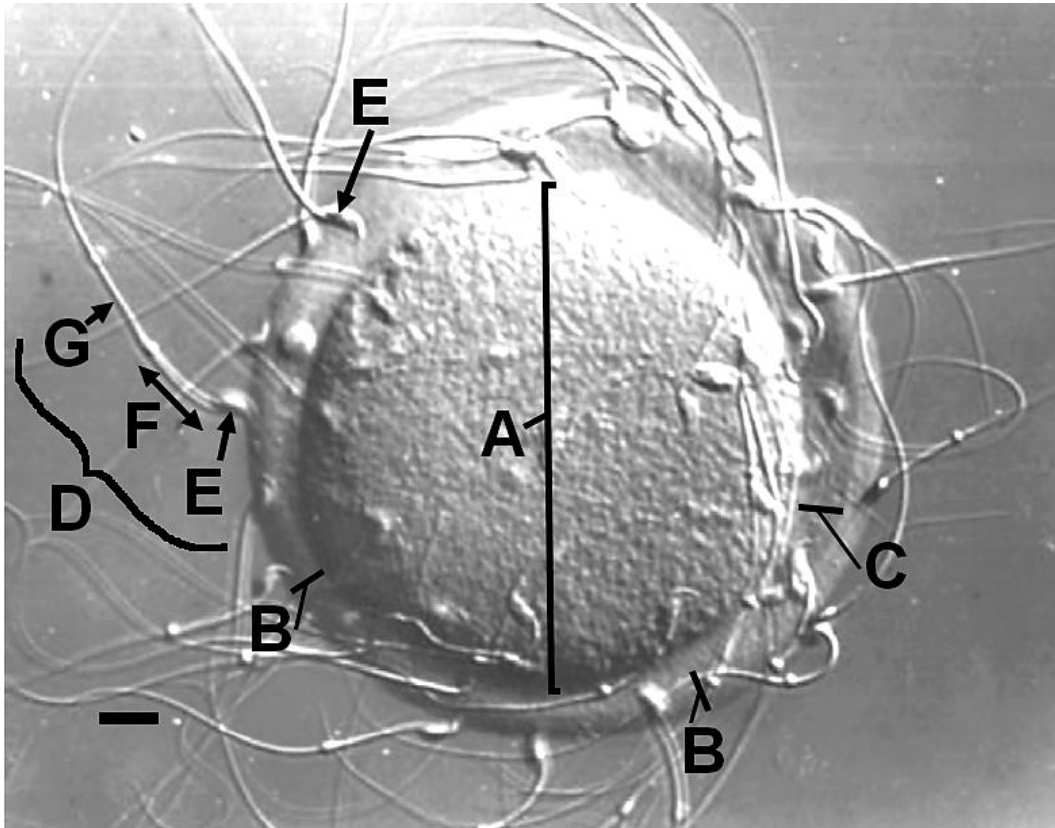
Les ovocytes des Mammifères sont entourés d'une matrice extracellulaire nommée zone pellucide (ZP). On se propose d'étudier l'une de ces protéines, la ZP3.

### 1.1. Fécondation *in vitro* chez la souris sauvage

Des ovocytes matures et des spermatozoïdes issus d'un éjaculat de souris ont été mis en contact.

**Question 1.a.** Nommer toutes les structures du Document 1 désignées par une lettre. Donner un titre et une valeur pour la barre d'échelle (trait noir).

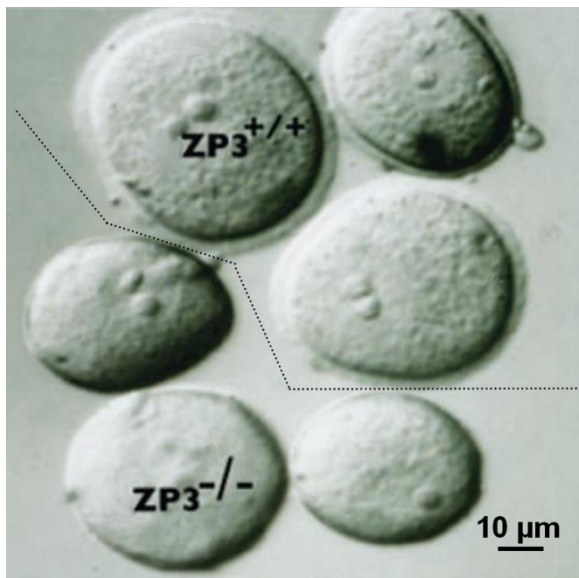
**Question 1.b.** Expliquer quand et comment se forme la structure C et quelle est la conséquence fonctionnelle de l'apparition de cette structure.



Document 1.

## 1.2. Effet de l'inactivation du gène ZP3

À partir d'une lignée sauvage fertile (notée  $ZP3^{+/+}$ ), une lignée de souris a été créée avec une inactivation du gène ZP3 (notée  $ZP3^{-/-}$ ). Cette lignée est stérile.



Document 2 : Ovocytes de la lignée sauvage (en haut) et de la lignée sans gène ZP3 fonctionnel (en bas), observés en microscopie optique à contraste de phase.

**Question 2.a.** À partir de l'analyse de la Document 2, expliquer quel est l'effet cellulaire de l'inactivation du gène ZP3.

**Question 2.b.** En comparant les Documents 1 et 2, proposer un mécanisme expliquant la stérilité de la lignée mutante  $ZP3^{-/-}$ .

**Partie 2 (3 points)**  
**Effet de ZP3 recombinantes et mutantes**

**2.1. Effet de l'ajout de protéines ZP3 produites *in vitro***

On a produit *in vitro* des protéines ZP3 humaines ou de souris sauvages, ou des protéines chimères contenant des séquences de souris et des séquences humaines. Dans un milieu contenant des gamètes provenant de souris de lignée sauvage, on a ajouté ces protéines produites *in vitro*. On mesure ensuite le nombre de spermatozoïdes liés aux ovocytes.

				Nombre de spermatozoïdes liés par ovocyte	
Sans ajout de ZP3				41,4 ± 3,6	
<i>En ajoutant une des ZP3 ci-dessous :</i>					
ZP3 de souris	Exons 1 à 5 souris	6	7	8	22,9 ± 9,5
ZP3 humaine	Exons 1 à 5 humain	6	7	8	38,6 ± 1,6
ZP3 chimère 6	Exons 1 à 5 humain	6	7	8	39,2 ± 5,2
ZP3 chimère 7	Exons 1 à 5 humain	6	7	8	29,1 ± 2,8
ZP3 chimère 8	Exons 1 à 5 humain	6	7	8	38,6 ± 5,9

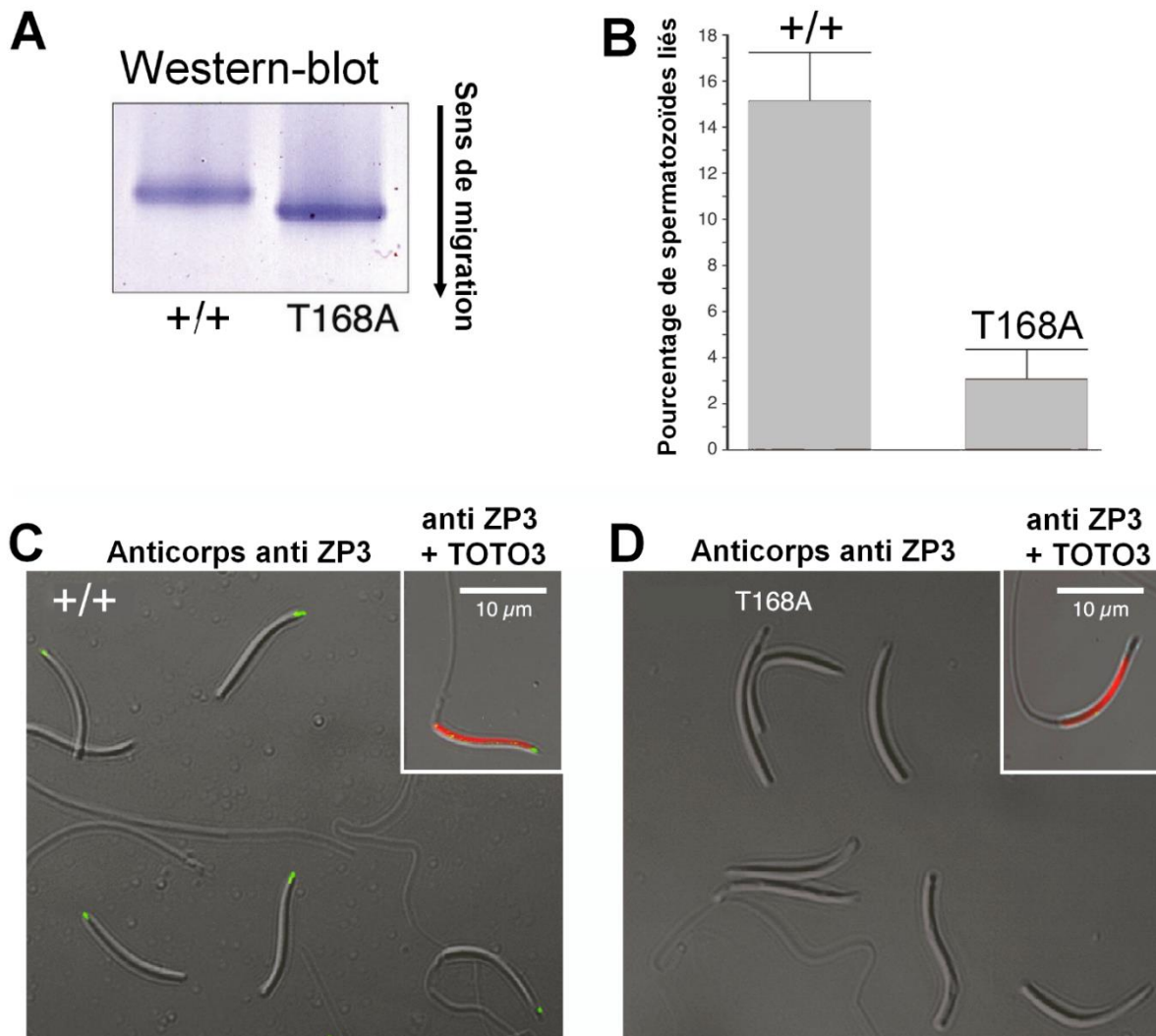
**Document 3 :** Structure des protéines ZP3 produites *in vitro* et l'effet de leur ajout sur la liaison des spermatozoïdes aux ovocytes de souris. « ZP3 chimère 6 » signifie que dans la protéine ZP3 humaine, l'exon 6 a été remplacé par un exon 6 de souris. Les chiffres désignent des moyennes suivies de leurs écart-types.

**Question 3.** Expliquer pourquoi l'ajout de protéines ZP3 a un effet sur la fixation des spermatozoïdes aux ovocytes de souris, et préciser quelle(s) partie(s) de la protéine est responsable de cet effet.

**2.2. Glycosylation de la ZP3 et fécondation**

On a produit à partir d'une lignée de souris sauvages (+/+), des souris qui produisent une ZP3 avec une mutation ponctuelle dans l'exon 7 (T168A). La thréonine 168, qui peut faire des réactions de glycosylation, a été remplacée par une alanine. La thréonine et l'alanine ont des masses moléculaires similaires.

On extrait les protéines d'ovocytes et on les fait migrer dans gel dénaturant avant de réaliser un western blot en utilisant un anticorps anti ZP3 (A). D'autre part, on étudie le pourcentage de spermatozoïdes sauvages capables de se fixer sur les ovocytes des deux lignées de souris (B). Enfin, on incube des spermatozoïdes sauvages avec des protéines ZP3 sauvages (C) ou mutées (D), et on révèle avec un anticorps anti ZP3.



**Document 4 :** (A) Western blot dénaturant de protéine ZP3 sauvage (+/+) et mutée (T168A). (B) Pourcentage de spermatozoïdes sauvages liés à un ovocyte de la lignée sauvage ou mutée. Les barres indiquent les écart-types. (C) Immunocytochimie sur des spermatozoïdes sauvages en présence de protéines ZP3 sauvages (+/+) ou mutées (D). La révélation des protéines ZP3 se fait avec un anticorps anti ZP3 couplé à un agent fluorescent vert, et la révélation des noyaux avec un anticorps anti TOTO3 couplé à un agent fluorescent rouge.

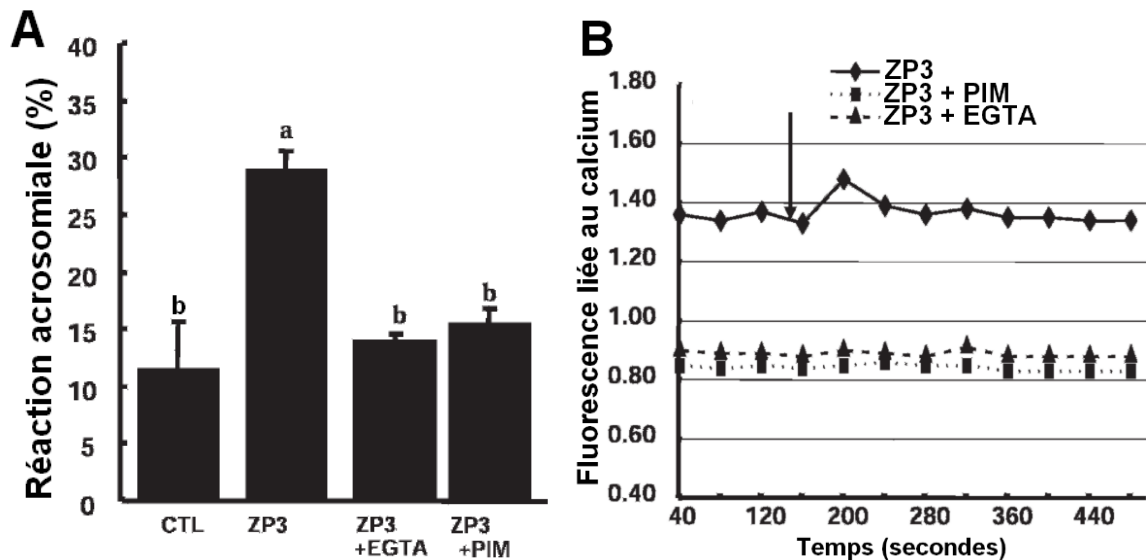
**Question 4.a.** Justifier précisément les différences de poids moléculaire de ces deux protéines ZP3 dans le Document 4A.

**Question 4.b.** Sur les Documents 4C et 4D, localiser le noyau et identifier la structure colorée en vert sur le Document 4C. Justifier votre réponse.

**Question 4.c.** En analysant le Document 4, expliquer le rôle de la protéine ZP3 et de la thréonine 168 en particulier, dans la fixation des spermatozoïdes à l'ovocyte.

### Partie 3 (2 points) ZP3 et réaction acrosomique

On mesure le pourcentage de spermatozoïdes faisant une réaction acrosomique en absence de tout traitement (CTL), ou en présence de ZP3. Afin d'étudier le mécanisme de déclenchement de la réaction acrosomique, on ajoute dans le milieu extérieur un fixateur de calcium (EGTA) ou un inhibiteur des canaux calciques de type T (PIM). On a injecté dans les spermatozoïdes un agent qui fluoresce en présence de calcium.



**Document 5 :** (A) Pourcentage de spermatozoïdes faisant une réaction acrosomique en absence (CTL) ou en présence de la ZP3. (B) Fluorescence du cytoplasme des spermatozoïdes en présence de calcium, lors de l'ajout de la ZP3. L'EGTA est un fixateur de calcium, ajouté dans le milieu externe. Le PIM est un inhibiteur des canaux calciques de type T, ajouté dans le milieu externe. En A, les lettres signalent des différences statistiquement significatives. En B, la flèche indique le moment d'ajout de la ZP3. Les autres composés sont déjà présents dans le milieu avant l'ajout de la ZP3. Le milieu extérieur est une solution physiologique, renfermant notamment des ions calcium.

**Question 5.a.** Expliquer ce qu'est la réaction acrosomique, dans quel contexte elle se produit naturellement, et ses conséquences.

**Question 5.b.** D'après les Documents 4 et 5, identifier le rôle de la ZP3 dans la réaction acrosomique et préciser quel est le mécanisme précis de déclenchement de la réaction acrosomique.

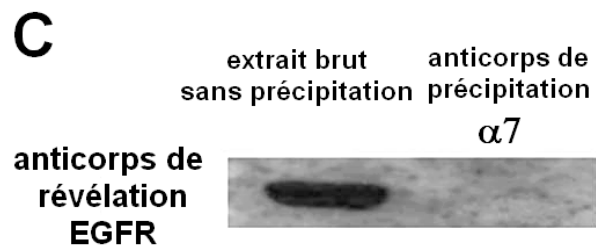
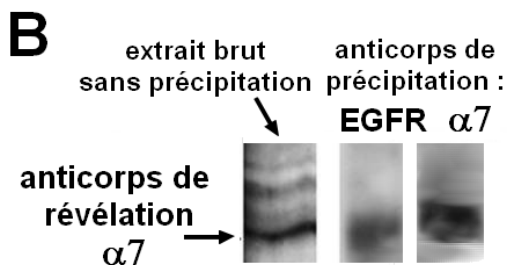
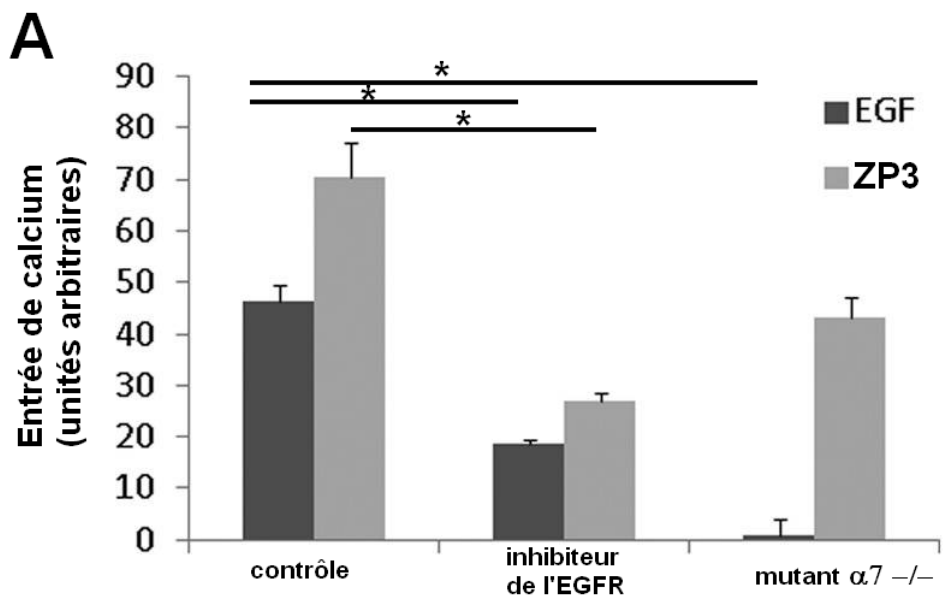
**Question 5.c.** Faire un schéma résumant l'ensemble de vos conclusions.

### Partie 4 (3 points) Contrôle de la réaction acrosomique

On cherche à comprendre le rôle du récepteur de l'EGF (EGFR) et d'un récepteur nicotinique à l'acétylcholine (noté  $\alpha 7$ ) dans le déclenchement de la réaction acrosomique. La ZP3, comme l'EGF, se fixe sur l'EGFR.

On dispose de souris mutantes n'exprimant pas le gène du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (lignée  $\alpha 7^{-/-}$ ).

Des immunoprécipitations ont été réalisées. Cela consiste à placer des broyats de spermatozoïdes en contact avec un anticorps lié à des billes denses. Les complexes anticorps-antigènes précipitent à cause de leur masse élevée, ce qui permet de les isoler. On les fait ensuite migrer par électrophorèse dénaturante, avant de les analyser en western blot avec un anticorps.



**Document 6 :** (A) Effet de l'incubation avec du peptide EGF ou de la ZP3 sur l'entrée de calcium dans des spermatozoïdes capacités. Certains spermatozoïdes ont été incubés en présence d'un inhibiteur spécifique du récepteur de l'EGF (EGFR). «  $\alpha 7^{-/-}$  » désigne une lignée de souris n'exprimant pas ce récepteur à l'acétylcholine. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les groupes reliés par le trait. (B et C) Immunoprécipitation de protéines de spermatozoïdes, à l'aide d'un anticorps anti EGFR, ou anti  $\alpha 7$ , suivi d'une électrophorèse dénaturante et d'une révélation avec un anticorps dit de révélation.

**Question 6.a.** Préciser ce qu'est le « contrôle » sur le Document 6A, puis analyser les résultats présentés.

**Question 6.b.** Expliquer par un schéma le protocole d'immunoprécipitation et interpréter le Document 6B. Comparer les Documents 6B et 6C et proposer une interprétation.

**Question 6.c.** Résumer en 10 lignes maximum l'ensemble des conclusions extraites du Document 6.

**Bibliographie :**

Wassarman et al. (2012) Int. J. Dev. Biol. 56: 833-839; Williams et al. (2006) Journal of Cellular Physiology 207:30–39; Han L. et al. (2010) Cell. 143: 404–415; Saldívar-Hernández et al. Reproductive Biology and Endocrinology (2015) 13:99; Ya. et al. (2007) Journal of Andrology, 28:3; Arukha et al. (2016) Journal of Reproductive Immunology 114, 18–26; Jaldety Y et al. (2012) J Biol Chem. 287(26):22328-40.

## BIOLOGIE 2 (Durée conseillée 1h30)

### FONCTIONNEMENT DU CŒUR DE MAMMIFÈRE

Les Mammifères possèdent un cœur pair, assurant la propulsion du sang.  
On se propose d'étudier plus particulièrement les cellules musculaires cardiaques, les cardiomyocytes.

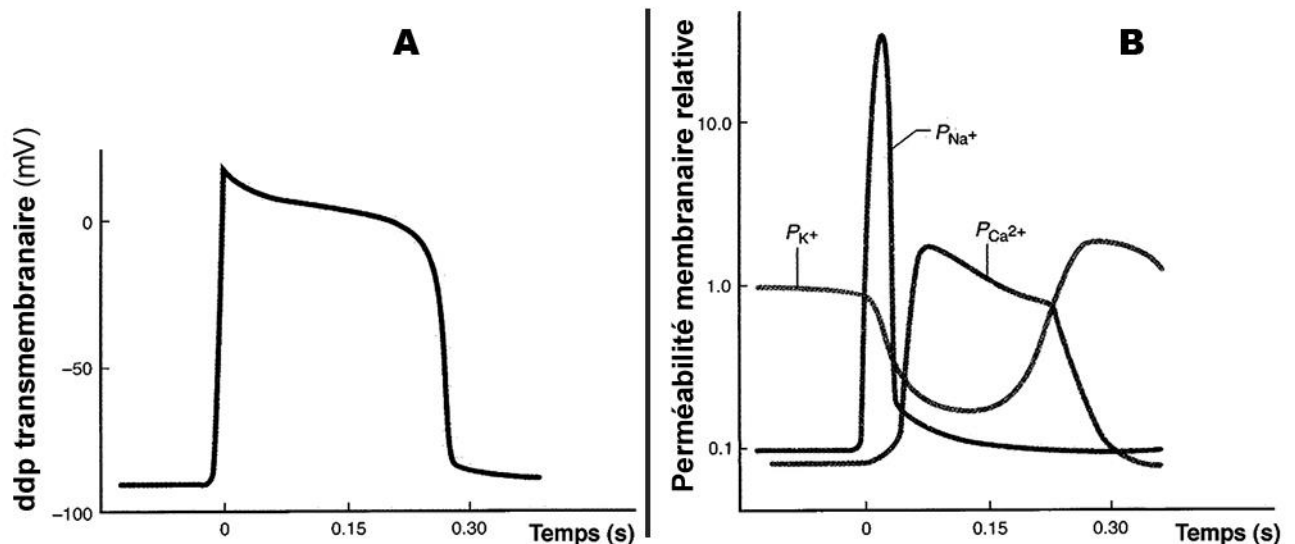
#### Partie 5 (4,75 points)

#### Excitabilité et contractilité des cardiomyocytes

##### 5.1. Potentiel d'action du cardiomyocyte

Le cœur de Mammifère présente deux populations de cellules excitables : les cellules nodales et les cellules musculaires cardiaques, les cardiomyocytes.

On porte notre attention sur les cardiomyocytes, responsables de la contraction du cœur.



**Document 7 :** Flux ioniques au niveau d'un cardiomyocyte de lapin. (A) Différence de potentiel (ddp) transmembranaire au niveau de cardiomyocytes. (B) Mesure de la perméabilité membranaire relative de certains ions.

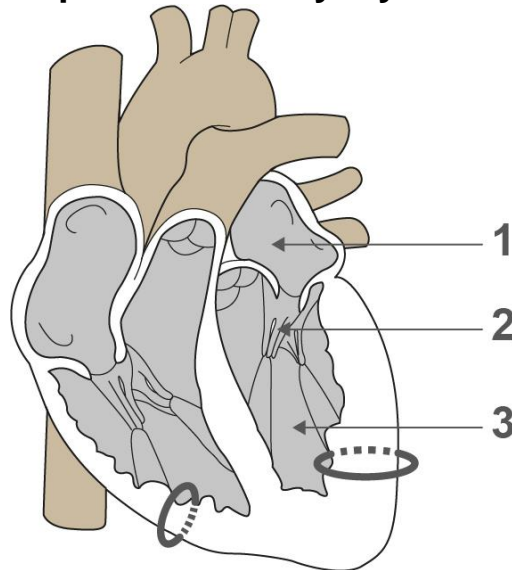
**Question 7.a.** Analyser les faits marquant du Document 7 en précisant les flux ioniques entrant et sortant.

**Question 7.b.** Discuter de l'importance biologique de la durée du potentiel d'action pour la fonction cardiaque.

**Question 7.c.** Sous la forme d'un schéma, préciser les points de différence et de similitude des potentiels d'action d'un neurone et d'un cardiomyocyte. Pour chaque cas, préciser l'espèce ionique jouant le rôle-clé.



## 5.2. Force développée par le cardiomyocyte

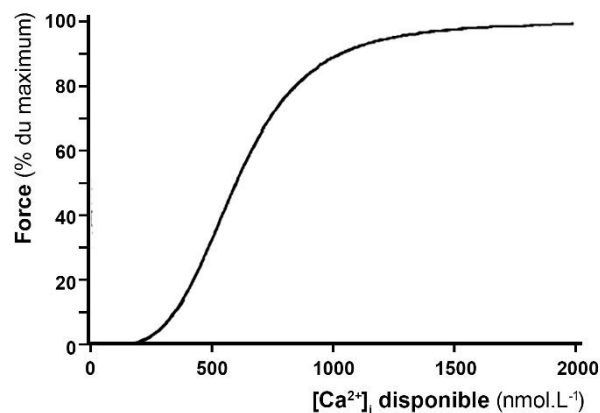


**Document 8** : Représentation schématique du cœur de Mammifère.

**Question 8.a.** Sur votre copie, donner le nom et la fonction des trois zones pointées sur le Document 8.

**Question 8.b.** Définir les deux zones entourées sur le Document 8 et préciser la différence. À quelle problématique biologique répond la différence observée ?

Le **Document 9** fournit des informations sur l'implication de l'ion calcium dans le cadre de la contraction des cardiomyocytes.



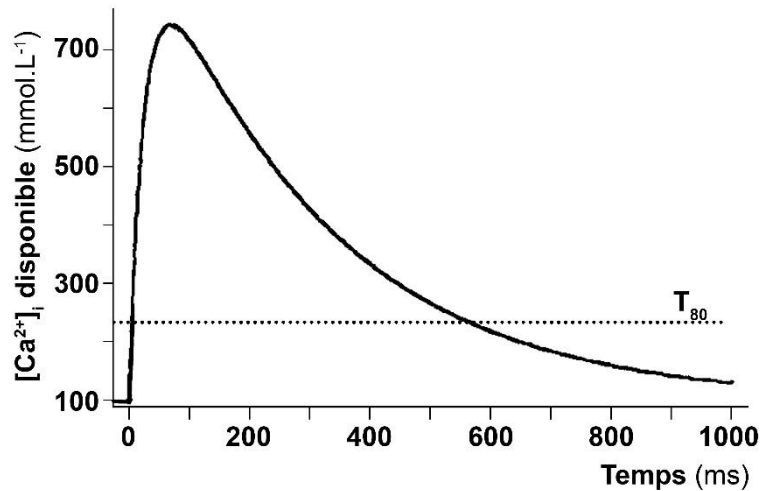
**Document 9** : Force développée par les cardiomyocytes en fonction de la concentration en calcium cytosolique disponible.

**Question 9.a.** Analyser le Document 9 afin de caractériser la force développée par le cardiomyocyte.

**Question 9.b.** Proposer un mécanisme moléculaire permettant d'expliquer l'allure de la courbe du Document 9.

Le **Document 10** décrit l'évolution de la concentration en calcium cytosolique dans un cardiomyocyte excité par une stimulation unique appliquée au temps 0.





**Document 10** : Concentration de calcium disponible dans le cytosol d'un cardiomyocyte excité. Le  $T_{80}$  représente le temps nécessaire à l'expulsion de 80% de calcium du cytosol du cardiomyocyte.

**Question 10.a.** Quelle est la conséquence biologique de la décroissance observée ?

**Question 10.b.** Quelles propriétés cellulaires sont nécessaires pour la réalisation de ce mécanisme biologique ?

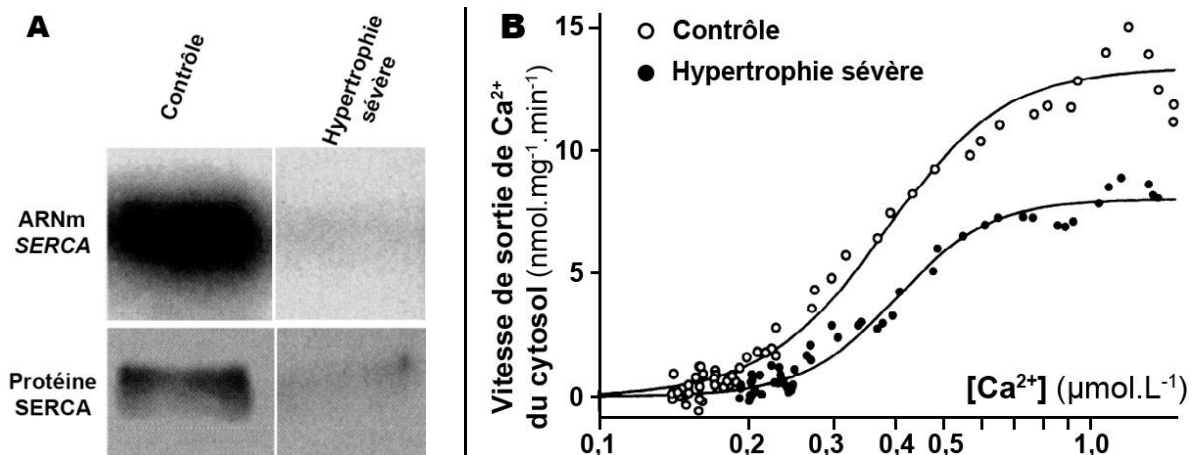
## Partie 6 (5,25 points)

### La protéine SERCA des cardiomyocytes

#### 6.1. Implication de la protéine SERCA

Des rats souffrant d'hypertrophie ventriculaire sont étudiés afin de comprendre l'origine de cet état. Des études ont mis en évidence le rôle de la protéine SERCA. Cette protéine transmembranaire a été localisée au niveau du réticulum endoplasmique des cellules musculaires cardiaques.

Le **Document 11** présente des résultats relatifs aux cardiomyocytes de rats.



**Document 11** : Phénotypes moléculaires (A) et fonctionnels (B) de rats affectés par une hypertrophie ventriculaire. (A) Abondance de l'ARNm SERCA et de la protéine SERCA dans des cardiomyocytes de différents lots de rats. (B) Vitesse de sortie de l'ion calcium du cytosol selon la concentration cytosolique en calcium de différents lots de rats. Pour chaque document, il a été vérifié que les mêmes quantités d'ARNm et de protéines avaient été déposées.

**Question 11.** Analyser le Document 11 afin de proposer un rôle à la protéine SERCA. Les documents mis en relation pour cette réponse seront clairement identifiés.

On étudie un des facteurs de régulation de la protéine SERCA, la protéine phospholambane.

## 6.2. Insertion d'un gène de phospholambane

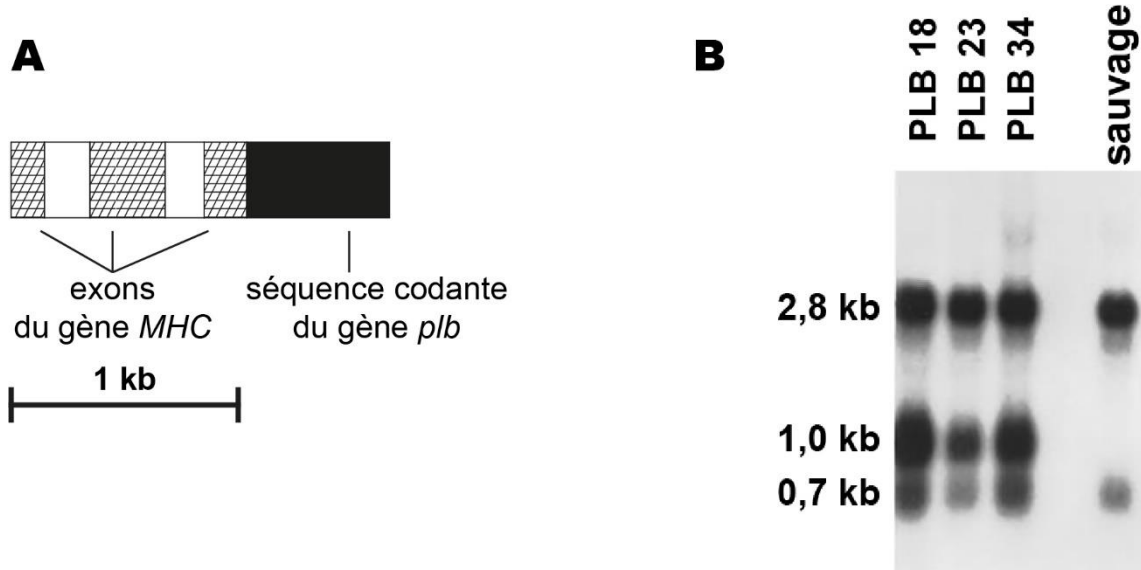
Le phospholambane (PLB) est une protéine formée de l'assemblage de 52 acides aminés. Elle est codée par le gène *plb* et est exprimée par les cardiomyocytes de Mammifère.

On construit des lignées transgéniques de souris dont le cœur exprime le gène d'intérêt selon la figure proposée dans le **Document 12A**. En effet, il est placé sous la commande du promoteur du gène de la chaîne lourde  $\alpha$  de myosine (MHC), exprimé dans les cardiomyocytes.

On extrait les ARN exprimés par diverses souches de souris.

Après migration électrophorétique des ARN sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes, on les transfère sur membrane de nitrocellulose (technique du northern blot).

La révélation est effectuée à l'aide d'un fragment d'ADNc de phospholambane marqué au  $^{32}\text{P}^*$  qui apparaît en sombre sur les photographies. Les résultats sont présentés dans le **Document 12B**.



**Document 12 :** Organisation du transgène et analyse des ARN exprimés par les lignées de souris transgéniques. (A) Représentation schématique de la construction génétique utilisée pour la transgénèse. *MHC* : gène codant la chaîne lourde de myosine ; *plb* : gène codant le phospholambane. kb : kilobases. (B) Analyse par northern blot des ARN exprimés par les lignées de souris sauvages et transgéniques PLB 18, 23 et 34.

**Question 12.** Analyser le Document 12 afin de caractériser les lignées transgéniques.

## 6.3. Expression d'un transgène de phospholambane par des cardiomyocytes de souris

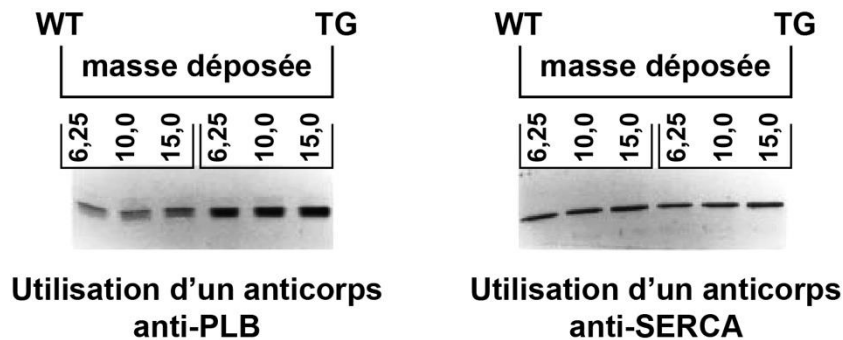
La quantité de phospholambane produite par les cardiomyocytes sauvages (WT) et transgéniques (TG provenant des souches PLB 18, 23 et 34) est établie par la technique du western blot.

Après extraction de toutes les protéines cellulaires et électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, on transfère les protéines ainsi séparées sur membrane de nitrocellulose.

On utilise une immuno-détection par l'emploi d'anticorps monoclonaux de lapin :

- anticorps anti-PLB ;
- anticorps anti-SERCA du réticulum endoplasmique.

La révélation est effectuée par un anticorps anti-lapin couplé à une enzyme qui apparaît en sombre sur les photographies. Les résultats sont présentés dans le **Document 13**.

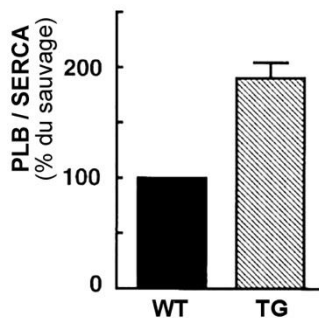


**Document 13** : Western blot de cardiomyocytes de souris. WT : extrait cellulaire de souche sauvage ; TG : extrait cellulaire de souche transgénique PLB 34. On précise que la masse moléculaire des protéines ayant migré n'est pas modifiée.

**Question 13.** Analyser le Document 13 afin de préciser l'expression du transgène *plb*.

Afin de préciser la localisation du phospholambane transgénique, on effectue des préparations de membranes de réticulum endoplasmique de cardiomyocytes de souris.

On parvient alors à déterminer les quantités de phospholambane (PLB) et de SERCA du réticulum endoplasmique présentes dans les membranes des microsomes. Les résultats sont présentés dans le **Document 14**.



**Document 14** : Quantités de phospholambane et de SERCA exprimées au niveau du réticulum endoplasmique des cardiomyocytes de diverses souches de souris. WT : extrait cellulaire de souche sauvage ; TG : extrait cellulaire de souche transgénique.

**Question 14.** Analyser le Document 14 afin de préciser la localisation de la protéine phospholambane (PLB).

## 6.4. Effet de l'expression d'un transgène de phospholambane sur le fonctionnement des cardiomyocytes de souris

Afin de déterminer si le fonctionnement des cardiomyocytes transgéniques est modifié, on mesure quelques paramètres de leur fonctionnement. Les résultats sont présentés dans le **Document 15**.

	Sauvage (WT)	Transgénique (TG)
<i>Paramètres contractiles</i>		
% de raccourcissement	9,2 ± 0,7	5,8 ± 0,7 *
+ dL/dt (µm.s <sup>-1</sup> )	167 ± 16	106 ± 15 *
- dL/dt (µm.s <sup>-1</sup> )	125 ± 14	69 ± 12 *
<i>Paramètres cinétiques du calcium</i>		
Amplitude de variation de [Ca <sup>2+</sup> ]	0,71 ± 0,06	0,59 ± 0,04 *
T <sub>80</sub> (secondes)	0,59 ± 0,06	0,77 ± 0,04 *

**Document 15** : Caractères fonctionnels de cardiomyocytes sauvages et transgéniques de souris ; +dL/dt : vitesse de raccourcissement ; -dL/dt : vitesse d'allongement ; T<sub>80</sub> : temps de diminution de 80 % de la variation de calcium ; un astérisque signale les valeurs significativement différentes du contrôle.

**Question 15.** Analyser le Document 15 afin de préciser l'effet de la protéine phospholambane (PLB) chez les souris sauvages. Établir un lien avec le fonctionnement de la protéine SERCA.

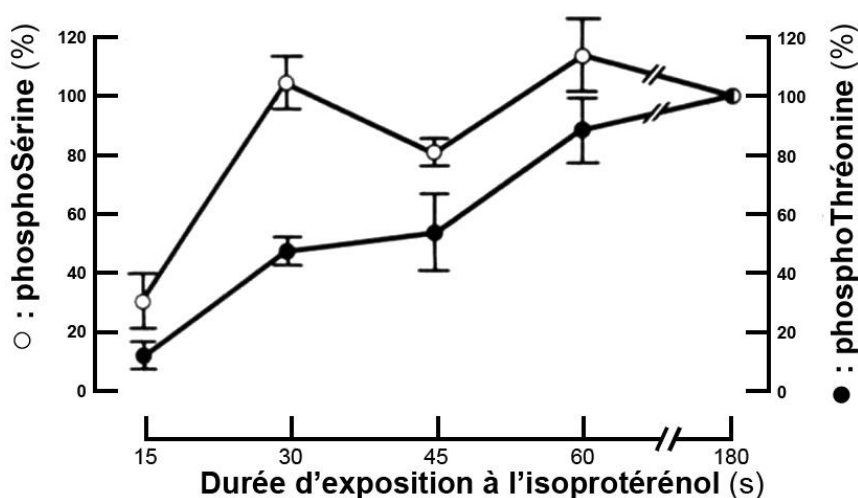
## 6.5. Effet de la stimulation β-adrénergique des cardiomyocytes de souris sur le phospholambane

Le fonctionnement de l'organisme peut être modifié par la stimulation β-adrénergique : la « décharge d'adrénaline » est un élément essentiel à la réponse adaptative au stress.

Afin de connaître l'effet de l'adrénaline sur le fonctionnement des cardiomyocytes, on place des cardiomyocytes de souris sauvages et transgéniques en présence d'isoprotérenol, agoniste (= substance qui produit les mêmes effets) de l'adrénaline sur les récepteurs β - adrénergiques.

Le phospholambane est une protéine possédant deux sites de phosphorylation potentielle, un radical Sérine en position 16 et un radical Thréonine en position 17.

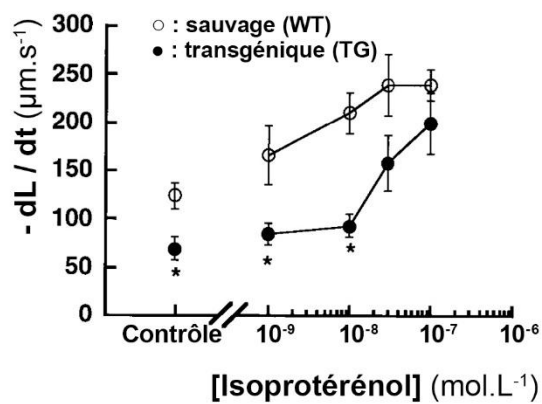
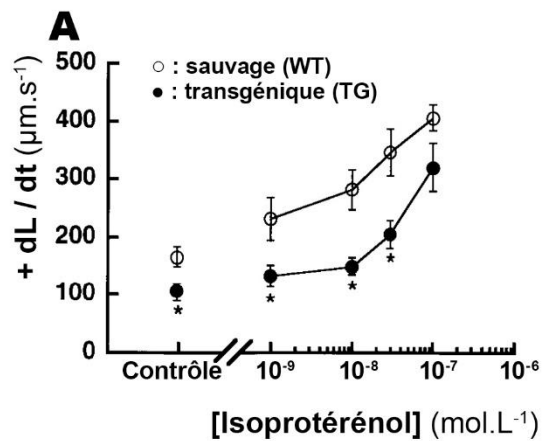
Le milieu de culture de cardiomyocytes contient des groupements phosphate radioactifs (<sup>32</sup>P\*) et on les expose à l'isoprotérenol pendant des durées variables. Le **Document 16** présente les résultats obtenus après extraction et électrophorèse du phospholambane suivie d'une autoradiographie.



**Document 16** : Phosphorylation du phospholambane suite à une stimulation adrénergique.

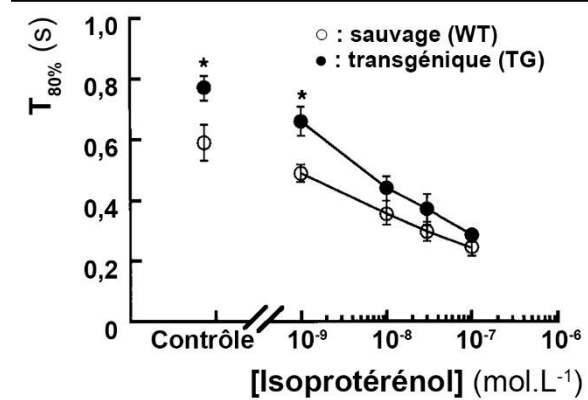
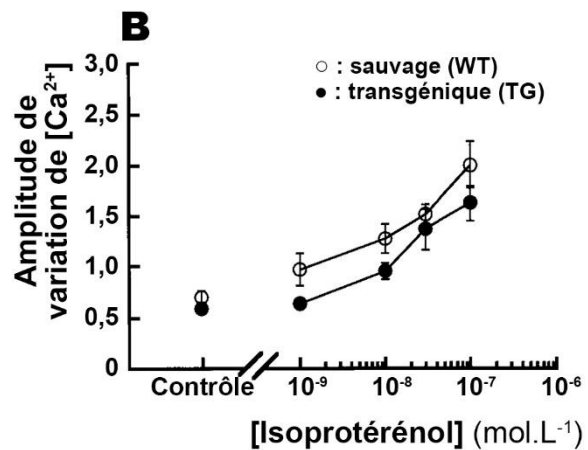
**Question 16.** Analyser le Document 16 afin de préciser l'effet de la stimulation β - adrénergique

On mesure ensuite le fonctionnement des cardiomyocytes. Les résultats sont présentés dans le Document 17.



Document 17A : Effet de doses croissantes d'isoprotérénol sur les vitesses de raccourcissement et de décontraction sur des cardiomyocytes sauvages et transgéniques

+dL/dt = vitesse de raccourcissement  
- dL/dt = vitesse de décontraction



Document 17B : Effet de doses croissantes d'isoprotérénol sur l'amplitude du signal calcium et le temps nécessaire au déclin de 80 % de cette amplitude sur des cardiomyocytes sauvages et transgéniques

T<sub>80</sub> = temps nécessaire à une diminution de 80 % de la variation

Un astérisque signale les valeurs significativement différentes du contrôle.

**Document 17** : Caractères fonctionnels de cardiomyocytes sauvages (WT) et transgéniques (TG) de souris suite à une stimulation adrénergique par l'isoprotérénol.

**Question 17.a.** Analyser le Document 17 afin de préciser le rôle de la stimulation  $\beta$ -adrénergique chez les cardiomyocytes des souris sauvages. Établir un lien avec le fonctionnement de la protéine SERCA.

**Question 17.b.** Analyser le Document 17 afin de préciser le rôle du phospholambane lors de la stimulation  $\beta$ -adrénergique chez les souris sauvages. Proposer une hypothèse.

#### Bibliographie :

Bers, D. M., et al. (2011) *Comprehensive Physiology*. 335–387 ; Cain B. S., et al. (1998) *JACC*. 32, No. 2 458-467 ; Kadambi V. J. et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 97 : 533-9 ; Qi M. et al., (1997) *Am. J. Physiol.* 272 : H2416-H24249.