

## 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 3 : Capacitation et état hypermotile du spermatozoïde

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

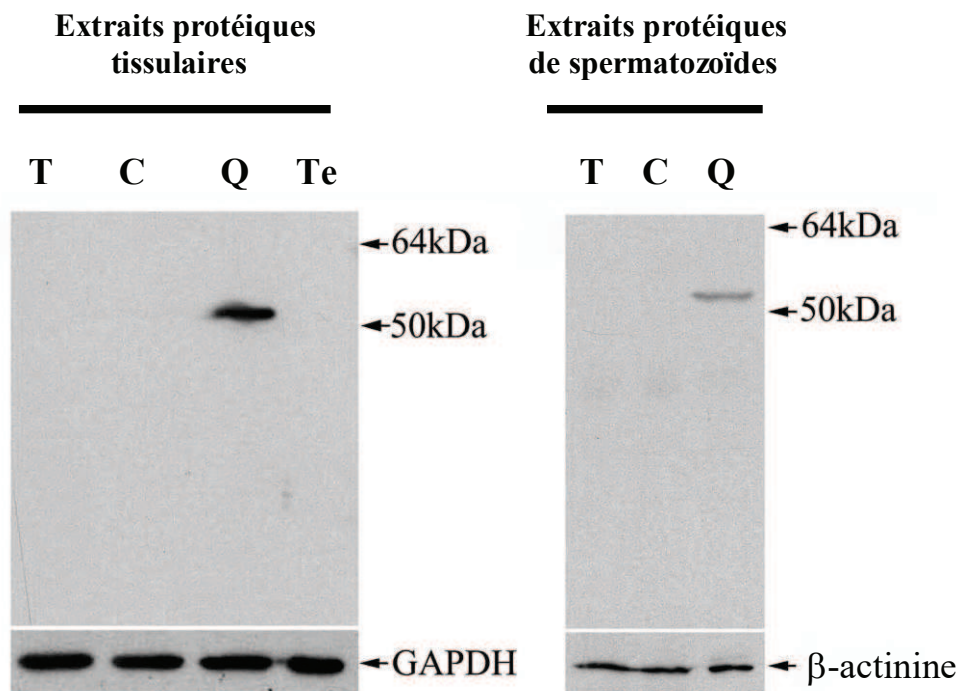
#### 3-1 : Localisation de la protéine HongrES1

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.

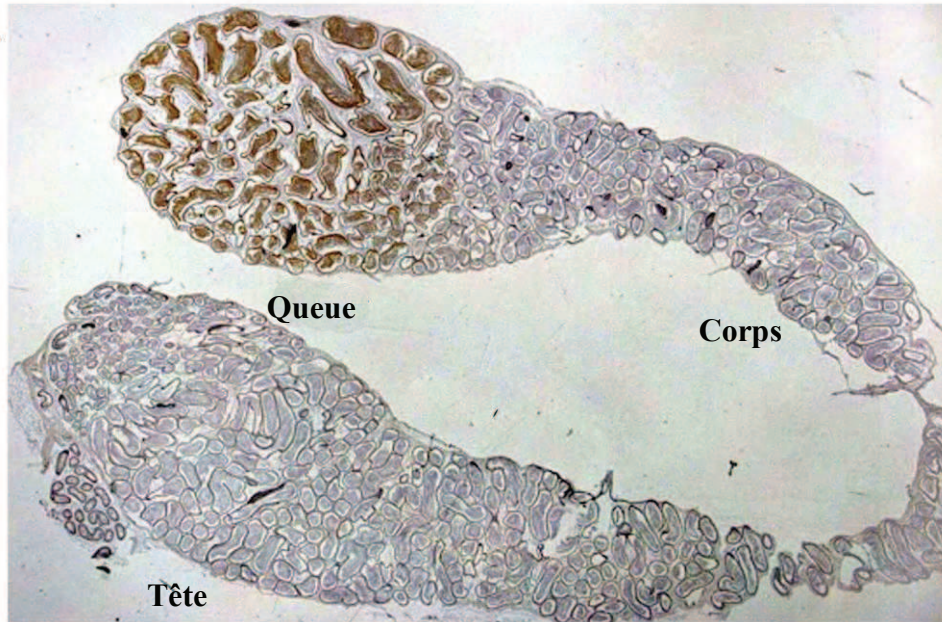
Les résultats des électrophorèses sont analysés par *Western blot* en utilisant :

- 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  $\beta$ -actinine.

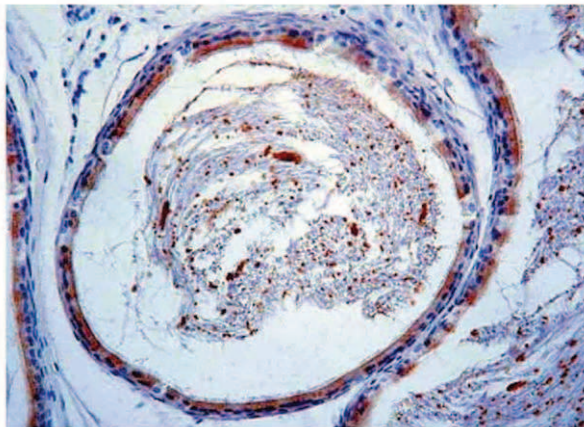


Document 3-1A : Résultats des Western blots

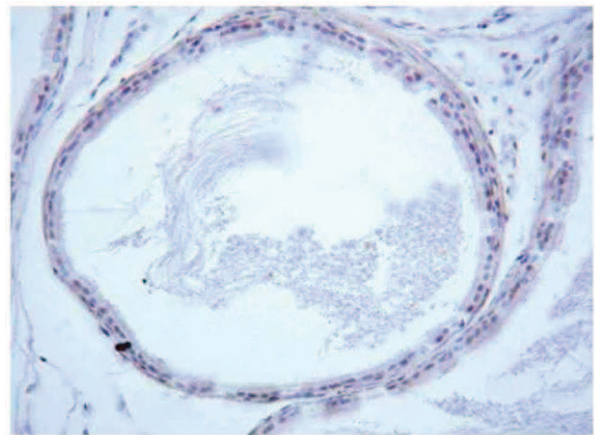
➤ Des coupes d'épididyme sont traitées par immunohistochimie avec l'immunsérum dirigé contre HongrES1 (révélation donnant une coloration rouge-brun) et une coloration de fond hématoxyline-éosine (coloration bleutée et rosée) révélant l'ensemble des structures tissulaires. Les résultats sont indiqués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



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



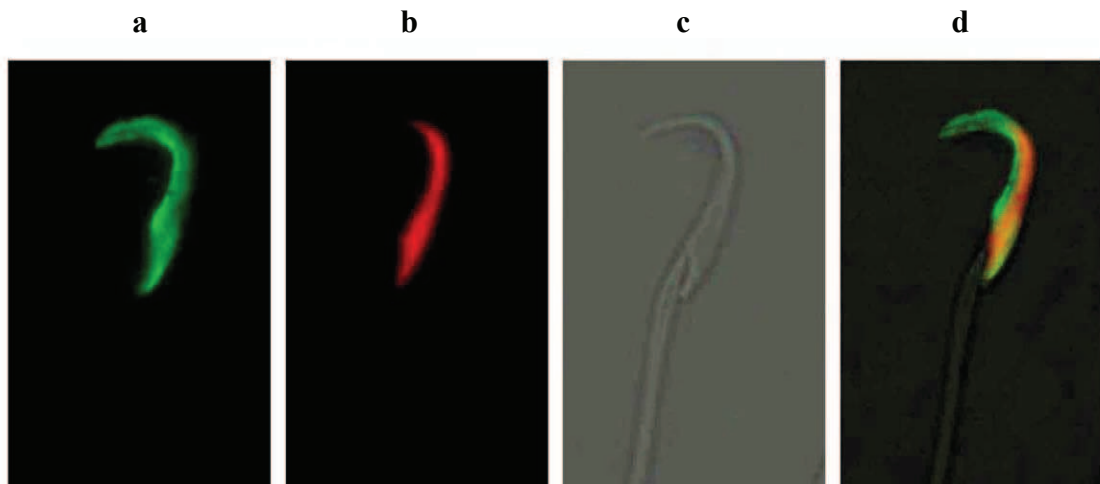
Coupe réalisée dans la queue de l'épididyme (x 100)



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)**

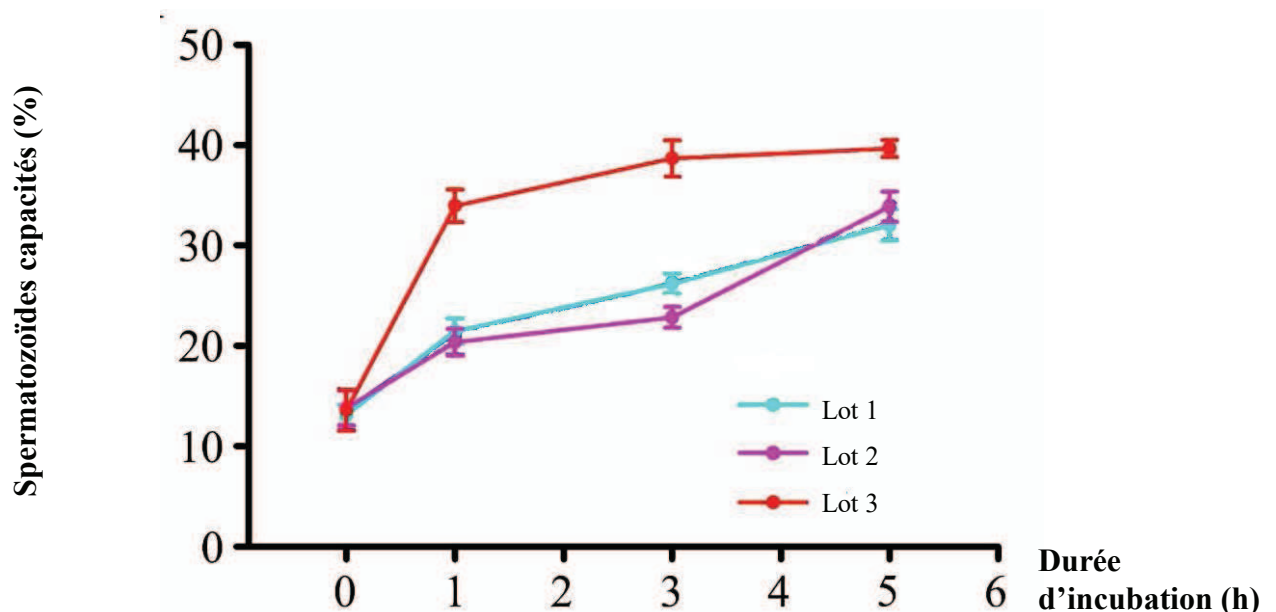
- a : Microscope confocal, jeu de filtres spécifique de la fluorescéine
- b : Microscope confocal, jeu de filtres spécifiques de l'iodure de propidium
- c : Microscope à contraste de phase
- d : Superposition des clichés a, b et c

**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 capités 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.

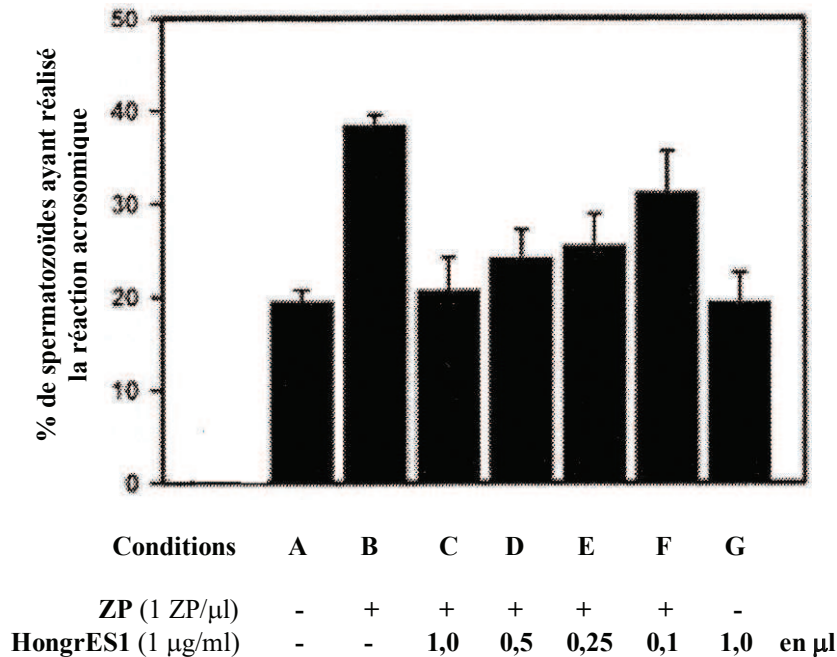
On détermine le nombre de spermatozoïdes capités en fonction de la durée d'incubation. Les résultats sont reportés sur le graphe suivant :



**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<sup>2+</sup> 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.



**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<sup>2+</sup> 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** :

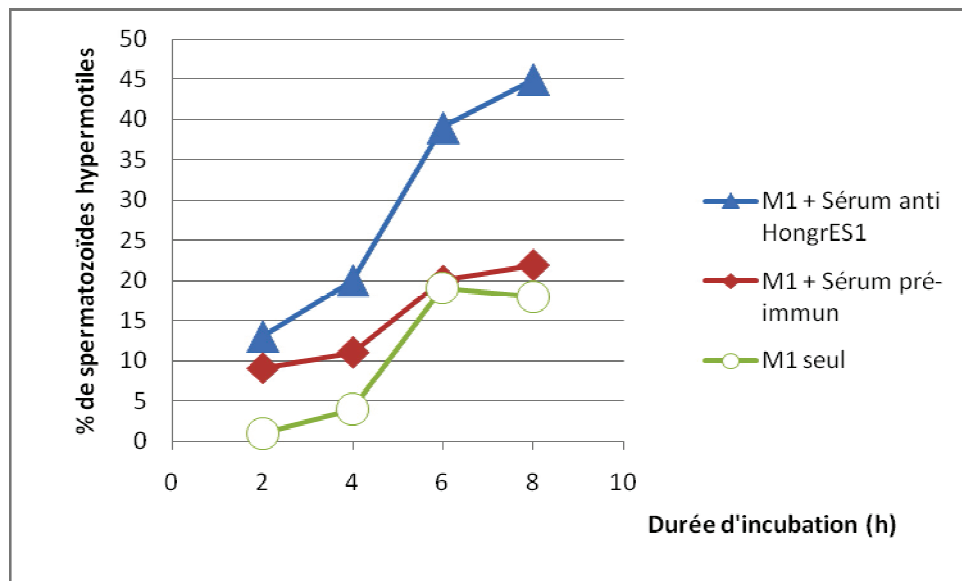
Condition d'incubation	% de spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique
Sans HongrES1	38,2 ± 4,6 %
Avec HongrES1	19,6 ± 2,8 %

**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<sup>2+</sup>. 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**