

5.4 Épreuve de travaux pratiques de contre-option du secteur A : Sujet et commentaires

5.4.1 Présentation de l'épreuve

L'épreuve pratique de contre-option du secteur A avait pour thématique « Quelques aspects histo-fonctionnels de l'appareil reproducteur femelle des Mammifères ». Elle partait de l'observation macroscopique de l'appareil uro-génital femelle pour ensuite s'intéresser aux hormones sexuelles et aux cellules qui les produisent, en abordant plusieurs aspects cellulaires et moléculaires.

Commentaires

Les trois parties étaient indépendantes, comme cela était précisé sur la page de garde du sujet. La deuxième partie nécessitait de prévoir les temps d'incubation nécessaire à sa bonne exécution : cela était aussi indiqué sur la page de garde. Malheureusement beaucoup de candidats n'ont pas tenu compte de cette précision et n'ont pas eu le temps de terminer leur dosage.

La première partie a été globalement bien traitée (pour ceux qui ont fait la dissection) et le jury a vérifié l'adéquation entre le schéma et la dissection elle-même. La qualité de la dissection a cependant été très variable : la mise en évidence de l'intégralité de l'appareil génital femelle nécessite la mise en évidence des deux ovaires et l'ouverture de la symphyse pubienne. L'identification des deux types de follicules n'a pas été difficile pour les candidats. Légender la coupe histologique de l'ovaire a posé un peu plus de problèmes et très souvent les légendes étaient incomplètes.

La deuxième partie a été traitée de manière très inégale. La présentation des hormones sexuelles était beaucoup trop succincte dans nombre de copies. L'identification des deux phases du cycle et l'analyse de la courbe sous oestro-progestatif ont été mieux réussies. On attendait pour ces deux questions de restitution de connaissances, de la précision, de la clarté et de la concision. La partie dosage a été traitée de façon décevante. Peu de candidats sont capables d'exposer le principe de l'ELISA. Nous ne reviendrons pas sur le manque d'organisation qui n'a pas permis d'effectuer le dosage dans son entier. Il faut noter que l'usage des micropipettes n'est pas maîtrisé par tous, ce qui pose question à ce niveau d'études. Les calculs de dilution et concentration (très simples, il faut le dire) ont été dans l'ensemble réussis. Il est malgré tout inquiétant qu'un certain nombre de candidats ne soient pas capables de les effectuer.

La troisième partie associait des aspects histo-fonctionnels, endocrines et génétiques. Elle permettait aux candidats de montrer qu'ils étaient capables d'analyser des documents scientifiques, d'en faire une synthèse et de proposer des hypothèses pour leur interprétation. Cette partie a été traitée de manière très décevante par une grande majorité de candidats, peut-être pris par le temps, conséquence de leur mauvaise organisation. Aucun candidat n'a été capable de répondre de manière complète à la question sur le principe de l'immunoperoxydase ni sur les contrôles à mettre en œuvre pour s'assurer de la validité des observations. Ce point est inquiétant pour des futurs enseignants de sciences : il est nécessaire de connaître le principe des grandes techniques de base de la discipline enseignée et d'être capable d'avoir un regard critique sur leur bonne exécution dans les publications. L'analyse des résultats présentés dans cette troisième partie a été faite de manière inégale et, notamment, les résultats négatifs n'ont pas été mis en exergue. On rappelle, par exemple, que le fait qu'une cellule n'exprime pas une protéine donnée est un résultat tout aussi important

que le fait qu'un autre type cellulaire l'exprime. Egalement, on rappelle que des valeurs qui ne présentent pas de différence statistiquement significative ne sont pas différentes même si elles peuvent le paraître (voir le cas du taux circulant de progestérone chez les ERKO : il n'est pas différent de celui des souris wild-type). Globalement, la mise en perspective de l'ensemble des données obtenues chez la souris ERKO a été assez limitée mais quelques candidats ont réussi à proposer un modèle pour les régulations médiées par le récepteur ER α .

5.4.2 Sujet commenté

AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE - SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2019

TRAVAUX PRATIQUES DE CONTRE OPTION DU SECTEUR A CANDIDATS DES SECTEURS B ET C Durée totale : 2 heures

Quelques aspects histo-fonctionnels de l'appareil reproducteur femelle des Mammifères

Au cours de cette épreuve de travaux pratiques, plusieurs aspects de la reproduction des femelles Mammifères seront abordés.

Les 3 parties sont indépendantes.

Certaines nécessitent des manipulations, prévoyez donc votre organisation en conséquence.

Partie I : Etude de l'appareil reproducteur femelle	page
<i>Durée conseillée : 0h30 – barème : 25/130</i>	
Partie II : Les hormones sexuelles femelles : œstrogènes et progestérone	page
<i>Durée conseillée : 1h00 – barème : 70/130</i>	
Partie III : Caractérisation (partielle) de la lignée αERKO	page
<i>Durée conseillée : 0h30 – barème : 35/130</i>	

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

N'oubliez pas d'appeler les correcteurs lorsque cela est demandé.

Certaines observations nécessitent que vous respectiez un planning de passage qui sera indiqué au tableau.

AVANT DE REMETTRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS.

Vous devez rendre la totalité des feuilles du dossier

Partie I : Etude de l'appareil reproducteur femelle

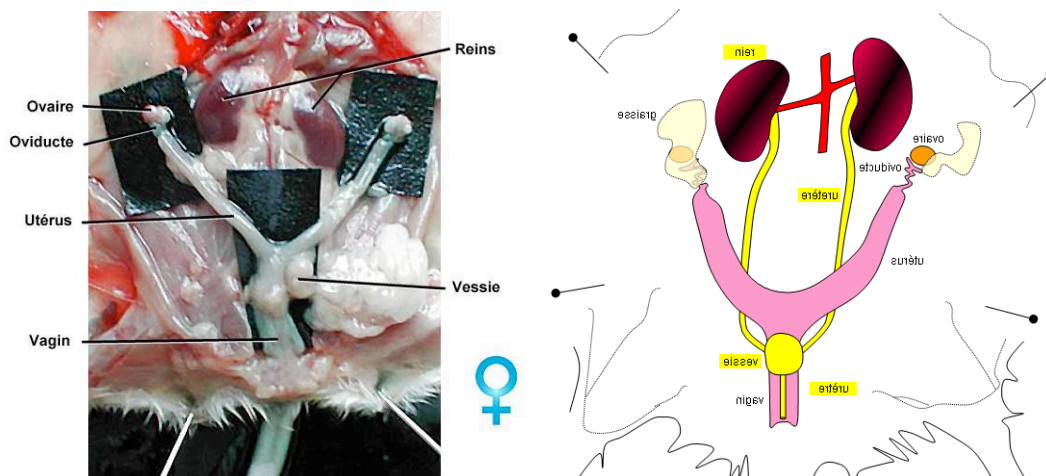
I.A - Vue d'ensemble

Vous disposez d'une souris femelle intacte dont vous mettrez en évidence l'appareil uro-génital femelle (en ayant fait l'ablation, ou mis sur le côté, l'appareil digestif).

A l'issue de votre dissection :

- **vous la présenterez à un surveillant,**
- vous en ferez un schéma légendé.

Réponse à la question I.A



I.B - Etude histologique de l'ovaire

Vous disposez d'une coupe d'ovaire de lapine en phase folliculaire colorée au trichrome de Masson, repérez :

- un follicule primaire
- un follicule à antrum avec une incidence de coupe passant par l'ovocyte.

Vous les présenterez à un surveillant : centrez le champ du microscope sur le follicule que vous avez sélectionné.

Il vous fournira une photo d'une partie de la coupe que vous légenderez le plus précisément possible.

N'oubliez pas de rendre la photo légendée avec votre copie !

A quel(s) stade(s) de la méiose se situent les ovocytes de chacun de ces follicules ?

Réponse à la question I.B

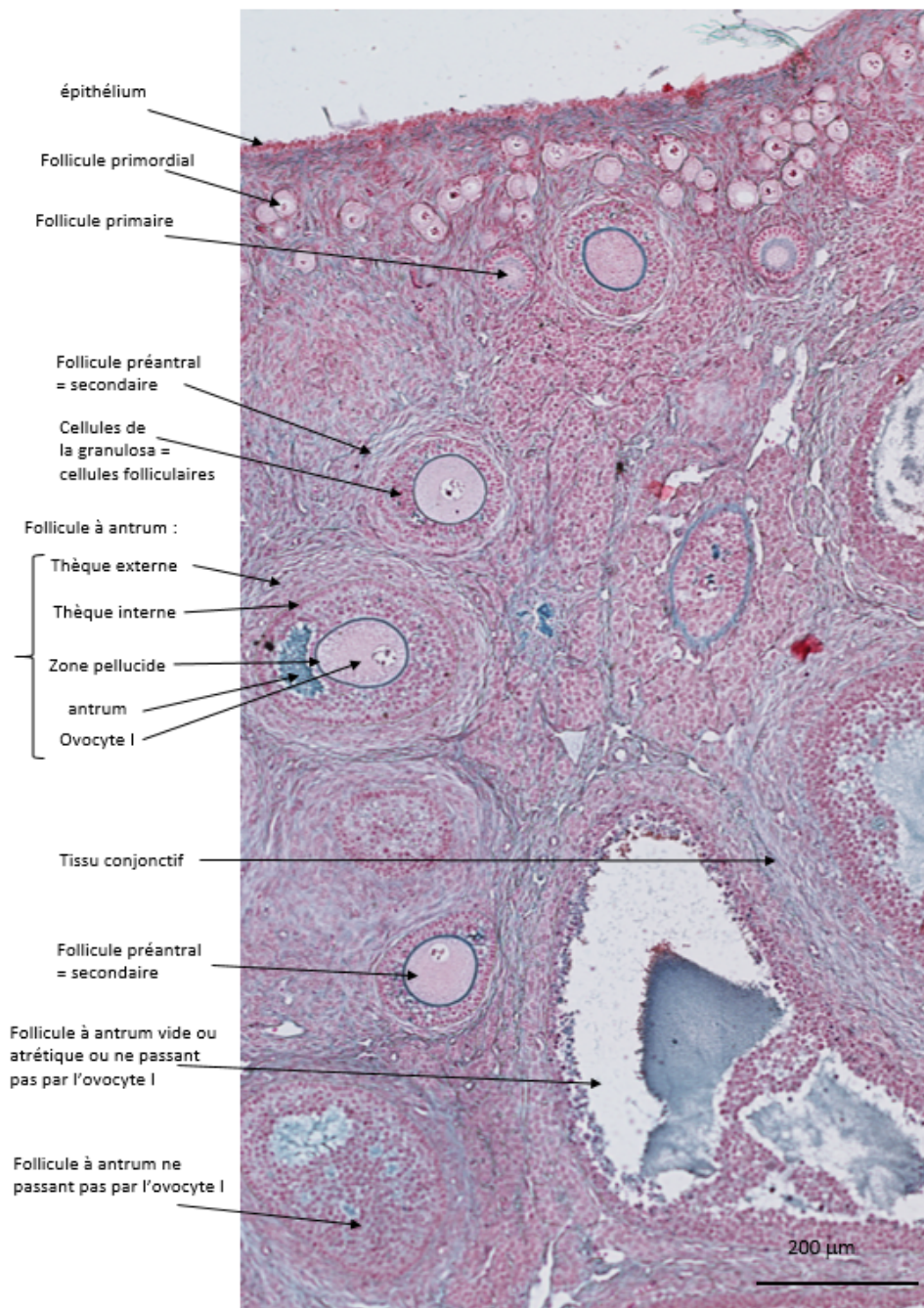
Légendes de la figure : titre, épithélium, tissu conjonctif, follicule primordial, follicule primaire, follicule pré-antral (= secondaire), follicule à antrum (contenant : antrum, zone pellucide, thèque interne, thèque externe, ovocyte I), cellules de la granulosa = cellules folliculaires.

stade(s) de la méiose des ovocytes de chacun de ces follicules :

follicule primaire et follicule à antrum : identique : ovocyte bloqué en prophase 1 (diplotène) de méiose 1.

(fin de méiose 1 et début de méiose 2 quand le complexe ovocyte-cumulus se détache du reste du follicule, puis fin méiose 2 au moment de la fécondation)

Coupe transversale d'ovaire de lapine colorée au trichrome



Partie II : Les hormones sexuelles femelles : œstrogènes et progestérone

Chez les Mammifères, le cycle sexuel de la femelle est sous le contrôle principal de deux familles hormonales : les œstrogènes et la progestérone. Nous allons maintenant nous intéresser à la variation de leurs niveaux de sécrétion au cours du cycle.

II.A - Présentation des hormones sexuelles femelles

En quelques lignes, faites une présentation succincte de ces deux hormones : vous rappellerez leur(s) lieu(x) de production, leur(s) précurseur(s), leur(s) mécanismes de biosynthèse, de libération et d'action sur leurs cellules-cible.

Réponse à la question II.A

Œstrogène : produit par ovaire. Les cellules de la thèque produisent de la testostérone qui est transformée en œstradiol par les cellules de la granulosa pendant la phase folliculaire.

Progestérone : produit par ovaire : par le corps jaune pendant la phase lutéale.

Les hormones sexuelles sont produites à partir du cholestérol, présentation rapide de la chaîne enzymatique de transformation du cholestérol (le détail des enzymes n'est pas nécessaire).

Elles sont libérées au fur et à mesure de leur production : pas de stockage

Transport dans le sang par des protéines de transport spécifiques ou non-spécifiques

Action sur les cellules-cibles via des récepteurs présents dans le cytoplasme : le complexe hormone-récepteur migre au noyau pour modifier l'expression de certains gènes équipés d'une séquence consensus spécifique dans leur promoteur.

Il existe aussi des récepteurs membranaires expliquant l'action non-génomique, et rapide, des hormones.

II.B - Variation des taux d'hormones sexuelles au cours du cycle

Le graphique ci-dessous montre les variations des taux d'œstrogène et de progestérone au cours du cycle chez la Femme.

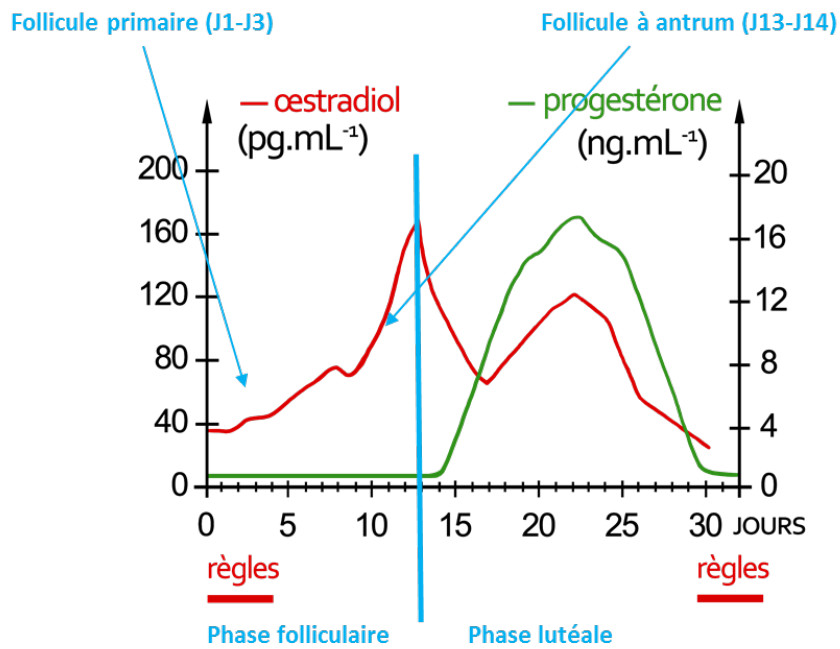
On distingue 2 phases dans le cycle :

- les nommer
- les placer sur le graphique.

A chaque cycle, un follicule est sélectionné et poursuit son développement.

Remplacez sur le graphique les périodes correspondant au stade « follicule primaire » et « follicule à antrum » que vous avez observé sur les coupes histologiques.

Réponse à la question II.B



II.C - Mesure des taux d'œstradiol circulants par dosage immunoenzymatique

Nous allons maintenant évaluer la concentration d'œstradiol circulante dans le sérum à l'aide d'un dosage immunoenzymatique de type ELISA-sandwich.

Pour cela on dispose d'un kit constitué des éléments suivants :

- . barrettes de micropuits coatées avec un anticorps de capture
- . solution d'anticorps de détection couplé à l'acétylcholine estérase (traceur)
- . solution de 17 β -œstradiol (100 ng/ml)
- . réactif d'Ellman (substrat de l'acétyl choline estérase)

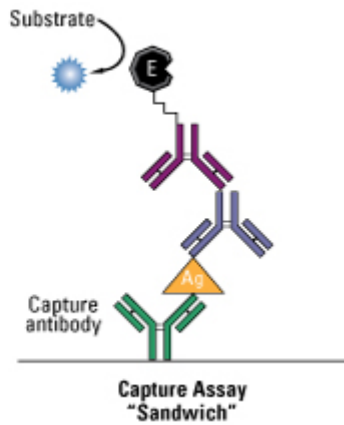
II.C.1 : Explicitez le principe d'un dosage de type ELISA-sandwich (vous pouvez vous aider d'un schéma). Vous préciserez et justifierez l'allure de la courbe-étalon attendue.

Réponse à la question II.C.1

Puit coaté avec anticorps de capture, œstradiol = antigène, anticorps de détection, couplé à l'acétylcholine estérase, réactif d'Ellmann substrat qui donne un précipité soluble.

Bonus : nécessité d'un antigène à deux épitopes pour avoir deux anticorps différents

NB : Le schéma devait indiquer que les anticorps sont fixés à l'antigène par leur partie hypervariable (pas dans le Y)



La gamme étalon est établie à partir d'une solution d'œstradiol de concentration connue : la DO est directement proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur l'anticorps de capture, corrélation : concentration/DO : droite puis plateau.

II.C.2 : Vous allez utiliser un kit de dosage commercial pour doser le 17 β -œstradiol.

Vous disposez de :

- . 2 barrettes de 8 puits déjà coatées avec l'anticorps de capture
- . 400 μ l de solution de 17 β -œstradiol à 100 ng/ml : noté « GE »
- . 1,5 ml de traceur (anticorps de détection couplé à l'acétyl choline estérase) : noté « T »
- . 3 ml de réactif d'Ellmann : noté « Ell »
- . 200 μ l d'échantillon à doser : noté « E »

Voici le protocole que vous aurez à suivre :

- . Préparer une gamme-étalon à partir de la solution de 17 β -œstradiol à 100 ng/ml selon le tableau ci-dessous (avec un volume final de 100 μ l, solvant : eau distillée).
- . Préparer les dilutions appropriées pour le dosage de l'échantillon à doser : 1/1, 1/2, 1/10.
- . Déposer 100 μ l de gamme-étalon ou d'échantillon dans les puits.
- . Ajouter 100 μ l de traceur.
- . Incuber 30 minutes à température ambiante.
- . Rincer 2 fois à l'eau distillée (retourner la barrette sur un papier absorbant, tapoter, rincer les puits avec une pissette d'eau distillée, attention à ne pas éjecter l'eau directement sur le fond du puit).
- . Ajouter 200 μ l de réactif d'Ellmann.
- . Incuber entre 30 et 40 minutes à température ambiante.
- . Lire le résultat à 412 nm.

II.C.2a : préparation de la gamme-étalon :

Détaillez les calculs et le mode opératoire qui vous permettent de construire une gamme-étalon avec les points suivants :

17 β -œstradiol (ng)	0	0,5	1	2	4	6	8	10
----------------------------	---	-----	---	---	---	---	---	----

Réponse à la question II.C.2a

100 ng/ml = 100 ng/1000 µl = 1 ng/10 µl = 0,1 ng

ng 17 β-oestradiol	0	0.5	1	2	4	6	8	10
Volume (µl) 17β-oestradiol (100 ng/ml) à prélever	0	5	10	20	40	60	80	100
Volume H2O (µl) pour compléter à 100 µl	100	95	90	80	60	40	20	0

II.C.2b : préparation du dosage de l'échantillon.

- indiquez dans le cadre ci-dessous les prélèvements à effectuer pour obtenir 100 µl de l'échantillon à doser aux dilutions suivantes : 1/1, 1/2, 1/10.

Réponse à la question II.C.2b

Dilution 1/1 : 100 µl échantillon

Dilution 1/2 : 50 µl échantillon + 50 µl H2O

Dilution 1/10 : 10 µl échantillon + 90 µl H2O

II.C.2c : évaluation qualitative de la concentration de l'échantillon.

- procédez à la réalisation du dosage : déposer la gamme-étalon et les échantillons à doser dans les puits, déposer ensuite les différents réactifs selon le protocole ci-dessus.

- quand vous estimez que la coloration est suffisamment développée (entre 30 et 40 minutes d'incubation), appelez un surveillant pour lui montrer les résultats de votre dosage

- évaluez qualitativement la concentration de l'échantillon à doser :

Réponse à la question II.C.2c

Evaluation par le surveillant :

Progression linéaire de la gamme

Tous les puits ont le même volume

la bonne dilution est 1/10 (les autres ne sont pas dans la gamme), la coloration se situe entre 4 et 6 ng d'oestradiol soit 5 ng

100 µl de la dilution 1/10 = 5 ng

Donc la concentration initiale de l'échantillon est 500 ng/ml = 0.5 ng/µl

II.C.2d : un dosage similaire a été réalisé et mesuré quantitativement à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques. Les résultats obtenus sont les suivants :

	GE 0	GE 0.5	GE 1	GE 2	GE 4	GE 6	GE 8	GE 10	E1	E2
DO	0	0.02	0.07	0.154	0.287	0.442	0.598	0.752	0.488	0.302

GE = gamme-étalon identique à celle préparée en II. C.2a

E1 : échantillon issu de la femelle #1 dont la concentration est à déterminer (dépôt d'un aliquot de 100 μ l d'un échantillon de sérum concentré 500 fois)

E2 : échantillon issu de la femelle #2 dont la concentration est à déterminer (dépôt d'un aliquot de 100 μ l d'un échantillon de sérum concentré 1000 fois)

Tracez la courbe-étalon (sur la feuille quadrillée fournie page suivante) et déterminez graphiquement la concentration exacte des deux échantillons.

A quelle phase de leur cycle étaient les femelles quand elles ont été prélevées ?

Réponse à la question II.C.2c

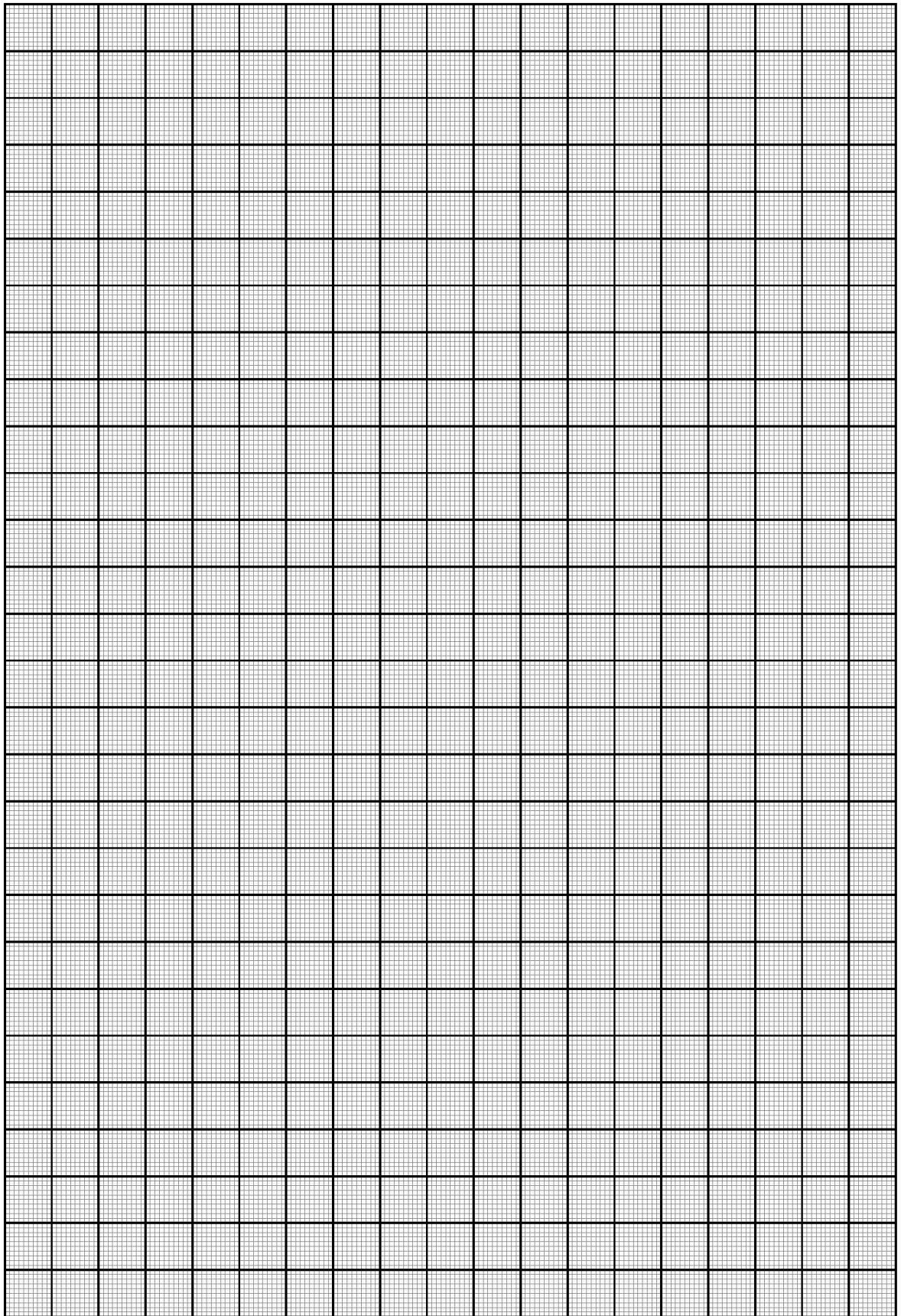
échelle appropriée pour tracer la gamme, unités indiquées sur les axes, titre, détermination graphique E1, détermination graphique E2

Calculs pour concentration E1 : DO qui donne 6,5 ng pour 100 μ l soit 65 ng/ml, la solution a été concentrée 500 fois donc la solution initiale est à une concentration de $65 / 500 = 0,13$ ng/ml soit 130 pg/ml.

Calculs pour concentration E2 (2 points) : DO qui donne 4 ng pour 100 μ l soit 40 ng/ml, la solution a été concentrée 1000 fois donc la solution initiale est à une concentration de $40 / 1000 = 0,04$ ng/ml soit 40 pg/ml.

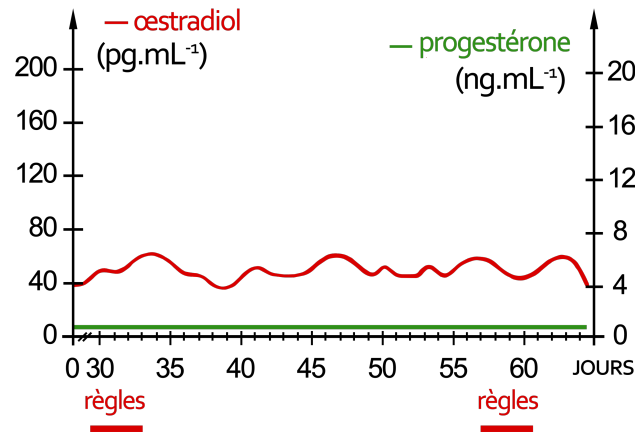
Phase du cycle femelle 1 : pic ovulatoire, transition phase folliculaire/phase lutéale

Phase du cycle femelle 2 : phase des règles, transition phase lutéale/phase folliculaire



II.D - Effet d'un contraceptif oral de type oestro-progestatif

Ce type de dosage a été utilisé pour suivre l'évolution de la concentration sanguine de l'oestradiol et de la progestérone chez une Femme prenant un contraceptif oral. Les résultats sont présentés sur la courbe ci-dessous :



Analysez ces résultats.

Réponse à la question II.D

la prise de pilule abolit la production d'œstrogène et de progestérone.

Pas de pic pré-ovulatoire d'oestradiol donc pas d'ovulation donc pas de corps jaune donc pas de progestérone.

les règles sont maintenues : ce ne sont pas des « vraies » règles mais des saignements de privation.

Partie III : Caractérisation (partielle) de la lignée α ERKO

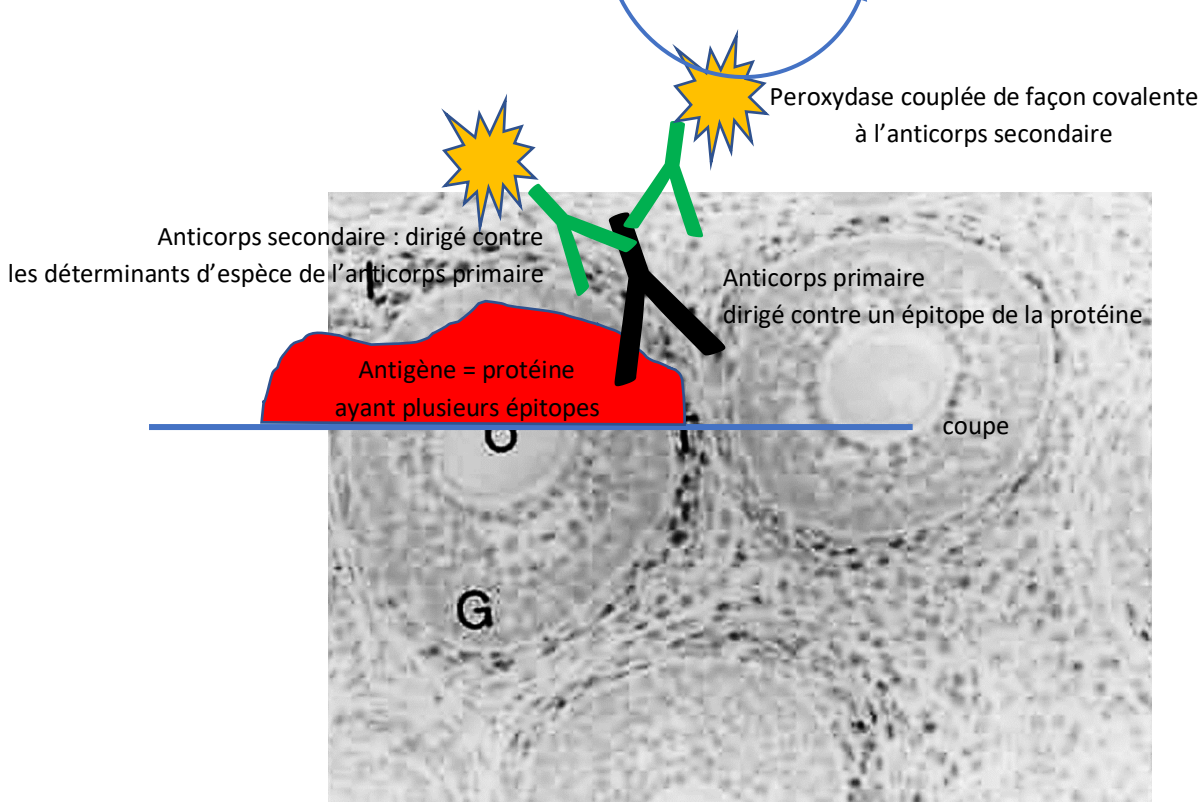
Les récepteurs des œstrogènes existent sous deux formes : ER α et ER β . Ils sont codés par des gènes différents et régulent des fonctions différentes des œstrogènes.

Dans cette partie, nous allons mettre en évidence certaines fonctions ovariennes contrôlées par le récepteur ER α .

III.A - Distribution cellulaire du récepteur ER α

La distribution cellulaire de ce récepteur est analysée à partir de coupes histologiques d'ovaires de souris femelle sur lesquelles un protocole d'immunohistochimie révélée par la peroxydase a été mis en œuvre à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ER α généré chez le lapin (Sar & Welsch, 1999).

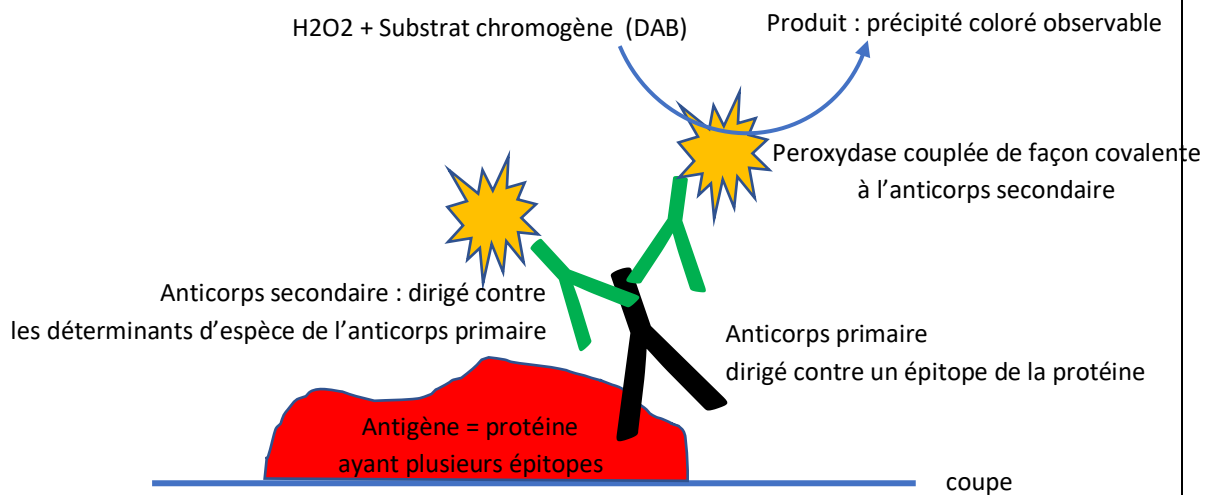
L'image obtenues est la suivante (I : interstitial gland cells, O : oocyte, G ; granulosa cells, T : thecal cells).



(Sar & Welsch, 1999)

III.A.1 : explicitez le principe de la technique d'immunohistochimie révélée par la peroxydase (vous pouvez vous aider d'un schéma).

Réponse à la question III.A.1



antigène = protéine à plusieurs épitopes, anticorps primaire, anticorps secondaire, l'anticorps secondaire est dirigé contre les déterminants d'espèce des anticorps primaires, peroxydase = enzyme couplée de manière covalente à l'anticorps secondaire, catalyse la dégradation de H_2O_2 et d'un substrat chromogène pour donner un produit précipité coloré.

III. A.2 : Quels doivent être les contrôles appropriés pour sa bonne mise en œuvre ? Justifiez à chaque fois vos réponses.

Réponse à la question III.A.2

Incubation sans anticorps primaire : détermination du signal non-spécifique lié au système de révélation
Epuisement de l'anticorps primaire avec une solution d'antigène purifiée en excès ou réactions avec des dilutions croissantes de l'anticorps primaire ou détection menée sur des coupes issues d'un animal KO pour la protéine recherchée : vérification de l'accrochage spécifique de l'anticorps primaire à l'antigène présent dans la coupe

Autre réaction d'immunohistochimie avec un anticorps dont on sait que l'antigène est présent sur la coupe : vérification de l'état du tissu

III. A 3 : Analyse de l'image : quelles sont les cellules qui expriment ER α ?

Réponse à la question III.A.3

Les cellules qui expriment ER α sont les cellules de la thèque, les cellules interstitielles mais pas les ovocytes.

III.B - Analyses fonctionnelles à partir d'une lignée de souris knock-out pour le gène ER α

Lubahn et al. (1993) ont construit la première souris KO pour le gène de l'ER α par recombinaison homologue en insérant une cassette Néo dans l'exon 2 du gène. Le plasmide ainsi construit a été électroporé dans des cellules embryonnaires ES. Ces cellules sont ensuite combinées avec des blastocystes de souris C57/Bl6 et implantées chez des femelles pseudo-gestantes C57/Bl6. La descendance de ces souris a été analysée par PCR à partir d'un prélèvement d'ADN à la queue.

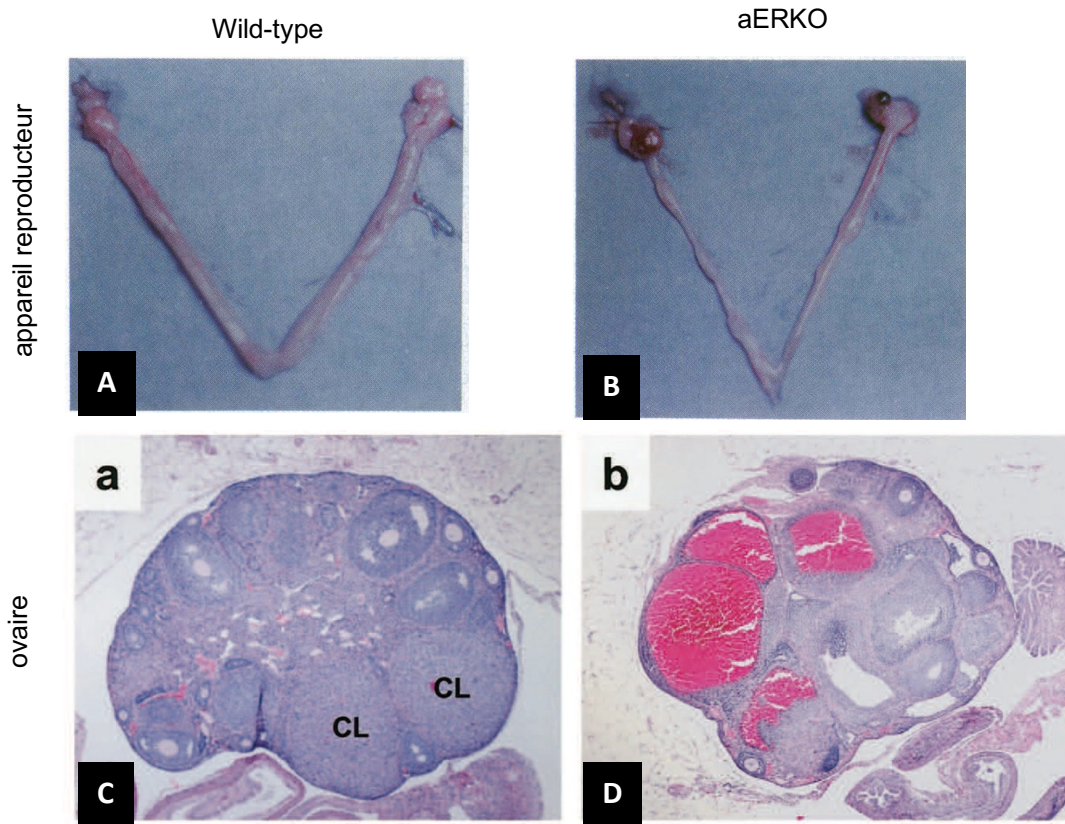
Les ovaires des souris femelles en périodes néonatale et pré-pubertaire apparaissent normaux. Cependant lors du déclenchement de la maturité sexuelle, les femelles apparaissent comme anovulatoires.

Les taux d'hormones circulantes ont été mesurées dans le sérum de souris adultes WT et α ERKO (Couse & Korach, 1999) :

Hormone	Wild type (moyenne \pm SEM)	α ERKO (moyenne \pm SEM)
Œstradiol (pg/ml)	29.5 \pm 2.5	84.3 \pm 12.5 *
Progestérone (ng/ml)	2.3 \pm 0.6	4.0 \pm 1.1
Testosérone (ng/ml)	0.4 \pm 0.4	3.2 \pm 0.6 *
LH (ng/ml)	0.3 \pm 0.04	1.7 \pm 0.3 *
FSH (ng/ml)	4.9 \pm 0.6	5.4 \pm 0.7

* : t-test, wild-type vs α ERKO, P<0.001

L'appareil reproducteur a été observé de manière macroscopique et des coupes d'ovaires ont été réalisées chez de souris femelles adultes WT et homozygotes α ERKO (Lubahn, et al., 1993).



CL : corpora lutea

Que pouvez-vous conclure quant aux régulations exercées par les œstrogènes au niveau de l'ovaire via le récepteur $ER\alpha$?

Réponse à la question III.B

L'ablation du gène codant pour l' $ER\alpha$ induit :

une augmentation significative des niveaux d'œstradiol circulants, et des niveaux de testostérone mais pas de modification des niveaux de progestérone

une augmentation des niveaux de LH mais pas de FSH.

une atrophie des cornes utérines

un développement anormal des ovaires : apparaissent très rouges macroscopiquement, en histologie : hypertrophiés, très vascularisés (hémorragiques et kystiques), on trouve des follicules aux différents stades mais il n'y a pas de corps jaune et les follicules présentent une thèque hypertrophiée.

conclusion : l' $ER\alpha$ n'est pas nécessaire à la production des cellules germinales, à la migration des cellules germinales vers les gonades, au recrutement des follicules primordiaux aux premières étapes de la phase folliculaire mais l'absence de corps jaune indique un blocage de la différenciation terminale. Ceci est cohérent avec le caractère anovulatoire de ces souris.

La thèque hypertrophiée est cohérente avec les hauts niveaux de LH qui stimulent les cellules de manière chronique et qui ainsi produisent beaucoup de testostérone qui sera transformée par les cellules de la granulosa.

L'ER α est exprimé par les cellules de la thèque chez le wt (cf question d'avant) : son absence chez les KO n'empêche pas la production d'œstradiol.

L'ER α est indispensable pour la phase terminale de la phase folliculaire : malgré la production d'œstradiol, il n'y a pas d'ovulation et de formation du corps jaune. Défaut de cyclicité et de production d'un pic ovulatoire ?

