

ULC 431

SESSION 2004

Filière BCPST

BIOLOGIE

Epreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage de calculatrices électroniques de poche à alimentation autonome, non imprimantes et sans document d'accompagnement, est autorisé. Cependant, une seule calculatrice à la fois est admise sur la table ou le poste de travail, et aucun échange n'est autorisé entre les candidats.

Thème de l'épreuve : Les axes de polarité des organismes

Le sujet qui vous est proposé est composé d'un sujet de synthèse et d'un sujet avec documents dont les deux parties, identifiées par les lettres A et B, sont totalement indépendantes. Vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Les documents se rapportant à chacune des questions sont fournis dans un fascicule séparé et sont repérés par la même lettre que la partie du sujet à laquelle ils correspondent.

Il sera particulièrement tenu compte de la clarté et de la concision des réponses, de la qualité et de la précision des schémas.

Il vous est fortement recommandé de bien gérer votre temps de composition afin de pouvoir aborder le sujet de synthèse et les deux parties du sujet avec documents. A titre tout à fait indicatif, des temps de composition sont indiqués.

Tournez la page S.V.P.

Sujet de synthèse

(durée conseillée : 1 h 30)

Axes de polarité et symétries des organismes.

Vous construirez votre devoir à partir d'exemples empruntés aux règnes animal et végétal.

En particulier, vous décrierez les étapes de la construction des axes de polarité et le contrôle de leur mise en place au cours du développement. Vous vous attacherez également à montrer en quoi l'acquisition de différents types de symétrie au cours de l'évolution constitue une adaptation des organismes aux contraintes imposées par leur milieu de vie et/ou leur mode de vie.

Sujet avec documents (durée conseillée : 4 h 30)

Partie A (durée conseillée : 2 h 15)

La génétique du développement chez *Arabidopsis thaliana*

Une liste des abréviations est fournie en fin de partie A.

Le développement des plantes se fait en deux grandes étapes : l'embryogenèse et le développement post-embryonnaire. L'embryogenèse se situe entre la fécondation de l'oosphère et les étapes de mise en dormance de la graine. Elle conduit à l'établissement des structures propres de l'embryon et du plan d'organisation de la plantule. Le développement post-embryonnaire débute après la germination et se caractérise par la production continue de tissus et d'organes à partir des méristèmes. Les méristèmes sont des masses de cellules souches mises en place au cours de l'embryogenèse et à partir desquelles se forment les tissus et les organes latéraux (feuilles, bourgeons, pièces florales) tout au long de la vie de la plante. Au cours des quinze dernières années, l'obtention et l'analyse de mutants de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier de nombreux gènes qui contrôlent la construction du plan d'organisation de la plante.

*Que connaissez-vous de la biologie d'*Arabidopsis thaliana* ? En quoi cette plante se prête-t-elle bien aux études génétiques ? Par quelle(s) méthode(s) peut-on obtenir des mutants d'*Arabidopsis thaliana* ?*

A-1. Embryogenèse et contrôle génétique de la mise en place de l'axe apico-basal

A-1.1. Au cours de l'embryogenèse d'*Arabidopsis thaliana*, la transition du stade globulaire au stade cordiforme s'accompagne de la formation de deux primordiums cotylédonaire diamétralement opposés. Le méristème apical caulinaire (MAC) correspond aux cellules apicales axiales situées entre les cotylédons et produira toute la partie aérienne de la plante (Document A.2.A).

a. Quel changement de symétrie subit l'embryon au cours de cette transition ?

Des analyses génétiques ont montré que les gènes *AINTEGUMENTA* (*ANT*) et *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) jouent un rôle fondamental dans le contrôle de cette transition. Afin de mieux comprendre leur fonction, les profils d'expression de ces gènes ont pu être déterminés par la technique d'hybridation *in situ*, qui permet de mettre en évidence directement dans les tissus l'ARN messager (ARNm) issu de la transcription d'un gène. Le principe est le suivant : une sonde d'acide nucléique présentant sur une certaine longueur une séquence complémentaire de l'ARNm à détecter, s'apparie spécifiquement avec celui-ci. Les sondes peuvent être marquées avec un isotope radioactif, un fluorochrome ou une enzyme, ce qui permet de les localiser sur des coupes histologiques. Les premières sont détectées par autoradiographie tandis que les secondes peuvent être observées directement. Enfin, les dernières sont incubées en présence du substrat de l'enzyme qui donne un produit coloré insoluble. Les profils d'expression des ARNm des gènes *ANT* et *STM* aux stades globulaire précoce et cordiforme ainsi que les définitions des différents plans de coupe sont donnés dans le Document A.1.

b. Décrivez les profils d'expression obtenus.

*c. Représentez sur des schémas les domaines d'expression des gènes *ANT* et *STM*, en coupe frontale et en coupe transversale, aux stades globulaire précoce et cordiforme.*

Les embryons qui présentent une inactivation du gène *STM* (mutants homozygotes *stm*) ne mettent jamais en place de MAC et présentent un cotylédon unique plus ou moins en forme d'entonnoir. De plus, l'expression du gène *ANT* au stade cordiforme est annulaire chez ces mutants.

*d. Quels peuvent être les rôles respectifs des gènes *ANT* et *STM* au cours de l'embryogenèse ? Justifiez votre réponse.*

A-1.2. A la fin de l'embryogenèse, la plantule sauvage d'*Arabidopsis thaliana* est constituée de trois régions superposées : les régions apicale, centrale et basale. Des mutants présentant des altérations du développement suivant l'axe apico-basal ont été identifiés et ont permis de définir quatre grandes classes de mutations (Document A.2.).

- a. *A quoi correspondent les trois régions superposées de la plantule sauvage ?*
- b. *Analysez et interprétez les résultats obtenus.*

A-2. Organisation et fonctionnement du MAC

A-2.1. Des analyses cytologiques ont permis de proposer plusieurs modèles d'organisation du MAC d'*Arabidopsis thaliana*, sur la base de différents critères tels que la taille et le taux de prolifération des cellules méristématiques, l'orientation de leurs plans de division et la densité de leur cytoplasme en ARN ribosomal. Selon un modèle largement admis, le MAC est organisé en trois régions fonctionnelles : la zone centrale (ZC) qui contient les cellules souches assurant le maintien du méristème, la zone périphérique (ZP) où les cellules méristématiques initient la formation des primordiums d'organes, et la zone médullaire (ZM) qui produit les tissus internes de la tige (Document A.3.). Par ailleurs, à cette organisation radiale se superpose une stratification horizontale du MAC en plusieurs couches : les deux assises cellulaires externes (*tunica*) correspondent aux couches L1 et L2, elles entourent les assises cellulaires sous-jacentes qui forment la couche L3 ou *corpus* (Document A.3.). Dans la *tunica*, les plans de division sont perpendiculaires à la surface du méristème (divisions anticlines) alors que dans le *corpus*, il n'existe pas d'orientation préférentielle des plans de division. Les couches L1, L2 et L3 forment respectivement l'épiderme, la zone corticale et la zone médullaire des différents organes.

Des études morphométriques détaillées ont été menées sur le MAC d'une population sauvage d'*Arabidopsis thaliana* en microscopie à balayage confocal. Cette technique de microscopie permet de balayer plusieurs plans optiques à différents niveaux du méristème, de repérer la position des cellules dans différents domaines du méristème (voir le Document A.4. pour la définition des domaines) et enfin de reconstituer une image en trois dimensions du méristème. L'index mitotique et la taille des cellules ont été déterminés pour chaque domaine (Tableau 1).

Tableau 1. Index mitotique et taille des cellules méristématiques dans le MAC d'une population sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. Le diamètre de la base du méristème est de 52 μm . Les nombres entre parenthèses correspondent aux marges d'erreur standards.

Zones méristématiques	Nombre de méristèmes ^a (n)	Nombre de cellules ^a	Nombre de mitoses ^a	Index mitotique	Taille ^b en μm
Couche L1					
Domaine A	50	280	5	1,8 % (0,6)	5,1 (0,2)
Domaine B	50	329	14	4,3 % (0,5)	4,5 (0,1)
Domaine C	50	377	17	4,5 % (0,5)	4,6 (0,1)
Domaine D	50	373	18	4,8 % (0,5)	4,5 (0,3)
Couche L2					
Domaine E	50	545	9	1,7 % (0,7)	5,2 (0,2)
Domaine F	50	1183	48	4,1 % (0,6)	4,6 (0,1)
Couche L3					
Domaine G	30	1652	40	2,4 % (0,4)	5,8 (0,1)

^a En raison du faible nombre de cellules par domaine, les mesures des nombres de cellules et de mitoses ont été effectuées sur un nombre n de méristèmes.

^b La taille cellulaire a été déterminée en mesurant la distance entre les noyaux des cellules dans les différents domaines de 12 méristèmes sauvages. Les valeurs données correspondent aux tailles cellulaires moyennes.

- a. *A quoi correspond l'index mitotique ? Donnez un exemple de calcul de cet index.*
- b. *Comment varie la taille cellulaire et l'index mitotique dans les différents domaines du MAC ?*
- c. *Proposez une correspondance entre les différents domaines et la zonation du MAC proposée dans le Document A.3. A quelle distance de l'axe du méristème se trouve la limite entre la zone centrale et la zone périphérique ?*

A-2.2. Le MAC est une structure dynamique où des cellules souches initiales de la zone centrale sont à l'origine de toutes les structures de l'appareil végétatif aérien de la plante. Afin d'étudier le devenir des cellules initiales de la zone centrale, il est possible de créer des méristèmes chimères formés par des cellules de génotypes différents, ce qui permet de les distinguer facilement les unes des autres. Par exemple, des cellules polyploïdes (cellules contenant des lots de chromosomes surnuméraires) peuvent être obtenues en traitant un MAC par la colchicine, un composé qui bloque la division des cellules mais pas la duplication des chromosomes. Le Document A.5.A présente un méristème chimère où toutes les cellules de la couche L2 sont tétraploïdes et dérivent d'une même cellule initiale tétraploïde, alors que les cellules des autres couches sont diploïdes. Cette méthode a permis de suivre le devenir des cellules de la zone centrale du MAC au cours du temps (Document A.5.B).

- a. *Quel est le devenir des cellules issues d'une cellule initiale de la couche L2 ?*

Par cette méthode, il est également possible de suivre le devenir des cellules des deux autres couches : lorsqu'une cellule de la couche L2 subit une division péricleine (division qui se fait selon un plan parallèle à la surface du méristème) et que l'une des deux cellules filles envahit la couche L1 ou la couche L3, elle se différencie respectivement en cellule épidermique ou participe à la formation des structures internes des organes.

- b. *Qu'est-ce qui détermine le devenir des cellules dans le MAC ?*
- c. *En quoi ce mécanisme de spécification des cellules est-il original par rapport au modèle animal ? Justifiez votre réponse.*

A-3. Contrôle génétique du fonctionnement du MAC

A-3.1. Diverses mutations affectant des gènes qui contrôlent le développement du MAC ont été isolées. Certaines de ces mutations affectent l'initiation de nouveaux primordiums d'organes alors que d'autres affectent le maintien de l'activité du MAC. Les phénotypes de certains mutants sont présentés dans le Document A.6.

- a. *Décrivez les phénotypes de ces mutants en précisant dans chacun des cas si la mutation affecte l'initiation de nouveaux organes.*
- b. *Formulez deux hypothèses quant à la fonction des gènes CLAVATA1 (CLV1) et CLAVATA3 (CLV3) dans le contrôle de l'activité du MAC. Justifiez votre réponse.*
- c. *Quelle peut être la fonction du gène WUSCHEL (WUS) ?*

Afin de mieux comprendre le rôle de *CLV3* au sein du MAC, des mesures de l'index mitotique ont été réalisées dans différents domaines de la couche L1 (voir le Document A.4 pour la définition des domaines) sur des MAC provenant d'une population sauvage d'*Arabidopsis thaliana* (Tableau 1) et sur des méristèmes provenant de plantes mutantes *clv3* (Tableau 2).

Tableau 2. Index mitotique dans le MAC du mutant *clv3* d'*Arabidopsis thaliana*. Le diamètre de la base du méristème *clv3* est de 82 μm . Les nombres entre parenthèses correspondent aux marges d'erreur standards.

Zones méristématiques	Nombre de méristèmes ^a	Nombre de cellules ^a	Nombre de mitoses ^a	Index mitotique
Couche L1				
Domaine A	50	434	8	1,8 % (0,5)
Domaine B	50	553	10	1,8 % (0,6)
Domaine C	50	664	27	4,1 % (0,8)
Domaine D	50	638	32	5,0 % (0,8)

^a En raison du faible nombre de cellules par domaine, les mesures des nombres de cellules et de mitoses ont été effectuées sur 50 méristèmes.

- d. Analysez les résultats obtenus. Laquelle des deux hypothèses émises précédemment ces résultats confortent-ils ?
- e. Calculez le nombre de cellules L1 dans les zones centrale et périphérique des MAC de plantes sauvages et de plantes mutantes. Précisez alors la fonction du gène *CLV3*.

A-3.2. Afin de mieux comprendre les interactions entre les gènes *WUS* et *CLV* dans le méristème sauvage, les phénotypes de doubles mutants ont été analysés et comparés aux phénotypes des simples mutants. De telles analyses permettent de dégager des relations d'épistasie entre gènes (un gène est dit épistatique par rapport à un autre lorsque le produit d'expression du premier masque ou empêche l'expression du second). Pour cela, différentes lignées de mutants homozygotes *wus*, *clv1* et *clv3* présentant tous des allèles non fonctionnels, ont été croisées et les phénotypes des fleurs des doubles et simples mutants analysés (Tableau 3).

Tableau 3. Nombres moyens d'organes floraux par fleur analysée chez les plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana*, chez les simples mutants *wus* et *clv*, et chez les doubles mutants *wus clv*. Les nombres entre parenthèses correspondent aux marges d'erreur standards.

Plante	Nombre de fleurs analysées	Nombres d'organes floraux			
		Sépales	Pétales	Etamines	Carpelles
sauvage	10	4,0 (0,0)	4,0 (0,0)	6,0 (0,0)	2,0 (0,0)
<i>wus</i>	8	4,0 (0,0)	4,0 (0,0)	1,0 (0,1)	0,0 (0,0)
<i>clv1</i>	10	4,9 (0,7)	4,6 (0,7)	9,3 (1,0)	4,5 (0,9)
<i>wus clv1</i>	29	4,0 (0,0)	4,0 (0,0)	1,1 (0,2)	0,0 (0,0)
<i>clv3</i>	10	4,4 (0,7)	4,5 (0,5)	8,7 (0,8)	5,4 (1,0)
<i>wus clv3</i>	18	4,0 (0,0)	4,0 (0,0)	0,9 (0,2)	0,0 (0,0)

- a. Analysez et interprétez ces résultats.

Afin de vérifier la nature de l'interaction entre les gènes *WUS* et *CLV*, l'expression des ARNm du gène *WUS* a été analysée dans les méristèmes floraux chez les mutants *clv1* et *clv3*, par la technique d'hybridation *in situ* (Document A.7.). Par ailleurs, des plantes transgéniques exprimant l'ADN complémentaire (ADN copie d'une molécule d'ARNm) du gène *CLV3* sous contrôle du promoteur constitutif 35S (P_{35S}) du virus de la mosaïque du chou-fleur ont été obtenues (plantes P_{35S} -*CLV3*). Ces plantes présentent un MAC qui initie la formation des premières feuilles, mais qui s'arrête précocement de fonctionner. Enfin, l'expression du gène *WUS* a été analysée dans les MAC de ces plantes (Document A.8.).

- b. Définissez le domaine d'expression du gène WUS au sein du méristème sauvage.
- c. Analysez et interprétez les profils d'expression du gène WUS chez les mutants *clv*, puis chez les plantes transgéniques P_{35S}-CLV3. A quel mutant ressemblent ces plantes transgéniques ?

A-3.3. Le transgène P_{35S}-CLV3 a également été introduit dans le mutant *clv1* d'*Arabidopsis thaliana*. Les plantes transgéniques obtenues expriment une quantité élevée d'ARNm CLV3 et présentent le même phénotype que les mutants *clv1*.

- a. Que pouvez-vous déduire de cette expérience ?

Les profils d'expression des ARNm des gènes CLV1 et CLV3 ont été analysés dans les MAC de plantes sauvages par hybridation *in situ* (Document A.9.). Par ailleurs, l'analyse des séquences protéiques montre que la protéine CLV1 présente des homologues de séquence avec une famille de récepteurs à domaine intracellulaire à activité kinase, alors que la protéine CLV3 est une protéine soluble localisée dans l'espace extracellulaire.

- b. Définissez les domaines d'expression des gènes CLV1 et CLV3 au sein du MAC.
- c. Comment pourraient agir les protéines CLV1 et CLV3 ?

A-3.4. Afin de préciser la fonction du gène WUS, des plantes transgéniques exprimant le gène WUS sous contrôle du promoteur du gène ANT (P_{ANT}), un promoteur normalement actif dans les primordiums d'organes, ont été réalisées (plantes P_{ANT}-WUS). Au bout de deux semaines de développement, le phénotype du MAC des plantes P_{ANT}-WUS a été analysé et les ARNm du gène CLV3 ont été détectés par hybridation *in situ* (Document A.10.).

- a. Décrivez et interprétez les résultats obtenus.
- b. Déduisez des informations obtenues jusqu'ici la boucle de régulation reliant les gènes WUS, CLV1 et CLV3. Quelle peut être la signification biologique de cette boucle de régulation ?
- c. Représentez dans un schéma synthétique du MAC les domaines d'expression des gènes WUS, CLV1 et CLV3 ainsi que les relations fonctionnelles entre ces gènes.

Liste des abréviations de la partie A

ANT	=	AINTEGUMENTA
ARNm	=	ARN messenger
CLV1	=	CLAVATA1
CLV3	=	CLAVATA3
MAC	=	méristème apical caulinaire
P _{ANT}	=	promoteur du gène ANT
P _{35S}	=	promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
STM	=	SHOOTMERISTEMLESS
ZC	=	zone centrale
ZM	=	zone médullaire
ZP	=	zone périphérique
WUS	=	WUSCHEL

Partie B (durée conseillée : 2 h 15)
La génétique du développement chez la drosophile

Les parties B-1, B-2 et B-3 peuvent être traitées indépendamment.

B - 1. Le crible de Heidelberg

Depuis les travaux de Stanley Morgan au début du XXe siècle, la drosophile est très utilisée comme modèle d'étude génétique des métazoaires. Ses avantages sont un temps de génération court (10 jours), un faible coût d'étude, la facilité d'observation de phénotypes variés et la simplicité de sa formule chromosomique ($N = 4$). Au cours des 25 dernières années, l'intérêt de ce modèle a été renouvelé par la mise au point de techniques élaborées de criblage génétique qui consistent à identifier des mutants et qui ont permis la découverte des gènes et des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement, depuis la mise en place des axes de polarité de l'organisme jusqu'au stade adulte. Nous nous proposons ici d'étudier ces techniques de criblage qui reposent sur l'observation que, pour la plupart des gènes du développement, une diminution de 50 % du taux d'expression n'induit aucun phénotype décelable.

Une de ces techniques de criblage utilise des drosophiles porteuses de mutation portées par le chromosome 2 (un autosome) : soit la mutation *cinnabar brown* (*cb*), soit la mutation *curly wings* (*Cy*). La mutation *Cy* est présente au niveau d'un chromosome 2 "*balancer*" qui porte de nombreuses inversions chromosomiques, ce qui empêche toute recombinaison de ce chromosome avec le chromosome 2 homologue au cours de la méiose. Le Tableau 1 présente la notation utilisée pour les génotypes et les phénotypes conférés par les deux types de chromosome 2.

Tableau 1. Notation des génotypes et phénotypes conférés par les deux types de chromosome 2.

Type de chromosome 2	Notation ^a utilisée pour les génotypes	Phénotype ^b à l'état hétérozygote	Phénotype ^b à l'état homozygote
<i>cinnabar brown</i>	2 + <i>cb</i>	YR	YB
<i>balancer, curly wings</i>	2 <i>B</i> <i>Cy</i> +	AE	létal

^a Pour chaque chromosome 2, on indiquera successivement s'il est normal (2) ou "*balancer*" (2*B*), s'il possède (*Cy*) ou non (+) la mutation *Cy* et s'il possède (*cb*) ou non (+) la mutation *cb*. Le chromosome 2 sauvage sera noté "2 + +".

^b YR = yeux rouges (phénotype sauvage) ; YB = yeux blancs ; AE = ailes enroulées sur elles-mêmes (on notera AD = ailes droites, le phénotype sauvage correspondant) ; létal = létal au cours du développement larvaire.

Des drosophiles mâles homozygotes pour la mutation *cinnabar brown* et de génotype (2 + *cb* / 2 + *cb*), ont été nourries avec des aliments contenant de l'éthyl-méthane sulfonate (EMS), un mutagène chimique puissant induisant des mutations ponctuelles dans l'ADN, un seul brin de la double hélice étant affecté pour chaque mutation, puis trois croisements successifs ont été réalisés :

- Croisement 1 : Ces mâles ont été croisés avec des femelles hétérozygotes pour la mutation *curly wings* et de génotype (2*B* *Cy* + / 2 + +).
- Croisement 2 : Chaque mâle (F1) issu du croisement 1 et présentant des ailes enroulées (phénotype AE) a été isolé dans un flacon séparé, de façon à fonder une lignée par croisement avec des femelles de génotype (2*B* *Cy* + / 2 + +).
- Croisement 3 : Tous les mâles AE et toutes les femelles AE (F2) issus d'un même flacon après le croisement 2 ont été croisés entre eux.

Dans le cas des lignées dans lesquelles aucune drosophile issue du croisement 3 (F3) ne présentait simultanément des yeux blancs et des ailes droites (phénotype YB - AD), les ovaires, les embryons précoces et les larves issues des femelles F2 ont été analysés.

- a. *Donnez une représentation schématique des chromosomes 2 des drosophiles parentales mâles et femelles utilisées pour réaliser le croisement 1.*
- b. *Donnez les différents génotypes et phénotypes des drosophiles adultes issues du croisement 1, ainsi que la fréquence théorique d'observation de chacun de ces génotypes et phénotypes (Pour les questions b., c. et d., on ne tiendra pas compte d'éventuelles mutations induites par l'EMS).*
- c. *Donnez les différents génotypes et phénotypes des drosophiles adultes issues du croisement 2, ainsi que la fréquence théorique d'observation de chacun de ces génotypes et phénotypes.*
- d. *Montrez qu'à l'issue du croisement 3, les génotypes suivants sont théoriquement obtenus : $(2 + cb / 2 + cb)$; $(2 + cb / 2B Cy +)$; $(2 + cb / 2 ++)$; $(2B Cy + / 2 ++)$ et $(2 ++ / 2 ++)$. Donnez la fréquence théorique d'observation de chacun de ces génotypes et des phénotypes correspondants.*
- e. *Comment est-il possible que certains flacons ne contiennent pas d'adultes aux yeux blancs et aux ailes droites (YB – AD) après le croisement 3 ? Pour quelle raison choisit-on de n'étudier que les drosophiles contenues dans ces flacons ?*
- f. *Pour quelle raison utilise-t-on dans les croisements des femelles possédant un chromosome 2 balancer ? Quelles sont les caractéristiques des mutations repérées par cette méthode de criblage génétique ?*

Une analyse superficielle du protocole peut faire penser que le croisement 2 est inutile et qu'on obtiendrait un résultat similaire en croisant directement les mâles et les femelles de phénotype AE issus du croisement 1. Pourtant, quand on procède ainsi, toutes les lignées obtenues contiennent des drosophiles YB - AD.

- g. *Compte tenu du mode d'action de l'EMS, comment expliquez-vous ce résultat ?*

B - 2. Les nouveaux outils de la génétique de la drosophile

On s'intéresse au gène *Delta*, un gène porté par le chromosome 2 qui s'exprime dans les tissus de l'ovaire pendant l'ovogenèse et qui est impliqué dans les étapes précoces de l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'œuf de drosophile. Un crible génétique a permis de sélectionner une mutation qui inactive ce gène et qui ne s'exprime qu'à l'état homozygote : la mutation *Delta^{M1}*.

Afin d'étudier l'effet de cette mutation dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur, un nouvel outil génétique a été mis au point : le système FLP/FRT. La flipase FLP est une enzyme dont le gène *flp* a été isolé du plasmide 2 μ m de levure, et qui catalyse spécifiquement une réaction de recombinaison homologue au niveau d'une courte séquence d'ADN présente au sein de ce plasmide, le site FRT. Le gène *flp* a été cloné et placé sous contrôle du promoteur *hs* (construction *P_{hs}-flp*). Ce promoteur, qui contrôle normalement l'expression d'une protéine de choc thermique de drosophile (*hs* = *heat shock*), est inactif à 25°C et s'active à 37°C.

Des croisements ont permis d'obtenir des drosophiles hétérozygotes pour la mutation *Delta^{M1}* et comportant la construction *P_{hs}-flp* insérée sur un des deux chromosomes 1. Par ailleurs, les drosophiles obtenues sont porteuses de sites FRT qui ont été introduits entre le gène *Delta* et le centromère, en position identique sur chacun des chromosomes 2. Enfin, ces drosophiles expriment de manière constitutive le gène de la GFP (*Green Fluorescent Protein*, une protéine fluorescente émettant une lumière verte) qui a été inséré entre le site FRT et le gène *Delta* sur le chromosome 2 portant l'allèle sauvage (*Delta⁺*).

- a. *Donnez une représentation schématique des chromosomes 1 et 2 des drosophiles obtenues par ces croisements.*

Des larves de drosophiles obtenues par ces croisements (se développant normalement à 25°C) ont été incubées deux jours à 37°C, au stade larvaire L3. A ce stade, se mettent en place et prolifèrent, dans les ovaires, les populations de cellules souches germinales qui donneront plus tard les gamètes. Quatre jours plus tard, les ovaires des drosophiles femelles issues de ces larves ont été analysés pour étudier le développement des œufs.

- b. Quel est le phénomène que l'on cherche à déclencher en incubant les larves à 37°C ? Précisez les événements conduisant à la survenue de ce phénomène.*
- c. Donnez une représentation schématique des chromosomes mitotiques avant et après la survenue de ce phénomène, ainsi que de la constitution chromosomique des différentes cellules issues de la mitose.*
- d. Quel est le phénotype des cellules issues de ce phénomène ? Comparez-le avec le phénotype des cellules ne l'ayant pas subi. Quel est l'intérêt d'avoir introduit le gène de la GFP ?*

B - 3. L'établissement de l'axe antéro-postérieur

B-3.1. Avant la fécondation, la présence dans l'ovule de gradients d'ARNm codant des protéines impliquées dans la définition des axes de polarité montre que les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont déjà établis au sein de l'ovaire. L'ovaire de la drosophile est composé de 16 à 20 ovarioles qui débouchent sur un oviducte, et dont la structure est observable dans la partie A du Document B.1. Chaque ovariole est constitué au pôle antérieur d'un germarium donnant naissance à une succession de follicules reliés par des tiges. Un follicule est formé d'un massif de seize cellules germinales (quinze cellules nourricières au pôle antérieur du follicule et un ovocyte au pôle postérieur) bordé d'une monocouche de cellules somatiques, les cellules folliculaires épithéliales.

La mise en place des follicules a lieu dans le germarium et leur maturation survient au cours de leur déplacement du pôle antérieur vers le pôle postérieur de l'ovariole (partie A du Document B.1.). Au pôle antérieur du germarium, les cellules souches germinales prolifèrent et se différencient en quinze cellules nourricières fortement polyploïdes (512 N) et en un ovocyte relié à elles par des ponts cytoplasmiques. Dès lors, la maturation de l'ovocyte est assistée par les cellules folliculaires. Au centre du germarium, les cellules souches folliculaires se différencient en deux lignées : d'une part les cellules folliculaires épithéliales qui prolifèrent et entourent les cellules germinales, d'autre part les précurseurs des cellules polaires et des cellules de tige (cellules PCPT), situés aux pôles antérieur et postérieur du follicule qui cessent rapidement de proliférer et se différencient en cellules polaires et en cellules de tige. Au cours de ce processus de différenciation, des follicules s'individualisent dans la région 3 du germarium (voir encadré de la partie A du Document B.1.) et forment un chapelet de kystes reliés entre eux par les cellules de tige.

- a. Faites un schéma légendé du germarium et d'un kyste ovarien au stade 6/7.*

Le signe d'asymétrie le plus précoce au cours de l'ovogenèse est le positionnement postérieur de l'ovocyte au sein du follicule, déjà observable au niveau du follicule le plus postérieur du germarium. Les mutants pour lesquels il ne survient pas produisent des embryons sans asymétrie antéro-postérieure. Ce positionnement postérieur semble être lié à la différenciation des cellules polaires et des cellules de tige, dont les mécanismes moléculaires commencent à être connus. Dans un premier temps, les cellules germinales du follicule le plus postérieur du germarium expriment Delta, un facteur diffusible induisant la différenciation des cellules PCPT qui leur sont immédiatement adjacentes en un petit nombre de cellules polaires antérieures et postérieures. Dans un deuxième temps, les cellules polaires différenciées expriment Unpaired, un facteur diffusible induisant les cellules PCPT restées indifférenciées à se différencier en cellules de tige.

- b. Faites un diagramme récapitulant les étapes de différenciation des cellules souches germinales et des cellules souches folliculaires, en indiquant les étapes de production et les voies d'action de Delta et Unpaired.*

B-3.2. Une mutation « clonale » homozygote du gène *Delta* a été induite chez des drosophiles exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*, une protéine fluorescente émettant une lumière verte) au niveau des noyaux cellulaires. L'expression de ce type de mutation n'apparaît que dans certaines cellules souches germinales (*Delta*⁻) et est associée à une perte de l'expression de la GFP dans ces cellules, ce qui conduit à la coexistence dans le même ovariole de follicules *Delta*⁺ présentant une fluorescence verte et de follicules *Delta*⁻ n'en présentant pas. Des ovarioles de drosophiles mutantes ont été préparés et observés en immunofluorescence. Seules les préparations dans lesquelles un seul follicule mutant était entouré par des follicules sauvages ont été analysées. Un kyste représentatif des résultats obtenus est montré dans la partie B du Document B.1.

- a. Comment expliquez-vous la présence de cellules fluorescentes vertes et non fluorescentes au sein de ce kyste ? Compte tenu du rôle de Delta dans la différenciation, comment interprétez-vous ces résultats ?*

Les cellules fluorescentes vertes sont toujours observées au pôle antérieur des kystes mutants, jamais au pôle postérieur.

- b. Comment expliquez-vous cette observation ? Précisez alors l'action de Delta.*
- c. En quoi la localisation ovocytaire peut-elle paraître paradoxale au sein du kyste mutant ? Formulez une hypothèse pour expliquer ce paradoxe.*

Dans les parties D et E du Document B.1., des germariums sauvages ont été marqués en bleu par le marqueur des cellules polaires A101 et en rouge par un marqueur des cellules de tige (anticorps anti-Bib).

- d. Que pouvez-vous en déduire quant à la chronologie de différenciation des cellules polaires ? Compte tenu des mécanismes moléculaires d'induction de la différenciation des cellules polaires et des cellules de tige, comment interprétez-vous ces résultats ?*

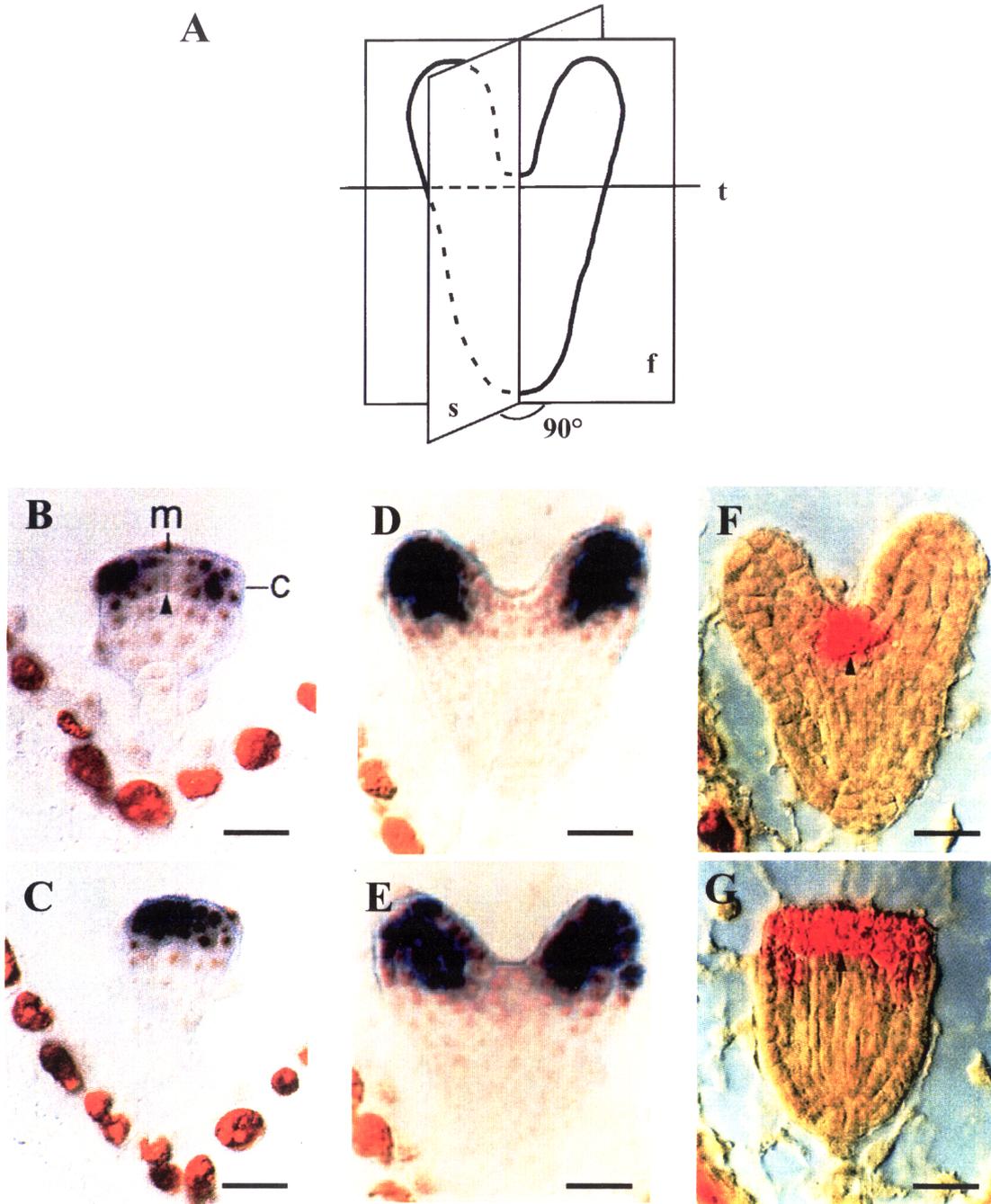
Le même marqueur A101 a été utilisé dans les parties B et C du Document B.1.

- e. Que montrent les flèches dans la figure B ? Comment interprétez-vous les résultats obtenus pour le kyste mutant ? Ce résultat vous paraît-il en accord avec votre interprétation de la question d. ? Justifiez votre réponse.*

Il a été montré que le positionnement postérieur de l'ovocyte dans les follicules est lié à l'expression, dans les cellules folliculaires et dans l'ovocyte, de DE-cadhérine, une molécule d'adhérence cellulaire. Des cellules exprimant cette protéine adhèrent les unes aux autres via l'interaction de molécules de DE-cadhérine entre elles. Un gradient d'expression de DE-cadhérine dans les cellules folliculaires, croissant du pôle antérieur au pôle postérieur, guide l'ovocyte vers le pôle postérieur. Des germariums de drosophiles *Delta*⁺ (partie F du Document B.1.) ou porteuses de la mutation « clonale » du gène *Delta* (partie G du Document B.1.) ont été marqués en rouge par un anticorps dirigé contre la DE-cadhérine, et en bleu par un anticorps dirigé contre Orb, une protéine s'accumulant dans l'ovocyte. Les parties F' et G' du Document B.1. donnent l'intensité du signal de DE-cadhérine sur les mêmes échantillons.

- f. Comparez la morphologie des follicules et l'expression de la DE-cadhérine, dans les follicules dont l'ovocyte est repéré par une flèche dans les parties F' et G' du Document B.1. Quelles conclusions en tirez-vous ?*
- g. En conclusion, proposez un modèle permettant d'expliquer l'établissement d'une asymétrie des follicules ovariens conduisant à la mise en place de l'axe antéro-postérieur. A votre avis, que se passe-t-il chez la jeune drosophile lors de la ponte de chacun des deux premiers ovules d'un ovariole ?*

Document A.1.



Profils d'expression des ARNm des gènes *ANT* (B, C, D et E) et *STM* (F et G) au cours du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus par hybridation *in situ*. Le gène *STM* ne s'exprime pas au stade globulaire précoce. Les cellules exprimant le gène *ANT* sont marquées en violet foncé, les cellules exprimant le gène *STM* en rouge. c = territoire présomptif cotylédonaire ; m = territoire présomptif du MAC ; tête de flèche = zone intercotylédonaire ; barre = 25 μ m.

(A) Définition des plans de coupe à travers un embryon de Dicotylédone. f = plan frontal ; s = plan sagittal ; t = plan transversal.

(B) Coupe frontale d'un embryon sauvage au stade globulaire précoce.

(C) Coupe parallèle à la coupe montrée en B, en région périphérique de l'embryon.

(D) Coupe frontale d'un embryon sauvage au stade cordiforme.

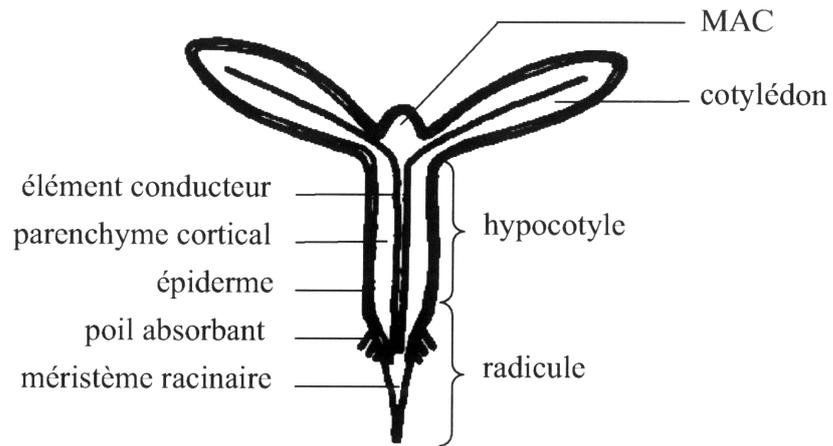
(E) Coupe parallèle à la coupe montrée en D, en région périphérique de l'embryon.

(F) Coupe frontale d'un embryon sauvage au stade cordiforme.

(G) Coupe sagittale d'un embryon sauvage au stade cordiforme.

Document A.2.

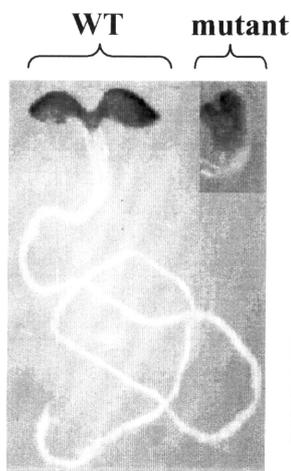
A



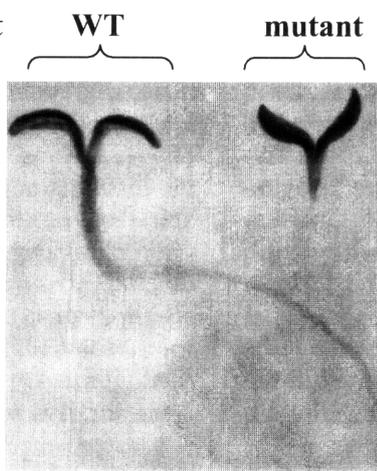
B



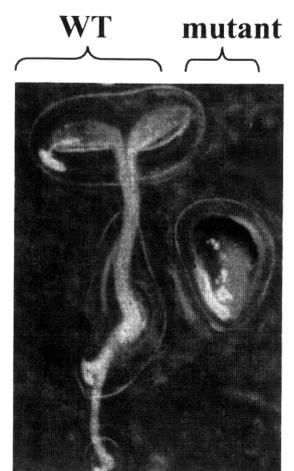
C



D



E



Phénotypes causés par la mutation des gènes *GURKE*, *FACKEL*, *MONOPTEROS* et *GNOM* chez *Arabidopsis thaliana*. Les schémas des mutants sont représentés en vue externe avec les éléments conducteurs.

(A) Schéma de la plantule sauvage d'*Arabidopsis thaliana*.

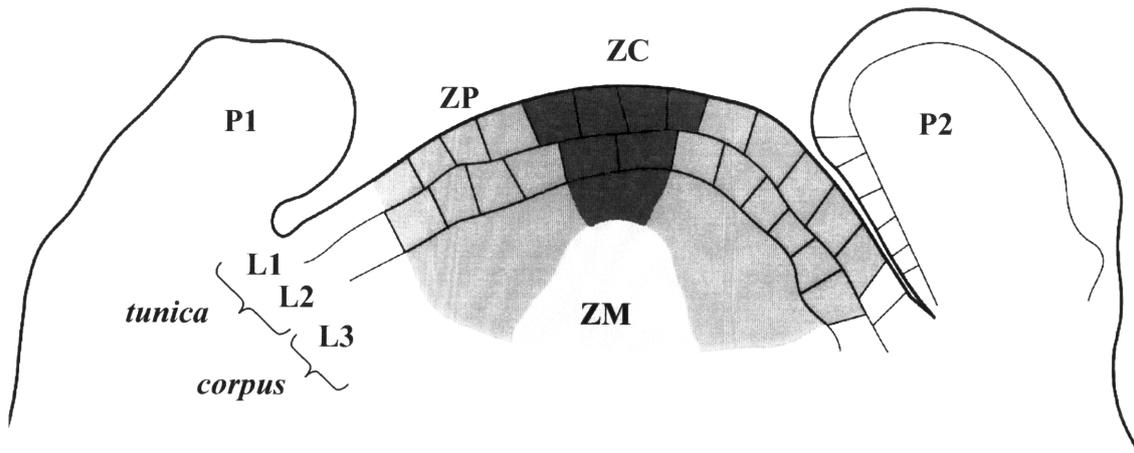
(B) Plantule sauvage (WT) et mutants *gurke*.

(C) Plantule sauvage (WT) et mutant *fackel*.

(D) Plantule sauvage (WT) et mutant *monopteros*.

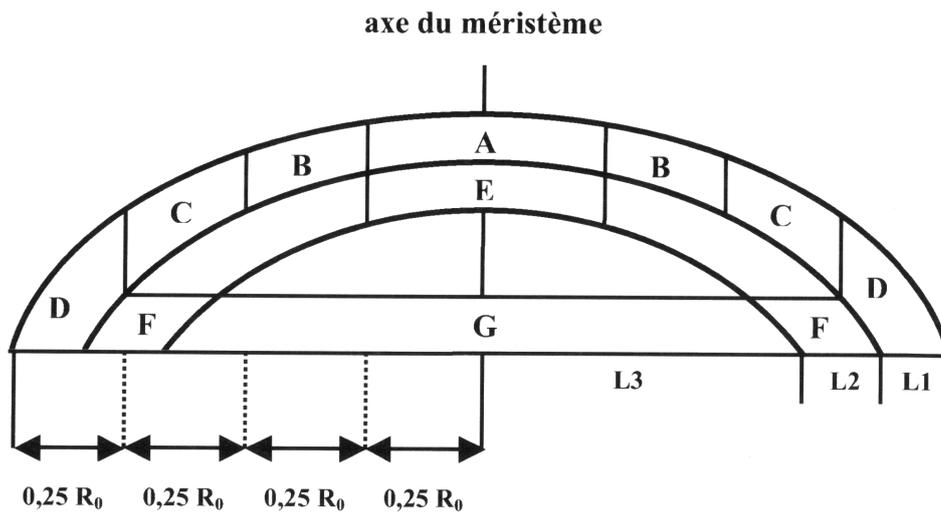
(E) Plantule sauvage (WT) et mutant *gnom*.

Document A.3.



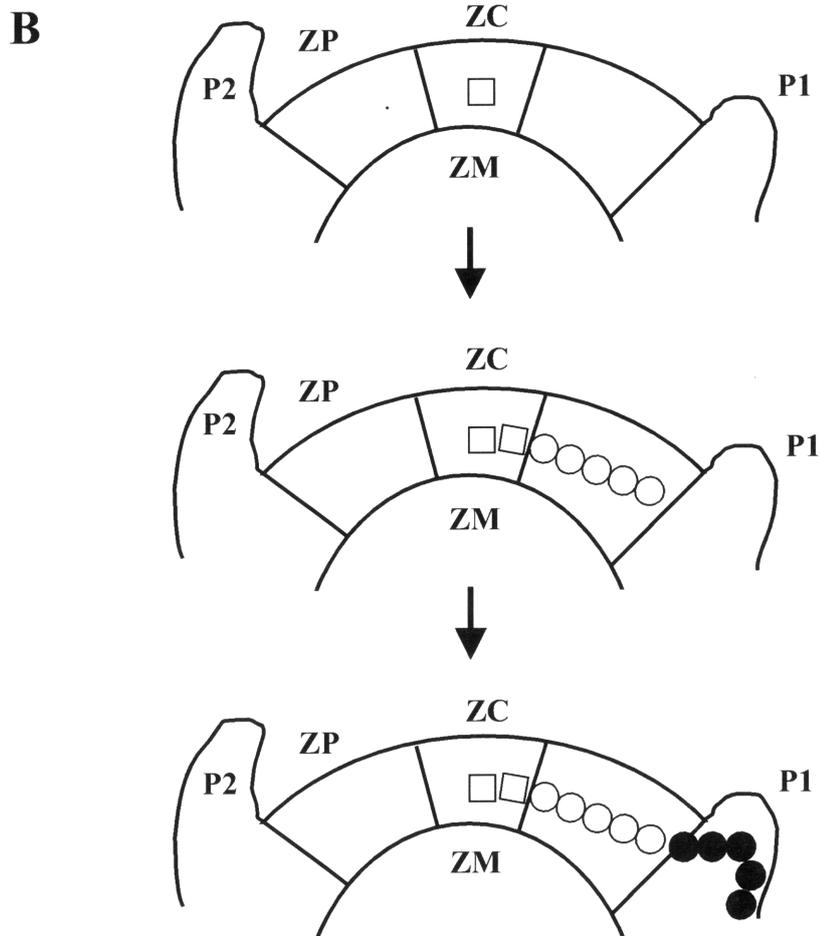
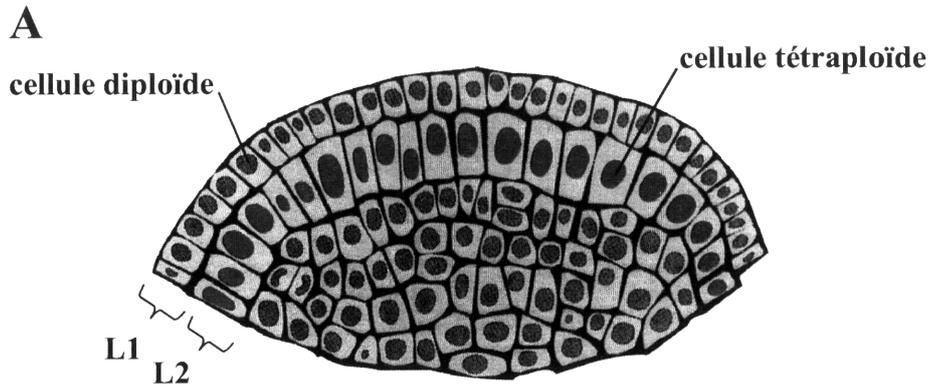
Organisation du MAC d'*Arabidopsis thaliana*. ZC = zone centrale ; ZP = zone périphérique ; ZM = zone médullaire ; P1, P2 = primordiums de feuilles.

Document A.4.



Définition des domaines du MAC d'*Arabidopsis thaliana*. Sept domaines ont été définis (A à G). La couche L1 comprend quatre domaines concentriques (A à D) qui, lorsqu'ils sont projetés sur la base du méristème, correspondent à quatre domaines circulaires de largeur $0,25 R_0$, où R_0 est le rayon de la base du méristème. Les cellules de la couche L2 qui sont au-dessous du domaine A forment le domaine E. Sur la base du méristème, les cellules de la couche L2 et de la couche L3 forment respectivement les domaines F et G.

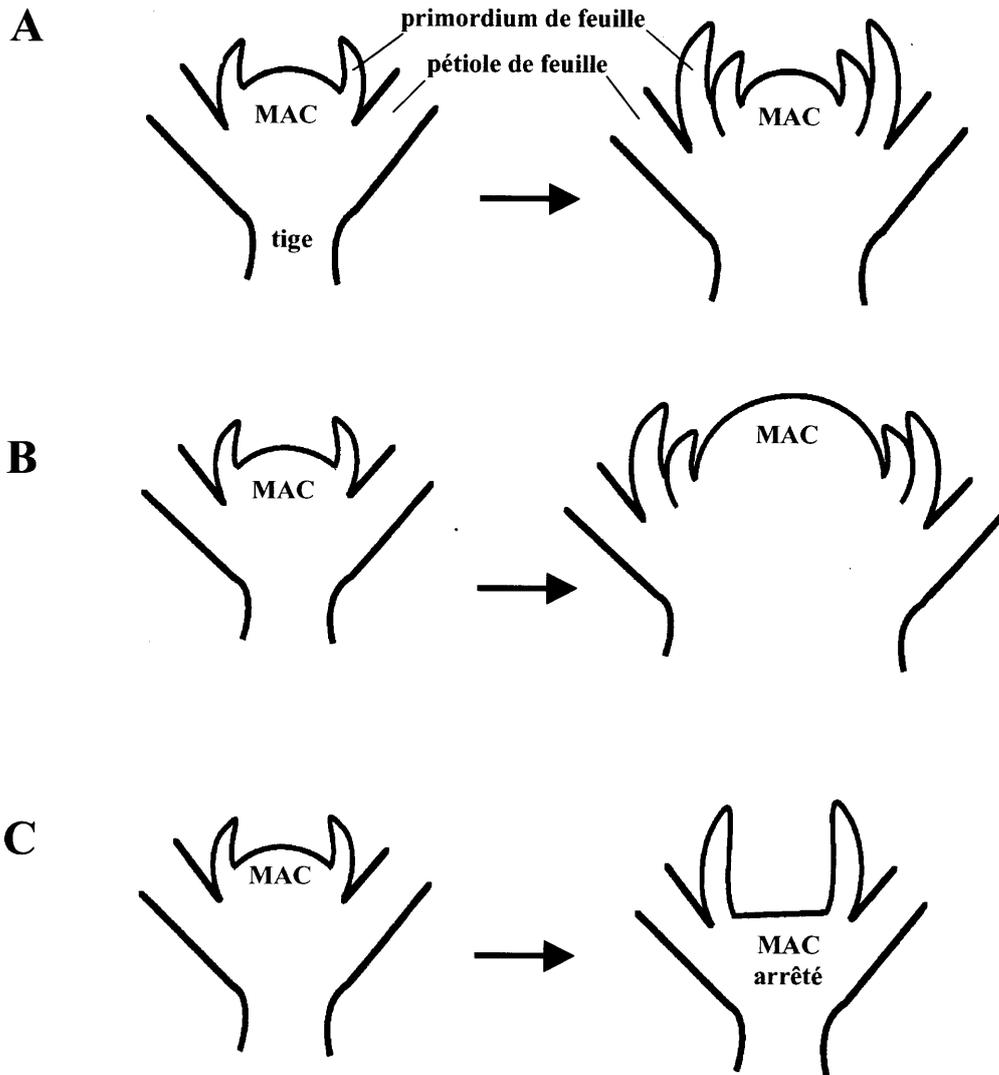
Document A.5.



Devenir des cellules méristématiques au sein du MAC.

- (A) Méristème chimère composé de cellules de génotypes différents. Dans la couche L1, les cellules sont diploïdes alors que dans la couche L2 les cellules sont tétraploïdes. Les cellules tétraploïdes sont plus grandes et donc facilement reconnaissables.
- (B) Dynamique du développement du MAC. Les carrés, les cercles vides et les cercles pleins représentent les positions successives d'une cellule de la couche L2 à différents temps de son développement. Les légendes sont les mêmes que celles du Document A.3.

Document A.6.



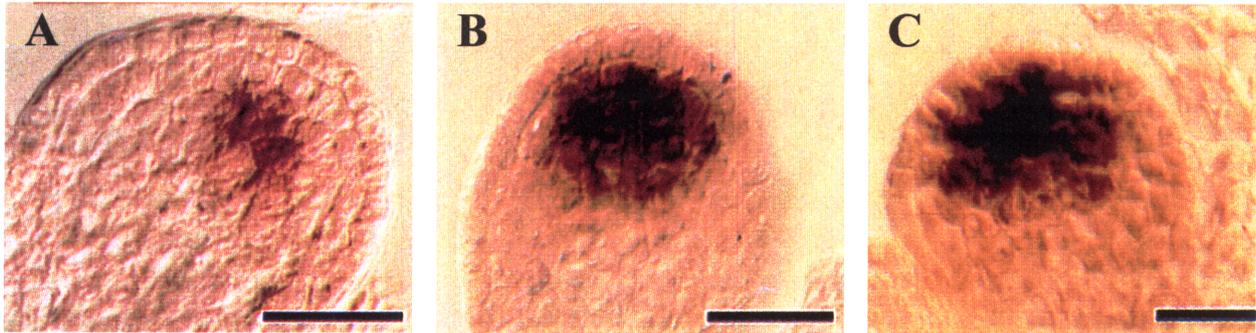
Comparaison du développement du MAC chez la plante sauvage et chez différents mutants homozygotes d'*Arabidopsis thaliana*. Les schémas de droite représentent les mêmes plantes à un stade plus avancé de leur développement.

(A) Plante sauvage.

(B) Mutant homozygote *clv1* ou *clv3*. La mutation inactive le gène *CLAVATA1* (*CLV1*) ou *CLAVATA3* (*CLV3*). Les MAC de ces mutants produisent un nombre plus important de feuilles que les MAC des plantes sauvages.

(C) Mutant homozygote *wus*. La mutation inactive le gène *WUSCHEL* (*WUS*). Chez ce mutant, de nouveaux MAC et méristèmes floraux sont produits continuellement.

Document A.7.



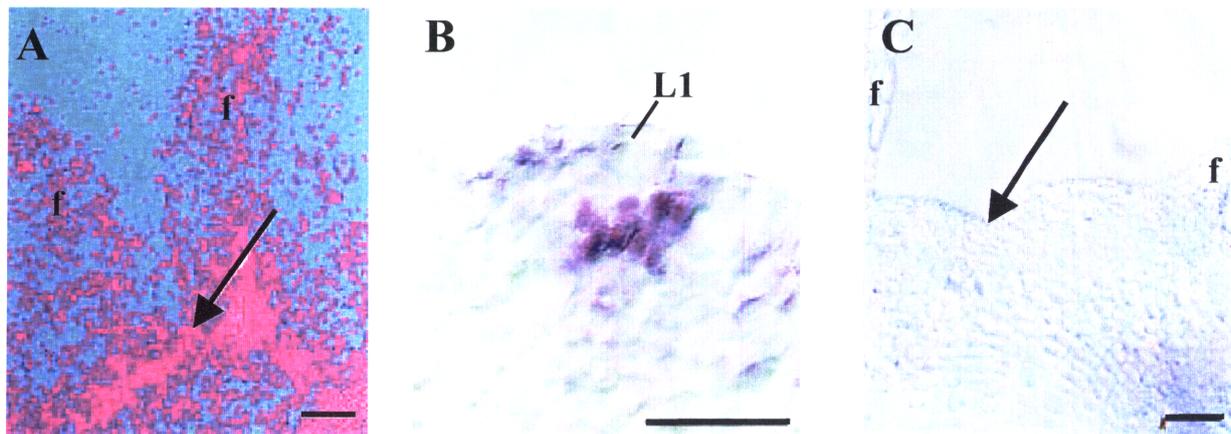
Profils d'expression des ARNm du gène *WUS* dans les méristèmes floraux d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales. Les cellules exprimant le gène *WUS* apparaissent en brun. Barre = 20 μ m.

(A) Plante sauvage.

(B) Mutant *clv1*.

(C) Mutant *clv3*.

Document A.8.



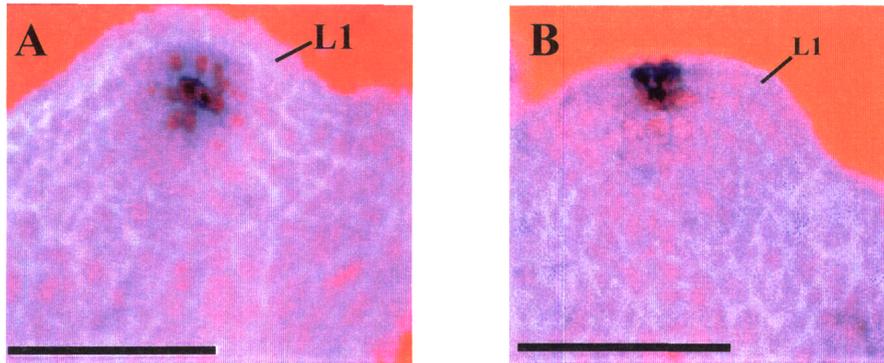
Profils d'expression des ARNm du gène *WUS* dans les MAC arrêtés de plantes transgéniques *P_{35S}-CLV3* d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales. Les cellules exprimant le gène *WUS* sont marquées en violet. f = primordium de feuille ; flèche = MAC arrêté ; barre = 20 μ m.

(A) Expression du transgène *CLV3* chez une plante transgénique. Les cellules exprimant le transgène apparaissent en rose.

(B) Expression du gène *WUS* dans le MAC d'une plante sauvage.

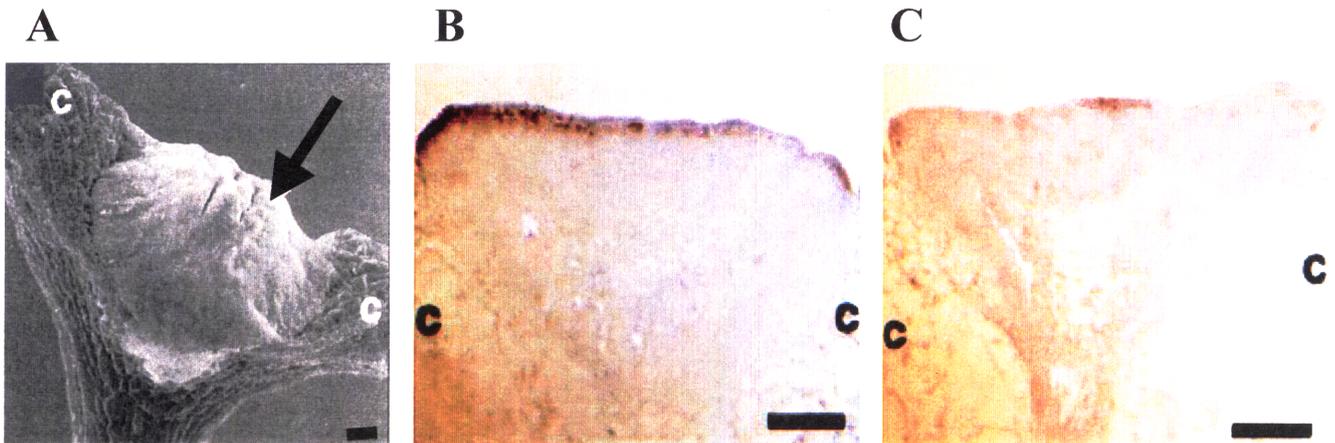
(C) Expression du gène *WUS* dans le MAC arrêté d'une plante transgénique.

Document A.9.



Profils d'expression des ARNm des gènes *CLV1* (A) ou *CLV3* (B) dans les MAC de plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales. Les cellules exprimant les gènes *CLV1* et *CLV3* sont marquées en brun. Barre = 50 μm .

Document A.10.



Profils d'expression des ARNm du gène *CLV3* chez les plantes transgéniques $P_{\text{ANT}}\text{-WUS}$ et les plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales. Les cellules exprimant le gène *CLV3* sont marquées en brun. c = cotylédon ; barre = 100 μm .

(A) Plante transgénique $P_{\text{ANT}}\text{-WUS}$ de deux semaines. La flèche montre une masse de cellules méristématiques qui s'est formée à la place d'une feuille.

(B) Détection des ARNm du gène *CLV3* dans le MAC de plante transgénique de deux semaines.

(C) Détection des ARNm du gène *CLV3* dans le MAC de plante sauvage de deux semaines.

Légende du Document B.1 : Analyse en immunofluorescence d'ovarioles de drosophiles *Delta*⁺ ou de drosophiles présentant une mutation germinale « clonale » du gène *Delta*. Veuillez noter d'une part que la même couleur peut correspondre à différents marqueurs dans différentes parties du document, et que d'autre part, il existe en fluorescence un phénomène de sommation des couleurs. Par exemple, une cellule doublement positive pour un marqueur rouge et un marqueur vert apparaîtra jaune ou orangée, et une cellule doublement positive pour des marqueurs bleu et vert apparaîtra turquoise. Toutes les parties du document sont données dans la même orientation (axe antéro-postérieur horizontal avec le pôle antérieur à gauche et le pôle postérieur à droite). Elles ne sont pas exactement à la même échelle.

(A) Vue globale d'un ovariole de drosophile sauvage. Les cellules sont marquées en rouge par un anticorps anti-FasIII, reconnaissant une protéine exprimée dans les cellules folliculaires peu différenciées ainsi que dans les cellules polaires, et en vert par un anticorps anti-BicD, reconnaissant une protéine s'accumulant dans l'ovocyte au cours de l'ovogenèse. Les cellules présentent spontanément une légère fluorescence verte intrinsèque, les noyaux polyploïdes des cellules nourricières apparaissent comme des plages sombres arrondies. Stade 1 à Stade 8 : stades 1 à 8 de la maturation des follicules. L'organisation du germarium est présentée dans le cadre en bas à gauche.

(B et C) Kystes ovariens observés chez une drosophile mutante. Les noyaux des cellules sauvages sont marqués en vert par la GFP. La GFP est inactivée dans les cellules germinales homozygotes pour le gène *Delta*. En rouge : marquage par un anticorps anti-Orb, reconnaissant une protéine s'accumulant dans l'ovocyte ; en bleu : le marqueur A101, reconnaissant spécifiquement le noyau des cellules polaires.

C. est l'agrandissement de la zone encadrée de la partie B.

(D et E) Germarium de drosophile sauvage. La fluorescence verte correspond à la fluorescence intrinsèque des cellules. En bleu le marqueur A101 (voir plus haut) ; en rouge : marquage par un anticorps anti-Bib, reconnaissant une protéine spécifiquement exprimée dans les cellules de tige. E. est l'agrandissement de la zone encadrée de la partie D.

(F, F', G et G') Germariums de drosophiles exprimant la GFP, colorés en rouge par un anticorps anti-DE-cadhérine et en bleu par l'anticorps anti-Orb (voir partie B). F. Germarium ne présentant aucun follicule mutant. G. Germarium contenant trois follicules *Delta*⁻. F' et G'. Mêmes échantillons que F et G, dans lesquels seule l'intensité du signal rouge (anticorps anti-DE-cadhérine) est représentée.

Document B.1.

