

**74.01B**

**SESSION 2007**

---

**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 ARN

Le sujet qui vous est proposé comporte **un sujet de synthèse** et **deux sujets avec documents** identifiés par les lettres A et B. A titre indicatif, des durées conseillées sont indiquées :

Sujets	Pages	Durée conseillée	Thème
synthèse	3	2 h	Les ARN.
A	4 à 8	1 h	Le 'RNA silencing' chez les plantes.
B	9 à 18	3 h	Contrôle de la qualité des ARN chez les Vertébrés.

**Les sujets A et B sont totalement indépendants**, vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Pour le sujet B, **les parties B-1 (pages 9 à 13) et B-2.1 (pages 14 à 17) peuvent également être traitées de manière indépendante.**

Il vous est fortement recommandé de bien **gérer votre temps** de composition afin de pouvoir aborder correctement les différentes parties de l'épreuve.

Lors de l'évaluation, les correcteurs attacheront une importance particulière à :

- la justification des raisonnements ;
- la clarté et la concision des réponses ;
- la qualité et la précision des schémas ;
- la construction des phrases, l'orthographe, la grammaire et la présentation.

## ***SUJET DE SYNTHÈSE***

---

# **Les ARN**

*Vous construirez votre devoir à partir d'exemples précis et de données expérimentales.*

---

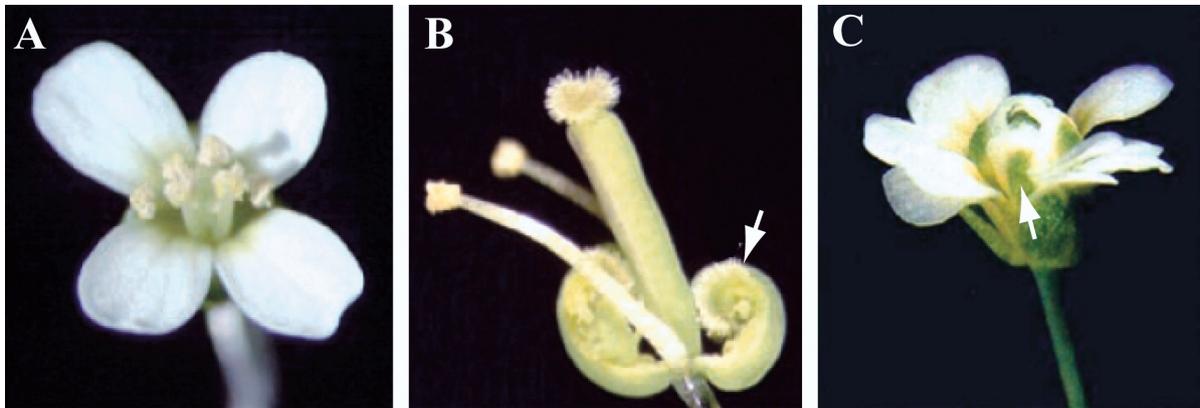
## *SUJET A*

### *Le ‘RNA silencing’ chez les plantes*

---

Le ‘RNA silencing’ correspond à l’extinction de l’expression génique via des interactions séquence-spécifiques impliquant de petites molécules d’ARN simple-brin de 21 à 26 nucléotides. Découvert récemment chez les plantes, ce processus affecte différentes étapes de l’expression du génome selon des mécanismes conservés. Il peut être induit notamment par des ARN non codants exprimés par le génome, appelés microARN.

Au cours du développement floral d’*Arabidopsis thaliana*, l’identité des pièces florales est déterminée par des gènes homéotiques dont la mutation conduit au remplacement de certains organes par d’autres. Parmi ces gènes, les gènes de classe A sont impliqués dans la spécification de l’identité des pièces du périanthe (sépalés et pétales) et les gènes de classe C dans la spécification de l’identité des pièces reproductives (étamines et carpelles). Les mutations *apetala2* et *agamous*, inactivant les gènes *APETALA2* (*AP2*) et *AGAMOUS* (*AG*) qui codent respectivement les protéines AP2 et AG, ont été isolées. Les phénotypes des fleurs mutantes sont donnés à la [Figure 1](#).



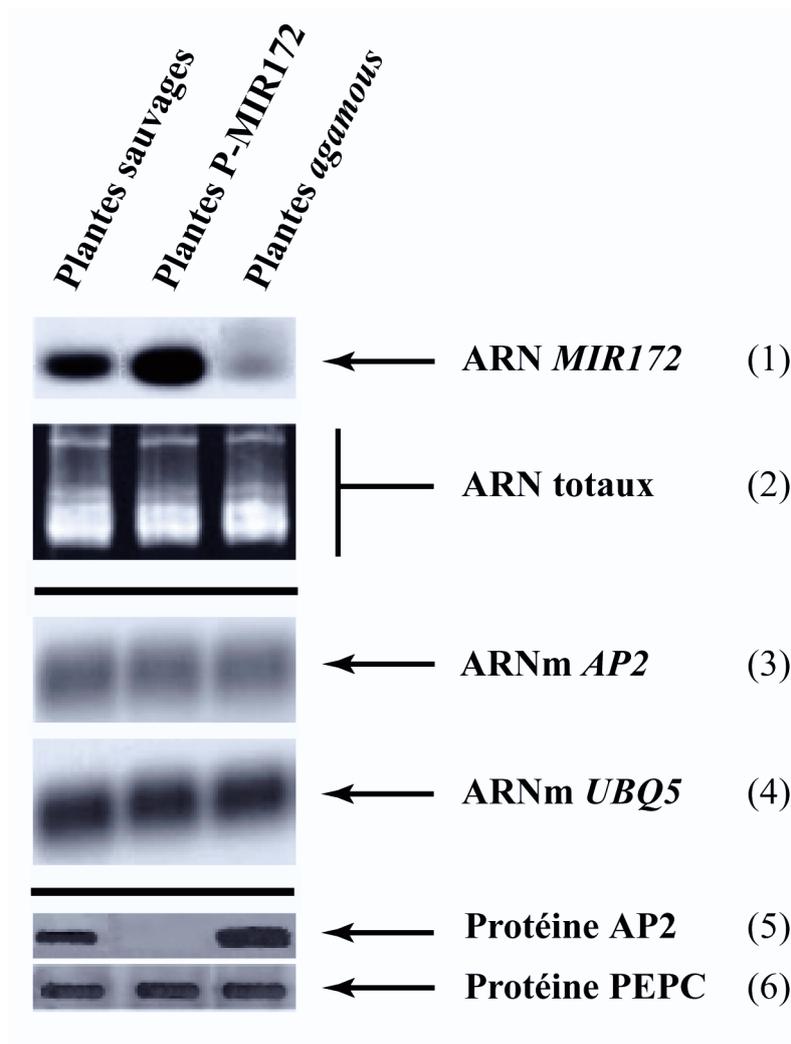
**Figure 1.** Phénotype des fleurs sauvages (A), des fleurs mutantes *apetala2* (B) et des fleurs mutantes *agamous* (C). Sur la photo B, la flèche pointe un carpelle ; sur la photo C, la flèche pointe un sépale.

**Question 1.** Analysez ces phénotypes. Précisez la classe des gènes AP2 et AG.

Chez les plantes *apetala2*, la protéine AG s’exprime dans les ébauches de toutes les pièces florales, alors qu’elle n’est présente que dans celles des pièces reproductives des plantes sauvages. Chez les plantes *agamous*, la protéine AP2 s’exprime dans les ébauches de toutes les pièces florales, mais elle n’est présente que dans celles des pièces du périanthe des plantes sauvages.

**Question 2.** Interprétez ces résultats. Comment interagissent les gènes AP2 et AG ?

L’ARN *MIR172* est un ARN non codant de 21 nucléotides exprimé à partir du gène *MIR172*. L’abondance de l’ARN *MIR172*, de l’ARNm *AP2* et de la protéine AP2 a été analysée dans les inflorescences de plantes sauvages, de plantes *agamous* et de plantes transgéniques exprimant le gène *MIR172* sous le contrôle d’un promoteur fort P (plantes P-MIR172, cf. [Figure 2](#)). Les fleurs des plantes P-MIR172 présentent un phénotype semblable à celui des fleurs *apetala2*.



**Figure 2.** Expression des gènes *MIR172* et *AP2* chez les plantes sauvages, les plantes P-MIR172 et les plantes *agamous*.

Des échantillons d'inflorescence de chaque plante ont été répartis en trois fractions :

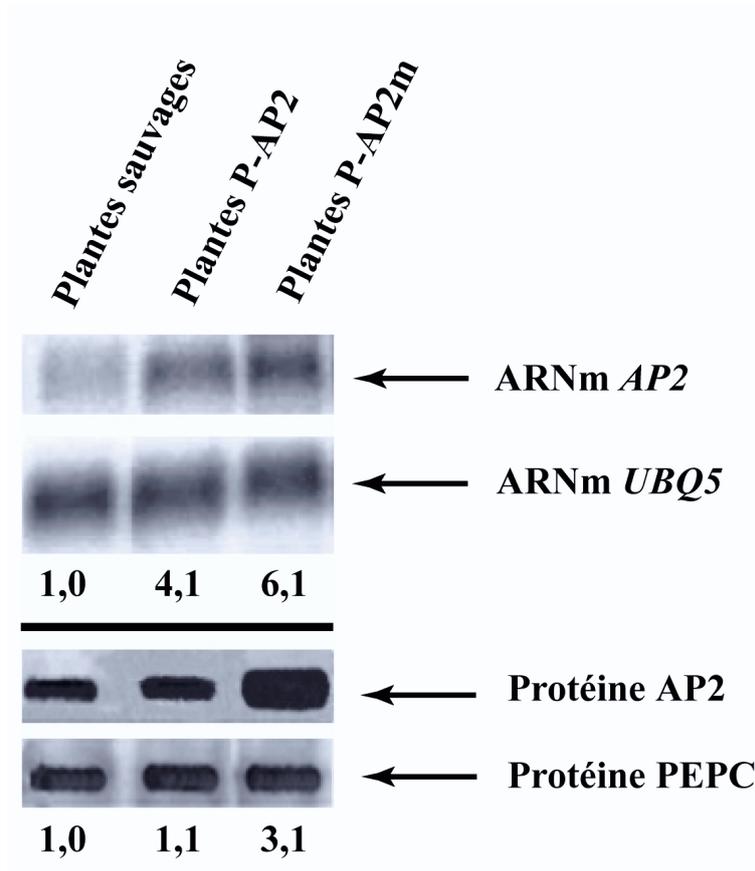
- 1) Les ARN totaux extraits à partir de la première fraction ont été séparés par électrophorèse, puis visualisés sous lumière ultraviolette (2). Après transfert de ces ARN sur une membrane, l'ARN *MIR172* a été détecté par hybridation avec un oligonucléotide radiomarqué de séquence complémentaire (sonde *MIR172*). (1)
- 2) Les ARNm extraits à partir de la deuxième fraction ont été séparés par électrophorèse, puis transférés sur une membrane. Les ARNm *AP2* (3) et les ARNm du gène cellulaire contrôle *UBQ5* (4) ont été détectés comme précédemment, à l'aide d'une sonde *AP2* et d'une sonde *UBQ5* respectivement.
- 3) Les protéines extraites à partir de la troisième fraction ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane. La protéine *AP2* (5) et la protéine cellulaire contrôle *PEPC* (6) ont été détectées à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence du substrat adéquat.

**Question 3.** Comparez les profils d'expression des gènes *MIR172* et *AP2* chez les plantes sauvages et P-MIR172. Que concluez-vous ? Comment expliquez-vous le phénotype des plantes P-MIR172 ?

**Question 4.** Analysez et interprétez les profils d'expression des gènes *MIR172* et *AP2* chez les plantes *agamous*. Comment expliquez-vous le phénotype de ces plantes ?

**Question 5.** Construisez à partir des informations obtenues jusqu'ici un schéma de régulation reliant les gènes *AG*, *AP2* et *MIR172*.

La séquence de l'ARN *MIR172* est complémentaire d'une courte région de l'ARNm du gène *AP2* (cf. [Figure 3A](#), page 7). Les gènes *AP2* ou *AP2m* (gène *AP2* présentant des mutations dans la région de complémentarité avec l'ARN *MIR172*, cf. [Figure 3A](#)) placés sous le contrôle d'un promoteur fort P, ont été introduits artificiellement dans des plantes sauvages, de façon à obtenir des plantes transgéniques (plantes P-*AP2* et plantes P-*AP2m* respectivement). Les fleurs des plantes P-*AP2* présentent le même phénotype que les fleurs sauvages alors que celles des plantes P-*AP2m* sont comparables aux fleurs *agamous*. La quantité d'ARNm *AP2* et de protéine *AP2* présente dans les inflorescences de ces plantes et des plantes sauvages a été étudiée (cf. [Figure 4](#)).



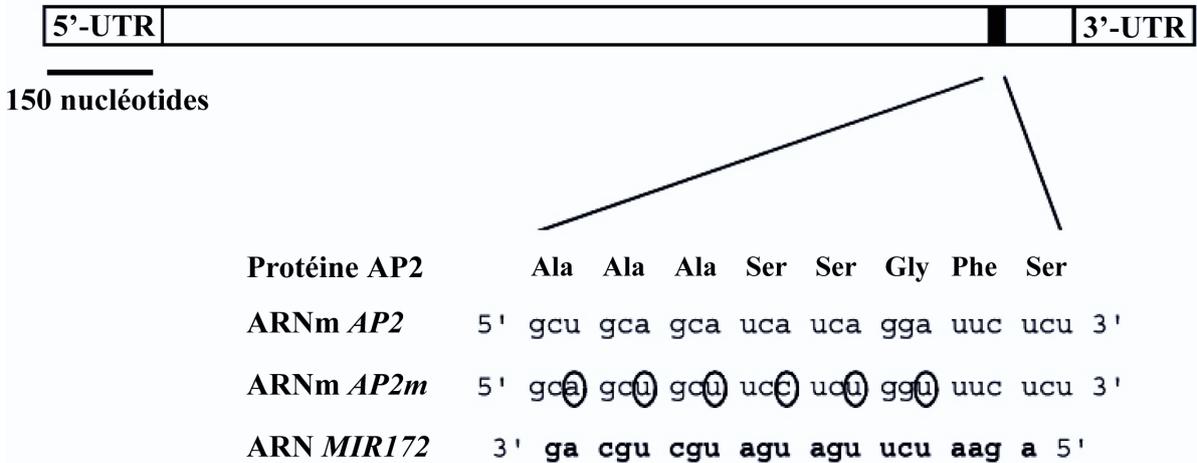
**Figure 4.** Expression du gène *AP2* chez les plantes sauvages et chez les plantes transgéniques P-*AP2* et P-*AP2m*. Des échantillons d'inflorescence de chaque plante ont été analysés selon le même protocole que précédemment (cf. [Figure 2](#)). Les nombres en dessous de chaque piste représentent les valeurs de la quantité d'ARNm *AP2* ou de protéine *AP2* normalisées respectivement par rapport à l'ARNm *UBQ5* ou à la protéine *PEPC*, puis rapportées aux valeurs obtenues chez les plantes sauvages.

**Question 6.** A l'aide du code génétique donné à la [Figure 3.B](#), précisez le type de mutations introduites dans le gène *AP2m*. Quel est l'intérêt d'avoir introduit ces mutations ?

**Question 7.** Analysez et interprétez les résultats obtenus avec les plantes P-*AP2*, puis avec les plantes P-*AP2m*. Concluez quant à l'effet régulateur de l'ARN *MIR172* chez les plantes sauvages.

**A**

### ARNm *AP2*



**B**

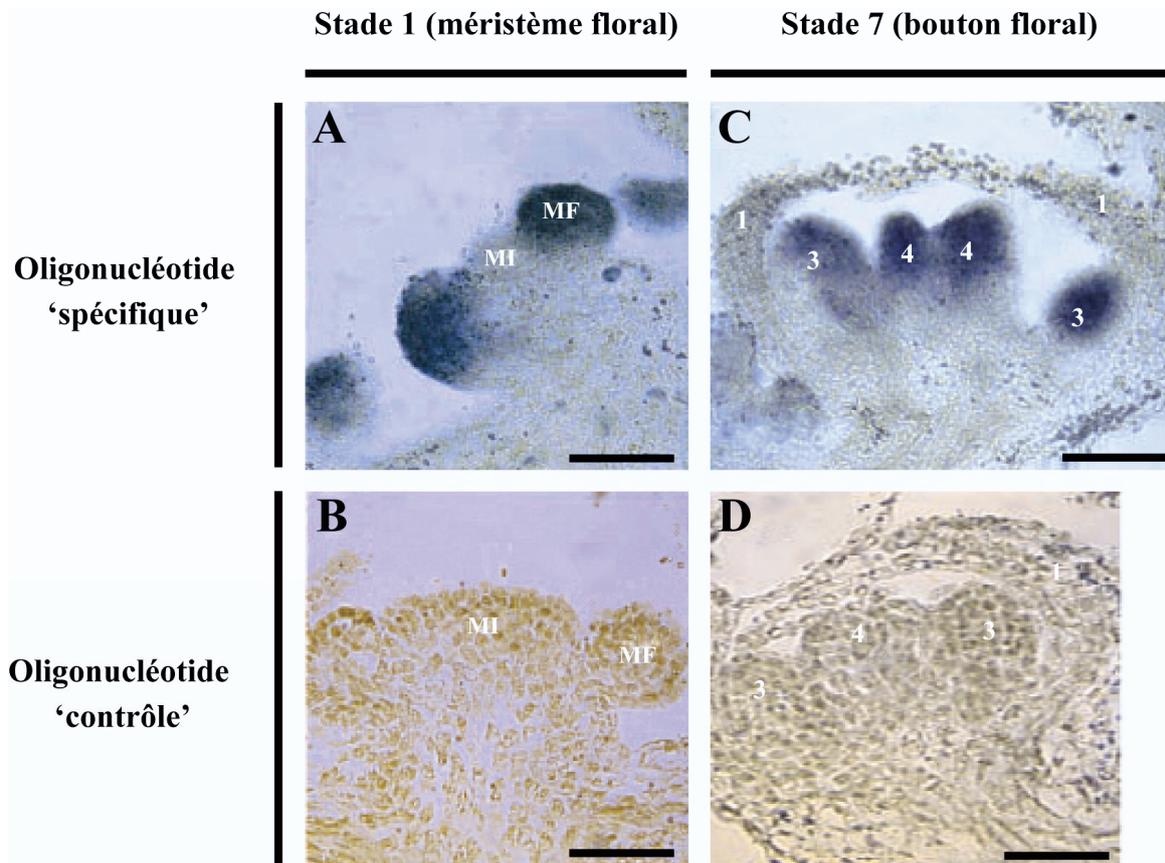
### Second nucléotide du codon

		U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	

**Figure 3. A, Complémentarité de séquence de l'ARN *MIR172* avec une courte région (rectangle noir) de l'ARNm *AP2*.** La séquence d'acides aminés codée par la région de complémentarité de l'ARNm *AP2* est donnée. Dans la version mutée de l'ARNm *AP2* (ARNm *AP2m*), les nucléotides mutés sont entourés par des cercles. Les régions 5'-UTR et 3'-UTR correspondent aux régions 5'- et 3'-non traduites de l'ARNm *AP2*.

**B, Tableau présentant le code génétique.**

L'expression de l'ARN *MIR172* a pu être suivie au cours du développement floral par la technique d'hybridation *in situ*, qui permet de localiser les ARN d'intérêt dans les coupes de tissus. Les profils d'expression de l'ARN *MIR172* dans les inflorescences (stade 1 du développement floral) et les boutons floraux (stade 7) de plantes sauvages sont donnés dans la [Figure 5](#).



**Figure 5.** Profils d'expression de l'ARN *MIR172* obtenus par hybridation *in situ* sur des coupes longitudinales réalisées au stade 1 (A et B) et au stade 7 (C et D) du développement floral de plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana*. Un oligonucléotide complémentaire de l'ARN *MIR172*, a été incubé sur des coupes histologiques, de façon à obtenir une hybridation spécifique (A et C). Un oligonucléotide contrôle, non spécifique, a par ailleurs été utilisé sur d'autres coupes (B et D). Après hybridation, les coupes ont été lavées de façon à éliminer les oligonucléotides non appariés. Ensuite, les oligonucléotides marqués à la digoxigénine ont été localisés sur les coupes par un anticorps anti-digoxigénine couplé à une enzyme qui donne un produit coloré bleu insoluble en présence du substrat adéquat. Les nombres correspondent à la position des ébauches de pièces florales, du verticille le plus externe (1) au verticille le plus interne (4). Notez que les ébauches des pièces du deuxième verticille (pétales) ne sont pas visibles sur ces coupes. MI = méristème d'inflorescence ; MF = méristème floral. Barre = 50  $\mu$ m.

**Question 8.** Décrivez les profils d'expression de l'ARN *MIR172* aux stades méristème floral et bouton floral.

**Question 9.** Déduisez des informations obtenues jusqu'ici le rôle possible de l'ARN *MIR172* dans le développement de la fleur sauvage d'*Arabidopsis thaliana*.

## SUJET B

### Contrôle de la qualité des ARN chez les Vertébrés

La plupart des ARN subissent un contrôle de qualité au moment de leur transcription, de leur épissage (processus faisant intervenir un complexe de protéines, le spliceosome, agissant au niveau des jonctions exon/intron), de leur exportation du noyau vers le cytoplasme et de leur traduction. Les ARN défectueux sont dégradés dans le noyau ou dans le cytoplasme alors que ceux qui subissent avec succès le contrôle de qualité sont traduits. La dégradation des ARN implique des endonucléases qui les découpent en fragments de plus petite taille ainsi que des exonucléases qui les digèrent à partir de leurs extrémités. L'objectif de cette partie est d'aborder quelques aspects de ce contrôle de qualité.

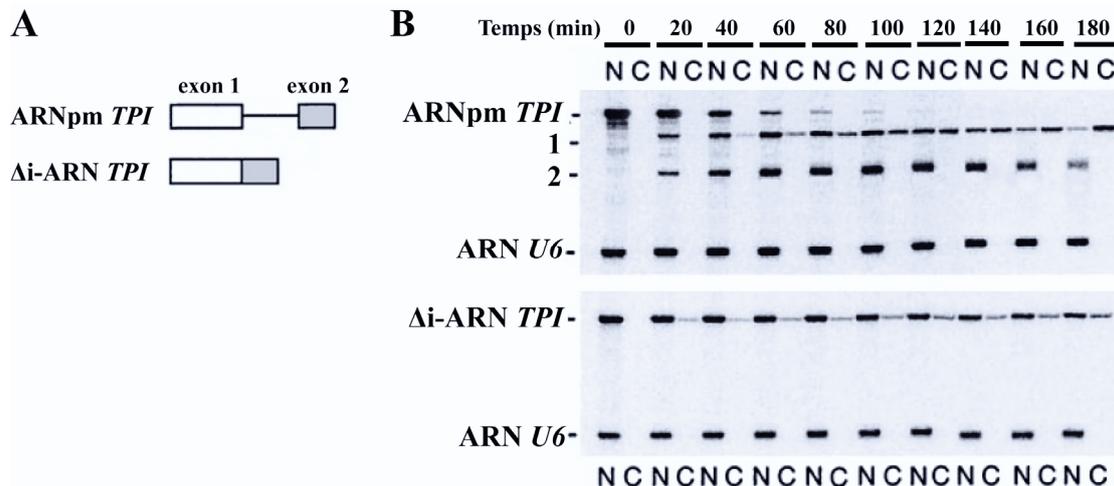
#### **B-1. Contrôle de qualité des ARN au moment de leur exportation vers le cytoplasme**

**Question 10.** Quelles sont les conséquences possibles de l'absence d'épissage d'un intron au moment de la traduction d'un ARN messager (ARNm) ?

Deux ARN artificiels dérivés du gène *TPI* humain (gène codant la triose phosphate isomérase) uniformément marqués au phosphate radioactif ( $^{32}\text{P}$ ) ont été synthétisés *in vitro* (cf. Figure 6.A) :

- L'ARNpm *TPI* est un ARN pré-messager constitué des deux premiers exons du gène *TPI* séparés par un intron ;
- $\Delta$ i-ARN *TPI* correspond à l'ARN précédent dont l'intron a été éliminé.

Ces ARN ont été micro-injectés séparément dans des noyaux d'ovocytes de Xénope, et la distribution nucléo-cytoplasmique des ARN *TPI* a été étudiée après divers temps d'incubation (cf. Figure 6.B).



**Figure 6.** Distribution nucléo-cytoplasmique des ARN *TPI*.

**A, Structure des ARNpm *TPI* et  $\Delta$ i-ARN *TPI*.** Les rectangles représentent des exons, le trait est un intron.  
**B, Evolution au cours du temps de la quantité d'ARN *TPI* nucléaire (N) et cytoplasmique (C).** Des quantités équivalentes d'ARNpm *TPI* (en haut) ou de  $\Delta$ i-ARN *TPI* (en bas) radiomarqué ont été injectées dans des noyaux d'ovocytes de Xénope avec l'ARN contrôle *U6* radiomarqué, un ARN non codant exclusivement nucléaire. Après incubation des ovocytes durant les temps indiqués, les ARN totaux nucléaires et cytoplasmiques ont été extraits, puis séparés par électrophorèse. Enfin, la radioactivité des ARN a été détectée.

**Question 11.** A quoi correspondent les bandes 1 et 2 sur la Figure 6.B ? Quelle est leur origine ?

**Question 12.** Analysez les résultats obtenus avec les ARNpm *TPI* d'une part et les  $\Delta$ i-ARN *TPI* d'autre part. Comparez les vitesses d'exportation des ARNm *TPI* issus ou non de l'épissage.

**Question 13.** D'après ces résultats, en quoi le déroulement de l'épissage contribue-t-il au contrôle de qualité des ARN ?

Plusieurs protéines impliquées dans l'exportation des ARN messagers du noyau vers le cytoplasme ont été caractérisées. Parmi celles-ci, la protéine DEK, exclusivement nucléaire, est connue pour interagir *in vitro* avec le spliceosome alors que les protéines Y14, REF, TAP et hnRNP A1 font des allées-venues entre le noyau et le cytoplasme. La protéine TAP interagit avec le complexe protéique des pores nucléaires au moment de l'exportation des ARNm.

Dans les expériences qui suivent, on utilise les propriétés de la RNase H, une enzyme qui clive l'ARN de manière non spécifique, uniquement lorsque celui-ci se présente sous forme d'hybride ADN/ARN.

Des ARNm et  $\Delta$ i-ARN *TPI* uniformément marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules humaines HeLa de façon à induire l'épissage, puis digérés à la RNase H de façon à libérer 3 fragments (cf. [Figure 7.A](#), page 11). Ensuite, ces fragments ont été soumis à des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques de protéines impliquées dans l'exportation des ARNm (cf. [Figure 7.B](#)). Les résultats de ces expériences sont donnés à la [Figure 7.C](#).

**Question 14.** Analysez et interprétez les résultats des co-immunoprécipitations obtenus avec les anticorps anti-Y14, anti-DEK et anti-REF ; l'anticorps anti-hnRNP A1 ; puis l'anticorps anti-TAP.

**Question 15.** Proposez une explication aux différences de vitesse d'exportation précédemment observées avec des ARNm *TPI* issus ou non de l'épissage.

Des ARNm *TPI* et  $\Delta$ i-ARN *TPI* uniformément marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été incubés en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa, puis la solution a été divisée en plusieurs fractions. Dans chaque fraction, un ADN de 12 nucléotides (oligonucléotide) s'hybridant à une courte région de l'ARN *TPI* a été additionné en présence de RNase H. Enfin, les ARN issus de chaque réaction ont été analysés (cf. [Figure 8.A](#), page 12).

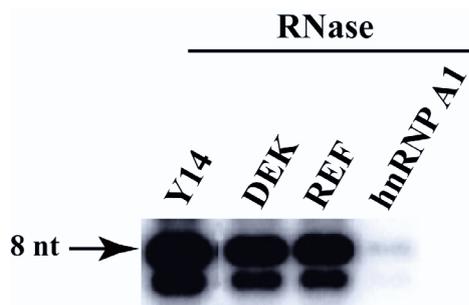
**Question 16.** Expliquez à l'aide de schémas les profils de digestion attendus pour différents oligonucléotides, dans le cas d'un ARNm *TPI* interagissant avec une protéine et d'un ARNm *TPI* n'interagissant pas.

**Question 17.** Analysez et interprétez les résultats obtenus.

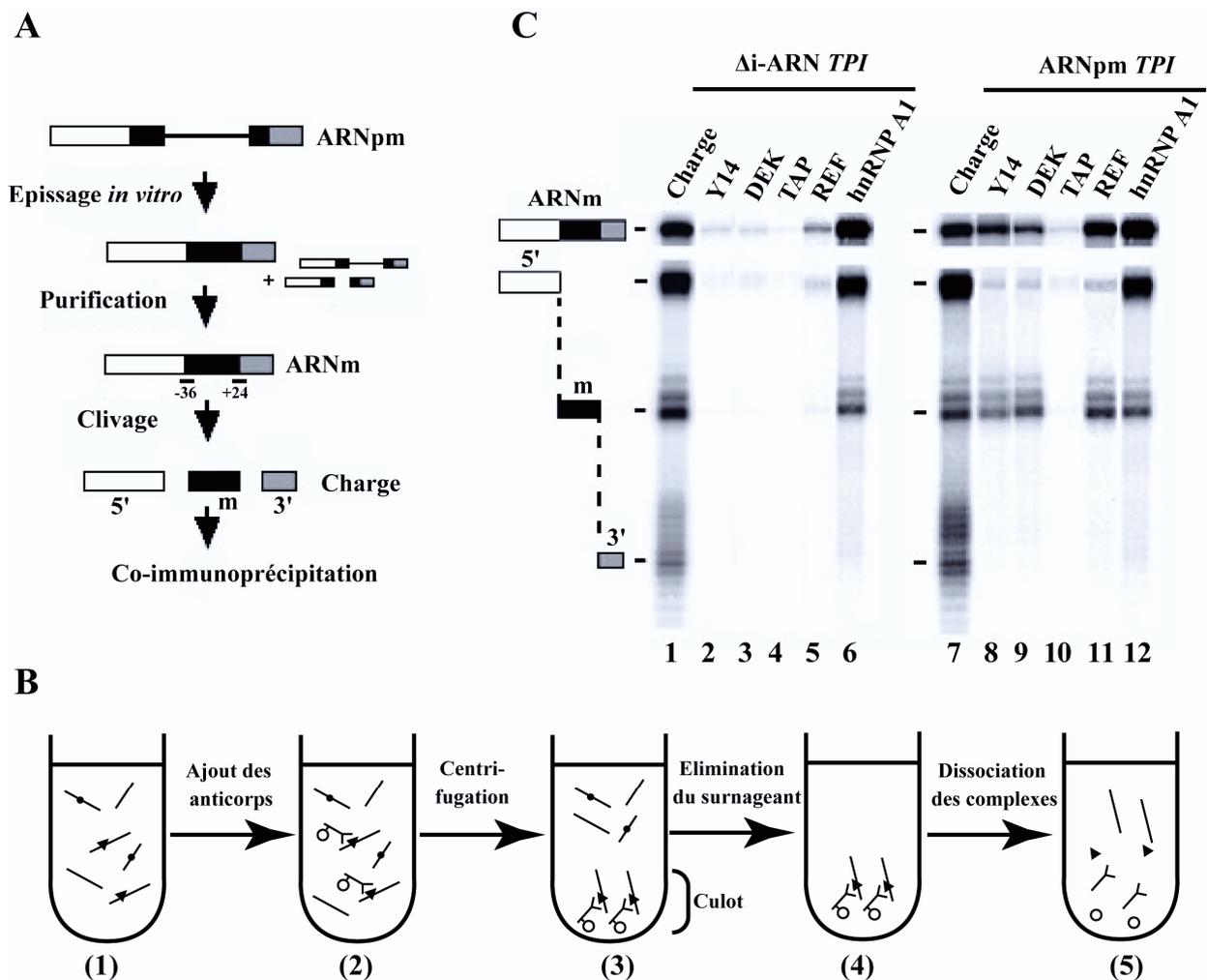
Des expériences du même type ont été menées avec des ARNm et  $\Delta$ i-ARN dérivés du gène *PIP85.B* sauvage ou avec des ARN identiques mais dans lesquels une séquence de 12 nucléotides (nt) a été insérée à l'extrémité 3' de l'exon 1 (cf. [Figure 8.B](#)).

**Question 18.** Quelle(s) information(s) supplémentaire(s) vous apporte l'analyse de ces résultats ?

Des ARNm *TPI* issus de l'épissage marqués au  $^{32}\text{P}$  en position -24 nt en amont de la jonction entre l'exon 1 et l'exon 2, ont été incubés en présence d'une RNase clivant les ARN simple-brin en plusieurs fragments, de manière non spécifique. Les produits de digestion ont été ensuite soumis à des immunoprécipitations à l'aide d'anticorps spécifiques de protéines impliquées dans l'exportation des ARNm (cf. [Figure 9](#)).



**Figure 9.** Co-immunoprécipitations de fragments d'ARN *TPI* après digestion à la RNase. Des ARNm *TPI* marqués au  $^{32}\text{P}$  en position -24 nt en amont de la jonction entre l'exon 1 et l'intron ont été incubés pendant 2 h en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Après incubation avec une RNase non spécifique, la solution a été séparée en 4 fractions qui ont respectivement été soumises à des immunoprécipitations en présence des anticorps anti-Y14, anti-DEK, anti-REF et anti-hnRNP A1. Les fragments d'ARN obtenus ont ensuite été séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes, et la radioactivité des fragments a été révélée. La taille d'un des fragments détectés est donnée en nucléotides (nt).

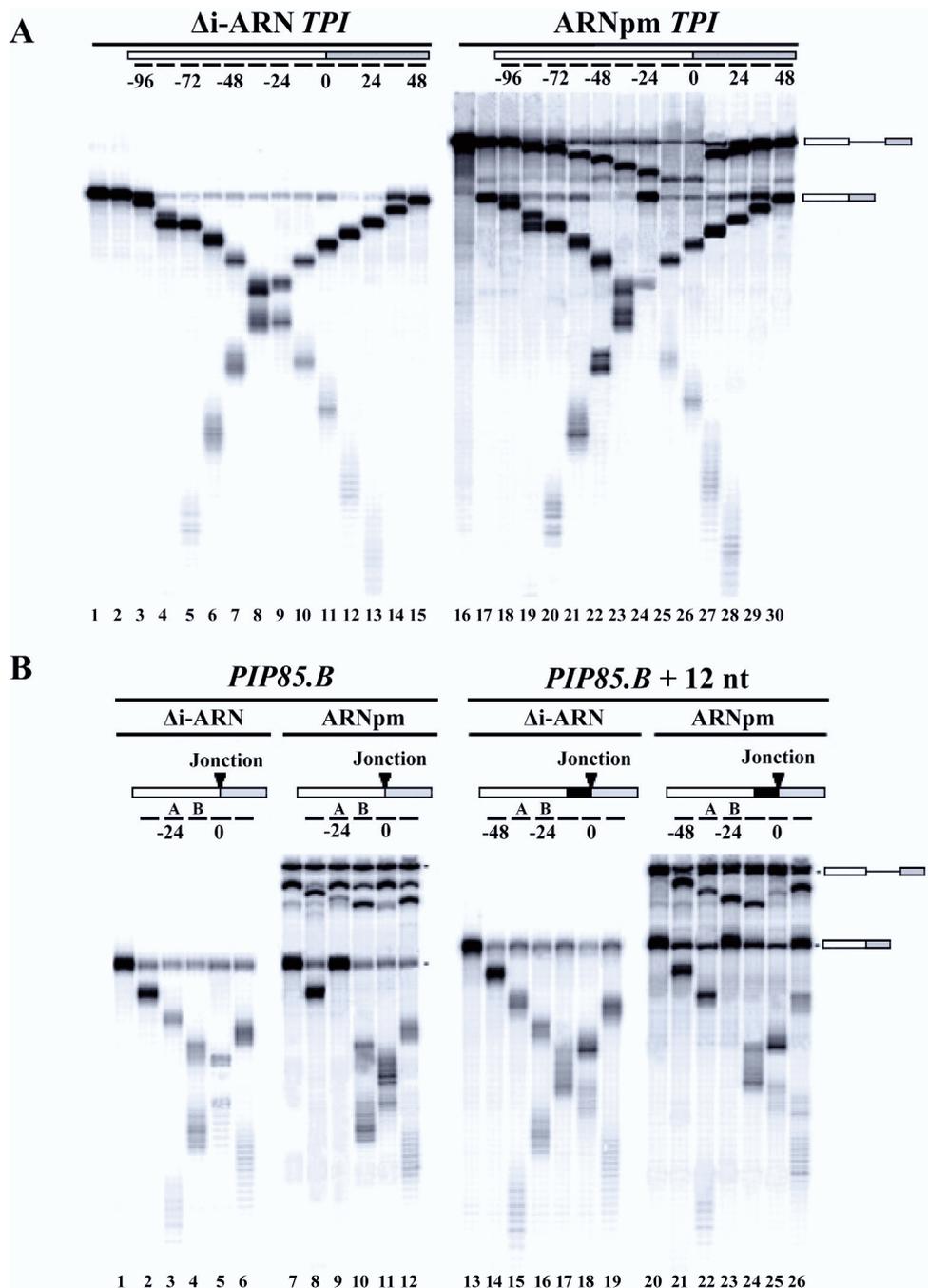


**Figure 7. Caractérisation de facteurs interagissant avec les ARNm TPI.**

**A, Identification de protéines interagissant avec des fragments d'ARNm TPI.** Les ARNpm TPI uniformément marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été épissés *in vitro* pendant 2 heures en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Les ARNm obtenus ont été séparés des ARNpm et autres sous-produits de l'épissage par ultracentrifugation sur gradient de glycérol (Purification), avant d'être incubés en présence de RNase H et de deux ADN s'hybridant spécifiquement à de courtes régions de l'ARN TPI situées respectivement aux positions -36 et +24 nucléotides de part et d'autre de la jonction exon/exon, de façon à libérer 3 fragments : un fragment 5' (rectangle blanc), un fragment médian m (rectangle noir) et un fragment 3' (rectangle gris). La solution a été ensuite séparée en plusieurs fractions et chaque fraction a été soumise à une immunoprécipitation. Les Δi-ARN TPI ont également été analysés en parallèle avec les réactions précédentes.

**B, Principe de la co-immunoprécipitation : détection de l'interaction entre une protéine et un acide nucléique ou une autre protéine.** Dans le cas de l'étude d'interactions ARN/protéine, des ARN purifiés (traits fins) associés ou non à des protéines (cercles et triangles pleins) (1) sont incubés en présence d'anticorps spécifiques de protéines d'intérêt. Ces anticorps sont liés de manière covalente avec des microbilles (cercles vides) (2), ce qui permet de retenir les complexes ARN/protéine d'intérêt sous forme d'un immunoprécipité restant dans le culot après centrifugation (3). Les complexes non reconnus restent dans le surnageant qui est éliminé (4). Après plusieurs lavages de l'immunoprécipité, les complexes ARN/protéine d'intérêt/anticorps sont dissociés (5).

**C, Résultats des co-immunoprécipitations.** Les fragments d'ARN TPI issus des réactions de clivage à la RNase H ('Charge', lignes 1 et 7) ont été co-immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-Y14 (lignes 2 et 8), anti-DEK (lignes 3 et 9), anti-TAP (lignes 4 et 10), anti-REF (lignes 5 et 11) et anti-hnRNP A1 (lignes 6 et 12). Les ARN ont ensuite été séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes, et leur radioactivité a été révélée.



**Figure 8.** Clivage des ARN *TPI* (A), *PIP85.B* et *PIP85.B + 12 nt* (B) par la RNase H. La position du centre de chaque oligonucléotide (tiret noir) par rapport à la jonction (position 0) entre l'exon 1 (rectangle blanc) et l'exon 2 (rectangle gris) est indiquée. nt = nucléotide.

**A,** Les  $\Delta$ i-ARN *TPI* (à gauche) et les ARNpm *TPI* (à droite) uniformément marqués au  $^{32}$ P ont été incubés en présence d'extraits nucléaires pendant 0 (lignes 1 et 16) ou 90 min (lignes 2-15 et 17-30). Des fractions provenant des réactions '90 min' ont ensuite été incubées en présence des oligonucléotides indiqués au dessus de chaque piste et de RNase H, de façon à cliver les ARN *TPI* (lignes 3-15 et 18-30). Les ARN ont été séparés par électrophorèse, en conditions dénaturantes, puis révélés par mesure de leur radioactivité.

**B,** Les  $\Delta$ i-ARN et ARNpm *PIP85.B* (à gauche) ou *PIP85.B + 12 nt* (à droite) uniformément marqués au  $^{32}$ P ont été incubés en présence d'extraits nucléaires pendant 90 min (lignes 1-26). Des fractions provenant de ces réactions (lignes 2-6, 8-12, 14-19 et 21-26) ont ensuite été incubées en présence des oligonucléotides indiqués au dessus de chaque piste et de RNase H. Puis, les ARN ont été séparés et révélés comme précédemment. L'ARNm *PIP85.B + 12 nt* présente une insertion de 12 nucléotides (rectangle noir) à l'extrémité 3' de l'exon 1. Les oligonucléotides A et B sont centrés respectivement aux positions -24 et -12 nt sur l'ARNm *PIP85.B* et aux positions -36 et -24 nt sur l'ARNm *PIP85.B + 12 nt*.

**Question 19.** Analysez et interprétez ces résultats. Votre conclusion vous semble-t-elle en accord avec les résultats obtenus avec la RNase H ?

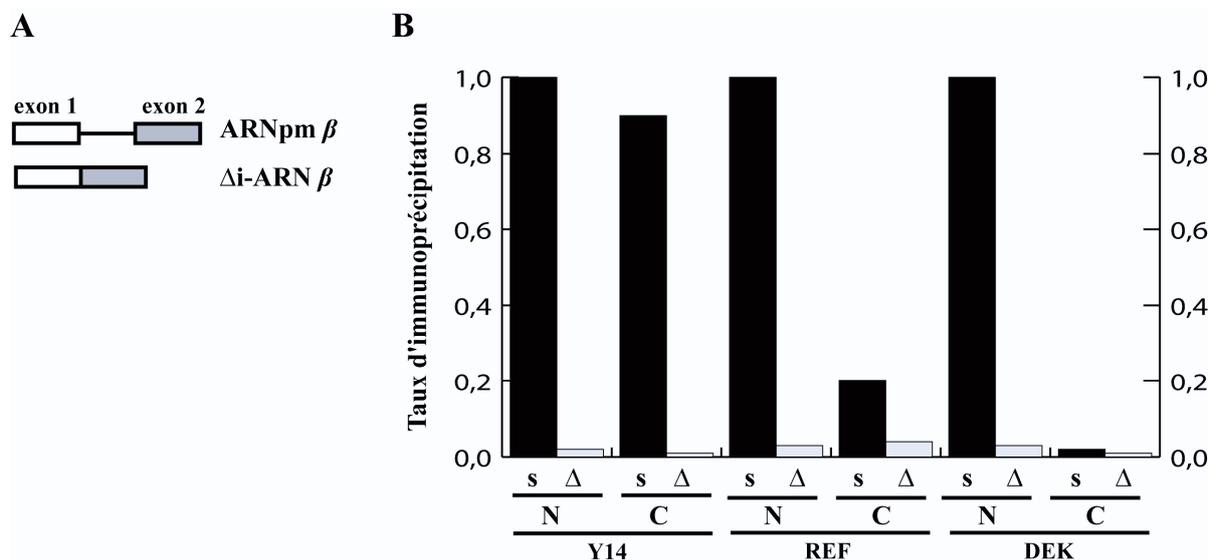
Des résultats identiques ont été obtenus pour des ARNm *TPI* issus de l'épissage marqués au  $^{32}\text{P}$  en position -20 nt en amont de la jonction entre l'exon 1 et l'exon 2.

**Question 20.** Quelle(s) précision(s) supplémentaire(s) vous apportent ces résultats ? Indiquez par un schéma les positions possibles de la région ainsi caractérisée sur l'ARNm *TPI*.

Le complexe de protéines mis en évidence (complexe EJC pour 'exon/exon junction complex') a été identifié de la même manière à proximité de chaque jonction exon/exon. Afin de mieux le caractériser, deux ARN artificiels dérivés du gène codant la  $\beta$ -globine humaine (gène  $\beta$ ) uniformément marqués au  $^{32}\text{P}$  ont été synthétisés *in vitro* (cf. Figure 10.A) :

- L'ARNpm  $\beta$  comprend les deux premiers exons du gène  $\beta$  séparés par un intron ;
- $\Delta$ i-ARN  $\beta$  correspond à l'ARNpm  $\beta$  dont l'intron a été éliminé.

Ces ARN ont été micro-injectés séparément dans des noyaux d'ovocytes de Xénope. Après 90 minutes d'incubation, les ARN totaux nucléaires et cytoplasmiques ont été extraits puis soumis à diverses immunoprécipitations. Enfin, les ARNm  $\beta$  ont été quantifiés (cf. Figure 10.B).



**Figure 10.** Etude du complexe EJC.

**A, Structure des ARN  $\beta$  micro-injectés.** Les rectangles représentent des exons, le trait représente un intron.

**B, Co-immunoprécipitations des ARN  $\beta$ .** 90 minutes après micro-injection de quantités équivalentes d'ARNpm  $\beta$  et de  $\Delta$ i-ARN  $\beta$  dans des noyaux d'ovocytes de Xénope, les ARN totaux nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) ont été extraits puis soumis à des immunoprécipitations à l'aide des anticorps anti-Y14, anti-REF ou anti-DEK (cf. principe à la Figure 7.B). Ensuite, les ARNm  $\beta$  co-immunoprécipités ont été quantifiés par mesure de leur radioactivité. Sur la figure, les ARNm  $\beta$  issus de l'épissage des ARNpm  $\beta$  sont notés 's', alors que les ARNm  $\beta$  non issus de l'épissage ( $\Delta$ i-ARN  $\beta$ ) sont notés ' $\Delta$ '. Pour chaque anticorps, le taux d'immunoprécipitation correspond au rapport de la quantité d'ARNm  $\beta$  (nucléaire ou cytoplasmique, issu ou non de l'épissage) sur la quantité d'ARNm  $\beta$  nucléaire issu de l'épissage.

**Question 21.** Analysez les résultats obtenus après micro-injection des ARNpm  $\beta$ . Qu'apportent les contrôles obtenus après micro-injection des  $\Delta$ i-ARN  $\beta$  ? Concluez quant à l'évolution de la composition du complexe EJC.

**Question 22.** Récapitulez par un schéma fonctionnel l'évolution des interactions ARN/protéines depuis l'épissage jusqu'à l'exportation des ARNm dans le cytoplasme. En quoi ces interactions assurent-elles un contrôle de la qualité des ARNm *in vivo* ?

## B-2. Contrôle de qualité des ARN au moment de leur traduction

**B-2.1.** Différents allèles dérivés du gène *TPI* humain (gène codant la triose phosphate isomérase) ont été obtenus par mutagenèse dirigée (cf. [Figure 11.A](#), page 15), placés sous le contrôle d'un promoteur fort, puis introduits dans des cellules de souris (expériences de transfection). Le gène codant la  $\beta$ -globine humaine (gène  $\beta$ ), placé sous le contrôle du même promoteur fort, a été simultanément introduit dans les mêmes cellules, en guise de contrôle de l'efficacité des transfusions et du niveau d'expression des gènes introduits. Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits et les ARNm *TPI* quantifiés (cf. [Figure 11.B](#)).

**Question 23.** *Quel est l'effet de la mutation non sens '189 Ter' sur la quantité d'ARNm TPI ? Comment expliquez-vous cet effet ? Interprétez ce résultat en terme de contrôle de la qualité des ARN par la cellule au moment de la traduction.*

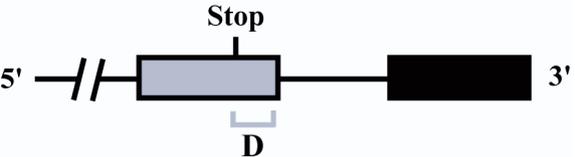
**Question 24.** *Comparez les effets des mutations non sens '189 Ter', '192 Ter', '195 Ter', '198 Ter' et '208 Ter'. Que remarquez vous ? Comment expliquez-vous les différences d'effet observées ? (proposez deux hypothèses)*

**Question 25.** *Analysez et interprétez les effets des mutations '208 Ter + 39 pb' et '208 Ter + 57 pb'.*

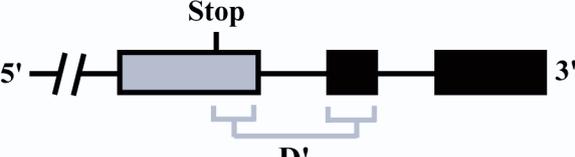
**Question 26.** *Analysez et interprétez les effets des mutations 'Norm  $\Delta$ ' et '189 Ter  $\Delta$ '.*

**Question 27.** *Qu'est-ce qui semble déterminant dans l'effet observé pour la mutation '189 Ter' ? Proposez une règle rendant compte de l'ensemble de ces résultats.*

Une étude statistique a permis de préciser les positions des codons stop normaux de gènes possédant un, voire deux exons entièrement non codants situés en position 3' du gène (cf. [Tableau 1](#)).

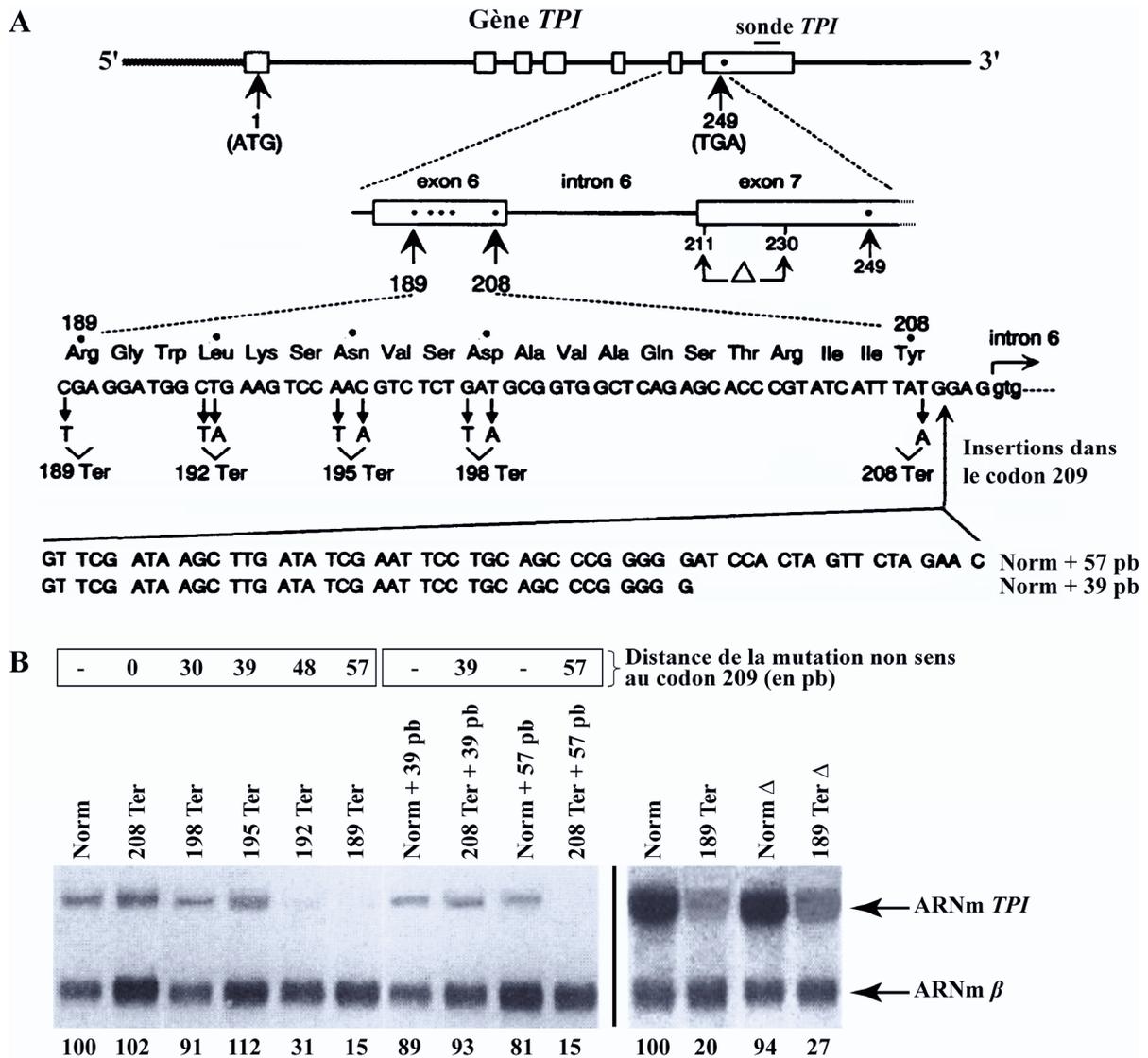
Gènes possédant 1 exon entièrement non codant			
	Organismes	Nombre de gènes	
		D < 50 pb	D > 50 pb
	Mammifères	70	0
	Oiseaux	5	1
	Poissons	1	0
	Insectes	14	0

Gènes possédant 2 exons entièrement non codant			
	Organismes	Nombre de gènes	
		D' < 50 pb	D' > 50 pb
	Mammifères	5	1

**Tableau 1.** Position des codons stop normaux dans les gènes possédant un, voire deux exons 3'-non codants. D et D' représentent les distances entre le codon stop normal et la dernière jonction exon/exon sur la séquence des ARNm possédant un ou deux exons 3'-non codants respectivement. Rectangles noirs : exons non codants ; rectangles gris : exons comportant le codon stop normal ; pb = paire de bases.

**Question 28.** *Ces observations vous semblent-elles en accord avec la règle énoncée ci-dessus ? Pourquoi ? Selon vous, quel acteur cellulaire est susceptible de reconnaître une mutation non sens et d'induire l'effet observé pour la mutation '189 Ter' ?*



**Figure 11. A, Structure du gène *TPI* normal et des allèles artificiels dérivés.** Le gène *TPI* normal comporte 7 exons (rectangles vides) séparés par 6 introns. Les nombres représentent la position des codons, du codon d'initiation ATG (codon 1) au codon stop TGA (codon 249). La séquence nucléotidique comprise entre les codons 189 et 208, et la séquence protéique correspondante sont données. La sonde *TPI* correspond à un ADN radiomarqué s'hybridant spécifiquement avec la région 3'-non traduite des ARNm *TPI* humains (normal ou artificiels), mais ne reconnaissant pas les ARNm *TPI* de souris. pb = paires de bases.

A partir du gène *TPI* normal (noté 'Norm'), plusieurs allèles artificiels ont été générés par mutagenèse :

- 1) Les allèles '189 Ter', '192 Ter', '195 Ter', '198 Ter' et '208 Ter' présentent un codon stop à la position indiquée (mutation non sens) en plus du codon stop normal. La position du codon stop est repérée par des points. Pour chaque mutation, les substitutions de nucléotides sont indiquées par des flèches.
- 2) Les allèles 'Norm + 57 pb' et 'Norm + 39 pb' présentent respectivement une insertion de 57 pb et de 39 pb dans le codon 209 du gène 'Norm'. Notez que ces insertions ne modifient pas la phase de lecture du gène *TPI* et que leurs 39 premiers nucléotides sont communs. Les allèles '208 Ter + 39 pb' et '208 Ter + 57 pb' ont été construits de même à partir de l'allèle '208 Ter' (allèles non représentés).
- 3) Les allèles 'Norm Δ' et '189 Ter Δ' résultent de la délétion des codons 211 à 230 (délétion de 57 pb, notée 'Δ' sur la figure) dans la séquence du gène 'Norm' et de l'allèle '189 Ter', respectivement.

**B, Quantification des ARNm *TPI*.** Chaque allèle artificiel du gène *TPI* a été introduit dans des cellules de souris avec le gène  $\beta$  (contrôle). Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits, séparés par électrophorèse, puis transférés sur une membrane. Les ARNm *TPI* et  $\beta$  ont été ensuite révélés à l'aide de la sonde *TPI* et d'une sonde dérivée du gène  $\beta$ , respectivement. Les nombres en dessous des pistes représentent les valeurs (en %) des quantités d'ARNm *TPI* artificiels normalisées par rapport au gène  $\beta$ , puis rapportées à la quantité normalisée d'ARNm *TPI* normal.

Les protéines hUpf3a et hUpf3b forment un complexe stable et réalisent des allées-venues entre le noyau et le cytoplasme. Elles peuvent de plus s'associer dans le cytoplasme à la protéine hUpf1 qui est capable d'interagir avec les facteurs de terminaison de la traduction (protéines eRF).

Afin de recruter ces protéines sur des ARN cibles (voyez le principe de la méthode à la [Figure 12.A](#), page 17), des constructions exprimant les protéines hUpf3a ou hUpf3b fusionnée avec la protéine MS2 (protéines MS2-hUpf) ont été générées, ainsi que deux allèles dérivés du gène codant la  $\beta$ -globine humaine (gène  $\beta$ ) auxquels des sites MS2 ont été rajoutés artificiellement en aval (allèle  $\beta$ -6MS2) ou en amont (allèle  $\beta$ -TAC-6MS2) du codon stop normal (cf. [Figure 12.B](#)). Ensuite, chacun de ces gènes a été introduit dans des cellules humaines HeLa avec le gène  $\beta$ -GAPDH (contrôle). Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits et les ARNm  $\beta$ -6MS2 quantifiés (cf. [Figure 12.C](#)).

**Question 29.** Analysez les résultats obtenus avec le gène  $\beta$ -6MS2. Déduisez-en l'effet des protéines hUpf3a et hUpf3b.

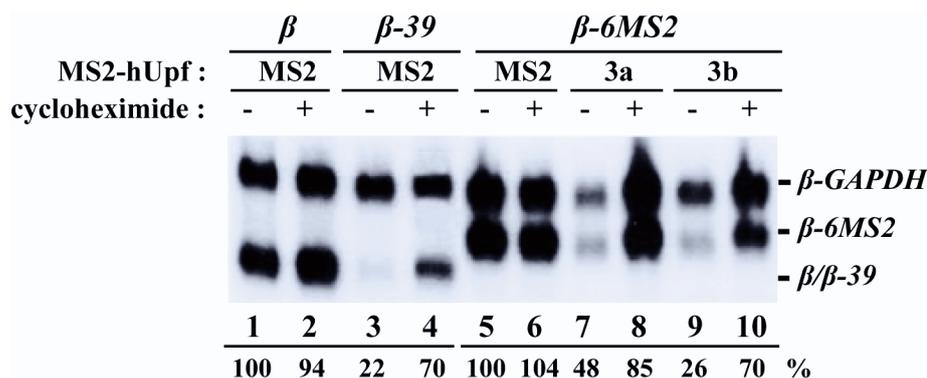
**Question 30.** Analysez et interprétez les résultats obtenus avec le gène  $\beta$ -TAC-6MS2.

**Question 31.** En quoi le déroulement de la traduction peut-il rendre compte des différences d'effet observées avec les gènes  $\beta$ -6MS2 et  $\beta$ -TAC-6MS2 ? Précisez alors à quel moment les protéines hUpf3a et hUpf3b exercent leur effet.

Une version non fonctionnelle (DN) de la protéine hUpf1 inhibant l'activité des protéines hUpf3 a été isolée. Le gène codant cette protéine a été introduit dans les cellules HeLa avec le gène  $\beta$  ou un allèle du même gène présentant une mutation non sens (allèle  $\beta$ -39, cf. [Figure 12.B](#)). Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits et les ARNm  $\beta$  et  $\beta$ -39 quantifiés (cf. [Figure 12.D](#)).

**Question 32.** Que pouvez-vous déduire de cette expérience ?

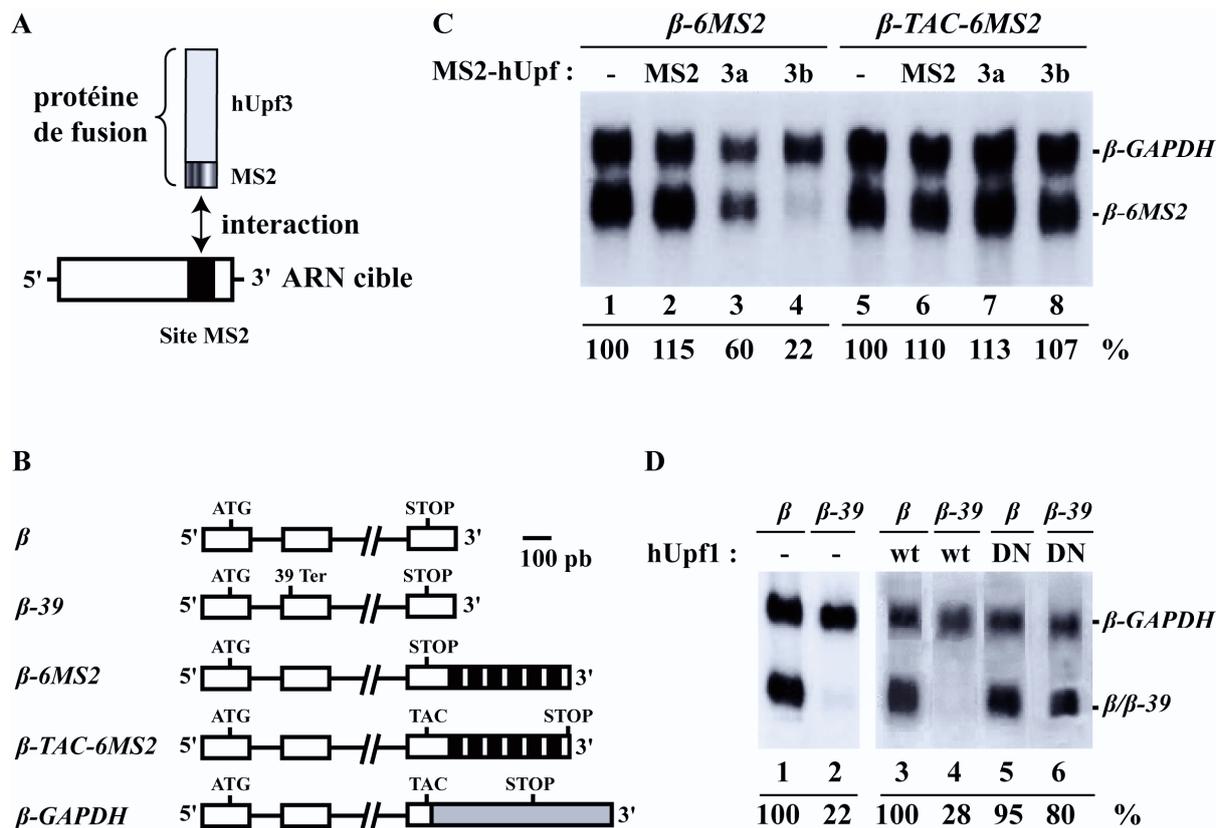
Des cellules HeLa ont été transfectées avec divers allèles artificiels du gène  $\beta$  et par les gènes codant les protéines MS2-hUpf3 (cf. [Figure 12.A](#)). Un jour après transfection, les cellules ont été incubées pendant 1 heure en présence ou en absence de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, puis les ARN totaux ont été extraits et les ARNm  $\beta$  normal ou artificiels quantifiés (cf. [Figure 13](#)).



**Figure 13.** Effet du cycloheximide sur la quantité d'ARNm  $\beta$  normal ou artificiels. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les gènes  $\beta$  (lignes 1-2),  $\beta$ -39 (lignes 3-4),  $\beta$ -6MS2 (lignes 5-10),  $\beta$ -GAPDH (lignes 1-10), ainsi que par les gènes exprimant les protéines MS2 (lignes 1-6), MS2-hUpf3a (lignes 7-8) et MS2-hUpf3b (lignes 9-10). Un jour après, les cellules ont été incubées en présence (+) ou en absence (-) de cycloheximide. Les ARNm  $\beta$ ,  $\beta$ -39 et  $\beta$ -6MS2 ont été quantifiés de même que précédemment (cf. [Figure 12.C](#)).

**Question 33.** Analysez et interprétez les résultats obtenus avec les gènes  $\beta$  et  $\beta$ -39. Qu'apportent de plus les résultats obtenus avec le gène  $\beta$ -6MS2 ?

**Question 34.** Récapitulez les étapes de la réponse induite par l'apparition d'une mutation non sens.



**Figure 12. Rôle des protéines hUpf3.**

**A, Recrutement des protéines hUpf3 sur un ARN cible.** On utilise les propriétés de la protéine de capsid du virus MS2 (protéine MS2) qui reconnaît spécifiquement un site sur l'ARN de ce virus (site MS2). Afin de recruter les protéines hUpf3 sur un ARN cible, un ou plusieurs sites MS2 sont introduits sur celui-ci, et des gènes artificiels codant les protéines de fusion hUpf3-MS2 sont construits.

**B, Structure du gène  $\beta$  normal et des allèles artificiels dérivés.** Les rectangles blancs représentent les exons du gène  $\beta$ ; les rectangles noirs, les sites MS2; les rectangles gris, la séquence codante du gène *GAPDH*. Le codon d'initiation ATG est porté par le premier exon des différents allèles du gène  $\beta$ , alors que le codon stop terminal est porté par le dernier exon. Une échelle est donnée (pb = paires de bases).

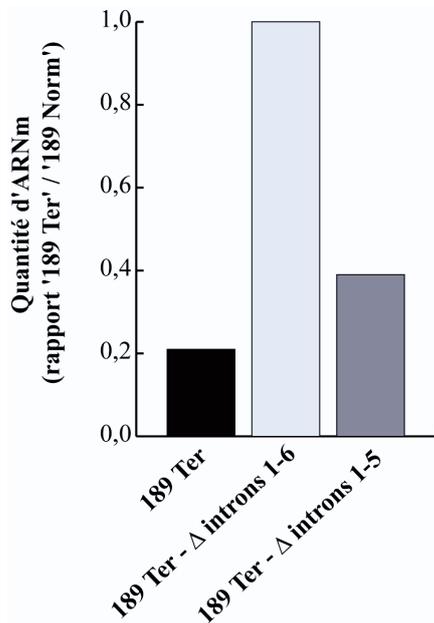
A partir du gène  $\beta$ , plusieurs allèles artificiels ont été générés par mutagenèse :

- 1) L'allèle  $\beta$ -39 présente un codon stop prématuré au niveau du codon 39 (mutation non sens, notée '39 Ter').
- 2) L'allèle  $\beta$ -6MS2 présente 6 sites MS2 insérés dans le dernier exon, en aval du codon stop normal. L'allèle  $\beta$ -TAC-6MS2 lui est semblable, mais le codon stop normal a été remplacé par le codon TAC (codant une tyrosine) et un codon stop terminal a été introduit en aval des sites MS2.
- 3) L'allèle  $\beta$ -GAPDH (contrôle) comporte le gène  $\beta$  (dont le codon stop normal a été remplacé par le codon TAC) fusionné avec la séquence codante du gène *GAPDH*.

**C, Quantification des ARNm  $\beta$ -6MS2.** Des cellules HeLa ont été transfectées avec les gènes  $\beta$ -6MS2 (lignes 1-4) ou  $\beta$ -TAC-6MS2 (lignes 5-8) et  $\beta$ -GAPDH (ligne 1-8), ainsi que par les gènes exprimant les protéines MS2 (lignes 2 et 6), MS2-hUpf3a (lignes 3 et 7) ou MS2-hUpf3b (lignes 4 et 8). Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits et séparés par électrophorèse, puis transférés sur membrane. Après transfert, les ARNm  $\beta$ -6MS2 et  $\beta$ -GAPDH ont été révélés à l'aide de la même sonde radioactive, spécifique du gène  $\beta$ . Pour chaque piste, les quantités d'ARNm  $\beta$ -6MS2 ont été normalisées par rapport au ARNm  $\beta$ -GAPDH. Les nombres en dessous de chaque piste représentent le rapport (en %) de la quantité normalisée d'ARNm  $\beta$ -6MS2 (en présence ou en absence des protéines MS2-hUpf) sur la quantité normalisée d'ARNm  $\beta$ -6MS2 en absence des protéines MS2-hUpf.

**D, Effet de la protéine hUpf1-DN sur la quantité d'ARNm  $\beta$  et  $\beta$ -39.** Des cellules HeLa ont été transfectées avec les gènes  $\beta$  (lignes 1, 3 et 5) ou  $\beta$ -39 (lignes 2, 4 et 6) et  $\beta$ -GAPDH (ligne 1-6), ainsi que par les gènes exprimant la protéine hUpf1 sauvage (hUpf1-wt, lignes 3 et 4) ou une version non fonctionnelle de hUpf1 (hUpf1-DN, lignes 5 et 6). Les ARNm  $\beta$  et  $\beta$ -39 ont été quantifiés de même que précédemment.

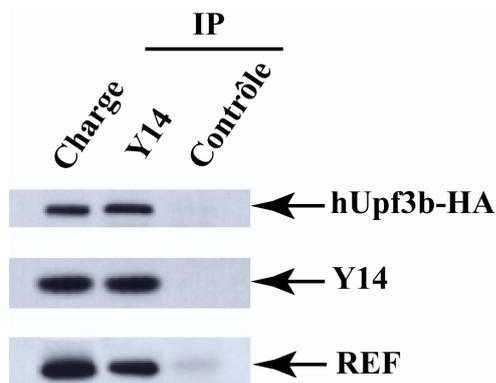
**B-2.2.** Des cellules de souris ont été transfectées par un allèle du gène *TPI* dont les 6 introns ont été éliminés (allèle 'Δ introns 1-6') ou par un allèle *TPI* dont les 5 premiers introns ont été éliminés (allèle 'Δ introns 1-5'), dans le contexte d'allèles possédant ou non la mutation non sens '189 Ter'. Un jour après transfection, les ARN totaux ont été extraits et les ARNm *TPI* quantifiés (cf. Figure 14).



**Figure 14.** Effet de la délétion des introns sur la mutation '189 Ter'. Un allèle du gène *TPI* possédant la mutation '189 Ter' et délété ou non des introns 1 à 6 ('189 Ter - Δ introns 1-6') ou des introns 1 à 5 ('189 Ter - Δ introns 1-5'), a été introduit dans des cellules de souris et, un jour après transfection, les ARNm *TPI* ont été quantifiés comme précédemment à l'aide de la sonde *TPI* (cf. Figure 11.B). La même série d'expériences a été réalisée avec des constructions identiques mais ne possédant pas la mutation '189 Ter' (constructions notées '189 Norm'). Pour chaque construction, les résultats sont exprimés sous forme de rapport de la quantité d'ARNm *TPI* '189 Ter' sur '189 Norm'.

**Question 35.** Analysez et interprétez ces résultats.

Afin de déterminer le rôle de hUpf3b *in vivo*, des cellules HeLa ont été transfectées par un gène codant la protéine hUpf3b fusionnée au peptide HA (hUpf3b-HA). Un jour après transfection, les cellules ont été lysées et les protéines nucléaires soumises à une immunoprécipitation en présence de l'anticorps anti-Y14 (cf. Figure 7.B pour le principe de l'expérience). Ensuite, les protéines co-immunoprécipitées ont été visualisées à l'aide d'anticorps anti-REF et anti-HA (cf. Figure 15).



**Figure 15.** Co-immunoprécipitations (IP) réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa, 24 h après transfection par le gène codant hUpf3b-HA. Les extraits nucléaires de cellules HeLa ('Charge') ont été immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-Y14 ('Y14') ou d'anticorps non spécifiques ('Contrôle'). Après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines ont été transférées sur une membrane. Les protéines hUpf3b-HA, Y14 et REF ont été respectivement détectées à l'aide d'anticorps anti-HA, anti-Y14 et anti-REF couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence du substrat adéquat.

**Question 36.** A quel complexe de protéines appartient la protéine hUpf3b ? A l'aide des résultats de la partie B.1, précisez la composition de ce complexe au moment de la traduction des ARNm.

**Question 37.** Réinterprétez les résultats de la question 35, en expliquant les différences d'effet de la mutation '189 Ter' obtenues dans le contexte d'ARNm *TPI* issus ou non de l'épissage.

**B-2.3.** Bilan.

**Question 38.** Récapitulez les mécanismes moléculaires assurant le contrôle de qualité des ARNm épissés au moment de leur traduction. Réalisez un schéma fonctionnel permettant de comparer le devenir d'un ARNm présentant une mutation non sens avec le devenir d'un ARNm normal.



