SESSION 2008

2nd concours

BIOLOGIE - BIOCHIMIE

École normale supérieure de Lyon

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 13 pages numérotées de 1 à 13

L'usage de tout document est interdit.

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.

Contraction musculaire et poliovirus

Cette épreuve comporte 3 parties indépendantes. Les temps prévisionnels qu'il est suggéré de consacrer à chacune des parties, et qui serviront de base à l'élaboration du barème, sont indiqués entre parenthèses. Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

Partie I. Réflexe myotatique et réponse musculaire (45min)

Question 1

Dans un exposé structuré et illustré basé sur une démarche expérimentale, le candidat présentera le réflexe myotatique et la contraction musculaire associée.

Le poliovirus est l'agent infectieux responsable de la poliomyélite. C'est un entérovirus capable d'infecter les cellules du tube digestif chez l'Homme, mais dans les formes les plus graves de la maladie, les motoneurones peuvent être atteints ce qui provoque des paralysies. Les parties suivantes proposent d'étudier différentes facettes du cycle de reproduction de ce virus.

Partie II. Cycle de réplication du poliovirus (30min)

L'entrée du poliovirus dans les cellules a été étudiée. Pour cela, des virus ont été doublement marqués par des colorants qui émettent une lumière fluorescente lorsqu'ils sont éclairés par des rayons ultra-violets (UV) : un colorant rouge a été fixé sur la capside, et un vert a été fixé sur le matériel génétique du virus. Des cellules ont alors été infectées par ces virus, et observées au microscope différents temps après l'infection. L'utilisation de filtres au niveau du microscope permet de voir l'une ou l'autre des fluorescences lors d'une stimulation par les UV, et l'observation est effectuée sur les cellules vivantes : le microscope utilisé permet de voir uniquement sur une profondeur de 100 à 200nm à partir de la surface cellulaire. Les images suivantes ont été obtenues :

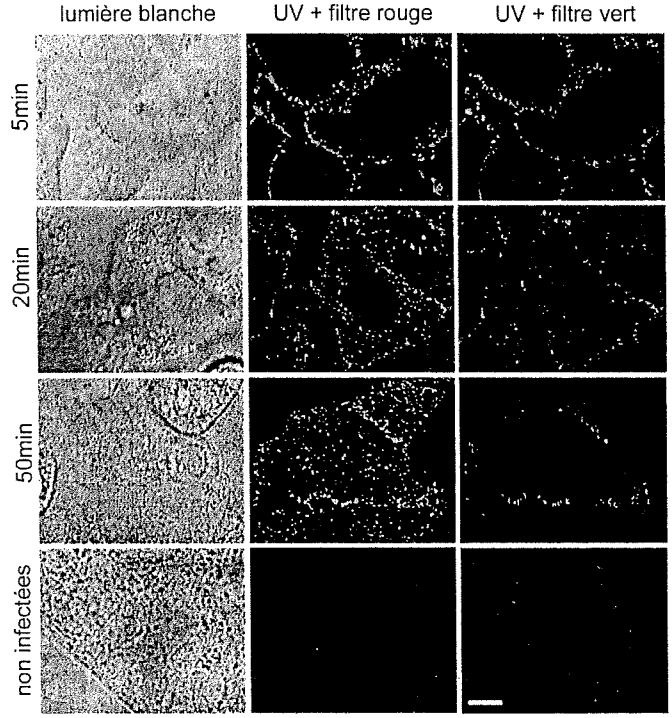

Figure 1 : observation microscopique de cellules en culture infectées ou non par des poliovirus doublement marqués par des molécules fluorescentes. Pour un même groupe de cellules le temps après le début de l'infection est indiqué à gauche et les conditions d'observation sont indiquées en haut des images. La barre représente 10µm.

Question 2

Analysez l'évolution de la fluorescence dans le rouge au cours de l'infection : comment l'interprétez-vous ?
Quelle(s) différence(s) voyez-vous avec l'évolution de la fluorescence dans le vert ? Qu'en concluez-vous ?

Le colorant rouge utilisé dans l'expérience précédente est sensible au pH : il est fluorescent à pH voisin de 7, mais perd sa fluorescence à des pH plus élevés. Les mêmes expériences que celles décrites sur la figure 1 ont été répétées, mais en plaçant les cellules dans un pH=9 juste avant l'observation. Une extinction de la fluorescence dans le rouge a été observée dans les temps précoces (5minutes après l'infection), mais pas dans les temps tardifs.

Question 3

Comment expliquez-vous ce résultat ? Quel modèle pouvez-vous proposer pour l'entrée du poliovirus dans les cellules ?

Afin d'étudier la suite du cycle viral, des cellules en culture ont été infectées par le poliovirus. A différents temps après l'infection, les cellules ont été lysées et analysées pour leur contenu en protéines virales, en ARN viral de polarité positive (c'est à dire dont la séquence correspond aux protéines virales après traduction) et en ARN viral de polarité négative (de séquence complémentaire à celle des ARN de polarité positive). Les résultats suivants ont été obtenus :

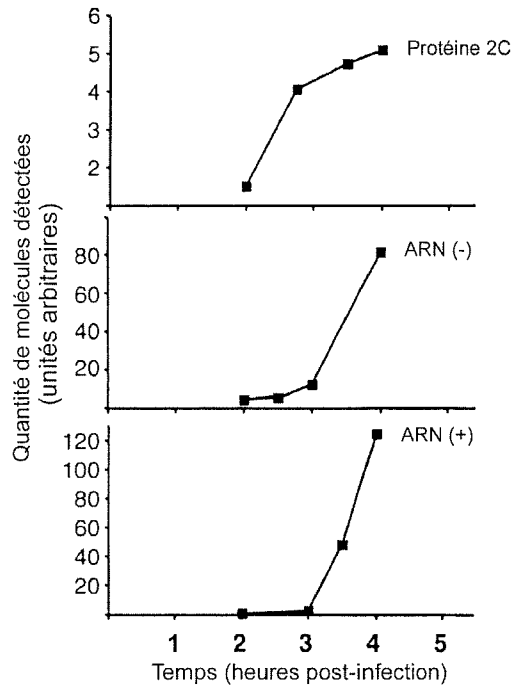

Figure 2 : cinétique d'apparition de la protéine 2C du poliovirus (en haut), des ARN viraux de polarité négative (au milieu), et des ARN viraux de polarité positive (en bas) dans des cellules infectées par le poliovirus. La quantification est effectuée en unités arbitraires.

Question 4

Analysez les résultats obtenus. Quelle est la première étape du cycle de réplication du poliovirus ? De quelle nature semble être le matériel génétique du poliovirus ? Proposez un modèle pour sa réplication.

Les conséquence d'une infection par le poliovirus sur l'architecture cellulaire ont été étudiées en microscopie électronique. Des images de ce type ont été obtenues :

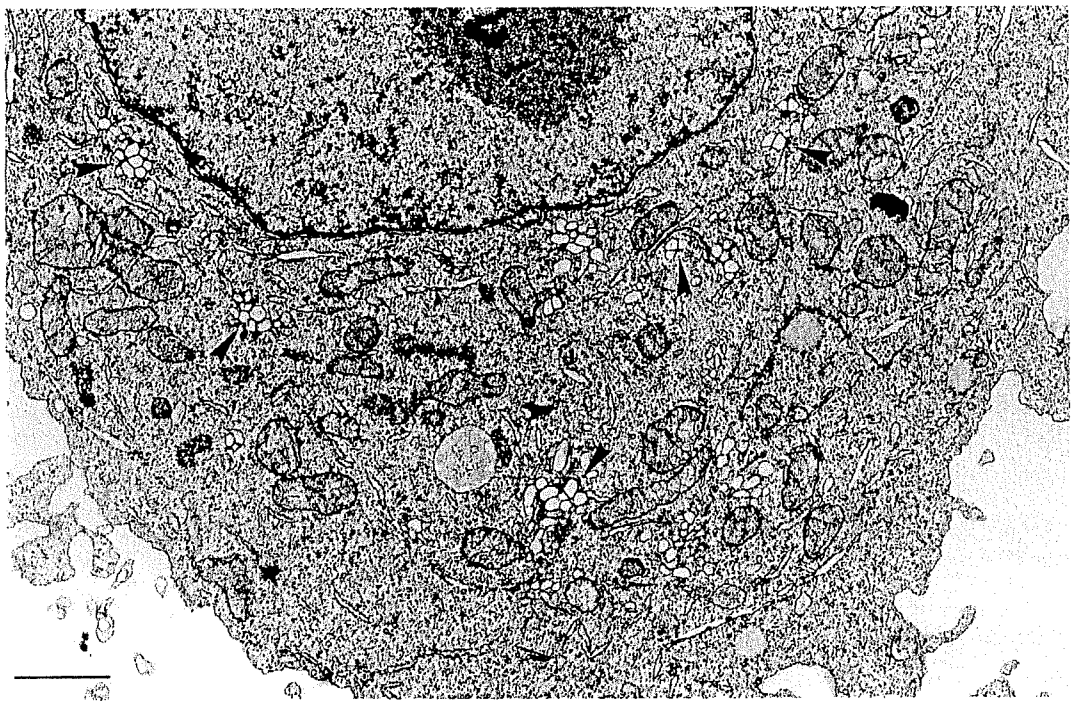

Figure 3 : micrographie électronique d'une cellule après 2 heures d'infection par le poliovirus. La barre représente 1µm.

Question 5

Réalisez un rapide croquis de cette image en positionnant les éléments cellulaires que vous reconnaissez.
Quelles différences voyez-vous avec une cellule non infectée ?

Des cellules infectées ou non par le poliovirus ont été fixées sur des lames de verre, puis incubées avec un oligonucléotide reconnaissant spécifiquement l'ARN viral de polarité négative. Cet oligonucléotide est par ailleurs couplé à une molécule fluorescente, ce qui permet d'obtenir des images de ce type lors de l'observation au microscope :

Figure 4 : détection de l'ARN viral de polarité négative dans une cellule non infectée (à gauche) ou infectée (à droite) par le poliovirus à l'aide d'une sonde fluorescente.

Question 6

Analysez les images obtenues. Comment expliquez-vous la fluorescence observée sur la cellule de gauche ? Comment qualifieriez-vous la distribution de la fluorescence dans la cellule de droite ? Quel rôle pouvez-vous attribuer aux structures mises en évidence dans la figure 3 ?

Question 7

Comment imaginez-vous le cycle de réplication du poliovirus ? Représentez-le sur un schéma.

Partie III. Poliovirus et expression génétique (1h45)

A. Effet d'une infection sur l'expression des protéines cellulaires

La production de protéines par des cellules infectées par le poliovirus a été étudiée. Pour cela des cellules en culture ont été infectées par le poliovirus, laissées une ou plusieurs heures dans un milieu normal puis placées pendant une heure dans un milieu contenant de la méthionine radioactive. Les cellules ont alors été lysées et les protéines déposées sur un gel d'acrylamide. Après migration en conditions dénaturantes, ce qui permet de séparer les protéines uniquement en fonction de leur masse moléculaire, le gel a été séché et exposé à un film radio. L'image suivante a été obtenue :

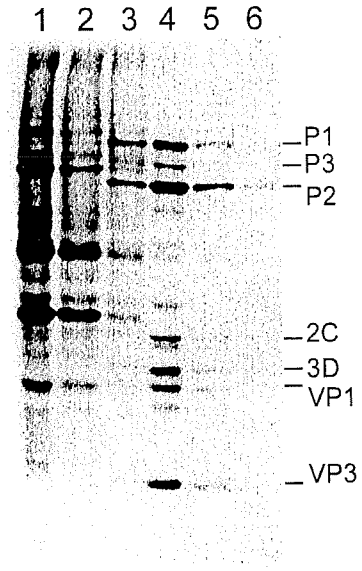

Figure 5 : cinétique de production des protéines dans des cellules infectées par le poliovirus. La durée d'infection (en heures) est indiquée en haut des pistes et certaines protéines virales sont identifiées sur la droite.

Question 8

Que se passe-t-il au cours des deux premières heures de l'infection ? Quelles hypothèses pouvez-vous émettre pour l'expliquer ?
Que se passe-t-il ensuite aux temps 3 et 4 heures ? Et aux temps 5 et 6 heures ? Comment l'expliquez-vous ? Représentez sur un schéma les différentes phases de l'expression protéique au cours d'une infection par le poliovirus.

Afin de comprendre à quelle étape de l'expression génétique cellulaire le poliovirus interfère principalement, une analyse de cellules infectées ou non par le poliovirus a été effectuée. Des lysats de ces cellules ont été soumis à une ultracentrifugation permettant de culotter les ribosomes ainsi que les protéines et les ARN associés à ces ribosomes, en laissant les autres protéines et ARN dans le surnageant. La synthèse protéique a ensuite été mesurée par incorporation de méthionine radioactive par les différentes combinaisons possibles de culots et de surnageants :

		Surnageant	
		Cellules non infectées	Cellules infectées
Culot	Cellules non infectées	2077	2022
	Cellules infectées	228	203

Tableau 1 : incorporation de méthionine radioactive dans des lysats cellulaires reconstitués à partir de culots et de surnageants de cellules infectées ou non par le poliovirus. Les résultats sont exprimés en coups par minute.

Question 9

En interprétant ces expériences de reconstitution de lysats cellulaires, dites sur quelle étape de l'expression génétique cellulaire le poliovirus vous semble jouer un rôle prépondérant et pourquoi.

B. Poliovirus et facteurs d'initiation de la traduction

Chez les Eucaryotes, l'initiation de la traduction passe par la reconnaissance de l'extrémité 5' des ARN messagers par la petite sous-unité ribosomale qui glisse ensuite le long de l'ARNm jusqu'au codon initiateur. Ces phénomènes impliquent de nombreuses protéines, appelés facteurs d'initiation (eIF pour eucaryotic Initiation Factor). Cette partie se propose d'analyser l'effet d'une infection par le poliovirus sur certains de ces facteurs.

L'état de différents facteurs d'initiation de la traduction a été analysé lors d'une infection par le poliovirus. Pour cela, des cellules en culture ont été infectées, puis lysées et leurs protéines ont été déposées sur des gels d'acrylamide. Après migration en conditions dénaturantes, les protéines ont été transférées sur des membranes, qui ont ensuite été incubées avec différents anticorps couplés à une enzyme dont l'activité peut être facilement détectée (technique du western blot). Ces anticorps ont été obtenus dans le sérum de lapins immunisés par injection des protéines eIF4E, ou des protéines p116 et p110 (deux sous-unités du facteur multiprotéique eIF3), ou de la région de eIF4G allant des acides aminés 1639 à 1666. Un marqueur de taille est soumis simultanément à l'électrophorèse afin d'estimer la taille des protéines visualisées en kilodaltons (kDa). Après lavage des membranes et révélation de la réaction enzymatique, les images suivantes ont été obtenues :

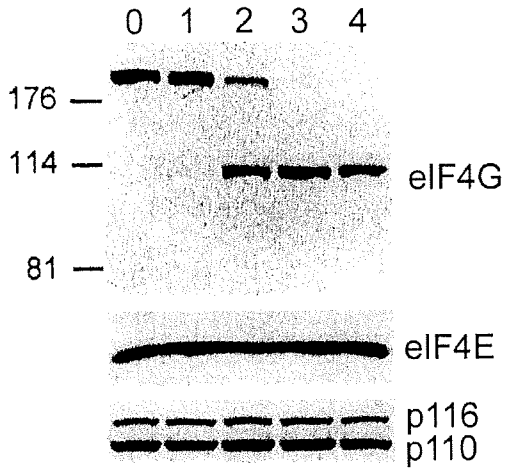

Figure 6 : détection des protéines eIF4G (membrane du haut), eIF4E (membrane centrale) et p110/p116 (membrane du bas) par western blot dans des extraits de cellules infectées par le poliovirus. Le temps après le début de l'infection est indiqué en heures en haut de la figure et les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués pour la membrane du haut à gauche de la figure en kilodaltons.

Question 10

Analysez les résultats obtenus. On rappelle que la masse moléculaire moyenne d'un acide aminé est de 110Da.

Afin de déterminer quelle(s) protéine(s) virale(s) étai(en)t responsable(s) de cette modification de eIF4G, des ARN permettant l'expression de différentes protéines virales ont été introduits dans des cellules en culture. La synthèse des protéines cellulaires a alors été analysée comme précédemment par incorporation de méthionine radioactive. Sur les mêmes extraits cellulaires, un western blot a été réalisé à l'aide d'anticorps reconnaissant la protéine eIF4G dans son ensemble. Les résultats suivants ont été obtenus :

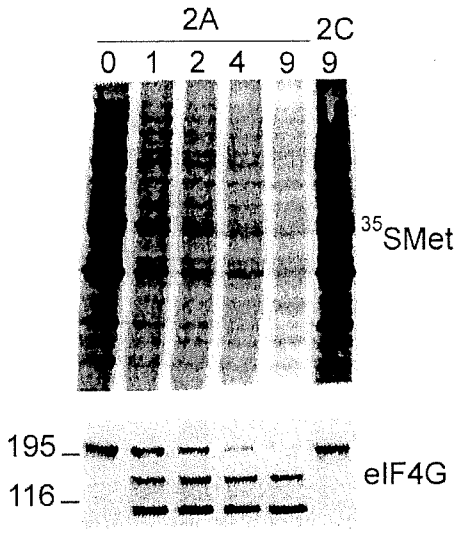

Figure 7 : analyse des protéines de cellules transfectées par des ARN permettant l'expression des protéines 2A ou 2C du poliovirus. La totalité des protéines cellulaires (panneau du haut, marquage à la méthionine ^{35}S) ou la protéine eIF4G (panneau du bas, western blot) ont été analysées en parallèle. La quantité d'ARN transfectés est indiquée en µg en haut des pistes, et les marqueurs de masse moléculaire en kilodaltons à gauche du western blot.

Question 11

Comparez ces résultats à ceux obtenus dans les figures 5 et 6.
Précisez le devenir de la protéine eIF4G sachant que cette protéine porte, dans sa région N-terminale (premiers acides aminés), des résidus glycosylés qui retardent sa migration sur gel d'acrylamide.
Comment qualifieriez-vous l'activité de la protéine 2A du poliovirus ?

C. Analyse de la fonction du facteur eIF4G

Afin de mieux comprendre le rôle de eIF4G dans l'initiation de la traduction en contexte normal et dans celui d'une infection par le poliovirus, ses relations avec d'autres facteurs d'initiation ont été étudiées. Pour cela, des extraits de cellules infectées ou non par le poliovirus ont été déposés sur gel d'acrylamide. Après migration en conditions dénaturantes, les protéines ont été transférées sur des membranes, qui ont été incubées soit avec un anticorps reconnaissant l'ensemble de la protéine eIF4G, soit avec la protéine eIF4E marquée radioactivement. Après révélation les images suivantes ont été obtenues :

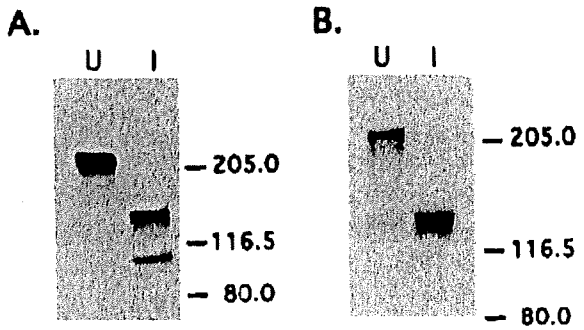

Figure 8 : western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre la protéine eIF4G entière (A) ou à l'aide d'une protéine eIF4E marquée radioactivement (B). L'origine des extraits cellulaires, infectés (I) ou non (U) par le poliovirus est indiquée en haut des pistes et les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués en kilodaltons à droite des membranes.

Question 12

Comment expliquez-vous le signal obtenu dans la figure 7B avec les cellules non infectées (U) ? Quelle est la conséquence d'une infection par le poliovirus sur les relations entre eIF4G et eIF4E ?

Chez les Eucaryotes, une structure particulière appelée coiffe est présente à l'extrémité 5' des ARN messagers. Les relations de eIF4E avec des ARN possédant ou non une coiffe ont été analysées par des expériences de retard sur gel. Pour cela, des ARNm coiffés ou non ont été

marqués radioactivement. Ces ARN marqués ont ensuite été incubés *in vitro* avec la protéine eIF4E, en présence ou non de protéase K (capable de détruire n'importe quelle protéine), d'anticorps anti-eIF4E, ou d'ARNm coiffés froids. Le contenu des différents tubes a été ensuite mis à migrer sur un gel d'électrophorèse, dans des conditions non dénaturantes. Dans ces conditions, les ARN libres migrent rapidement en bas du gel, alors que les complexes impliquant plusieurs molécules sont retardés. Le gel a été enfin séché et exposé à un film radio. Les images suivantes ont été obtenues :

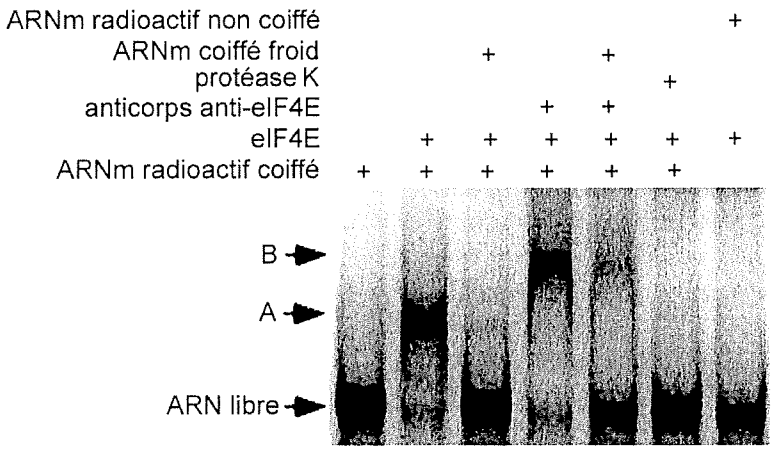

Figure 9 : retard sur gel réalisé avec des ARNm marqués coiffés ou non. La composition des différentes réactions est indiquée en haut des pistes (le signe + indique la présence du composé considéré).

Question 13

Représentez à l'aide d'un schéma ce qui se passe dans les différentes réactions. A quoi correspondent les signaux "A" et "B" ?
Quelle conclusion en tirez-vous sur le rôle possible du facteur eIF4E ?

Les relations entre la protéine eIF4G et le facteur multiprotéique eIF3 ont également été étudiées. Pour cela, l'expression de différents fragments de la protéine eIF4G, fusionnés à une étiquette FLAG (une courte séquence d'acides aminés contre laquelle des anticorps spécifiques ont pu être obtenus) a été induite dans des cellules en culture. Ces cellules ont ensuite été lysées, et les lysats obtenus ont été incubés avec des anticorps anti-FLAG fixés sur des billes permettant de précipiter les complexes protéiques qui leur sont liés. Après précipitation et lavages, les protéines ont été décrochées des billes, déposées sur gel d'acrylamide et soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes. Un western blot a alors été réalisé comme précédemment à l'aide d'un anticorps anti-FLAG ou d'un anticorps dirigé spécifiquement contre une des protéines composant le facteur eIF3, p116. Après révélation les images suivantes ont été obtenues :

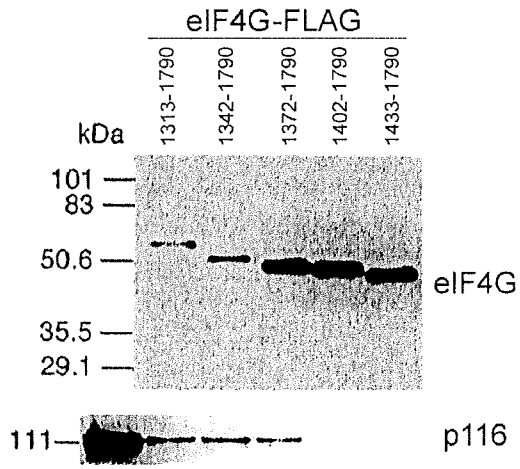

Figure 10 : détection des protéines eIF4G-FLAG (panneau du haut) et de p116 (panneau du bas) par western blot après immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-FLAG. Les numéros des acides aminés présents dans les différents fragments de eIF4G sont indiqués en haut des pistes, et les marqueurs de masse moléculaires sont indiqués en kilodaltons à gauche des panneaux. Dans la piste la plus à gauche du panneau du bas un extrait cellulaire total avant immunoprécipitation a été déposé.

Question 14

Représentez à l'aide d'un schéma les différentes étapes de l'expérience. Pourquoi utilise-t-on une étiquette FLAG et les anticorps associés plutôt que ceux dirigés contre la protéine eIF4G ?

Question 15

Analysez les résultats obtenus. Qu'en concluez-vous sur les relations existant entre eIF4G et eIF3 ?

Le rôle du facteur eIF3 dans l'initiation de la traduction a été étudié. Une protéine de ce complexe a été marquée radioactivement et incubée dans un lysat cellulaire total. Le lysat a ensuite été déposé à la surface d'un gradient de saccharose (c'est à dire un tube contenant une solution de saccharose de plus en plus concentrée en allant vers le fond du tube) et soumis à une ultracentrifugation. Dans ces conditions les différents composants cellulaires migrent dans le gradient en fonction de leur densité : plus ils sont denses, plus ils vont vers le fond du tube. A la fin de la centrifugation, les différentes "couches" de composants cellulaires ont été récupérées, et sur les différentes fractions obtenues ont été mesurées l'absorbance à 254nm (correspondant à la présence d'ARN ribosomal) d'une part et la radioactivité d'autre part. Les résultats suivants ont été obtenus :

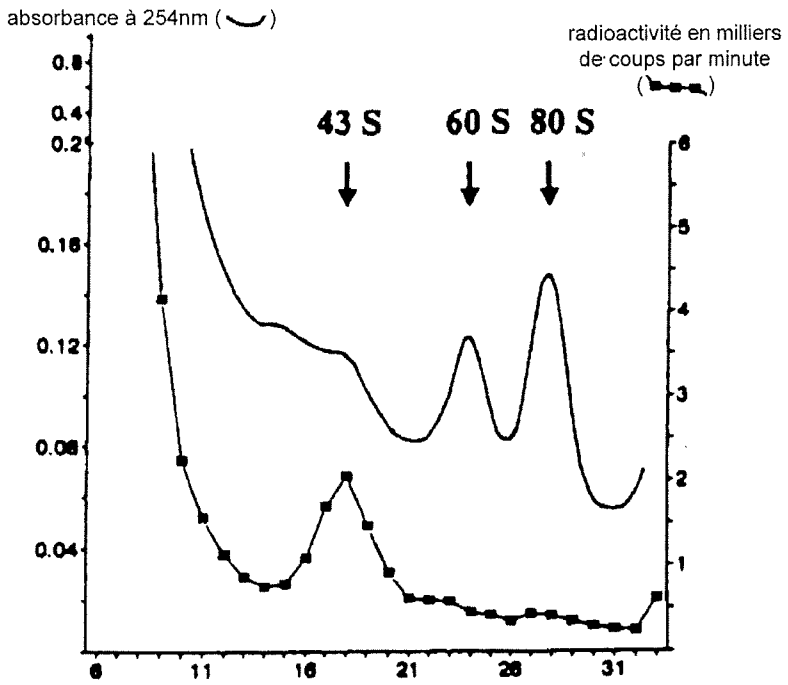

Figure 11 : distribution de l'absorbance à 254nm et de la radioactivité après ultracentrifugation sur gradient de saccharose d'un lysat cellulaire contenant la protéine p116 marquée. Les numéros des fractions sont indiqués en bas de la figure. Les coefficients de sédimentation des principaux pics observés sont indiqués en Svedberg (S).

Question 16

A quoi correspondent les pics d'absorbance observés à 60S et 80S sachant que si le lysat avait été réalisé avec des bactéries, les chiffres obtenus auraient été 50S et 70S ?
A quoi pourrait correspondre le pic observé à 43S ? Qu'en déduisez-vous sur la fonction possible du facteur eIF3 ?

Afin de mieux comprendre les relations entre les protéines eIF4G, eIF4E, le facteur multiprotéique eIF3, la coiffe des ARN messagers et les ribosomes, deux expériences ont été réalisées : un lysat cellulaire total dépourvu d'ARNm est incubé ou non avec la protéine 2A du poliovirus, puis avec des billes portant une structure semblable à la coiffe des ARN

messagers. Les réactions sont alors déposées sur de petites colonnes laissant s'écouler le liquide (constituant la fraction E) mais pas les billes ni ce qui leur est associé. Après lavage, toutes les protéines restantes sont décrochées des billes par un réactif, ce qui s'écoule des colonnes constitue alors la fraction B. D'autre part, ce lysat est également soumis à une ultracentrifugation permettant de séparer les ribosomes et tout ce qui leur est associé (fraction C), du surnageant (fraction S). Les différentes fractions sont alors soumises à des western blot comme précédemment en utilisant des anticorps dirigés contre eIF4G, eIF4E et p116. Les résultats suivants ont été obtenus :

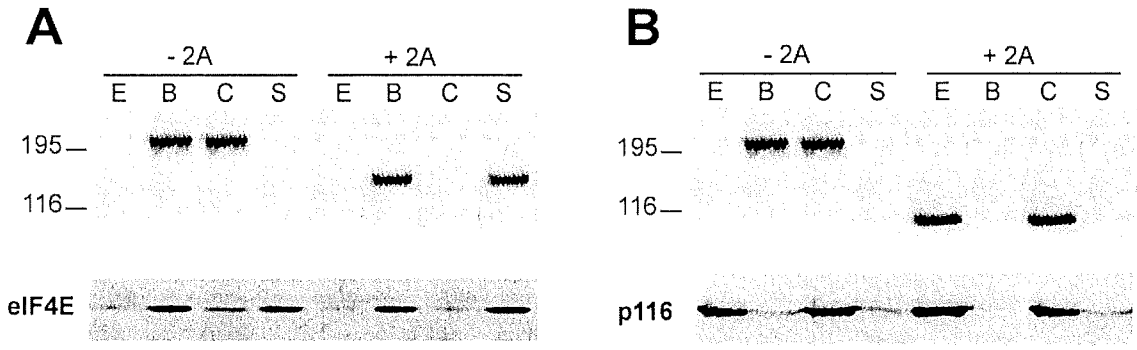

Figure 12 : panneaux du haut : détection de la protéine eIF4G avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les acides aminés 270 à 282 (A) ou 1639 à 1666 (B). Panneaux du bas : détection de la protéine eIF4E (A) et p116 (B). Les différentes fractions déposées sont indiquées en haut des pistes (E : fraction exclue de la colonne, B : fraction liée aux billes, C et S : culot et surnageant de centrifugation). L'incubation préalable des lysats avec la protéine 2A est indiquée en haut des pistes (-2A ou +2A). Les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués à gauche des gels supérieurs en kilodaltons.

Question 17

Représentez sur un schéma les différentes étapes de ces expériences.
Analysez les résultats obtenus en comparant notamment les parties A et B de la figure.

Question 18

Sur un schéma représentant la protéine eIF4G, faites un bilan de l'ensemble des résultats obtenus. Comment qualifieriez-vous le rôle de cette protéine dans l'initiation de la traduction en contexte normal ? Que se passe-t-il lors d'une infection par le poliovirus ?

D. Mécanisme de traduction des protéines virales

Afin de comprendre comment les protéines virales sont produites au cours d'une infection par le poliovirus, la région 5' des ARN viraux a été étudiée. Cette étude a montré que ces ARN possédaient à leur extrémité 5', une protéine qui leur est liée covalemment, nommée VpG. Par ailleurs une analyse structurale de cette région 5' donne les résultats suivants :

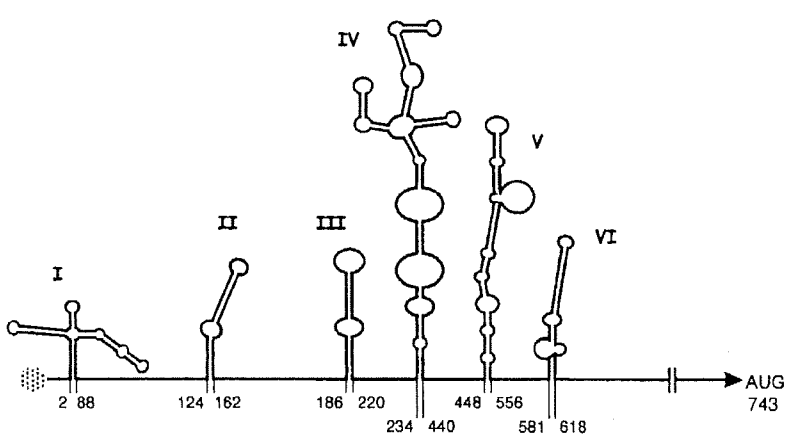

Figure 13 : modèle représentant la structure secondaire de la région 5' de l'ARN du poliovirus. Les différentes structure en tige-boucle sont identifiées par des chiffres romains. Les chiffres arabes représentent le 1er et le dernier nucléotide de chaque tige-boucle. La protéine VpG est représentée en grisé.

Question 19

Comment une telle structure peut-elle se former ?

Question 20

Rappelez l'allure générale d'un ARNm eucaryote normal. En quoi la région 5' de l'ARN du poliovirus rend-elle peu probable une production des protéines virales selon le mécanisme utilisé pour produire les protéines cellulaires ?

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette région, nommée IRES, ses relations avec la protéine eIF4G ont été étudiées. Pour cela, différents fragments de la protéine ont été produits *in vitro*, puis incubés ou non avec la séquence IRES du poliovirus marquée radioactivement. Les mélanges réactionnels ont alors été soumis à un traitement aux UV, qui permet de fixer fortement les protéines et les ARN qui sont en contact. Les ARN non protégés sont alors digérés par des RNases, puis les réactions sont déposées sur gel d'acrylamide. Après migration en conditions dénaturantes, le gel est soit séché et exposé à un film radio, soit traité avec un réactif révélant toutes les protéines présentes. Les résultats suivants ont été obtenus :

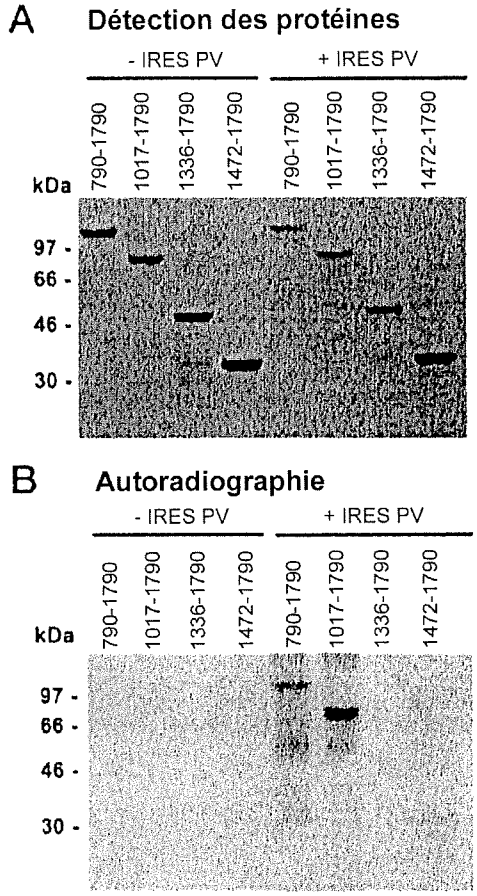

Figure 14 : différents fragments de la protéine eIF4G ont été incubés (+ IRES PV) ou non (- IRES PV) avec un ARN correspondant à la séquence IRES du poliovirus. Après traitement aux UV et migration, les gels sont soumis à une détection des protéines (panneau A) ou exposés à un film radio (panneau B). Les numéros des acides aminés présents dans les différents fragments de eIF4G sont précisés en haut des pistes. Les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués à gauche des gels en kilodaltons.

Question 21

Représentez sur un schéma les différentes étapes de l'expérience.
Comment expliquez-vous le signal observé après autoradiographie ?
Quelle hypothèse pouvez-vous formuler sur le rôle de la séquence IRES du poliovirus dans la synthèse des protéines virales ? Quelle serait la fonction de la protéine eIF4G dans ce contexte ?

Afin de mieux comprendre ce rôle, une lignée cellulaire capable de produire seulement la protéine 2A du poliovirus a été établie. Cette protéine s'exprime en présence d'un inducteur (On) mais pas en son absence (Off). Différents ARN ont ensuite été introduits dans ces cellules : tous comportent la séquence codant pour une même enzyme, la luciférase, mais en amont de cette séquence est placée soit la région 5' non traduite de la luciférase, soit cette même région avec une coiffe à l'extrémité 5', soit la séquence IRES du poliovirus. Après 3 ou 6 heures d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase mesurée. Les résultats suivants ont été obtenus :

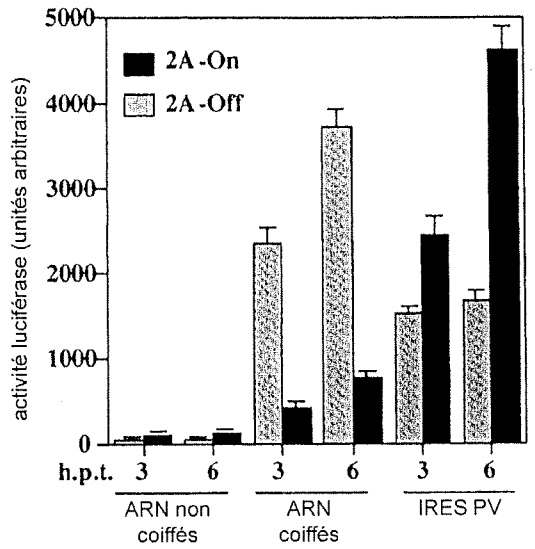

Figure 15 : activité luciférase (mesurée en unités arbitraires) de lysats de cellules dans lesquelles a été induite (2A-On) ou non (2A-Off) l'expression de la protéine 2A avant transfection par différents ARN (indiqués en bas des histogrammes) codant pour la Luciférase. h.p.t : heures post-transfection.

Question 22

Analysez les résultats obtenus. Que pouvez-vous en déduire sur les différences d'effet de la protéine 2A sur les ARN cellulaires et les ARN viraux ?

Question 23

En reprenant les réponses aux questions 5 à 17, représentez sur un schéma un modèle de ce qui se passe au niveau de la synthèse des protéines lors d'une infection par le poliovirus.

La poliomyélite connu une grande expansion au début du XXe siècle jusqu'à l'apparition des premiers vaccins, notamment celui obtenu par Sabin, constitué de souches de virus vivants atténués. Les séquences des ARN de ces virus ont été étudiées (figure 16), et des expériences semblables à celle présentée dans la figure 15 ont été réalisées dans des cellules en culture (figure 17).

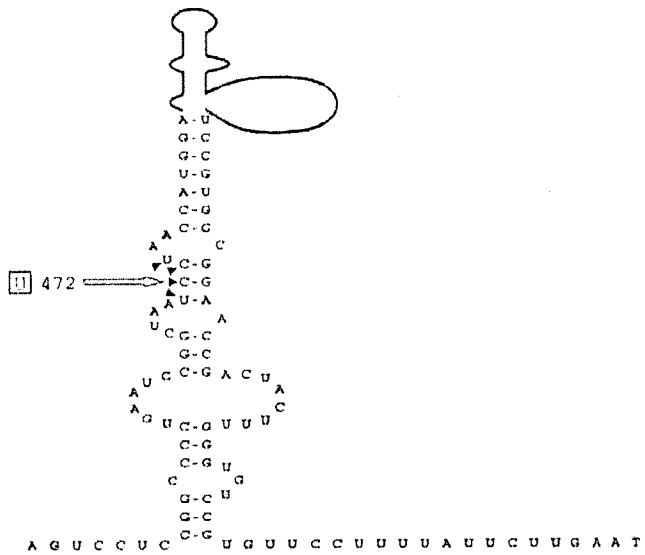

Figure 16 : Domaine V de la région 5' de l'ARN du poliovirus. La différence entre la souche sauvage (Leon) et la souche Sabin 3 est indiquée par une flèche. Les nucléotides sensibles à la RNase dans la souche Sabin mais pas dans la souche sauvage sont indiqués par des triangles.

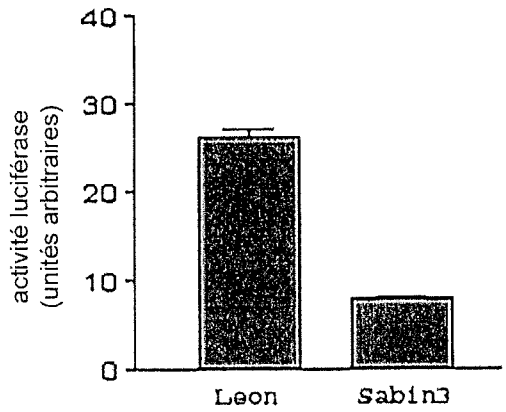

Figure 17 : activité luciférase (mesurée en unités arbitraires) de lysats de cellules transfectées par des ARN codant pour la Luciférase et portant dans leur région 5' la séquence IRES de la souche Léon ou de la souche Sabin 3.

Question 24

Quelles sont les conséquences structurales et fonctionnelles de la mutation observée dans la souche Sabin 3 ?
Comment expliquez-vous son emploi en tant que souche vaccinale ?