

Ecole Normale Supérieure de Lyon

Concours d'admission session 2012

Filière : second concours

Epreuve de Biologie-Biochimie

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 13 pages numérotées de 1 à 13

Cette épreuve comporte 4 parties qui peuvent être traitées de façon indépendante. 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 ci-dessous :

- Partie I. Rôles du groupement phosphate dans la cellule (30 min)
- Partie II. Particularité de l'expression de l'argininosuccinate lyase humaine (30 min)
- Partie III. Quelques aspects de la régulation de la luminescence chez *V. fischeri* (1h30)
- Partie IV. Particularités de l'expression de *mod(mdg4)* chez la drosophile (30 min)

Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

L'usage de tout document et de calculatrice est interdit

I. Rôles du groupement phosphate dans la cellule.

Question 1. Que savez-vous des divers rôles biologiques du groupement phosphate dans les cellules ? Vous pouvez utiliser des schémas. Votre exposé doit tenir sur une page, figure(s) non comprise(s) ; soyez complet et concis.

II. Particularités de l'expression de l'argininosuccinate lyase humaine

L'argininosuccinate lyase (ASL) est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse réversible de l'argininosuccinate en arginine et fumarate, une réaction importante pour la détoxification de l'ammoniaque via le cycle de l'urée et pour la biosynthèse de l'arginine. Des mutations dans le gène ASL sont responsables de l'acidurie argininosuccinique, une maladie grave touchant 1 nouveau-né sur 70 000.

L'enzyme a été purifiée puis analysée par chromatographie d'exclusion stérique. Dans cette technique, l'enzyme sous sa forme active est déposée au sommet d'une colonne contenant un gel de chromatographie, et migre vers le bas de la colonne entraînée par une solution tamponnée. L'enzyme reste active tout au long de son trajet. Les auteurs notent le volume de solvant nécessaire à l'élution de la protéine. Ils chromatographient de même du chymotrypsinogène, de l'ovalbumine et de la catalase purifiée, de masse connue. La Figure 1 représente le volume d'élution K_{AV} en fonction de la masse moléculaire apparente des différentes protéines analysées.

Par ailleurs, les auteurs ont soumis la protéine purifiée à une analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide après chauffage en présence de sodium dodécylsulfate (SDS), un détergent puissant dénaturant les protéines, et de β mercaptoéthanol, un agent réduisant les ponts disulfures. Ils ont fait de même pour d'autres protéines. La Figure 2 représente la distance relative de migration dans le gel de chaque protéine en fonction de sa masse moléculaire apparente.

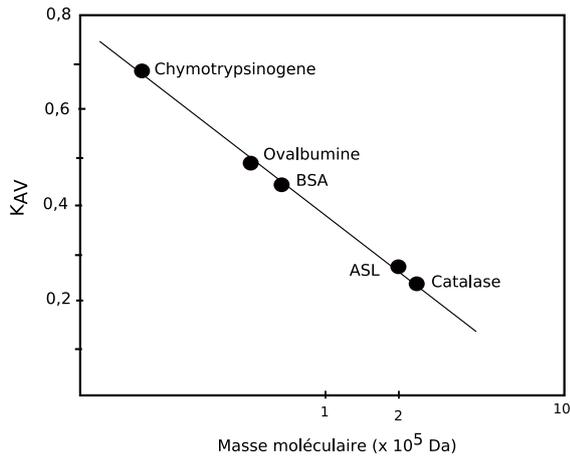


Figure 1 : analyse chromatographique de l'ASL

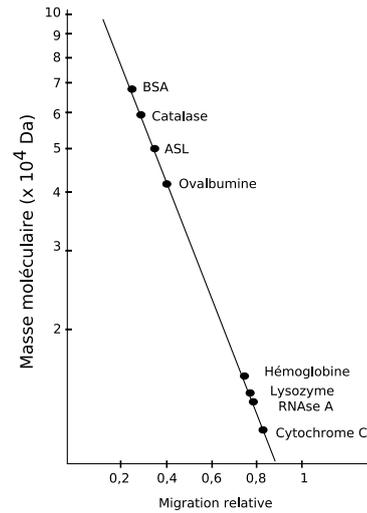


Figure 2 : Analyse de l'ASL par électrophorèse dénaturante en gel d'acrylamide.

Question 2. Quelle information capitale apporte l'analyse combinée de ces deux figures ?

De nombreuses mutations affectant le gène codant ASL ont été identifiées chez des patients souffrant d'acidurie argininosuccinique. Deux ont été particulièrement étudiées : le remplacement d'un acide aspartique (D) par une glycine (G) en position 87 (mutation notée D87G) et le remplacement d'une glutamine (Q) par une arginine (R) en position 286 (Q286R). Les auteurs ont forcé des cellules appelées COS à produire les protéines mutantes. Pour cela, ils ont inséré individuellement les séquences des gènes mutants correspondant dans des vecteurs capables d'exprimer ces gènes. Ils se sont ensuite servi de ces constructions vecteurs+gène pour « transférer » les cellules, c'est-à-dire faire pénétrer le gène d'intérêt dans le noyau de la cellule. Ils ont ensuite cultivé ces cellules transfectées et ils en ont extrait les protéines d'une part, et mesuré l'activité de l'ASL, d'autre part.

La Figure 3 présente le résultat de l'analyse, par western-blot, des protéines extraites. Les protéines sont préparées et soumises à l'électrophorèse comme pour l'analyse en gel de polyacrylamide décrite précédemment. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane, qui est comme une réplique du gel. La présence d'ASL est alors détectée à l'aide d'un antisérum reconnaissant aussi bien les protéines ALS mutantes que sauvage. Une bande sur une piste du gel signe la présence de la protéine d'une manière quantitative. Outre les cellules transfectées par D87G ou par Q286R, les auteurs ont inclus des cellules transfectées doublement, c'est-à-dire par les deux gènes mutants (D87G/Q286R), des cellules non transfectées (notées COS) et des cellules transfectées par un vecteur portant le gène sauvage (Wild-Type en anglais, noté WT). Une échelle de masse moléculaire (notée MW standards) permet d'étalonner l'analyse.



Figure 3 : Analyse par western blot avec un sérum dirigé contre la protéine ASL. Trois essais sont représentés pour chaque transfection.

Question 3. Que dire de l'expression des différentes protéines dans cette expérience ?

Le Tableau 1 rapporte les mesures de quantité de protéines ASL (par western-blot comme ci-dessus) et les mesures et calculs d'activité d'ASL dans différentes cellules transfectées avec les constructions indiquées. Les auteurs dosent l'activité de chaque échantillon à partir d'extraits protéiques totaux (contenant toutes les protéines cellulaires) dont ils mesurent par ailleurs la quantité totale de protéines.

Tableau 1

Construction	Quantité relative d'ASL (%) ^a	Activité ASL (pmol/min/mg) ^b	Activité ASL relative (%) ^c	Activité ASL spécifique (pmol/min/mg) ^d	Activité ASL spécifique relative (%) ^e
WT	100±19	1900±150	100±8	2000±330	100±16
D87G	18.5±4.8	15±7.9	0.79±0.41	92±42	4.5±2
Q286R	23.15±2.0	<1.0	<0.001	0.93±0.15	<0.05
D87G/Q286R	22.5±7.9	130±2.4	6.9±0.13	610±89	30±4.4
Néant	0	0	-	-	-

Données présentées ± l'écart-type calculé sur les trois essais pour chaque construction

^a Pourcentage par rapport à la bande de l'échantillon WT

^b Activité ASL par mg de protéine cellulaires totales

^c Pourcentage de l'activité obtenue avec la construction WT

^d Activité ASL par mg de protéine cellulaires totales et rapportée à l'intensité de la bande détectée par western blot pour chaque échantillon

^e Pourcentage de l'activité spécifique obtenue avec la construction WT

Question 4. Quels sont les résultats remarquables des expériences rapportées dans ce tableau?

Question 5. Pouvez vous bâtir une hypothèse susceptible d'expliquer ces résultats ?

III. Quelques aspects de la régulation de la bioluminescence chez la bactérie *Vibrio fischeri*.

La régulation de l'expression des gènes chez les procaryotes a mis en lumière des mécanismes moléculaires sous-jacents très divers. Nous nous intéresserons à la régulation de la bioluminescence chez la bactérie *Vibrio fischeri*, un organisme modèle étudié depuis plus de 40 ans. *V. fischeri* vit en symbiose avec des animaux marins ou à l'état libre dans la mer. En association symbiotique, la bactérie est luminescente. L'enzyme luciférase est une monoxygénase bactérienne qui confère ces propriétés de bioluminescence en catalysant la réaction suivante :



Dans la réaction, une molécule RCHO d'aldéhyde à longue chaîne aliphatique, produite par la bactérie, est oxydée pour donner un acide carboxylique en utilisant de l'oxygène et une molécule réduite de flavine mononucléotide FMNH₂. Une FMN est produite en émettant une lumière bleu-vert. Il est rappelé que FMNH₂ dérive du pouvoir réducteur de la cellule, *via* l'oxydation de NADH par une FMN réductase.

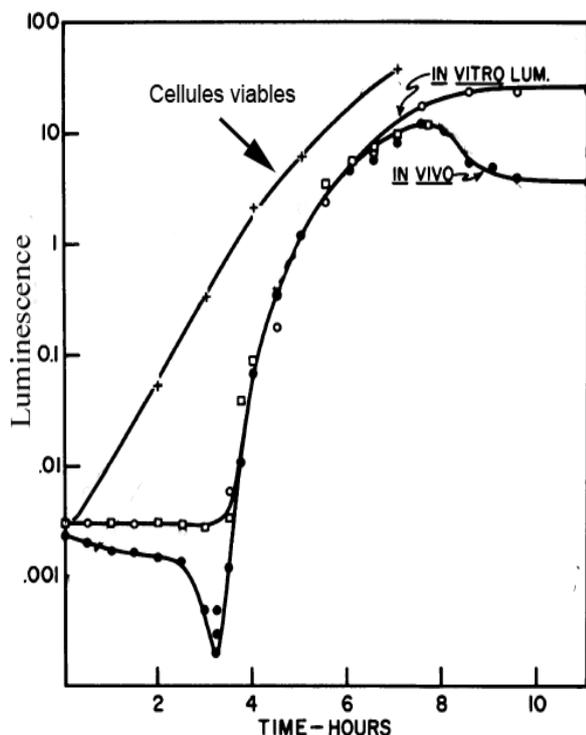


Figure 4 Evolution de l'émission de lumière par une culture de *V. fischeri*, au cours du temps.

La Figure 4 présente des courbes de croissance et de luminescence en fonction du temps de culture des bactéries (TIME-HOURS). Le nombre de cellules viables (unité=10⁸ cellules/ml) et l'intensité lumineuse (unité = 2 x 10¹⁰ quanta.s⁻¹.ml⁻¹) sont rapportés sur une échelle logarithmique. Pour l'intensité lumineuse, deux courbes ont été tracées. La courbe « *in vivo* » représente la quantité de lumière émise mesurée directement dans la culture, la courbe « *in vitro* » représente l'activité de la luciférase extraite des bactéries, purifiée, et mise en contact avec ses substrats. Les auteurs ont aussi dosé la quantité de luciférase ; la courbe de ce dosage est exactement superposée à la courbe « *in vitro* »

Question 6. Commentez cette figure.

Question 7. Pourquoi les auteurs ont-ils procédé à deux types de mesure de lumière différents ? En particulier, en quoi la mesure « *in vitro* » est elle importante ?

Pour mieux analyser les résultats de la Figure 4 en particulier le comportement des cultures pendant les 4 premières heures, des expériences supplémentaires sont présentées Figure 5. Outre la courbe « *in vivo* » déjà vue, la figure présente aussi la quantité de lumière produite par des cultures en présence d'un aldéhyde, substrat de la luciférase, ajouté (+ALD) et/ou de cyanure (+CN), un poison de la chaîne respiratoire. La courbe « *in vitro* », non représentée, serait superposée à la courbe « +CN+ALD ».

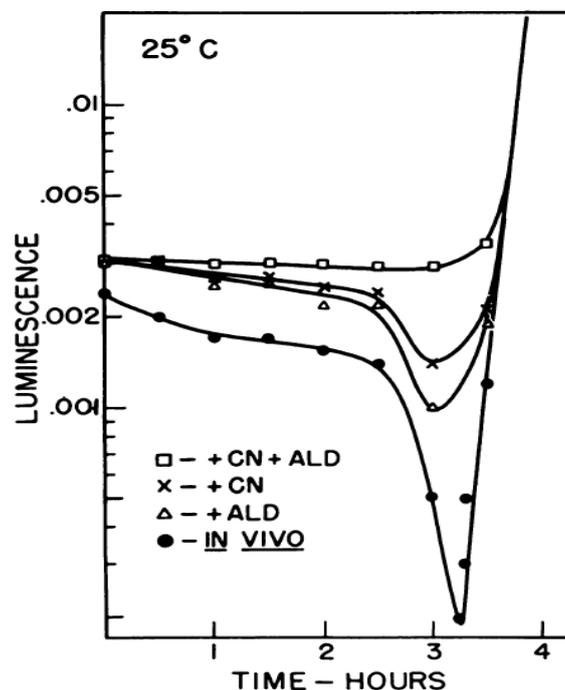


Figure 5 Agrandissement de la Figure 1 et résultats supplémentaires

Question 8. Pourquoi ajouter un aldéhyde au milieu de culture ?

Question 9. Quel est le rôle du cyanure dans cette expérience ?

Question 10. Au final, comment interpréter le comportement des cultures dans les 4 premières heures de l'expérience ?

Il est facile de faire sédimenter les bactéries d'une culture par centrifugation ; le surnageant obtenu est alors dépourvu de toute cellule. Dans l'expérience rapportée en Figure 6 les auteurs ont préparé de tels surnageants à partir de cultures de *V. fischeri* ayant atteint des densités optiques à 660nm (OD660) allant de 0,27 à 3,4. La densité optique d'une culture (en fait, sa turbidité) mesurée à 660nm est essentiellement proportionnelle à la densité cellulaire. Ils ont ensuite ajouté un volume de ces surnageants (on parle de supplémentation) à de nouvelles cultures toutes identiques. La Figure 6 indique l'évolution de la luminescence en

fonction de la croissance de 10 de ces nouvelles cultures supplémentées. Les chiffres sur chaque courbe indiquent la OD660 atteinte par la culture utilisée pour préparer les surnageants de supplémentation. Pour chaque courbe le volume de surnageant ajouté est le même.

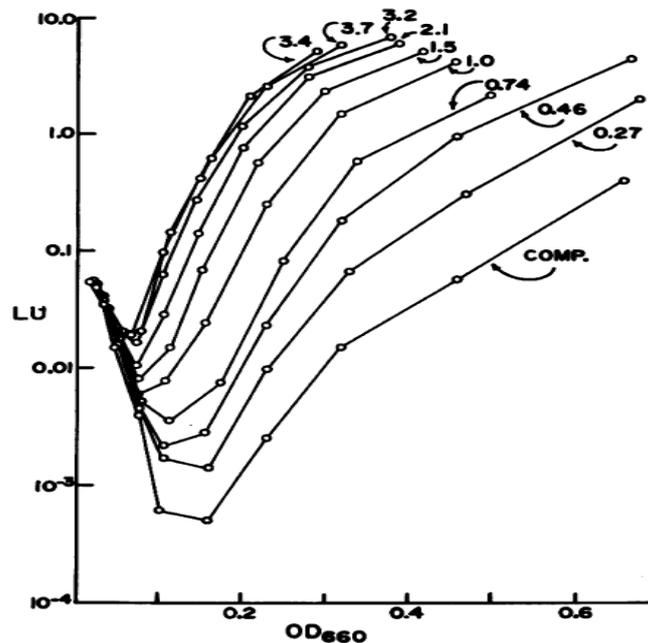


Figure 6. Expériences de supplémentation par des surnageants de culture. Evolution de la luminescence LU en fonction de la croissance bactérienne, après ajout de surnageants de culture. Vous pouvez considérer qu'il y a proportionnalité entre OD660 et temps de croissance, avec une OD660 de 0,2 à peu près équivalente à 4 h de culture sur les figures précédentes.

Question 11. Commentez l'évolution des courbes.

Question 12. Quelles hypothèses pouvez vous bâtir pour expliquer l'allure de chaque courbe de la Figure 6 ?

Question 13. Que pourriez-vous envisager de faire pour tester vos hypothèses ?

L'ADN de *V. fischeri* a été extrait et digéré par BamHI, enzyme de restriction. Ces enzymes coupent l'ADN au niveau de séquences connues. Les fragments obtenus ont été ligaturés individuellement dans un vecteur de type plasmide pour construire une banque génomique finalement utilisée pour transformer une souche de bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*), c'est-à-dire faire pénétrer 1 plasmide par cellule. *E. coli* sauvage n'est pas luminescent. On obtient alors une population d'*E. coli* dont tous les individus (dit transgéniques) portent un segment différent du génome de *V. fischeri*. Certains de ces individus sont luminescents et présentent des caractéristiques de régulation de la luminescence proches de *V. fischeri*. Ils peuvent être isolés et cultivés individuellement (on parle de population clonale, ou de clones). Tous les

clones d'*E. coli* luminescents contiennent un même fragment de 11 000 paires de bases (11 kb) du génome de *V. fischeri*.

Question 14. : Quelles conclusions tirez-vous de ces dernières informations ?

Les plasmides pJE201 et pJE202 contiennent tous deux le fragment de 11 kb. Deux cultures d'*E. coli* luminescentes, porteuses l'une du plasmide pJE201 et l'autre d'un plasmide pJE202, ont été infectées respectivement par le transposon Tn5 et le transposon mini-Mu. Ces transposons s'insèrent aléatoirement dans l'ADN. Une insertion dans un gène invalide le plus souvent ce gène en bloquant totalement la transcription au niveau d'un signal fort d'arrêt de la transcription situé dans le transposon : c'est une mutagenèse par insertion. Dans les conditions utilisées, il y a un événement d'insertion par cellule au plus. A partir de chaque culture mutagenisée, des individus non luminescents sont repérés et isolés, les plasmides qu'ils contiennent sont extraits, analysés et les sites d'insertion au sein du fragment de 11 kb sont identifiés. Les résultats sont présentés Figure 7. Notez bien que dans ce genre de manipulations, des milliards de copies de chacun des plasmides sont mutagenisés.

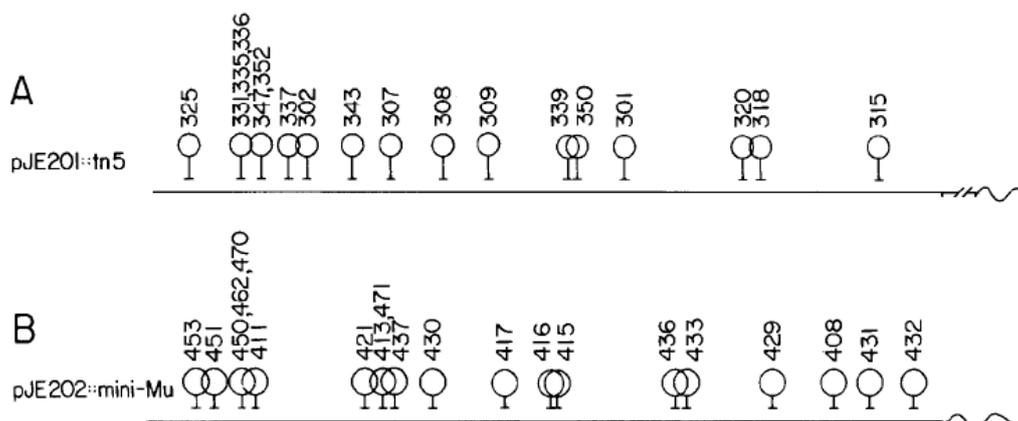


Figure 7 Les cercles indiquent les sites d'insertion des transposons, identifiés par un numéro, le long du fragment de 11 kb (ligne horizontale). En A, culture de pJE201, et en B, culture de pJE202.

Question 15. Que vous apprennent les expériences en Figure 7 ?

Des bactéries *E. coli* sauvages ont été transformées par des combinaisons de deux plasmides mutagenisés, l'un provenant de la série A et l'autre de la série B de la Figure 7. La Figure 8 est une image des différentes combinaisons réalisées. Les taches visibles sont des colonies bactériennes qui sont (taches blanches) ou non (taches gris pale) luminescentes, la photo étant prise avec la lumière propre des colonies.

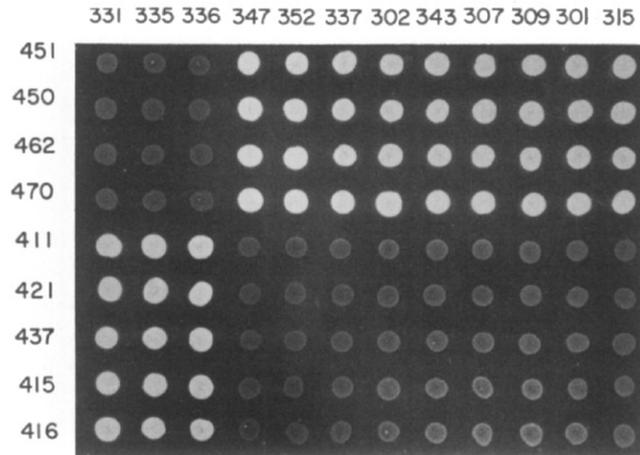


Figure 8 Luminescence d' *E. coli* contenant deux plasmides mutants d'insertion

Question 16. Qu'apporte la Figure 8 quant à la nature génétique du fragment de 11 kb ?

Le transposon mini-Mu contient, à une de ses extrémités, un gène rapporteur codant pour la β -galactosidase, une enzyme dont l'activité peut facilement être mise en évidence. Dans le transposon, ce gène est dépourvu de promoteur, le début de sa séquence codante coïncide avec le début du transposon, et le gène est suivi d'une séquence qui arrête la transcription. Parmi les clones non-luminescents obtenus par insertion de mini-Mu, la moitié environ expriment la β -galactosidase. Pour les insertions entre 453 et 411 (cf Figure 7, B), le gène de la β -galactosidase n'est exprimé que lorsqu'il est orienté de 411 vers 453, tandis que pour les insertions entre 421 et 432, il n'est exprimé qu'orienté de 421 vers 432.

Question 17. Comment expliquez-vous l'expression de la β -galactosidase, alors que le gène est dépourvu de promoteur ?

Question 18. Que pouvez vous dire de l'organisation globale du segment de 11 kb ?

Il est possible de préparer des « minicellules » qui sont des bactéries avec un cytoplasme normal mais dépourvues d'ADN génomique. Elles peuvent contenir un plasmide d'intérêt. Des minicellules contenant un plasmide avec le fragment de 11 kb ont été incubées en présence d'acides aminés radioactifs. Après lyse des minicellules, sept protéines différentes sont alors identifiées par électrophorèse.

Question 19. Comment interpréter cette observation ?

Par ailleurs, les plasmides pJE201 contenant le fragment de 11 kb sauvage ont été également traités par l'hydroxylamine, un agent qui crée des mutations ponctuelles, puis introduits dans *E. coli*. Dans les conditions expérimentales utilisées, une mutation au plus apparaît par

plasmide. Comme pour les mutations par transposon, des clones non luminescents ont été isolés, leur plasmide purifié, et la mutation portée est localisée (plasmides mutants de la série 500). Les mêmes manipulations sont réalisées pour le plasmide pJE202 (plasmides mutants de la série 600).

La Figure 9 représente la luminescence de 196 colonies d'*E. coli* qui contiennent une combinaison de deux plasmides : un de la série 500 et un de la série 600. Les plasmides, dont le nom est indiqué sur la figure, sont rangés selon la position de leur mutation : les plasmides 501 et 601 sont mutés au début des 11 kb et les plasmides 545 et 645 sont mutés vers la fin des 11 kb.

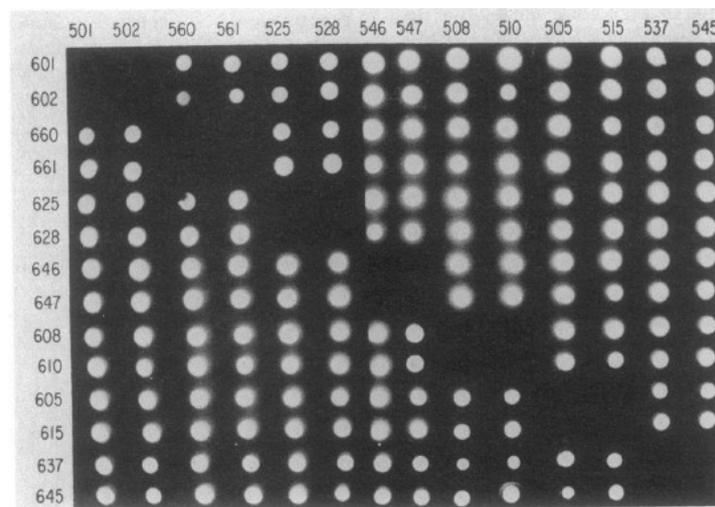


Figure 9 Luminescence d' *E. coli* contenant deux plasmides muté par l'hydroxylamine.

Question 20. Cette figure est elle en contradiction ou en cohérence avec ce qui précède ?

Nous appellerons « bactéries 5XX » une population d'*E. coli* porteuses du plasmide mutant 5XX. Des bactéries ont été cultivées en modifiant leur milieu pour analyser l'apparition de la luminescence. Si on ajoute des aldéhydes dans le milieu de culture des bactéries 525, 528, 546, 547, 537 et 545, elles se comportent à peu près comme *V. fischeri* : elles sont capables d'être bioluminescentes selon les mêmes modalités. Les bactéries 560 et 561 se comportent de même après ajout de surnageant de culture, comme pratiqué en Figure 6, et elles n'ont pas besoin d'ajout d'aldéhydes. Les bactéries 508, 510, 505 et 515 ne sont jamais lumineuses, même faiblement, quoi que l'on fasse. Les bactéries 501 et 502 présentent en fait une luminescence très faible en toute circonstance, quelles que soient les conditions de culture.

Question 21. Quelles nouvelles informations relatives aux fonctions du fragment de 11 kb sont désormais disponibles ?

Une des protéines produites par les minicellules contenant le fragment de 11 kb présente des propriétés dévoilées par les résultats de la Figure 10. Une solution de cette protéine, produite sans ajout de radioactivité, est mélangée avec une solution de fragments d'ADN radioactif, et avec des quantités décroissantes (de 6,2 à 0,025 en unités arbitraires) du surnageant d'une

culture de *V. fischeri* ayant atteint une forte concentration bactérienne. Les mélanges migrent ensuite par électrophorèse dans un gel d'agarose, de haut en bas sur la figure. L'ADN libre migre le plus loin, et tout complexe nucléo-protéique est retardé, car plus volumineux : c'est la technique de retard en gel. Dans la figure, la première piste ne contient que le fragment d'ADN. Ce fragment provient d'une région du fragment de 11 kb située entre les sites d'insertion 411 et 470 (cf. Figure 7). Si une autre portion d'ADN est utilisée, toutes les pistes ressemblent à la première piste. Le surnageant seul n'induit aucun retard non plus.

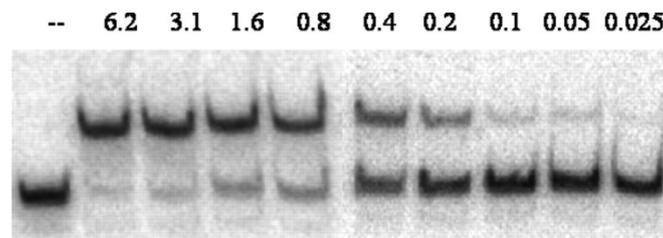


Figure 10 Analyse par retard en gel, d'une protéine extraite des minicellules. Les chiffres indiquent la quantité de surnageant ajoutée, en unités arbitraires. La première piste ne contient que le fragment d'ADN.

Question 22. Commentez l'évolution de la migration en fonction de la quantité de surnageant.

Question 23. Quelle pourrait être la fonction de cette protéine ?

Si on ligature le fragment d'ADN utilisé ci-dessus en amont de la séquence codant la β -galactosidase, et que l'on place cette construction chez *V. fischeri* sauvage, la β -galactosidase s'exprime selon les mêmes modalités que la luciférase. Si on le place chez *E. coli* sauvage, rien ne se passe.

*Question 24. Pouvez-vous dessiner un modèle expliquant la régulation de l'expression de la luciférase chez *V. fischeri* ?*

IV. Particularités de l'expression de *mod(mdg4)* chez la Drosophile

Les « enhancers » sont des séquences qui interagissent avec des facteurs protéiques et augmentent l'activité de transcription de gènes spécifiques. Certaines séquences, appelées isolateurs, sont capables de bloquer l'action des enhancers si elles sont placées entre les enhancers et les promoteurs. Nous appellerons *IoG* un de ces isolateurs qui existe chez la mouche Drosophile *D. melanogaster*. La Figure 11, panneaux a et b présente les effets de *IoG* lorsque celui-ci est expérimentalement inséré entre les enhancers et promoteurs respectifs des gènes *yellow* (abrégé *y*) et *cut* (*ct*) de la Drosophile, donnant lieu aux mutations y^2 et ct^6 , touchant respectivement la pigmentation de l'abdomen et la forme de l'aile. Les panneaux k et l présentent les phénotypes d'une drosophile sauvage pour tous les gènes considérés. Les mouches des autres panneaux portent les mutations y^2 et ct^6 et différentes combinaisons d'allèles d'un gène appelé *mod(mdg4)*, abrégé *mod*. L'allèle mod^A est létal à l'état homozygote (noté $mod^{A/A}$) chez les larves. L'allèle mod^B à l'état homozygote ($mod^{B/B}$) ne donne pas de phénotype très marqué chez un individu par ailleurs sauvage, mais donne le phénotype présenté Figure 11 panneaux c et d dans le contexte des mutations y^2 et ct^6 induites par *IoG*. La combinaison des allèles A et B de *mod* (notée $mod^{A/B}$) donne, toujours dans le contexte y^2 et ct^6 , les phénotypes visibles panneaux e et f.

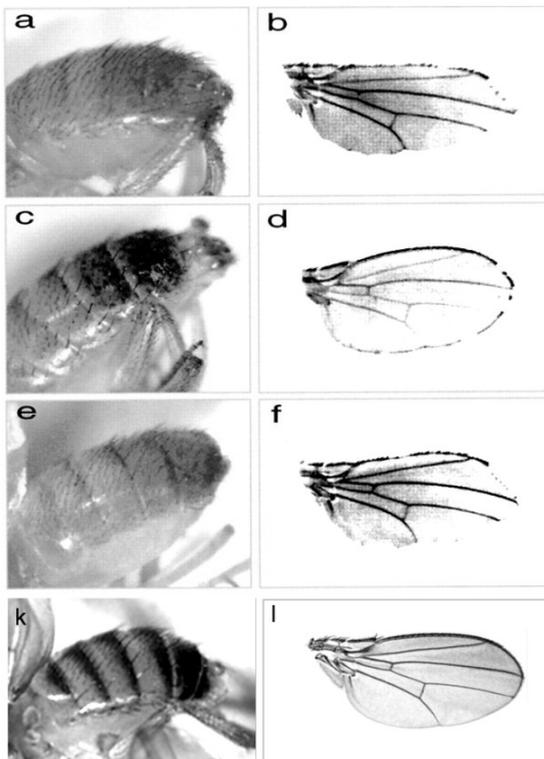


Figure 11 Les mouches des trois premières lignes portent les mutations y^2 et ct^6 . Ces mouches portent les combinaisons d'allèles de *mod* suivantes :

- a et b : *mod* sauvage ($mod^{+/+}$). Une mouche hétérozygote $mod^{A/+}$ ou $mod^{B/+}$ présente le même phénotype.
 - c et d : homozygote $mod^{B/B}$
 - e et f : mouche double mutante $mod^{A/B}$
- La mouche en k et l est sauvage pour tous gènes (*y*, *ct*, *mod*).

Question 25. Que pouvez vous dire du fonctionnement de IoG dans les différents contextes mutants ou sauvage de mod ?

Le gène *mod* est complexe. Il code pour plusieurs protéines. La Figure 12 présente un western-blot. Pour le réaliser, un extrait protéique total est préparé à partir de mouches de génotype indiqué. Les protéines sont dénaturées et soumises à électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines y migrent sous forme de monomères en fonction de leur taille. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane, qui est comme une réplique du gel. La présence des protéines est alors détectée à l'aide d'un anticorps spécifique de la région touchée par la mutation *mod^B*.

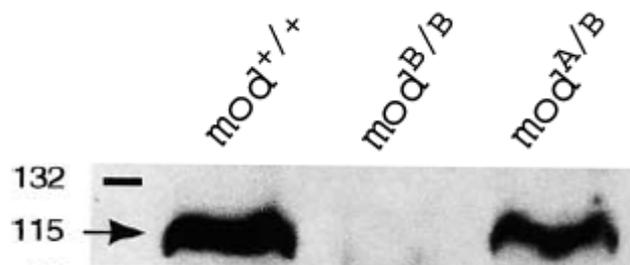


Figure 12 Détection par western blot, d'une protéine de 115 kDa codée par le gène *mod*(*mdg4*), dans des mouches de différents génotypes.

Un autre anticorps reconnaissant les séquences protéiques codées par les premiers exons du gène détecte la bande à 115 kDa selon les mêmes modalités que le premier anticorps, mais détecte en plus de nombreuses autres bandes, identiques dans les 3 types de mouche.

Il n'est pas possible de tester la présence de la protéine de 115 kDa chez des mouches adultes de génotype *mod^{A/A}* puisqu'il est précocement létal. On peut montrer par contre que la protéine est absente dans les premiers stades de développement chez ces individus, alors qu'elle est présente chez les individus sauvages.

Enfin, le message codant pour cette protéine n'est produit que par les individus possédant au moins un allèle *mod* sauvage et les individus de génotype *mod^{A/B}*

Question 26. Vous proposerez une hypothèse capable d'expliquer l'ensemble des observations.

- FIN DE L'ENNONCE -