

SESSION 2012

SECOND CONCOURS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

BIOLOGIE – BIOCHIMIE

Durée : 4 heures

L'usage de documents est interdit.

L'usage de calculatrices est autorisé.

Consignes générales

Le sujet est composé de quatre parties et de 20 pages au total.

Toute réponse sera **argumentée**, même brièvement. Une réponse correcte mais non justifiée sera jugée **incomplète**. Les schémas et tableaux récapitulatifs de données seront les bienvenus si ils améliorent la clarté de l'analyse.

Chaque partie comporte des questions pouvant être traitées indépendamment.

Si au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signalera sur sa copie et poursuivra l'épreuve en expliquant les raisons des initiatives qu'il aura été amené à prendre.

Le barème suivant sera appliqué :

Partie I : 30 points, Partie II : 20 points, Partie III : 30 points, Partie IV : 5 points.

Partie I – Sujet de synthèse

Le chromosome interphasique des metazoaires.

Vous décrirez de façon concise (8 pages maximum, schémas compris) et sans dépasser les limites du sujet, les divers aspects de la biologie du chromosome interphasique des métazoaires.

Vous illustrerez votre propos à l'aide de schémas précis et synthétiques.

FIN DE LA PARTIE I

Introduction générale

A l'inverse des génomes circulaires de la majorité des bactéries, le génome nucléaire des eucaryotes est organisé en chromosomes linéaires indépendants. Ceci pose deux problèmes fondamentaux pour la biologie de ces chromosomes. Premièrement, la cellule doit faire la différence entre les extrémités des chromosomes et les cassures d'ADN double brin qui peuvent se produire dans différentes conditions physio-pathologiques. Ne pas faire cette distinction peut conduire à des réarrangements chromosomiques (par exemples des fusions de chromosomes) catastrophiques pour la cellule. Le second problème fondamental posé par la linéarité des chromosomes eucaryotes, est le problème de la réplication de l'ADN aux extrémités du chromosome.

Ces deux "problèmes" ont été résolus par l'invention des *télomères* (du grec *τέλος* "fin" et *μέρος* "partie"). Les télomères sont des complexes moléculaires composés d'ADN et de protéines.

L'ADN télomérique est composé de séquences répétées, basées sur un motif court et qui diffère selon les organismes: TTAGGG chez les vertébrés, TTGGGG chez le cilié *Tetrahymena thermophila*, ou TTTAGGG chez la brassicacée *Arabidopsis thaliana*. Le nombre de répétitions de ces motifs peut être très variable entre organismes et entre les différentes cellules d'un même organisme. Toutefois, ces séquences ont en commun leur richesses en guanine.

Certaines protéines appartenant au complexe télomérique reconnaissent ces séquences d'ADN répétées et recrutent ensuite une série de facteurs permettant la maintenance et la protection des télomères.

Q1. Expliquez et décrivez le mécanisme qui permet la réplication de l'ADN *non télomérique*.

Q2. Expliquez pourquoi ce mécanisme n'est pas adapté à la réplication des extrémités des chromosomes et précisez la structure (théorique) des extrémités d'un chromosome répliqué par une polymérase ADN conventionnelle.

Une étape clé de l'étude des télomères fut la découverte, entre 1985 et 1987, par Carol GREIDER et Elizabeth BLACKBURN d'une enzyme appelée *télomérase* (Prix Nobel 2009 avec Jack SZOSTAK). Cette découverte permit de comprendre le mécanisme de synthèse des extrémités des chromosomes. En effet, la télomérase est une transcriptase inverse composée d'une sous-unité catalytique (TERT) et d'une molécule ARN (TER) qui sert de patron lors de l'élongation du brin 3' sortant des télomères (Figure 1).

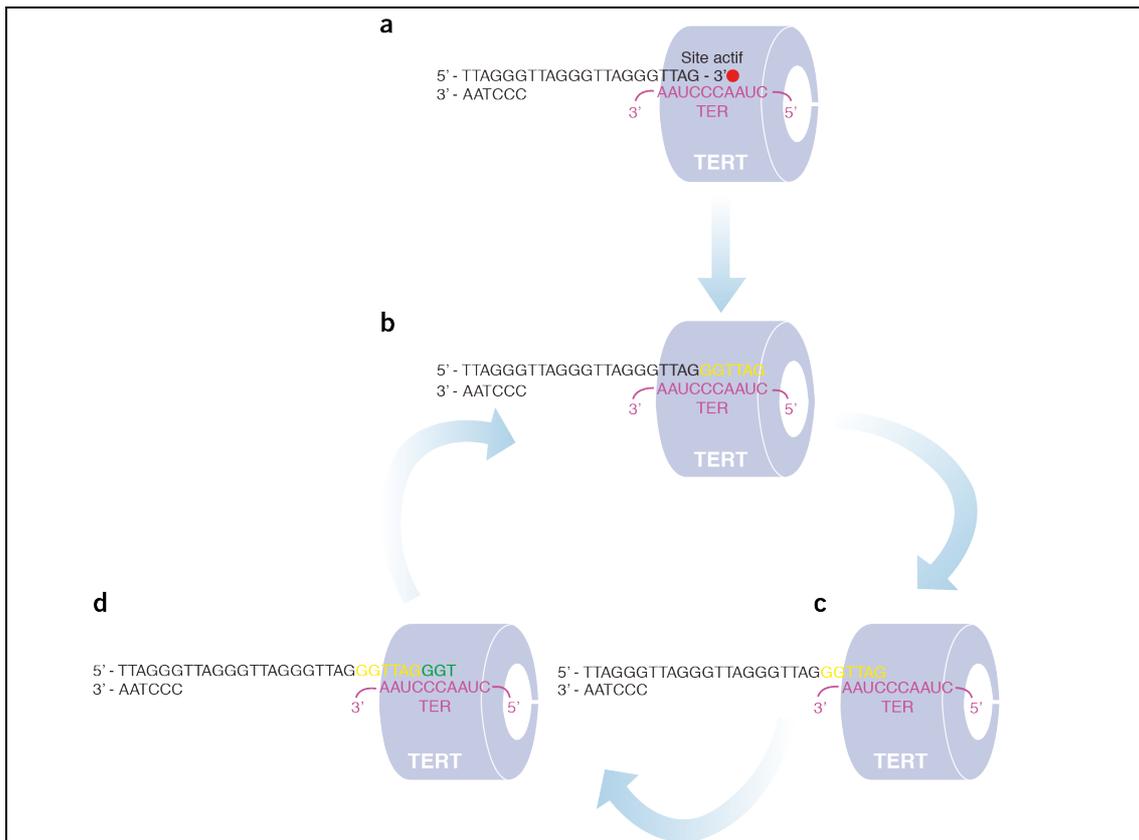


Figure 1 - Mécanisme de réplication du brin 3' sortant d'un télomère par la télomérase.
a, La réplication du brin 3' sortant du télomère est initiée par l'hybridation de la sous-unité ARN (TER) de la télomérase. **b,** Synthèse de la séquence d'ADN complémentaire au motif ARN de la sous-unité TER. **c,** Une fois la synthèse achevée, la télomérase se détache temporairement du télomère pour réinitier le cycle de réplication (étape **d**).

Q3. On remarquera que la portion de séquence de TER (5'-CUAACCCUAA-3') participant à la réplication du télomère est plus longue que le motif lui-même. Comment cela optimise-t-il le "travail" de la télomérase ?

Q4. Proposez un autre exemple de transcriptase inverse ainsi que sa fonction.

Alors que les cellules de la lignée germinale et plus de 80% des cellules tumorales expriment la télomérase, la majorité des cellules post-embryonnaires et non-cancéreuses présentent des niveaux d'expression de télomérase très faibles qui ne permettent en général pas de compenser la perte de séquences lors de la réplication des extrémités télomériques. En l'absence de télomérase, une portion du télomère est donc perdue à la fin de chaque cycle de division cellulaire. Cette érosion télomérique conduit à la sénescence des cellules, c'est-à-dire l'arrêt de leur cycle mitotique. C'est pourquoi les télomères sont parfois décrits comme les horloges moléculaires "mesurant" l'espérance de vie des cellules.

Dans les parties suivantes, vous allez analyser différents aspects de la biologie des télomères.

Partie II – Le contrôle de la longueur des télomères

II.1 – Raccourcissement des télomères lors du vieillissement de fibroblastes humains en culture

Afin d'observer et de quantifier le raccourcissement des télomères des cellules somatiques lors de leurs divisions successives, des fibroblastes (cellules issues du tissu conjonctif) sont isolés depuis différents donneurs (cf. Table 1). Les fibroblastes ont une capacité *finie* à se diviser une fois qu'ils sont placés en culture *in vitro*. On observe donc les cellules à intervalle régulier pour estimer le nombre moyen de divisions cellulaires (NMDiv) qu'elles effectuent à partir de leur mise en culture. On détermine le plus tôt possible (Âge *in vitro*, NMDiv) la longueur moyenne des télomères (en kilobases). Cette mesure peut se faire par Southern blot. L'ADN total est alors extrait des cellules et digéré avec des enzymes de restriction ciblant des sites de coupure proches du début des séquences télomériques (voir aussi Figure 11a). On obtient ainsi des *fragments de restriction terminaux* (FRT). On note aussi le nombre maximal de divisions que ces cellules peuvent effectuer *in vitro* (entre parenthèses, NMDiv max).

Lignée	Âge		Longueur moyenne des télomères (kbases)
	<i>in vivo</i> années	<i>in vitro</i> NMDiv (NMDiv max)	
HSC172	Fœtal	18-28 (88)	8.6
A30S	0	33 (58)	7.3
A38	24	31-33 (68)	6.9
A35	70	19 (41)	6.7
F001	71	21-29 (40)	6.5
F002	91	18-20 (45)	6.2

Table 1 - Effet de l'âge du donneur sur la longueur des télomères de fibroblastes humains. Plusieurs lignées de fibroblastes sont établies à partir de différents donneurs. "Âge, *in vivo*" correspond à l'âge du donneur au moment du prélèvement. Une fois mises en culture, on détermine le plus tôt possible (Âge *in vitro*, NMDiv) la longueur moyenne des fragments de restriction terminaux (Longueur moyenne des télomères; en kilobases) de ces cellules.

Q5. Quelles conclusions qualitatives pouvez-vous tirer des données de la Table 1 ?

Durant toute la culture *in vitro*, on prélève régulièrement des échantillons de cellule afin de déterminer la longueur de leurs télomères. Une fois fractionnés selon leur taille par migration électrophorétique, les fragments de restriction terminaux sont reconnus par une sonde marquée radioactivement (Southern blot; Figure 2). La sonde utilisée ici est un oligonucléotide radiomarqué (TTAGGG)₃.

Figure 2

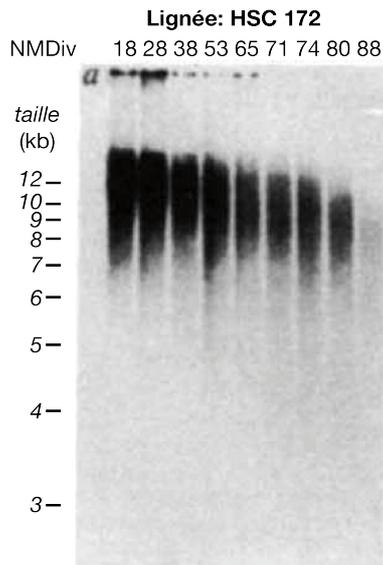


Figure 2 - Analyse par Southern blot de l'évolution de la longueur des FRT de fibroblastes fœtaux en culture (lignée HSC 172). On observe ici des *fragments de restriction terminaux* (FRT) pour des populations de cellules ayant effectué entre 18 et 88 divisions cellulaires *in vitro* en moyenne (NMDiv).

Q6. Analysez les résultats de l'expérience de la Figure 2. Pourquoi observe-t-on des "trainées" d'ADN télomérique dans chaque piste ?

On répète cette opération pour plusieurs lignées (cf. Figure 3 et Table 1). Les données agrégées sont représentées sous forme de graphes permettant une estimation du comportement moyen par régression linéaire.

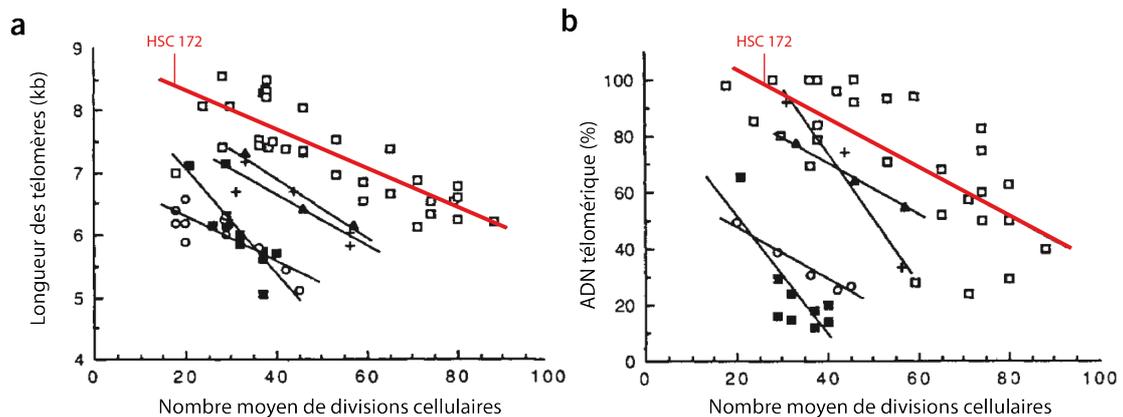


Figure 3 - Longueur moyenne des télomères (a) et quantité d'ADN télomérique totale (b) en fonction du nombre moyen de divisions dans plusieurs lignées de fibroblastes humains. **a**, On détermine la longueur moyenne des fragments de restriction terminaux en fonction du nombre moyen de divisions cellulaires *in vitro*. **b**, On quantifie ici, pour différentes lignées, la quantité totale d'ADN télomérique (intégrale du signal observé en Southern blot comme dans la figure 2) présent dans un population de cellules. Cette valeur est normalisée grâce au signal observé à l'aide d'une autre sonde qui détecte une région non variable du génome.

Q7. Calculez la vitesse d'érosion des télomères pour la lignée HSC 172.

Q8. Pourquoi est-il important de mesurer en parallèle la quantité d'ADN télomérique (Figure 3b) ?

II.2 – Contrôle de la longueur des télomères par TRF1

Dans les cellules tumorales et les lignées cellulaires immortalisées, l'érosion des séquences télomériques au fil des divisions cellulaires est contrecarrée par des mécanismes spécifiques. On remarque notamment que la longueur moyenne des télomères dans ces cellules est relativement faible mais reste stable au cours du temps, ce qui suggère que la longueur des télomères est précisément régulée par la cellule.

On s'intéresse maintenant à un des facteurs régulant la longueur des télomères : la protéine TRF1 (*telomeric-repeat binding factor 1*).

II.2.a – Etude de quelques propriétés de TRF1

La protéine TRF1 a été identifiée comme un facteur se liant à l'ADN télomérique. Afin de mieux comprendre comment TRF1 se lie à l'ADN, on procède à des expériences de "gel shift". Le "gel shift" est une technique biochimique qui permet de tester *in vitro* la liaison d'une protéine purifiée à une séquence d'ADN donnée. Dans un premier temps, on produit deux formes de TRF1 par synthèse *in vitro* : (1) une forme sauvage (TRF1, **W**) et (2) une forme sauvage fusionnée à une protéine "GFP" (protéine fluorescente verte, GFP-TRF1, **G**) (Figure 4a, b). On incube ensuite les protéines purifiées avec de l'ADN double brin marqué radioactivement ((TTAGGG)₁₂) (Figure 4c). Enfin, on fait migrer ces échantillons sur un gel d'électrophorèse. Si une protéine se lie à la sonde, le complexe ainsi formé aura une masse moléculaire beaucoup plus élevée que la sonde seule et donc une mobilité réduite sur gel.

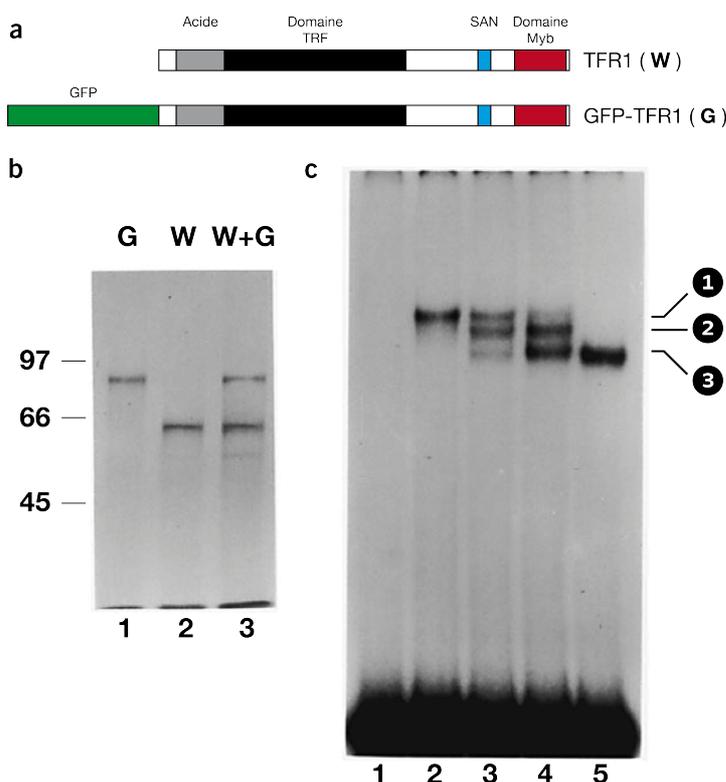


Figure 4 - Liaison de TRF1 à des séquences d'ADN télomérique. **a**, On dispose de deux protéines TRF1 : une forme sauvage (**W**) et une forme chimérique comportant une séquence GFP N-terminale (**G**). Le domaine SAN assure l'adressage de la protéine au noyau de la cellule. **b**, Les protéines sont produites par synthèse *in vitro*, soit individuellement (**G** et **W**), soit simultanément lors de la même réaction de synthèse (**W+G**). Une échelle de poids moléculaire est indiquée à gauche du gel (en kDa). **c**, Pour chaque piste on ajoute à la sonde radiomarquée différents mélanges de protéines : **[1]** pas de protéines, **[2]** **G**, **[3]** **G:W** au ratio 1:1, **[4]** **G:W** au ratio 1:2, **[5]** **W**. La migration de l'ADN se fait du haut vers le bas du gel.

Q9. Décrivez les résultats obtenus dans chaque piste (figure 4c). Quelles conclusions pouvez-vous tirer de cette expérience en comparant les différentes pistes de l'autoradiogramme ?

Q10. Quelles sont les protéines présentes dans les bandes ①, ② et ③ du panneau c de la figure 4 ?

On cherche maintenant à comprendre quel domaine de TRF1 permet sa liaison à l'ADN. Pour cela on produit *in vitro* une série de protéines tronquées ou pleine longueur (Figure 5)

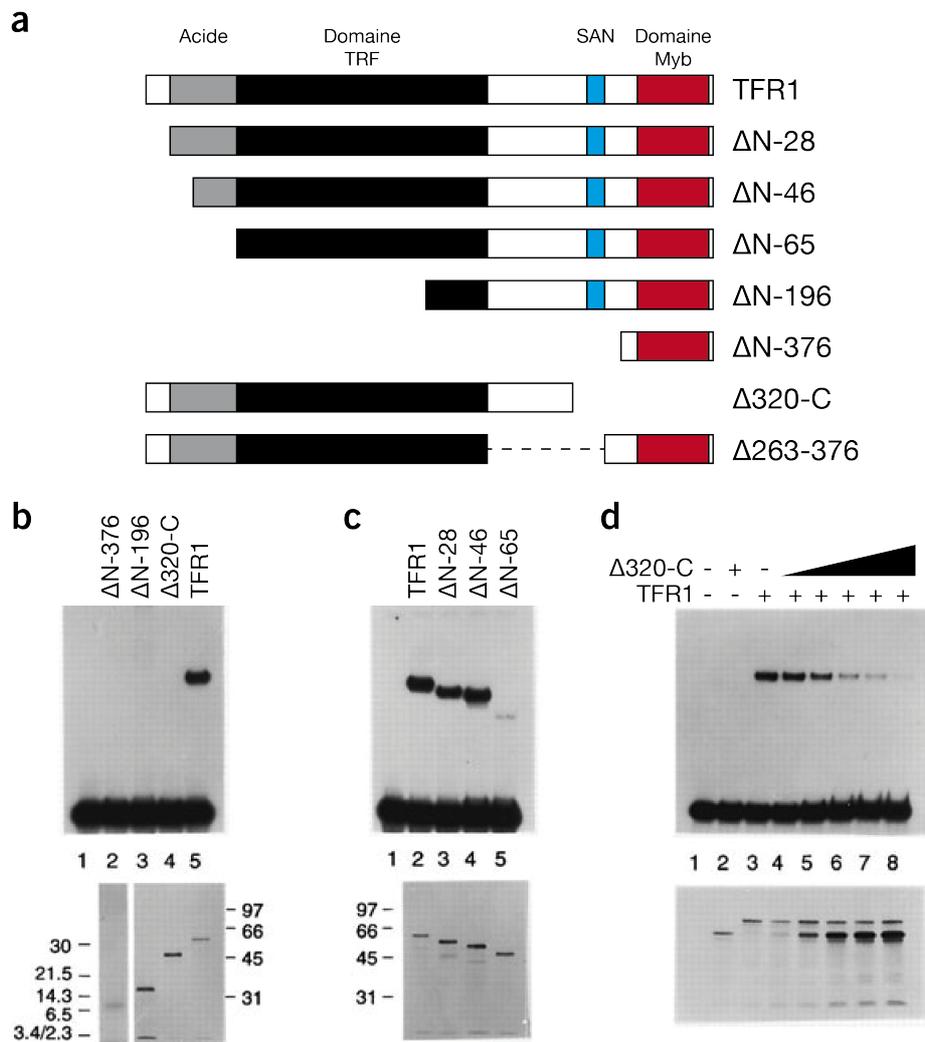


Figure 5 - Détermination du domaine de liaison à l'ADN de TRF1. a, On dispose de différentes protéines dérivées de la forme TRF1 pleine longueur. b, c, d, Expériences de gel shift. Dans les pistes 4-8 du panneau (d), on ajoute une quantité croissante de Δ 320-C.

Q11. Comment peut-on conclure de ces expériences que TRF1 se lie à l'ADN uniquement sous forme dimérique ? Argumentez précisément votre réponse en analysant les résultats présentés dans la Figure 5b, c et d.

On cherche maintenant à étudier la fonction de TRF1 *in vivo*, dans des cellules en culture. Pour cela, on décide de mettre au point une protéine TRF1 modifiée (TRF1dn) qui aura un effet dominant négatif, inhibant donc la fonction de protéines TRF1 sauvages.

Q12. Proposez d'autres stratégies expérimentales permettant de perturber l'activité de TRF1.

On teste la protéine TRF1dn par gel shift (Figure 6).

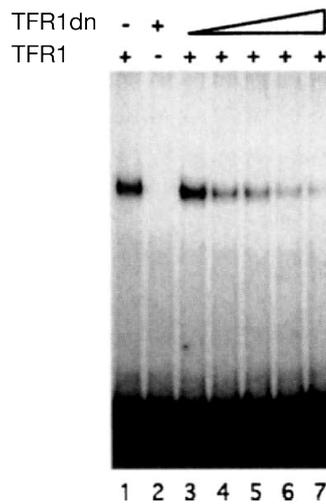


Figure 6 - Caractérisation du mutant TRF1dn par gel shift. TRF et TFRF1dn sont produits par synthèse *in vitro*.

Q13. Faites un schéma représentant une protéine TRF1 modifiée (TRF1dn) qui devrait avoir un effet dominant-négatif *in vivo* et qui se comporterait comme la protéine testée dans la Figure 6. Cette protéine doit être munie de plus d'une séquence "FLAG-tag" (8 acides aminés) N-terminale pouvant être reconnue par un anticorps anti-FLAG.

II.2.b – Analyse de la fonction de TRF1 dans un modèle cellulaire

On teste maintenant la protéine TRF1dn *in vivo* dans les cellule HeLa (une lignée cellulaire cancéreuse issue d'une métastase d'un cancer du col de l'utérus).

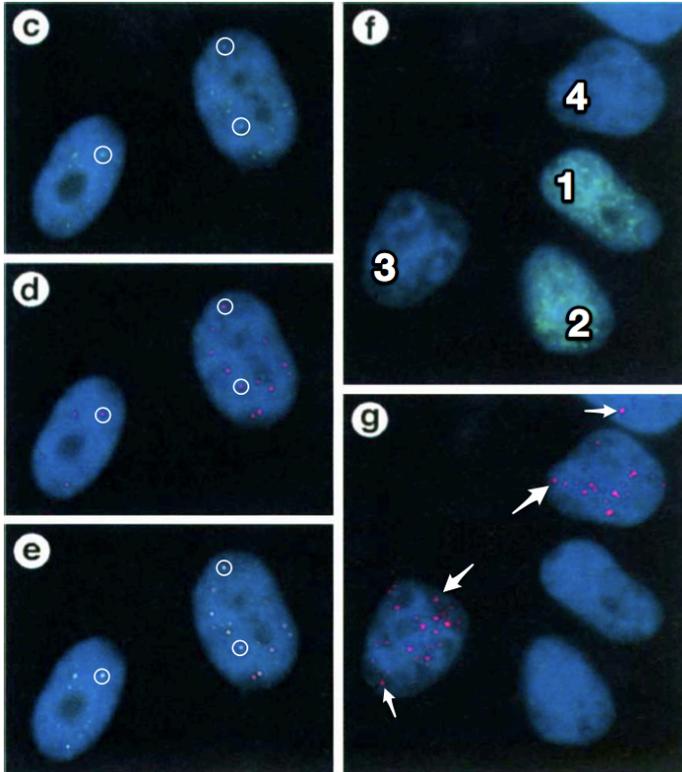


Figure 7 - Expression de TRF1dn dans des cellules HeLa. L'ADN est révélé (en bleu) par un marquage au DAPI. Trois cercles blancs dans les panneaux (c), (d) et (e) marquent des positions équivalentes dans chaque cellule. **c**, On marque les protéines TRF1 endogènes à l'aide d'un anticorps reconnaissant TRF1 (marquage ponctiforme vert). **d**, On identifie les télomères à l'aide d'une sonde ARN fluorescente (marquage ponctiforme rouge) **e**, Superposition de (c) et (d). **f**, Les cellules HeLa sont transfectées avec un transgène exprimant TRF1dn. Les cellules 1 et 2 expriment la protéine TRF1dn révélée à l'aide d'un anti-corps Anti-FLAG (marquage vert). Les cellules 3 et 4 ne sont pas transfectées. **g**, Marquage des mêmes cellules que dans le panneau f avec un anticorps reconnaissant la forme sauvage de TRF1 (marquage ponctiforme rouge; quatre exemples marqués par des flèches blanches) mais pas la forme TRF1dn (cf. c).

Q14. Quelle pourrait être la séquence de la sonde ARN utilisée dans le panneau d de la Figure 7 ?

Q15. Pourquoi les auteurs de ce travail ont-ils choisi de représenter les cellules [3] et [4] en plus des cellules [1] et [2] dans les panneaux f et g de la Figure 7 ?

Q16. Justifiez que TRF1dn est bien un mutant dominant négatif à partir des résultats de la Figure 7.

On cherche maintenant à étudier le rôle de la protéine TRF1 dans le contrôle de la longueur des télomères en surexprimant ou en inhibant TRF1 de façon chronique. On utilise pour cela une lignée cellulaire (HT1080, fibrosarcome humain) qui exprime la télomérase de façon constitutive.

A partir de cette lignée HT1080, on établit de nouvelles lignées cellulaires dans lesquelles l'expression de la protéine TRF1 ou TRF1dn est contrôlée par un système inductible par la doxycycline (Figure 8). En présence de doxycycline, l'expression est réprimée alors qu'elle est constitutive en l'absence de doxycycline.

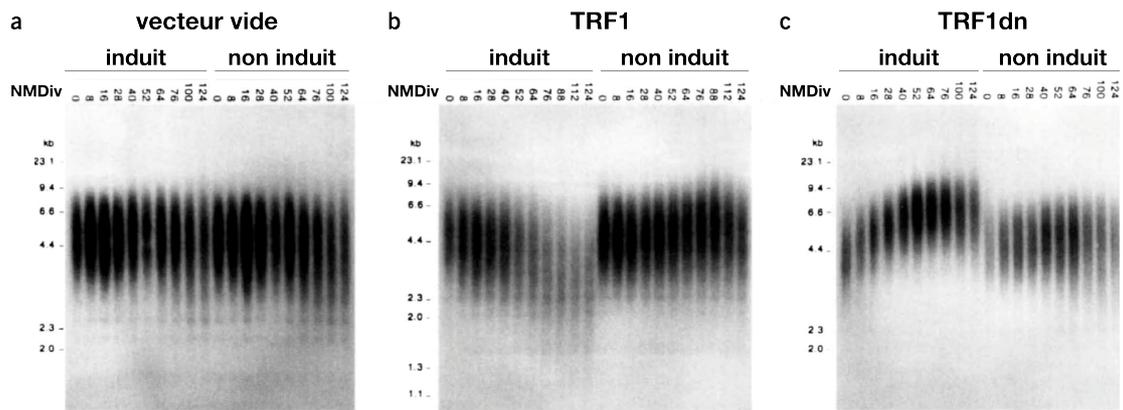


Figure 8 - Effet de l'expression chronique de TRF1 sauvage et TRF1dn sur la longueur des télomères. Chaque piste contient des *fragments de restriction terminaux* isolés à partir de l'ADN total d'un même nombre de cellules. Ces FRT sont reconnus par une sonde radiomarquée ((TTAGGG)₁₂). **a**, Lignée transgénique comportant un vecteur d'expression "vide". **b**, Lignée transgénique permettant la surexpression de TRF1 sauvage. **c**, Lignée transgénique permettant la surexpression de TRF1dn.

Q17. Que peut-on déduire de l'expérience présentée dans le panneau **a** de la Figure 8 ?

Q18. Décrivez et comparez les panneaux **b** et **c** de la Figure 8 ? Quelles conclusions pouvez-vous tirer de ces données quant à la fonction de TRF1 ?

Q19. Estimez la vitesse de raccourcissement des télomères dans le panneau **b** de la Figure 8 ? Comment expliquez-vous la différence observée avec la valeur déduite de la Figure 3 ?

FIN DE LA PARTIE II

Partie III – Structure et régulation des extrémités télomériques

On a vu dans la partie précédente que la protéine TRF1 était impliquée dans la régulation de la longueur des télomères. Toutefois, TRF1 se lie uniquement à l'ADN télomérique double brin. Or la télomérase cible l'extrémité simple brin des télomères. On a donc cherché à identifier des facteurs liant l'extrémité simple brin des télomères et qui pourraient être capables de recruter la télomérase. On s'intéresse ici à la fonction de la protéine Pot1.

III.1 Pot1 : une protéine se liant aux télomères

Afin d'étudier la fonction de Pot1, on dispose d'un mutant perte de fonction du gène *pot1* chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. On dispose aussi d'une souche de levure mutante pour le gène codant la portion catalytique de la télomérase (*trt1*).

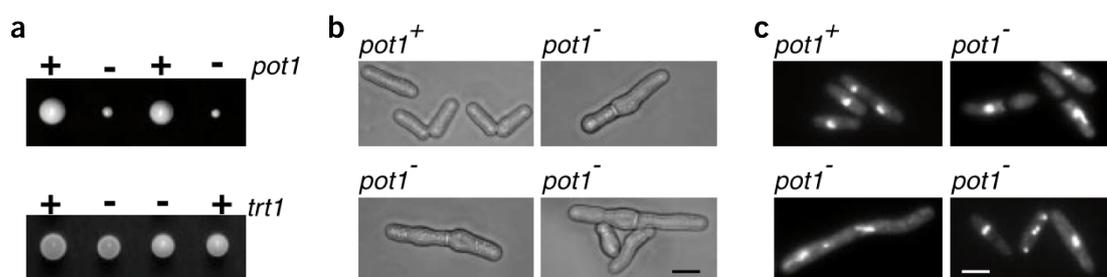


Figure 9 - Comparaison des phénotypes de levures mutantes pour *pot1* ou *trt1*. a, Comparaison de la morphologie des colonies *pot1*⁻, *pot1*⁺, *trt1*⁻ ou *trt1*⁺ générées à partir de spores haploïdes. "+" et "-" indiquent que l'allèle présent est soit sauvage, soit mutant. b, Images microscopiques de cellules de levures issues des colonies présentées dans le panneau (a). c, Marquage fluorescent de l'ADN dans les levures sauvages ou mutantes pour le gène *pot1*.

Q20. Définissez les termes *cellule haploïde* et *cellule diploïde*.

Q21. Que pouvez-vous conclure de l'expérience présentée dans le panneau a de la Figure 9 ?

Q22. Quelles sont les conséquences visibles de la perte de la protéine Pot1 dans les panneaux b et c ?

On s'intéresse maintenant au mécanisme de liaison de Pot1 à l'ADN télomérique. Pour cela on produit en bactérie les protéines Pot1 humaine (hPot1p) et de levure *S. pombe* (SpPot1p). Lors de la purification biochimique de ces protéines, on remarque qu'une forme tronquée est produite en bactérie en plus de la forme pleine longueur attendue. On peut toutefois séparer ces protéines durant la purification.

On réalise ensuite des expériences de gel shift (cf. II.2.a) en mélangeant les préparations de protéines Pot1 avec des séquences télomériques double brin ou simple brin radiomarquées.

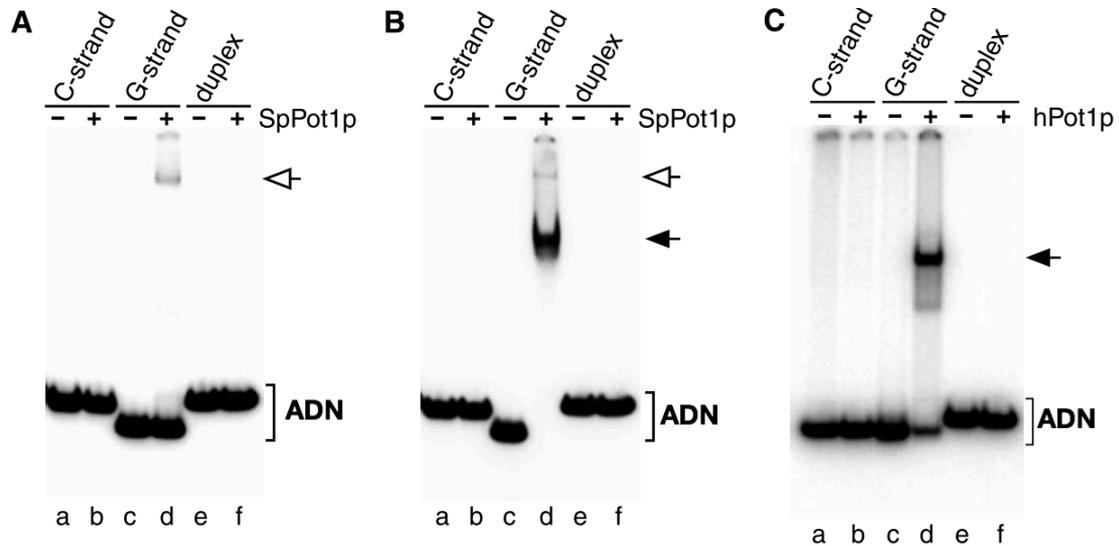


Figure 10 - Test de liaison de Pot1 aux séquences télomériques. Expériences de gel shift avec oligonucléotides radiomarqués en présence (+) ou absence (-) de protéine Pot1. Les flèches blanches indiquent le niveau de migration des protéines pleine longueur. Les flèches pleines indiquent les formes tronquées. La nature des séquences ADN utilisées est indiquée en haut de chaque piste. **A**, On utilise uniquement la forme longue de SpPot1p et les oligonucléotides *S. pombe*. **B**, On utilise un mélange de protéines SpPot1p tronquée et pleine longueur, ainsi que des oligonucléotides *S. pombe*. **C**, On utilise une forme pleine longueur et tronquée de la protéine humaine hPot1p, ainsi que des oligonucléotides *H. sapiens*.

Oligonucléotides (ADN) *S. pombe* :

C-strand : 5'-CGTAACCGTAACCCCTGTAACCTGTAACCTGTAACCGTGTAACC-3'

G-strand : 5'-GGTTACACGGTTACAGGTTACAGGTTACAGGGTTACGGTTACG-3'

Oligonucléotides (ADN) *H. sapiens* :

C-strand : 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA-3'

G-strand : 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'

Duplex : C-strand + G-strand

Q23. Analysez systématiquement et interprétez les résultats de la Figure 10. Quelles conclusions pouvez-vous tirer de cette expérience en comparant les différentes pistes de l'autoradiogramme ?

On analyse maintenant le devenir des séquences télomériques dans les levures mutantes pour *pot1*.

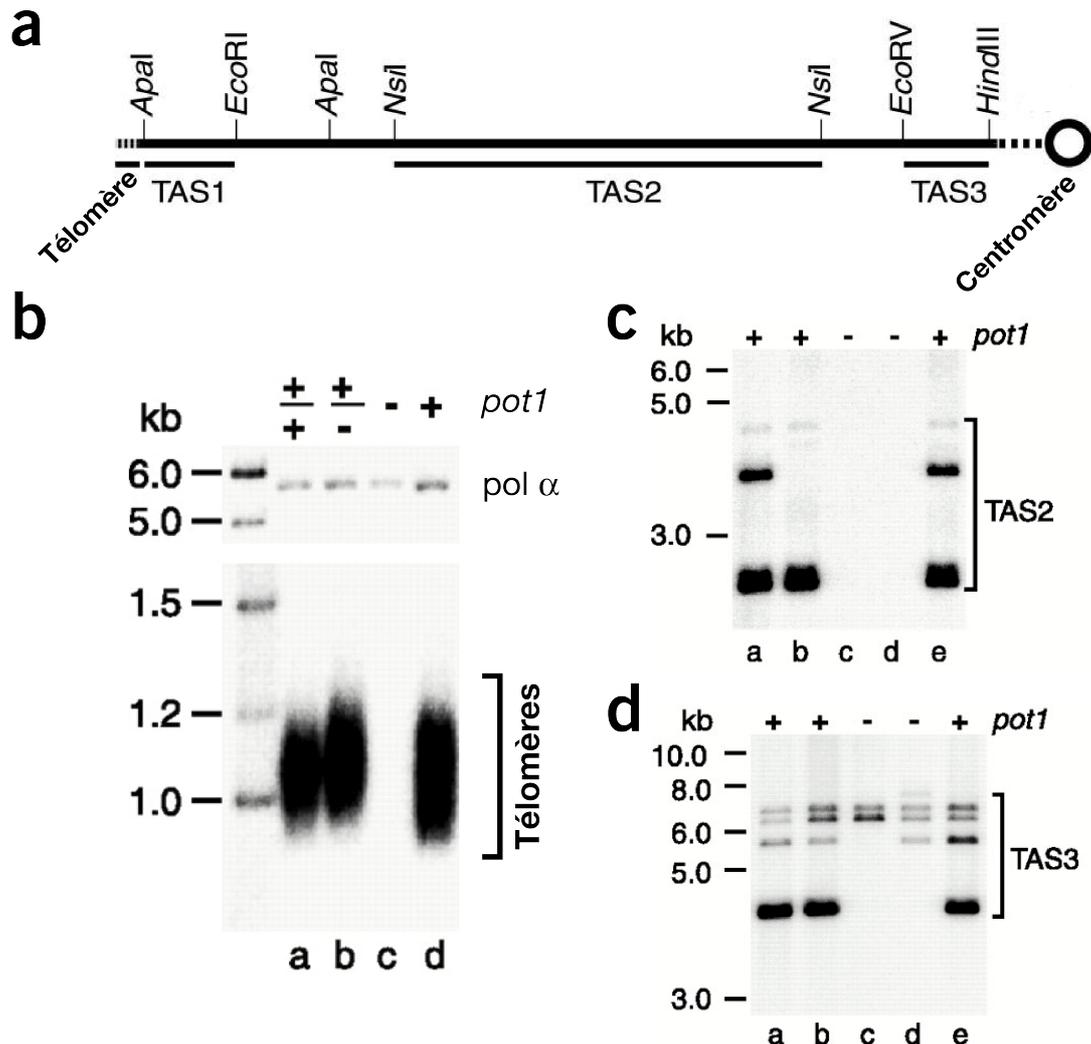


Figure 11 - Statut des séquences télomériques et sub-télomériques des mutants *pot1* par Southern blot. L'ADN génomique extrait de différentes souches de levure est digéré à l'aide d'enzymes de restriction, puis séparé par migration électrophorétique sur gel d'agarose. **a**, Position des sites de coupure de différentes enzymes de restriction aux extrémités des chromosomes de levure. Les séquences sub-télomériques (TAS1, TAS2 ou TAS3) sont suffisamment similaires sur les différents chromosomes pour qu'elles puissent être révélées par des sondes communes. **b**, Digestion de l'ADN génomique de cultures de cellules de levures (homozygotes, hétérozygotes ou haploïdes pour le gène *pot1*) par *EcoRI* et hybridation avec une sonde reconnaissant les séquences télomériques. *pol α* est une polymérase ADN. **c** et **d**, Digestion de l'ADN génomique de plusieurs cultures indépendantes de cellules de levures haploïdes par *NsiI* et hybridation avec des sondes reconnaissant la région sub-télomérique TAS2 (**c**) et TAS3 (**d**).

Q24. A quoi sert le test d'hybridation pour *pol α* dans la Figure 11?

Q25. Décrivez et interprétez les résultats des expériences présentées dans la Figure 11.

III.2 – Pot1 et TPP1: régulation de l'activité télomérase

En plus de Pot1, une seconde protéine nommée TPP1 dispose des motifs protéiques permettant la liaison aux extrémités des télomères. On cherche ici à tester expérimentalement si TPP1 peut effectivement se lier aux télomères.

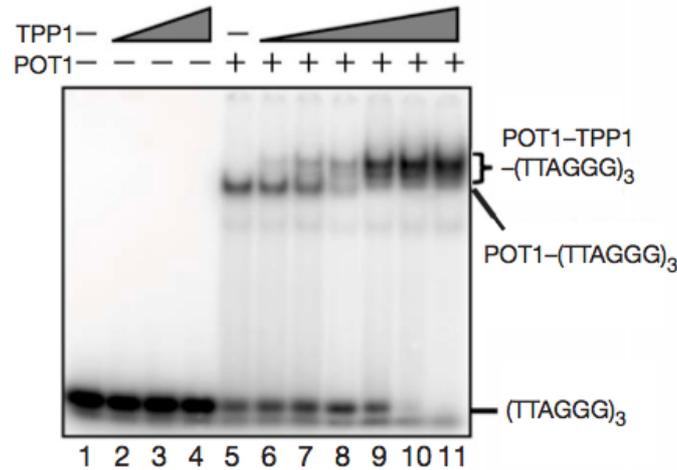


Figure 12 - Liaison de TPP1 et Pot1 à l'ADN télomérique. Expérience de gel shift utilisant un oligonucléotide radiomarqué (TTAGGG)₃. La présence et la quantité relative de protéine ajoutée aux oligonucléotides radiomarqués sont indiquée en haut de chaque piste.

Q26. En analysant systématiquement les résultats de la Figure 12, quelles conclusions pouvez-vous tirer de cette expérience ? En particulier, que pouvez-vous conclure sur l'affinité de liaison des protéines pour l'oligonucléotide ?

On répète ces expériences d'interaction en utilisant cette fois la séquence (TTAGGG)₅ (au lieu de (TTAGGG)₃) et un variant de TPP1 (TPP1-N) dans lequel un domaine N-terminal – représentant 15% de la protéine TPP1 pleine longueur – est supprimé (sans conséquences fonctionnelles).

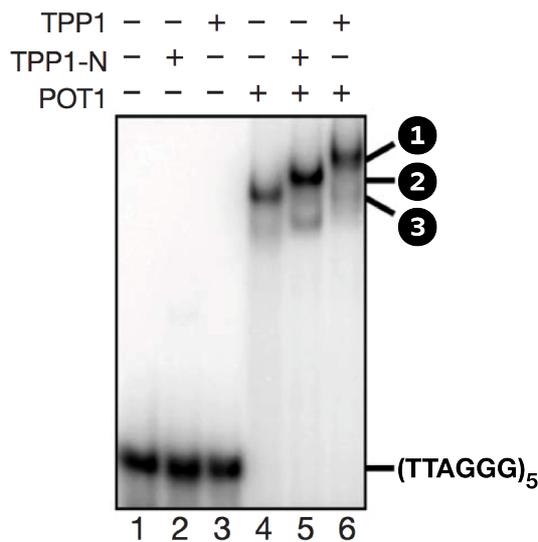


Figure 13 - Liaison de TPP1, TPP1-N et Pot1 à l'ADN télomérique. Expérience de gel shift utilisant la sonde radiomarquée (TTAGGG)₅. La présence (+) ou l'absence (-) de chaque facteur dans une piste est indiquée en haut de chaque piste.

Q27. Quel avantage technique apporte l'utilisation de la séquence (TTAGGG)₅ par rapport à la séquence (TTAGGG)₃ de l'expérience précédente ?

Q28. A quoi correspondent les trois bandes ①, ② et ③ dans la Figure 13 ?

On cherche maintenant à comprendre comment Pot1 se lie aux séquences télomériques. On détermine donc l'affinité de liaison de Pot1 ou du mélange Pot1-TPP1 pour différentes séquences d'ADN simple brin. On sait par ailleurs que Pot1 se lie précisément au motif d'ADN simple brin 5'-TTAGGGTTAG-3'.

Les oligonucléotides simple brin suivants sont utilisés :

- a 5' -TTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
- a3 5' -TTTGGGTTAGGGTTAGGG-3'
- a5 5' -TTAGGGTTAGCTTAGGG-3'

N.B. des mutations indiquées en gras/souligné sont introduites dans les oligonucléotides a3 et a5.

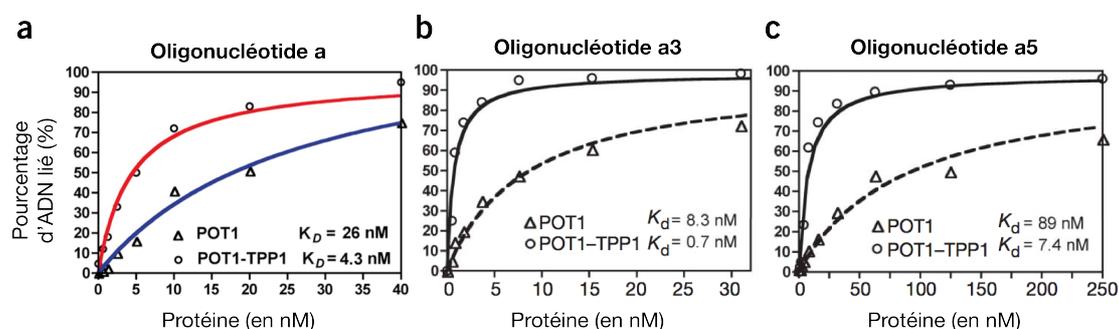


Figure 14 - Mesures d'affinité de liaison de Pot1 et Pot1-TPP1 pour différentes séquences d'ADN simple brin. Les constantes d'affinité (K_D) déduites des courbes de liaison sont indiquées dans chaque graph.

Q29. En observant les courbes de liaison et les constantes d'affinité, que pouvez-vous conclure sur le site de fixation de Pot1 et sur l'effet de TPP1 ?

On étudie maintenant l'influence de Pot1 et TPP1 sur l'activité de la télomerase *in vitro*. On dispose pour cela d'une télomerase recombinante produite en bactérie. En présence d'oligonucléotides contenant la séquence reconnue par la sous-unité TER (cf. **Introduction**), la télomerase est capable – *in vitro* – d'étendre cette séquence selon son patron caractéristique. On peut ensuite faire migrer les produits de cette réaction sur gel pour analyser la distribution de taille des ADN simple brins produits (Figure 15).

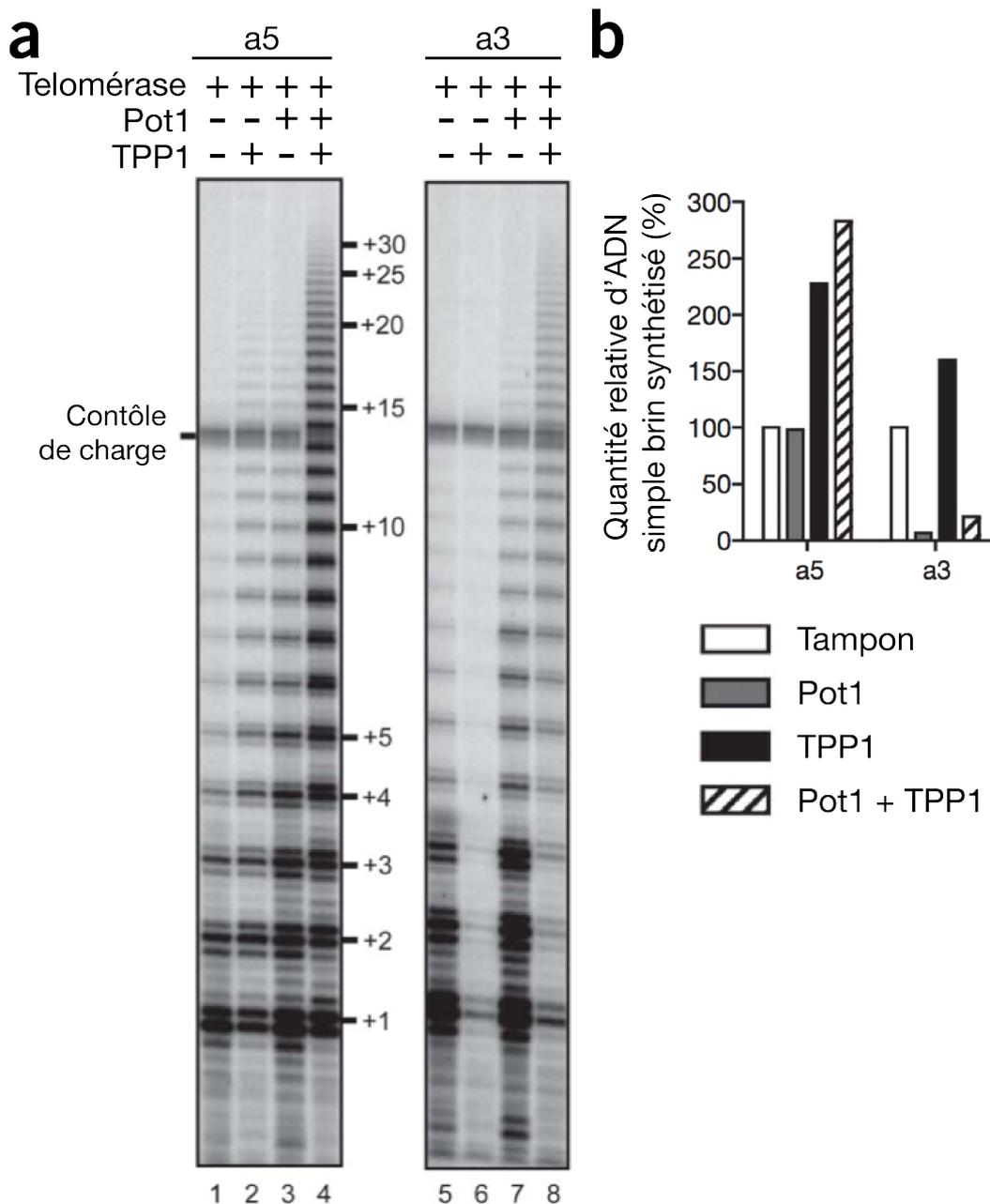


Figure 15 - Test de l'influence du complexe Pot1+TPP1 sur l'activité de la télomérase *in vitro*. **a**, Migration sur gel d'ADN simple brin produits par polymérisation dépendante de la télomérase. **b**, Quantités relatives d'ADN produites selon les conditions expérimentales.

Q30. En vous basant sur les observations faites à la question précédente et en comparant les résultats obtenus selon l'amorce utilisée (a3 ou a5) et selon les protéines ajoutées à la télomérase (Pot1, TPP1 ou Pot1+TPP1), que pouvez-vous déduire du rôle de chacun de ces facteurs dans l'élongation des extrémités simple brin des télomères ?

Q31. Au vu de tous les résultats détaillés jusqu'ici, formulez des hypothèses sur le rôle de Pot1 en présence et en l'absence de télomérase.

III.3 – La structure tri-dimensionnelle des télomères

Afin d'observer directement la structure des extrémités des chromosomes, on a extrait des *fragments de restriction terminaux* (FRT, cf. section II.1) de cellules de foie. Ces échantillons sont préparés pour être ensuite observés en microscopie électronique (Figure 17). Un des traitements consiste à exposer l'échantillon d'ADN au rayonnement ultraviolet (UVA) en présence de psoralen. Le psoralen appartient à une famille de composés naturellement présents chez les plantes. Le psoralen est un intercallant de l'ADN; l'exposition aux rayonnements UVA active cette molécule organique, qui peut alors se lier de façon covalente aux deux brins d'une double hélice d'ADN (Figure 16). Cette liaison se fait préférentiellement entre deux thymidines.

Réaction de photoactivation

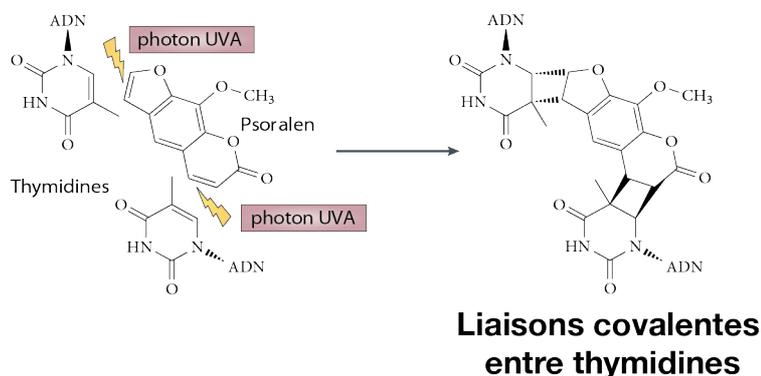


Figure 16 - Formation de liaisons covalentes entre deux thymidines lors d'un traitement psoralen+UV.

On observe maintenant les télomères d'hépatocytes après (1) traitement au psoralen, puis (2) élimination des protéines de l'échantillon.

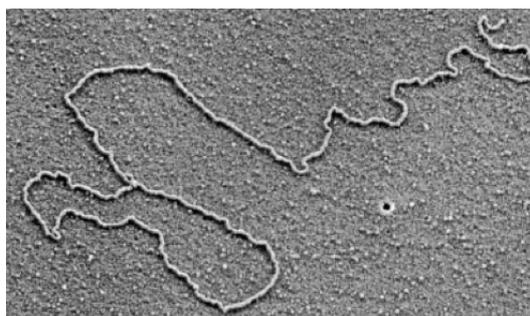


Figure 17 - Fragment de restriction terminal de télomères d'hépatocyte de souris observé en microscopie électronique. L'ADN total est traité au psoralen+UV avant extraction. Puis les protéines sont éliminées.

On observe la formation d'une boucle située à l'extrémité du fragment de télomère (Figure 17). Cette structure est appelée "t-loop" ("boucle t" ou boucle télomérique). Cette boucle n'est pas observée en l'absence de traitement psoralen+UV (non représenté ici).

On s'intéresse maintenant au rôle des protéines TRF1 et TRF2 dans la formation de cette boucle t dans un système *in vitro*. On sait que ces deux protéines peuvent se lier à des séquences télomériques double brin. On utilise donc un fragment d'ADN télomérique purifié qui est mélangé avec différentes protéines (Figure 18).

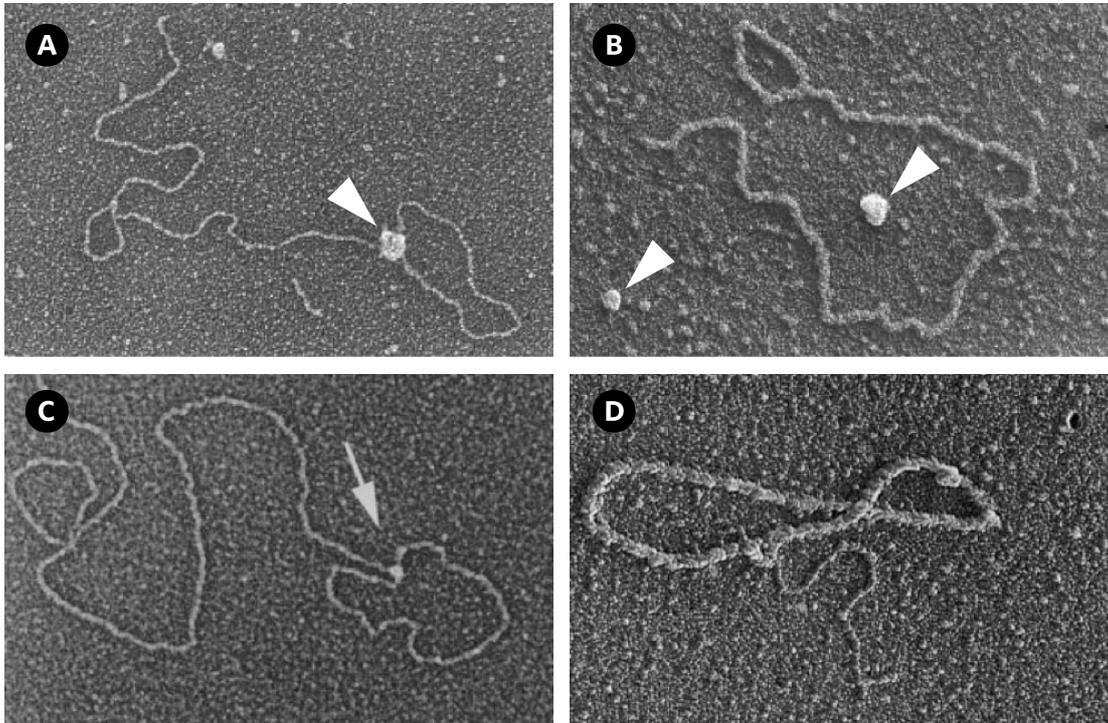


Figure 18 - a, ADN télomérique incubé avec TRF2 mais non traité au psoralen+UV. Une flèche blanche indique les agrégats de protéine TRF2. **b**, ADN télomérique incubé avec TRF2, traité au psoralen+UV, puis débarrassé de ses composants protéiques. Des flèches blanches indiquent les agrégats de protéine TRF2. **c**, Incubation d'ADN télomérique (après traitement au psoralen+UV) avec une protéine bactérienne purifiée se liant uniquement à l'ADN simple brin (SSB - single strand binding protein; indiquée par une flèche). **d**, ADN télomérique incubé avec TRF1 et traité au psoralen/UV.

Q32. Analysez chacun des panneaux de la Figure 18.

Q33. Proposez un modèle schématique le plus détaillé possible montrant la configuration prise par les deux brins des télomères lors de la formation de la t-loop ("boucle t"), ainsi que des protéines eucaryotes se liant aux différentes régions de cette structure.

FIN DE LA PARTIE III

Partie IV – Questions de culture générale

Q34. Répondez de façon brève et précise aux points suivants.

- a) Étymologie du terme "*chromosome*".
- b) Taille du génome de *Escherichia coli* et de *Homo sapiens*.
- c) Nombre de chromosomes chez *Homo sapiens*.
- d) d.1) Nommez les trois co-découvreurs de la structure en double hélice de l'ADN.
d.2) En quelle année fut faite cette découverte (à 5 ans près) ?
d.3) Quelle technique fut utilisée pour résoudre la structure de l'ADN ?
- e) Énoncez les deux lois formulées par Erwin Chargaff.
- f) Nommez les deux chercheurs français qui ont inventé le terme "Opéron".
- g) Proposez une définition du terme "*code génétique*".

FIN DE LA PARTIE IV

FIN DE L'ÉPREUVE