

# EPREUVE PRATIQUE DE BIOLOGIE- BIOCHIMIE

ENS : PARIS

*Coefficient : 30*

MEMBRE DE JURY : O. HYRIEN

L'épreuve d'une durée totale de trois heures concernait la ségrégation des chromosomes à la mitose et le mécanisme de la transition métaphase-anaphase, et reposait sur l'analyse de résultats expérimentaux extraits d'articles originaux. L'épreuve ne nécessitait que très peu de connaissances préalables, qui étaient d'ailleurs brièvement rappelées dans l'énoncé. Les expériences décrites mettaient en jeu des notions simples de biologie cellulaire, de génétique et de biologie moléculaire. Toutefois, le sujet était long, difficile, subtil et seuls ceux qui ont fait preuve de beaucoup de rigueur et d'objectivité sont parvenus à le traiter entièrement et à en démontrer une compréhension satisfaisante.

Dans les deux premières questions, les candidats devaient déduire d'expériences de micromanipulation et d'observation de la mitose dans des cellules en culture que : i) dès la métaphase les chromosomes alignés sur la plaque métaphasique sont soumis de la part des microtubules associés à chaque kinétochore à des forces opposées, dirigées vers les pôles opposés du fuseau, et qui s'équilibrent; ii) la séparation des chromatides sœurs au début de l'anaphase se fait indépendamment des forces exercées par les microtubules. Ils devaient en conclure que : iii) en anaphase il existe une force de cohésion entre les chromatides sœurs qui leur permet de résister aux tractions exercées par les microtubules ; iv) le déclenchement de l'anaphase n'est pas dû à une augmentation de la traction des microtubules mais à une dissolution brutale de la cohésion entre les chromatides sœurs. Ces questions ont été très bien traitées par certains candidats, moins bien par d'autres qui n'ont pas su déduire toutes les conclusions qui s'imposaient et se sont parfois égarés à répéter l'énoncé, à exposer des connaissances inutiles, voire à imaginer des scénarios inutilement compliqués sans pouvoir les appuyer sur les données présentées.

Dans les deux questions suivantes, les candidats devaient analyser des expériences de microscopie et de biochimie réalisées dans des extraits mitotiques d'œufs de grenouille capables d'assembler des plaques métaphasiques *in vitro*. Une première expérience montrait que i) l'addition de calcium à ce système expérimental déclenche l'inactivation du MPF et le passage de la métaphase à l'anaphase, puis le retour en interphase ; ii) l'addition d'une cycline B recombinante non dégradable bloque l'inactivation du MPF mais ne bloque pas la transition métaphase-anaphase; en revanche elle bloque

le retour en interphase ; iii) l'inactivation du MPF n'est donc pas nécessaire à la séparation des chromatides sœurs bien qu'elle soit nécessaire à la sortie de mitose.

Dans une expérience complémentaire, on ajoutait à l'extrait un fragment peptidique correspondant à la partie N-terminale de la cycline B, contenant ses signaux de dégradation. On précisait que ce peptide bloque la dégradation de la cycline B. Les candidats devaient i) comprendre que ce peptide agit comme un inhibiteur compétitif de la machinerie d'ubiquitination et de protéolyse de la cycline B et proposer des expériences pour vérifier ce point ; ii) déduire des résultats expérimentaux que ce peptide, selon la concentration ajoutée, retarde ou bloque à la fois l'inactivation du MPF et l'anaphase.

De la comparaison de ces deux expériences, les candidats devaient conclure que le peptide N-terminal bloque l'anaphase par un mécanisme distinct du maintien du MPF, puisque la première expérience montrait que l'anaphase peut se produire malgré le maintien artificiel d'une activité MPF élevée. Très peu de candidats ont été capables d'analyser correctement l'ensemble des données et de montrer en quoi les résultats des deux expériences étaient apparemment contradictoires. Certains ont même indiqué à tort que ces expériences se renforçaient mutuellement, alors même qu'ils avaient correctement interprété chacune ! Aucun n'a été capable d'imaginer la solution de ce paradoxe, à savoir que puisque le peptide agit en bloquant la machinerie d'ubiquitination de la cellule, c'est l'ubiquitination ou la dégradation d'une ou de plusieurs autres protéines que la cycline B qui est nécessaire à la séparation des chromatides sœurs. Aucun n'a été capable d'imaginer à ce stade que la cohésion des chromatides sœurs puisse être assurée par des ponts protéiques, et que la dégradation de ces ponts à l'anaphase fasse directement ou indirectement appel à la même machinerie que celle qui dégrade la cycline B. Dans la plupart des cas, il semble que ces erreurs soient dues à un manque de minutie dans l'analyse des images de microscopie.

Le reste de l'épreuve présentait une longue série d'expériences chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* destinée à identifier les protéines responsables de la cohésion entre chromatides sœurs et les protéines dont la dégradation à l'anaphase déclenche la dissolution de cette cohésion. Dans ces expériences on analysait en parallèle, chez le type sauvage et dans divers mutants, la progression du cycle cellulaire (taux de bourgeonnement, distribution du contenu en ADN), la formation des fuseaux mitotiques, la séparation des chromatides sœurs (après marquage d'un centromère par la GFP) et la présence de certaines protéines dans le noyau ou sur les chromosomes. Les premières questions indiquaient qu'un mutant d'une sous-unité de l'*anaphase promoting complex* (APC), un complexe multiprotéique responsable de l'ubiquitination des cyclines, est bloqué en métaphase. On utilisait ce mutant pour rechercher de nouveaux mutants capables de séparer leurs chromatides sœurs malgré l'inactivation de l'APC. Il fallait comprendre que ce crible permettait d'identifier des protéines impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs et dont la dégradation à la transition métaphase-anaphase est normalement assurée par l'APC, mais distinctes des cyclines.

On devait déduire des expériences réalisées avec le mutant *scc1* les points suivants. Le mutant *scc1* souffre d'un défaut de cohésion (séparation précoce) des chromatides sœurs, qui aboutit parfois à un déséquilibre de leur répartition dans les cellules filles. Cette séparation se produit avant la protéolyse de Pds1 (une protéine détruite avant l'entrée en anaphase, et dont des dérivés non dégradables inhibent l'anaphase) par l'APC, événement qui est normalement nécessaire à la séparation des chromatides sœurs, et se produit même en absence totale de fonction de l'APC. La protéine Scc1 est une protéine nucléaire instable, et son abondance fluctue au cours du cycle cellulaire. Elle est absente en G1, s'accumule en S, G2 et métaphase, et décline pendant l'anaphase. A l'inverse de la protéine Pds1 la protéolyse de Scc1 n'est pas complète même lorsque les deux jeux

de chromosomes sont séparés. Toutefois des étalements de chromosomes montrent qu'elle s'associe aux chromosomes pendant la phase S et s'en dissocie à la transition métaphase-anaphase. Ce point coïncide avec le début de sa protéolyse mais précède clairement son achèvement. Une dernière expérience montrait que l'association de Scc1 aux chromosomes dépendait de Smc1, une autre protéine dont la mutation aboutit à une séparation précoce des chromatides sœurs même en l'absence de fonction APC. On pouvait proposer sur la base de ces données que Scc1, Smc1 et les autres protéines identifiées lors du crible initial (Scc2, Smc3) forment un complexe associé aux chromosomes dès la phase S, responsable du maintien de la cohésion des chromatides sœurs jusqu'en métaphase, et dont la dissociation en anaphase, qui normalement dépend de l'activité de l'APC, déclenche la ségrégation des chromatides sœurs.

On devait déduire d'autres expériences réalisées avec des mutants de Pds1 et de l'APC que le seul rôle de l'APC dans la séparation des chromatides sœurs passe par la destruction de la protéine Pds1. En absence de Pds1, la séparation des chromatides sœurs est retardée mais ne dépend plus de l'APC. En l'absence d'APC et de Pds1, Scc1 se dissocie des chromosomes simultanément à la séparation des centromères, comme chez le type sauvage, alors que Scc1 ne se dissocie jamais des chromosomes dans les simples mutants de l'APC, qui sont incapables de séparer les chromatides sœurs. Des expériences de biochimie montraient que Pds1 n'est jamais associée aux chromosomes, mais forme un complexe avec une protéine de 180 kDa, Esp1. L'analyse du mutant *eps1* montre qu'il est incapable de séparer les chromatides sœurs alors que la dégradation de Pds1 n'est pas affectée. Il fallait comprendre que Pds1 est un inhibiteur de Esp1, et que lorsque Pds1 est dégradé par l'APC, Esp1 peut déclencher la dissociation de Scc1 des chromosomes, et donc la dissolution de la cohésion des chromatides sœurs et leur migration aux pôles opposés du fuseau mitotique.

Les candidats ont tous été handicapés dans la compréhension de ces expériences par le fait qu'aucun n'avait saisi qu'il doit exister des protéines distinctes de la cycline B dont la dégradation par l'APC aboutit directement ou indirectement à la perte de la cohésion des chromatides sœurs. Cependant, les plus rigoureux et les plus logiques ont su correctement interpréter la plupart des expériences et en déduire un modèle à peu près valide du rôle des protéines Esp1, Pds1, Scc1 et de l'APC dans le contrôle de la transition métaphase-anaphase. Ceci est remarquable si l'on tient compte de l'abondance des données à analyser et de la difficulté à faire les rapprochements nécessaires entre les différentes parties de l'énoncé. Les qualités d'observation et de rigueur nécessaires pour résoudre ce sujet se rapprochaient nettement plus de celles de bons étudiants de deuxième cycle que de ce qu'on attend habituellement d'étudiants de premier cycle.

Le sujet n'a été traité en totalité ou presque que par quatre candidats. Les autres n'en ont traité que la moitié (un candidat) ou les trois-quarts (cinq candidats). La notation et le classement des candidats n'ont pas posé de problème particulier. Un candidat a fourni une excellente copie, avec des réponses justes, précises et concises à la plupart des questions. Quatre candidats ont montré des qualités certaines. Quatre autres copies sont de qualité insuffisante, soit dans la qualité des réponses (trois copies), soit dans le nombre de questions traitées (une copie), et une seule copie s'est montrée très décevante.

La différence entre les candidats s'est faite sur leur capacité à interpréter correctement et complètement les données qui leur étaient soumises, à rédiger leurs conclusions de manière concise, et à faire les rapprochements nécessaires entre les différentes parties de l'énoncé. Nombreux sont ceux qui se sont égarés dans des réponses préconçues, simplificatrices, préférant se reposer sur leurs connaissances que d'affronter des résultats expérimentaux complexes dont ils ne connaissaient pas *a priori* l'interprétation. On ne saurait trop conseiller aux futurs candidats de s'entraîner à cette

épreuve à l'aide de livres d'exercices fondés sur l'analyse de données expérimentales originales.