

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2013

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 12 pages numérotées de 1 à 12

Calculatrices et documents non autorisés.

Le sujet comporte 3 parties complètement indépendantes.  
Le temps qu'il est conseillé de consacrer à chacune est d'une heure.

## Partie I : Sujet de synthèse.

*Question 1. Comparé à l'ADN, l'ARN présente une très grande variété de structures et de fonctions. Vous présenterez ces différentes fonctions en composant un exposé structuré dans lequel les illustrations graphiques seront les bienvenues. Vous veillerez à ne pas consacrer trop de temps à cette partie au détriment des deux autres (rappel : durée conseillée : 1h)*

## Partie II

La coccinelle d'Asie *Harmonia axyridis* (appelée ci-après *Harmonia*) est utilisée depuis près d'un siècle comme agent de lutte biologique contre divers ravageurs dont les pucerons. *Harmonia* envahit l'habitat des coccinelles établies comme *Coccinella septempunctata* (appelée *Coccinella*) dans de nombreux pays. Les premiers foyers invasifs sont décrits en 1988 aux États-Unis et en 2001 en Europe. Cette invasion est accompagnée d'une baisse significative de la population de *Coccinella*. Pour l'anecdote, *Coccinella septempunctata* a elle-même été introduite aux États-Unis au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle et s'y est comportée comme une espèce invasive.

**Question 2. Les facteurs favorisant l'invasion sont nombreux. Vous proposerez quelques hypothèses susceptibles d'expliquer l'avantage compétitif d'*Harmonia*.**

En plus de la prédation envers les pucerons, les larves des coccinellidés peuvent présenter un cannibalisme intra- et interspécifique. Dans une série d'expériences en milieu semi-naturel, van den Berg *et al.* ont placé des individus de même ou de différentes espèces sur une feuille d'arbre (4). Ils ont ensuite compté le nombre et la fréquence des contacts, leur nature (simple contact, attaque, capture, prédation), et, le cas échéant, l'espèce attaquant. Une troisième espèce est aussi étudiée ici, *Adalia bipunctata*. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 1.

Combinaison	Toutes observations			Observations des contacts				
	Nombre d'observations		Fréquence de contact	Nombre De contacts	Espèce attaquant	Attaque	Captures	Prédation
	sans contact	avec contact	(% des observations)					
HH	37	28	43%	59	H	14%	0%	0%
CC	54	17	24%	33	C	15%	0%	0%
AA	39	20	34%	41	A	10%	0%	0%
HC	52	29	36%	38	H	24%	78%	86%
					C	5%	0%	0%
HA	42	24	36%	33	H	27%	100%	44%
					A	6%	0%	0%
CA	57	17	23%	23	C	9%	100%	100%
					A	0%	0%	0%

Tableau 1 : Résultats des expériences de mise en contact homo- ou hétérospécifiques. La combinaison d'espèces utilisée est indiquée avec la convention suivante : H : *Harmonia* ; C : *Coccinella* ; A : *Adalia*.

**Question 3. Qu'apportent ces résultats ?**

**Question 4. A votre avis, quel est l'impact d'*Harmonia* sur les populations naturelles d'*Adalia* ?**

Le cannibalisme des coccinelles s'exerce aussi au dépend des œufs. La Figure 1 présente les résultats de mesures de prise de poids et de vitesses de développement de larves de premier stade des espèces *Harmonia* et *Coccinella*, nourries avec des œufs soit de la même espèce, soit de l'autre espèce. N/A indique que les mesures n'ont pas été réalisées à cause de la mort des animaux.

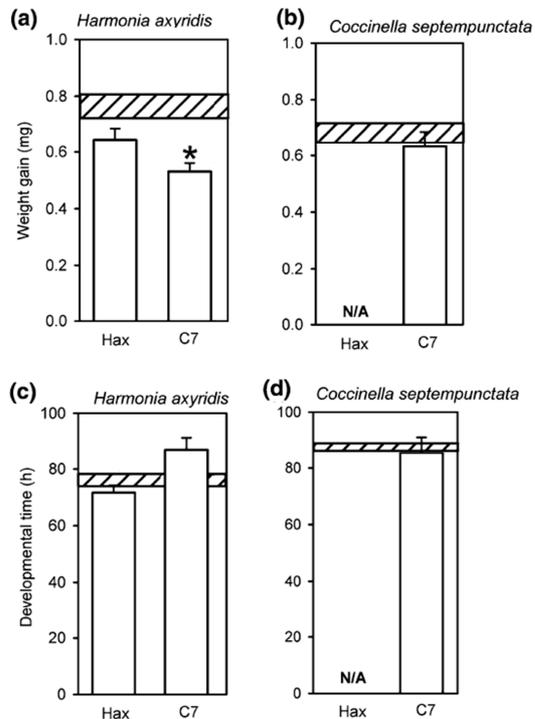


Figure 1 Gain de poids (a et b) et temps de développement (c et d) entre le premier et le second stade larvaire de larves d'*Harmonia* (a et c) ou de *Coccinella* (b et d) nourries avec des œufs soit d'*Harmonia* (Hax) soit de *Coccinella* (C7). Zones hachurées = valeurs atteintes en nourrissant les larves avec des pucerons ; l'astérisque indique une différence significative avec ces valeurs. Adaptée de (1).

**Question 5. A quoi servent les expériences réalisées en nourrissant les larves avec des pucerons ?**

**Question 6. Quelles informations vous apportent ces résultats ?**

En analysant le contenu des œufs des deux espèces, les auteurs ont mis en évidence des différences de composition significatives, en particulier, la présence d'un alcaloïde appelé harmonine, spécifique d'*Harmonia* (1). L'harmonine est également présente dans l'hémolymphe, toujours chez *Harmonia*. L'hémolymphe est le fluide circulatoire des arthropodes. La Figure 2 montre les effets de l'hémolymphe d'*Harmonia* et de *Coccinella* sur la croissance de la bactérie *E. coli*. Les auteurs ont synthétisé chimiquement de l'harmonine et montré qu'elle présente des effets similaires à ceux de l'hémolymphe d'*Harmonia* sur de nombreuses cellules procaryotes et Eucaryotes.

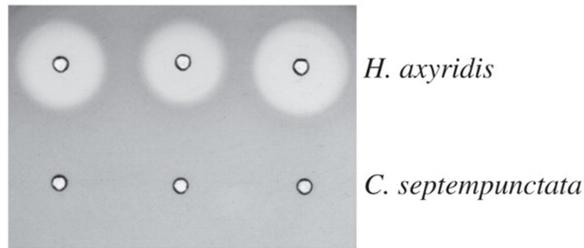


Figure 2 Croissance d'un tapis d'*Escherichia coli* sur un milieu riche gélosé après dépôt d'extrait d'*Harmonia* (ligne du haut) ou de *Coccinella* (ligne du bas) dans des puits pratiqués dans la gélose. Chaque dépôt est constitué d'un extrait d'un individu unique. Le milieu reste translucide en absence de développement de *E. coli*. Adapté de (2).

**Question 7. A quelle classe fonctionnelle de molécules pourriez-vous rattacher l'harmonine ?**

**Question 8. Quelles hypothèses pouvez-vous désormais bâtir pour expliquer les dynamiques relatives des populations d'*Harmonia* et de *Coccinella* ?**

La Figure 3 montre le devenir au cours du temps d'individus *Coccinella* ayant reçu ou non une injection d'harmonine.

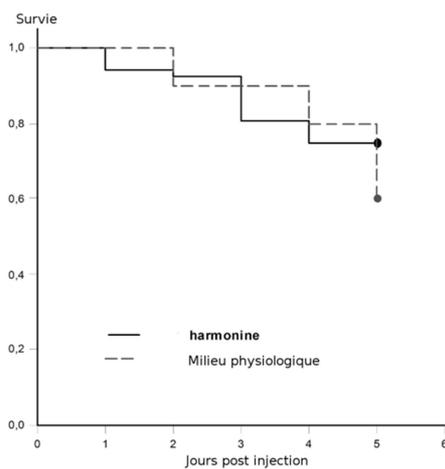


Figure 3 : Survie au cours du temps des individus de deux populations de *Coccinella*, après injection soit avec un tampon physiologique, soit avec ce tampon contenant de l'harmonine. En ordonnées, 1.0 et 0.0 indiquent respectivement 100% et 0% de survie.

**Question 9. Etes vous conforté(e) dans l'une de vos hypothèses ?**

Dans un article récent (3), les auteurs ont observé au microscope optique des échantillons d'hémolymphe brute des deux espèces. Ils ont par ailleurs soumis l'hémolymphe d'*Harmonia* à une centrifugation qui permet de séparer les divers corps cellulaires d'une part, et le surnageant qui ne contient plus que des solutés, d'autre part. Une suspension très diluée des divers corps cellulaires ainsi isolés a été injectée à une population de *Coccinella*. Après quelques jours, l'hémolymphe brute de ces *Coccinella* a également été observée au microscope optique (Figure 4).

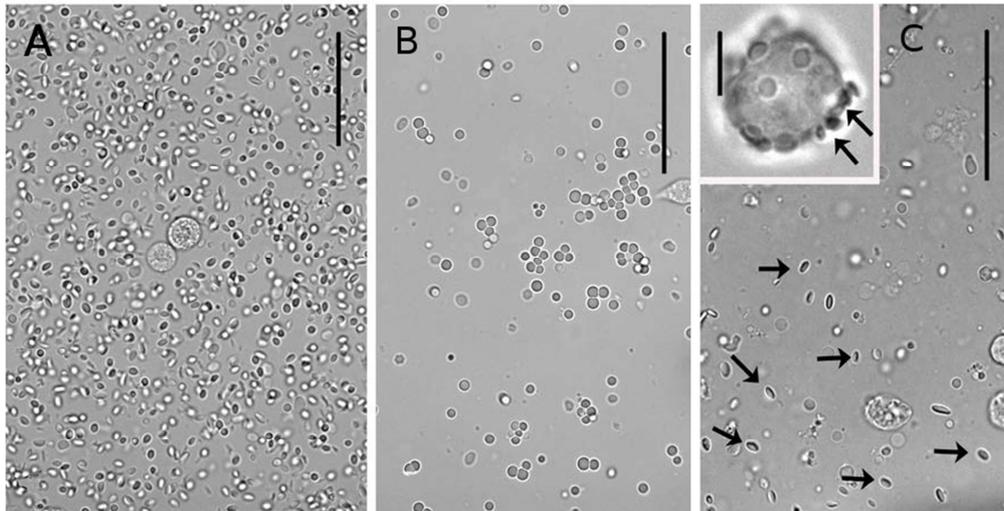


Figure 4 : Observation au microscope optique d'échantillons d'hémolymphe. Hémolymphe brute d'*Harmonia* (A). Hémolymphe brute de *Coccinella* avant (B) ou quelques jours après injection d'une suspension très diluée des divers corps cellulaires d'hémolymphe d'*Harmonia* (C). Les flèches en C montrent des structures non vues en B, et l'insert est un agrandissement d'un hémocyte. Barre d'échelle 20µm sauf en C, 5µm.

Question 10. Que dire de la comparaison entre les panneaux B et C de la Figure 4 ?

Question 11. Quelle peut être la nature des éléments pointés par les flèches Figure 4C ?

Sur le panneau A de la figure 4, au centre, et sur la droite des panneaux B et C sont visibles des hémocytes (plus gros que les autres corpuscules) qui sont des cellules circulantes de l'hémolymphe.

Question 12. a) Proposez un rôle physiologique pour ces cellules.  
b) Comment le testeriez-vous ?

Des *Coccinella* ont reçu diverses injections comme indiqué dans la légende de la Figure 5, où est rapporté le taux de survie des animaux dans les jours qui suivent l'injection.

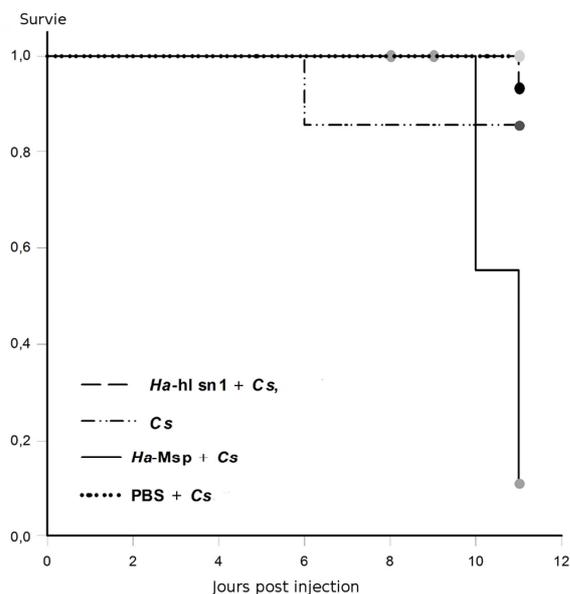


Figure 5 : Survie de populations de *Coccinella* ayant reçu une injection soit d'hémolymphe de *Coccinella* seule (Cs) ou additionnée d'un tampon salin (PBS+Cs), soit d'une suspension des divers corps cellulaires isolés d'hémolymphe d'*Harmonia* très diluée dans de l'hémolymphe de *Coccinella* (*Ha-Msp* + Cs), soit d'un surnageant d'hémolymphe d'*Harmonia* dilué dans de l'hémolymphe de *Coccinella* (*Ha-hl sn 1* + Cs). En ordonnées, 1.0 et 0.0 indiquent respectivement 100% et 0% de survie.

*Question 13. Que conclure de l'analyse de cette figure ?*

*Question 14. Vous récapitulerez l'ensemble de ces résultats sur une figure.*

## PARTIE III

La protéine p53 est un facteur de transcription qui participe au contrôle de l'expression de nombreux gènes suite, entre autres, à la perception, par la cellule, d'une variété de stress génotoxiques. Ses fonctions sont capitales pour le contrôle du cycle cellulaire après un stress, la stabilité du génome et le déclenchement de l'apoptose. La régulation de l'expression de p53 fait ainsi l'objet de très nombreuses études qui en ont montré la complexité et l'intrication avec de nombreuses voies de signalisation. Cette partie propose d'explorer certains aspects de cette régulation.

La Figure 6A présente le résultat de l'analyse, par western-blot, des protéines extraites de cellules MCF7 (lignée cellulaire issue d'un cancer mammaire humain), après un temps d'irradiation variable, en présence ou non de cycloheximide, un inhibiteur puissant de la synthèse protéique. L'irradiation crée des lésions dans l'ADN. Pour réaliser le western blot, les protéines sont extraites des cellules traitées, puis séparées selon leur taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide après chauffage en présence de sodium dodécylsulfate (SDS), un détergent puissant dénaturant les protéines, et de  $\beta$ -mercaptoéthanol, un agent réduisant les ponts disulfures (technique dite SDS-PAGE). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane, qui est comme une réplique du gel. La présence de p53 est alors détectée à l'aide d'un anticorps spécifique. Une bande signe la présence de la protéine d'une manière quantitative.

**Question 15. Quelle conclusion pouvez-vous tirer à partir de l'analyse de la figure Figure 6A ?**

**Question 16. Avez-vous des réserves à émettre sur l'expérience ?**

La Figure 6B présente, dans la boîte du haut, le résultat d'une immunoprécipitation (IP) de p53 analysée par autoradiographie. Pour cela, des cellules MCF7 ont été irradiées ou non et cultivées 20 minutes en présence de méthionine radiomarquée par le soufre radioactif  $^{35}\text{S}$  (qui n'induit pas d'effets radiotoxiques aux doses utilisées) et de MG132, une drogue inhibant le fonctionnement du protéasome. Le protéasome est un complexe multiprotéique réalisant la dégradation de certaines protéines. Les cellules sont lysées et les protéines p53 sont précipitées grâce à un anticorps spécifique. Le précipité est soumis à électrophorèse en gel dénaturant SDS-PAGE, et le gel est autoradiographié. L'IP est quantitative : toutes les molécules p53 présentes en solution sont précipitées.

Dans la boîte du milieu, p53 immunoprécipitée est détectée par western blot, comme décrit plus haut.

La boîte du bas présente une autoradiographie de l'extrait protéique brut avant l'immunoprécipitation de p53.

**Question 17. Quelle information apporte l'expérience de radiomarquage/immunoprécipitation ?**

**Question 18. Que vous apprend la comparaison attentive des western blots des panneaux A et B de la Figure 6 ?**

**Question 19. Qu'apporte la détection par western blot de l'actine ou de la luciférase, comme visible en A et C de la Figure 6 ?**

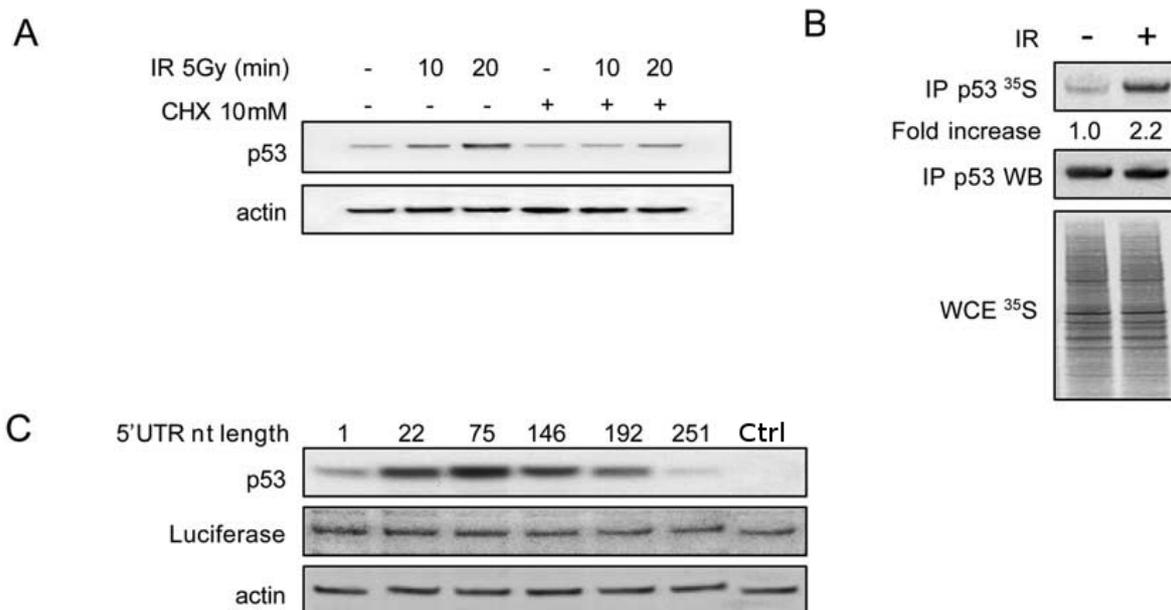


Figure 6 Analyse de l'expression de p53. **A** : Western blot d'extraits de cellules MCF7, non-irradiées (-), ou irradiées à une dose de 5 Gray (Gy) et récoltées et analysées au bout du temps indiqué. Les cellules sont traitées ou non avec la cycloheximide. p53 et actine sont détectées grâce à des anticorps spécifiques. **B** : (Boîte du haut) Autoradiographie après immunoprécipitation de p53 à partir de cellules irradiées (+) ou non (-), et cultivées en présence de méthionine <sup>35</sup>S et de MG132. « Fold increase » indique le facteur d'augmentation du signal d'autoradiographie. (Boîte du milieu) Western blot détectant p53 après immunoprécipitation. (Boîte du bas) Autoradiographie de l'extrait avant immunoprécipitation (WCE : whole cell extract, extrait total). **C** : Analyse par western blot de l'expression, dans des cellules H1299, de p53 codée par des plasmides présentant, en amont de la séquence codante, un 5'UTR d'une longueur variable indiquée en nucléotides (nt) sur la figure. Ctrl : cellules non transfectées. La luciférase et l'actine sont également détectées par western blot. Figure adaptée de (5)

Outre la séquence qui code la protéine, les ARN messagers p53 comportent des séquences transcrites mais non-traduites (untranslated regions, UTR) en amont et en aval ; on parle de 5'UTR et 3'UTR, respectivement. Les auteurs ont construit, sur des plasmides, plusieurs versions du gène p53 codant des ARNm de p53 avec leur 5'UTR plus ou moins tronquée. Ces gènes portent de plus une 3'UTR et un signal de polyadénylation normaux. Les auteurs ont ensuite transfecté des cellules H1299 (issues d'un carcinome pulmonaire humain) avec ces plasmides (et avec des plasmides codant la luciférase) et analysé la production de p53 par western blot. Les résultats sont présentés en Figure 6C.

**Question 20.** a) Pourquoi avoir utilisé des cellules H1299 plutôt que MCF7 comme auparavant?  
b) Quelle information peut-on d'ailleurs en tirer ?

**Question 21.** Que conclure de l'analyse de cette Figure 6C ?

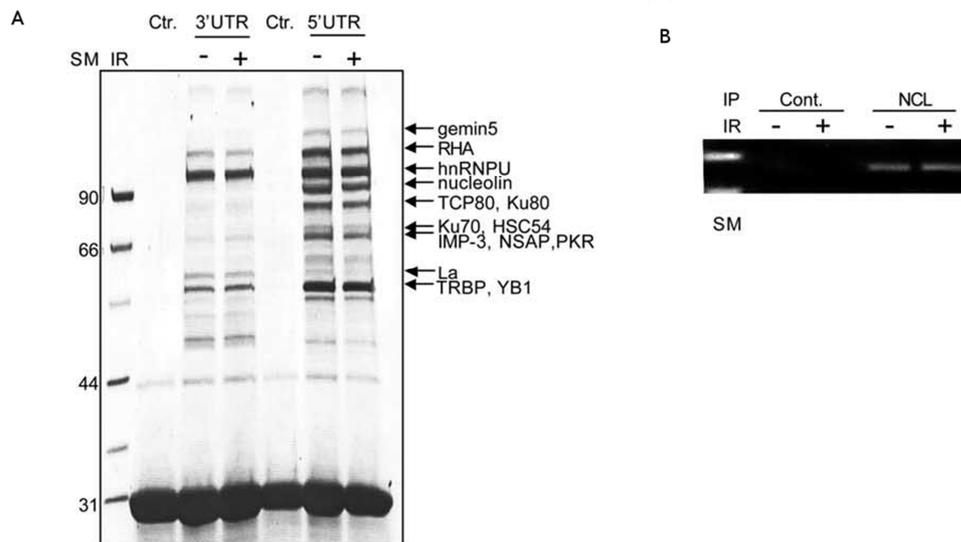
Les auteurs ont mis en contact des ARN produits *in vitro*, correspondant soit à la 5'UTR soit à la 3'UTR, avec des extraits cytoplasmiques de cellules MCF7 irradiées ou pas. Ces ARN ont été modifiés chimiquement et portent des molécules de biotine. Puis ils ont ajouté des billes recouvertes de streptavidine, une molécule ayant une très forte affinité pour la biotine. Après incubation, ils ont extrait les billes par centrifugation, et les ont fait bouillir dans une solution de SDS et de β-

mercaptoéthanol. Les surnageants ont ensuite été analysés par SDS-PAGE, le gel étant coloré par un réactif révélant toutes les protéines. Le résultat est visible Figure 7A. Les bandes visibles ont été analysées et les protéines identifiées sont indiquées sur la figure.

**Question 22.** Représenter le déroulement de l'expérience sur une figure. Que cherche-t-on à identifier ?

**Question 23.** En quoi consistent selon vous les expériences de contrôles (Ctr.) réalisées ?

**Question 24.** Que suggère cette expérience ?



**Figure 7 A :** Résultats de la coloration du gel SDS-PAGE ; les protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse. Voir texte principal. **B :** Résultats de l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-nucléoline (NCL) suivie d'une RT-PCR ; SM : marqueur de taille.

Par la suite les auteurs ont immunoprécipité la nucléoline (NCL), une des protéines détectées par spectrométrie de masse, à partir d'extraits cytoplasmiques de cellules MCF7 irradiées ou non, et grâce à un anticorps anti-nucléoline. Les précipités ont été débarrassés de leurs protéines, puis traités par l'ADN polymérase ARN dépendante dite reverse transcriptase (RT), en présence d'amorces polydT et de désoxynucléotides triphosphate. Enfin, les échantillons sont soumis à une PCR en présence d'amorces spécifiques du 5'UTR de p53. Les résultats sont présentés Figure 7B.

**Question 25.** Représenter le déroulement de l'expérience sur une figure. Que cherche-t-on à identifier ?

**Question 26.** a) Que suggère cette expérience ?  
b) Quelles en sont les limites ?

La Figure 8A représente le résultat d'une expérience dite de retard sur gel. La séquence 5'UTR radiomarquée est incubée avec la protéine RPL26. Puis la solution est soumise à une électrophorèse non dénaturante, et le gel est autoradiographé. Une solution contenant en plus un anticorps anti RPL26 est également analysée, ainsi qu'un contrôle ne contenant que la 5'UTR radiomarquée. La Figure 8B est comme la Figure 7B, mais un anticorps anti RPL26 est utilisé cette fois ci.

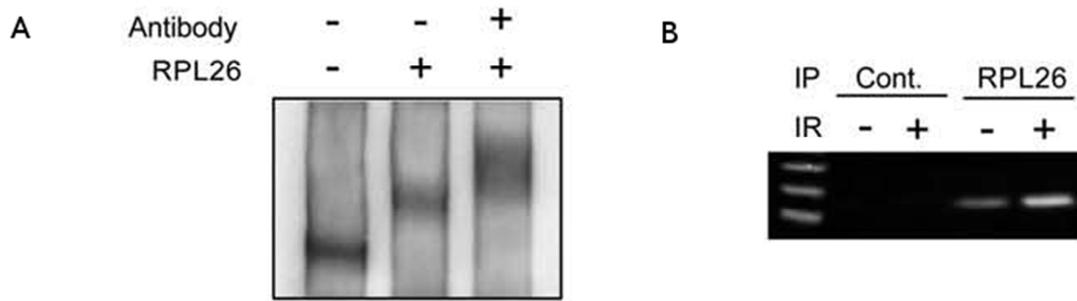


Figure 8 A : Résultat de l'expérience de retard sur gel. B : Résultats de l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-RPL26 suivie d'une RT-PCR

Question 27. Que suggèrent les résultats rapportés dans le panneau A ?

Question 28. Qu'apporte le panneau B ?

La Figure 9 rapporte des expériences similaires à celles de la Figure 6B. Les auteurs ont en plus ici préalablement transfecté les cellules MCF7 avec différentes combinaisons de plasmides codant la nucléoline ou RPL26. Les cellules sont ensuite cultivées en présence de méthionine <sup>35</sup>S, lysées, et une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique de p53 est réalisée. Après électrophorèse SDS-PAGE, les protéines sont visualisées par autoradiographie ou par immunodétection grâce à l'anticorps anti p53. Le lysat brut (avant IP) est aussi analysé par autoradiographie.

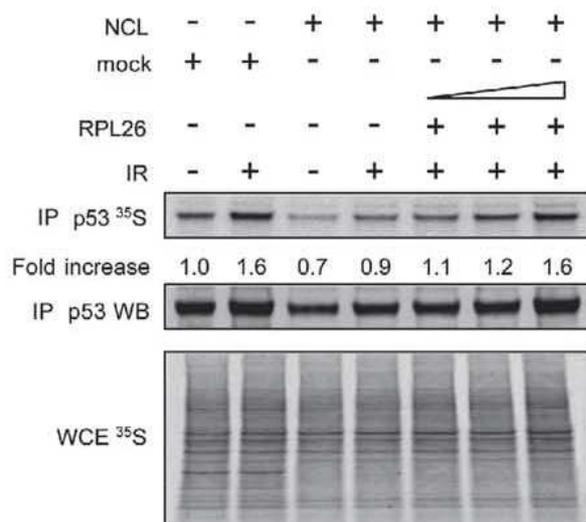


Figure 9 NCL, RPL26 et mock indiquent la transfection par un plasmide codant la nucléoline ou RPL26, ou un plasmide vide, respectivement. IR : irradiation. Le triangle allongé indique l'utilisation d'une dose croissante de plasmide codant RPL26. (Boîte du haut) Autoradiographie après immunoprécipitation de p53 à partir de cellules irradiées (+) ou non (-), et cultivées en présence de méthionine <sup>35</sup>S. « Fold increase » indique le facteur d'augmentation du signal d'autoradiographie. (Boîte du milieu) Western blot détectant p53 avec un anticorps spécifique. (Boîte du bas) Autoradiographie de l'extrait avant immunoprécipitation (WCE : whole cell extract, extrait total). Le MG132 n'est pas utilisé dans toute cette figure.

Question 29. Analyser l'effet de la nucléoline et de RPL26.

Question 30. Vous récapitulerez l'ensemble des résultats de cette partie sur une figure.

FIN DE L'ENONCE

## Références

1. Y. Kajita, J. J. Obrycki, J. J. Sloggett, K. F. Haynes, *Oecologia* **163**, 313 (Jun, 2010).
2. C. R. Rohrich *et al.*, *Biol Lett* **8**, 308 (Apr 23, 2012).
3. A. Vilcinskas, K. Stoecker, H. Schmidtberg, C. Z. Röhrich, H. Vogel, *Science* **340**, 862 (2013).
4. C. L. Raak-van den Berg, H. J. De Lange, J. C. Van Lenteren, *PLoS One* **7**, e40681 (2012).
5. M. Takagi, M. J. Absalon, K. G. McLure, M. B. Kastan, *Cell* **123**, 49 (Oct 7, 2005).