

Session 2014

Filière : 2^{ème} concours

ENS de Lyon

Epreuve de Biologie-Biochimie

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 12 pages numérotées de 1 à 12

Cette épreuve comporte 2 parties dont les thématiques sont reliées mais 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. Quelques aspects de la structure et du fonctionnement des télomères (1h15)
- Partie II. Quelques aspects de la structure et du fonctionnement des centromères (1h45)

Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

L'usage de tout document et de calculatrice est interdit

Centromères et télomères, des éléments essentiels du chromosome eucaryote

Préambule

Question 1

Nommez les différentes phases du cycle cellulaire eucaryote, en indiquant brièvement les événements essentiels qui s'y déroulent. Indiquez le devenir d'un chromosome dans chacune des phases, notamment pendant la mitose.

Partie I. Quelques aspects du fonctionnement des télomères

(1h15)

A. Approche de la structure des télomères

1. Observation initiale

La mesure de la longueur des télomères sur des fibroblastes (cellules du tissu conjonctif fraîchement mises en culture) humains montre les résultats suivants :

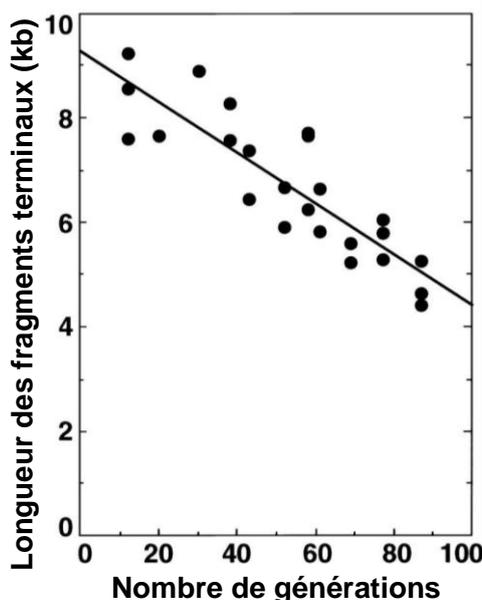


Figure 1 : longueur du fragment d'ADN terminal (exprimée en kilo paires de bases) de chromosomes de fibroblastes humains mis en culture en fonction du nombre de générations après la mise en culture des cellules.

Question 2

En rappelant le mécanisme de la réplication de l'ADN sur une fourche, expliquez quelle(s) conséquence(s) sont attendues aux extrémités d'un ADN linéaire et proposez une explication au résultat de la figure 1. Quelle(s) conséquence(s) pourrai(en)t avoir ce phénomène ?

2. Séquence des télomères

Une séquence caractéristique des télomères a été mise en évidence dans de nombreuses espèces : chez l'Homme il s'agit toujours de la même, répétée de très nombreuses fois à la suite :

côté 5'TTAGGG3' côté
centromère 3'AATCCC5' extrémité

Afin de connaître plus précisément l'organisation des télomères, notamment à leur extrémité, de l'ADN génomique a été dégradé grâce à des enzymes qui préservent les télomères, puis les fragments obtenus ont été incubés avec différents types d'oligonucléotides (courts

fragments d'ADN simple brin de séquence connue synthétisés artificiellement), portant à leur extrémité un marqueur biotine (petite molécule reconnue très spécifiquement par une autre, la streptavidine).

De la streptavidine fixée à des billes magnétiques a été ajoutée aux mélanges, et un aimant a permis de séparer le surnageant et les billes. L'ensemble a alors été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, permettant de séparer les fragments d'ADN. Après transfert sur une membrane, l'ADN a été dénaturé (chauffé afin de dissocier les deux brins) et incubé avec un oligonucléotide de séquence $5' \text{TTAGGG}^3'$ marqué radioactivement. La détection de la radioactivité donne un signal noir sur la membrane.

Les résultats suivants ont été observés :

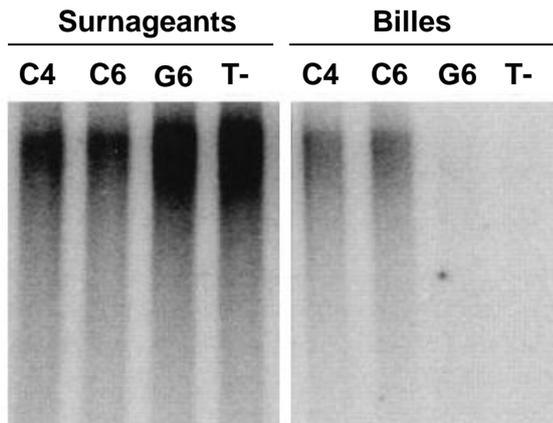


Figure 2 : analyse des séquences télomériques

Les fragments d'ADN télomériques ont été préparés comme indiqué dans le texte, en utilisant des oligonucléotides biotinylés portant 4 ou 6 fois la séquence $5' \text{CCCTAA}^3'$ (pistes C4 et C6), ou 6 fois la séquence $5' \text{TTAGGG}^3'$ (pistes G6), ou une séquence quelconque (piste T-). Après séparation les surnageants ont été déposés sur la partie gauche du gel et les billes sur la partie droite. Après électrophorèse et transfert sur membrane, l'ensemble des ADN a été dénaturé et incubé avec un oligonucléotide de séquence $5' \text{TTAGGG}^3'$ marqué radioactivement.

Question 3

Schématisez l'expérience réalisée. Comment les auteurs ont-ils choisi les séquences des nucléotides utilisés pour l'expérience ?
 Que pouvez-vous déduire des résultats obtenus ? Le modèle de structure de l'extrémité télomérique qui en découle est-il compatible avec votre analyse de la question 2 ?

3. Structure des télomères

Des fragments d'ADN correspondant aux télomères de chromosomes de cellules en culture ont pu être isolés, débarrassés de toute protéine et observés en microscopie électronique à balayage. Les images suivantes ont été obtenues :

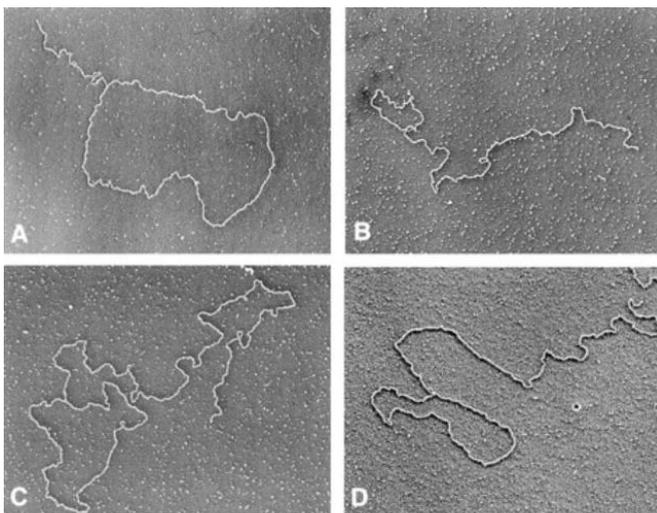


Figure 3 : observation de télomères, issus de cellules en culture, par microscopie électronique à balayage.

Lors de la purification les télomères ont été séparés du reste de l'ADN génomique et débarrassés de leurs protéines. La barre d'échelle représente une longueur d'ADN de 5 kilo paires de bases.

Question 4

Décrivez les images obtenues et proposez une explication.

B. Rôle des protéines télomériques TRF

Plusieurs protéines associées aux télomères ont été caractérisées. Afin de comprendre l'importance de l'une d'elle, TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 2), une lignée de cellules humaines en culture a été construite. Cette lignée est capable d'exprimer, suite à une induction par l'expérimentateur, une version mutée de TRF2, TRF2 Δ . Cette protéine mutée a un effet dominant négatif, c'est-à-dire qu'elle empêche la protéine normale (pourtant toujours présente) d'exercer sa fonction.

Suite à l'induction de l'expression de TRF2 Δ , les cellules cessent rapidement de se diviser. L'observation de leurs premières mitoses permet de visualiser les images suivantes :

A



B

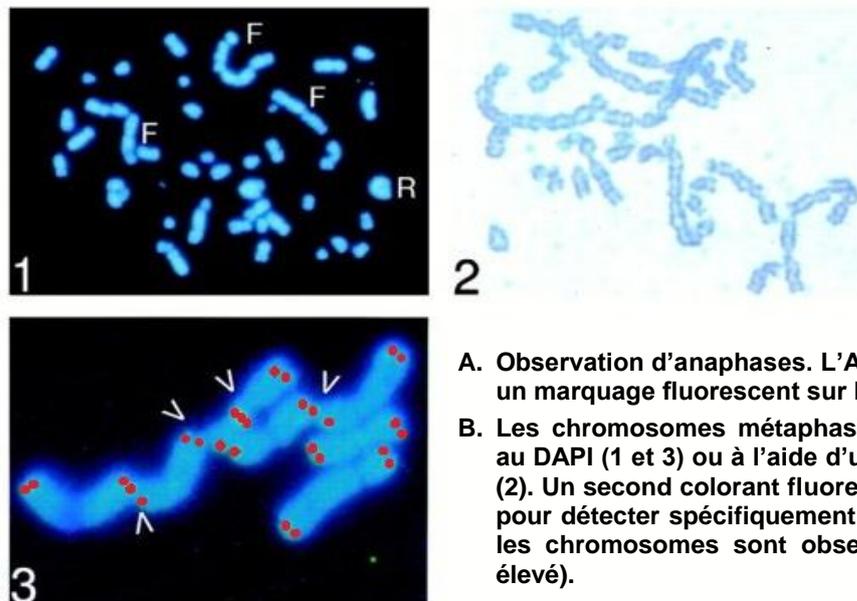


Figure 4 :
observation
de cellules
exprimant
TRF2 Δ

- A. Observation d'anaphases. L'ADN est coloré au DAPI, donnant un marquage fluorescent sur l'ensemble des molécules.
- B. Les chromosomes métaphasiques ont été isolés et colorés au DAPI (1 et 3) ou à l'aide d'un colorant bleu non fluorescent (2). Un second colorant fluorescent dans le rouge a été utilisé pour détecter spécifiquement les séquences télomériques (3, les chromosomes sont observés à un grossissement plus élevé).

Question 5

Que pouvez-vous dire des images obtenues en A ?

Question 6

Comment décririez-vous les figures observées en B ?

Sachant que d'une part, les cellules sont en permanence exposées à des agressions (d'origine endogène ou exogène) provoquant des cassures double-brins sur leurs molécules d'ADN, auxquelles elles doivent faire face, et que d'autre part les séquences répétées sont souvent sujettes à recombinaison, quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer les images observées en B ?

Dans cette hypothèse, quel(s) rôle(s) pourriez-vous attribuer à la protéine TRF2 ?

Afin de mieux comprendre la fonction des protéines TRF, la même expérience que celle décrite dans la figure 3 a été réalisée, mais les fragments télomériques obtenus ont été incubés en présence de différentes protéines purifiées. Les images suivantes ont été obtenues :

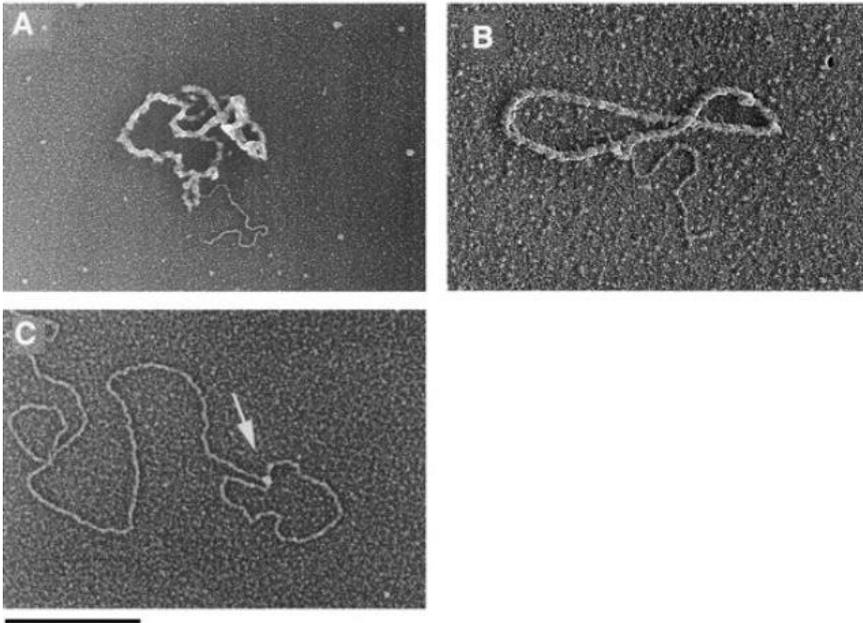


Figure 5 : fragments télomériques obtenus comme dans la figure 3, mais incubés après purification avec des protéines TRF purifiées (A et B) ou une protéine capable de se lier uniquement à l'ADN simple brin (C). La barre correspond à une longueur d'ADN de 1 kilobase (kb).

Question 7

Analysez les images obtenues. Proposez un modèle de structure des télomères en le représentant sur une figure.

C. Quelques données sur la télomérase

1. Découverte

Le phénomène décrit par la figure 1 n'est pas visible dans les cellules souches, ni dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Dans ces cellules, une activité enzymatique particulière a été découverte et nommée télomérase.

La caractérisation de la structure cette enzyme a permis de montrer qu'elle était constituée d'un ARN et de protéines.

Question 8

Quel(s) rôle(s) peuvent jouer les ARN dans les complexes enzymatiques ?

Sur l'ARN de la télomérase une séquence $5'CUAACCCUAAC3'$ a été caractérisée. Afin d'étudier son importance, des lignées cellulaires en culture surexprimant l'ARN de la télomérase sauvage ou présentant diverses mutations dans cette séquence ont été obtenues. Comme dans l'expérience décrite dans la figure 4, la surexpression de la télomérase mutée inhibe l'activité de la télomérase endogène. Les télomères de ces cellules ont été analysés et les résultats suivants ont été obtenus :

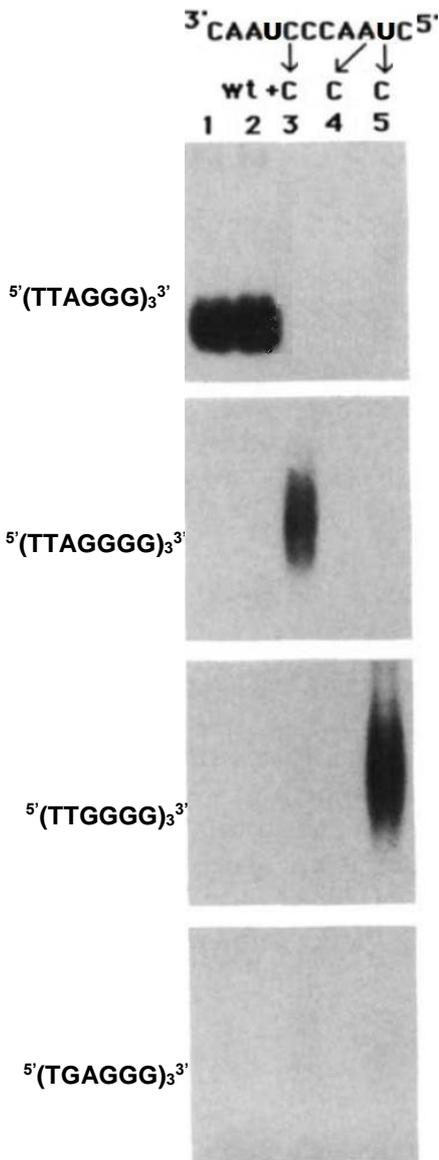


Figure 6 : analyse des télomères des cellules surexprimant l'ARN de la télomérase sauvage ou muté.

L'ADN génomique de cellules normales (1), surexprimant l'ARN de la télomérase sauvage (2) ou présentant diverses mutations (3 à 5, les mutations sont indiquées en haut de la figure sur la séquence-cible de l'ARN de la télomérase, orienté de 3' vers 5', +C signifie une addition de C) a été coupé par des enzymes, et les fragments ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Après transfert sur membrane, les ADN ont été dénaturés et incubés avec différents oligonucléotides marqués radioactivement dont les séquences sont indiquées sur le côté gauche. La révélation de la radioactivité donne un signal noir.

Question 9

Analysez les résultats obtenus dans les pistes 1 à 3. Que pouvez-vous en déduire sur le rôle de l'ARN de la télomérase ? Quel nom pourriez-vous donner à cette enzyme en référence à son activité ?

Question 10

Analysez les résultats obtenus dans les pistes 4 et 5. Comment pouvez-vous les expliquer ? On rappelle que selon les règles d'appariement de Wooble G peut s'apparier avec C ou avec U.

Question 11

Sur une figure représentez un modèle de fonctionnement de la télomérase, et expliquez les propriétés des télomères des cellules souches.

Question 12

Par quel mécanisme classique les télomères peuvent-ils se retrouver avec une structure essentiellement double-brin suite à l'action de la télomérase ?

Partie II. Quelques aspects du fonctionnement des centromères (1h45)

A. Approche de la structure des centromères

Question 13

Comment définiriez-vous un centromère ? Quels sont ses rôles ?

Les séquences d'ADN présentes au niveau des centromères ont été déterminées chez de nombreuses espèces. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau 1 :

Espèce	Type de séquence retrouvée	Taille
Levure <i>S. cerevisiae</i>	3 séquences fonctionnelles conservées, liant des protéines spécifiques	125 pb
Levure <i>S. pombe</i>	Un élément central de séquence variable selon les chromosomes, entouré de séquences répétées	35 à 110 kb
Drosophile	2 séquences répétées de nombreuses fois	500 kb
Homme	ADN satellite α répété de très nombreuses fois	100 kb à 4 Mb
Nématode <i>C. elegans</i>	Centromère dispersé tout le long des chromosomes	

Tableau 1 : comparaison des séquences d'ADN centromérique chez différentes espèces.

Les tailles des séquences sont exprimées en paires de bases (pb) et leurs multiples (kb = kilo paires de bases, Mb = mégapaires de bases).

Question 14

En analysant le tableau 1, et sachant que chez l'Homme des néocentromères peuvent apparaître au niveau de séquences diverses lors d'une cassure ou fusion de chromosome, que pouvez-vous dire sur les séquences centromériques ?

L'analyse de différentes régions chromatiniennes a permis de caractériser une nouvelle protéine, nommée CENP-A. Il s'agit d'un variant de l'histone H3, inclus dans les nucléosomes à la place de ce dernier. La détection de différentes protéines associées aux chromosomes humains a permis d'obtenir les images suivantes :

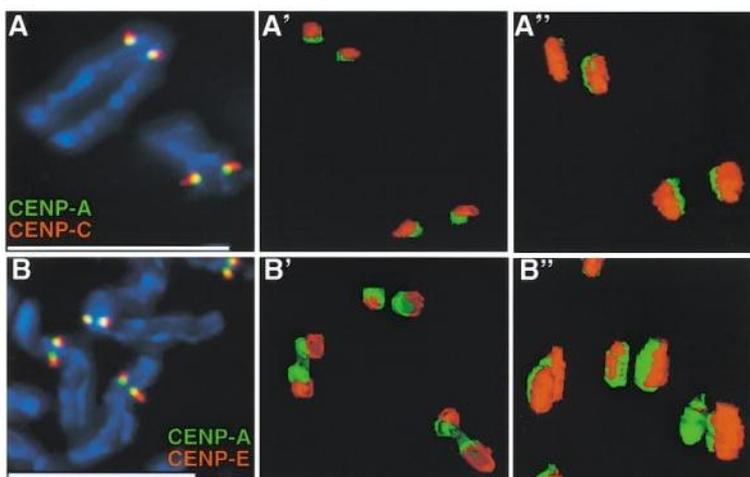


Figure 7 : localisation des protéines CENP-A, C et E sur des chromosomes humains.

Des chromosomes métaphasiques humains ont été isolés et incubés avec un colorant fluoresçant dans le bleu et reconnaissant la molécule d'ADN, un anticorps fluoresçant dans le vert reconnaissant la protéine CENP-A et deux anticorps fluoresçant dans le rouge reconnaissant les protéines CENP-C (A, A' et A'') ou CENP-E (B, B' et B''). La technique microscopique utilisée permet de visualiser les différentes fluorescences séparées ou ensemble, et de faire tourner les signaux afin d'avoir un effet 3D (A' et A'', B' et B'')

Question 15

Sachant que CENP-C est une protéine du kinétochore interne, et CENP-E une protéine du kinétochore externe, que pouvez-vous dire de la localisation de CENP-A ? On rappelle que le kinétochore est le complexe protéique permettant l'attachement du centromère aux microtubules.

Question 16

Que vous indiquent ces images sur l'architecture des centromères ? Comment vous semble-t-elle adaptée à leur fonction ?

Question 17

Sachant que la protéine CENP-A a été retrouvée sur les chromosomes de toutes les espèces étudiées avec une localisation identique, y compris au niveau des néocentromères, et que l'inhibition de son expression conduit à de graves dysfonctionnements lors de la mitose, quel pourrait être son rôle ?

B. Le mécanisme du SAC (Spindle Assembly Checkpoint)

1. Généralités

Chez les Eucaryotes la progression d'une cellule tout au long du cycle cellulaire est soumise à différents points de contrôle. Lors de la mitose, le passage de la métaphase à l'anaphase est notamment contrôlé par un complexe protéique nommé APC (Anaphase Promoting Complex).

Afin de comprendre le déterminisme de ce point de contrôle, la cinétique de la mitose a été étudiée sur des cellules en culture. Les résultats suivants ont été obtenus :

Cellules dans lesquelles il a pu être observé que :	Temps écoulé entre NEB et anaphase (moyenne en minutes)	Temps écoulé entre la bi-orientation du dernier chromosome et l'anaphase (moyenne en minutes)
20min après NEB, tous les chromosomes sont bi-orientés	38	24
20 à 29min après NEB, il reste au moins un chromosome mono-orienté	43	23
30 à 39min après NEB, il reste au moins un chromosome mono-orienté	59	25
40min ou plus après NEB, il reste au moins un chromosome mono-orienté	73	24
Temps moyen	50	23

Tableau 2 : chronologie de la mitose de cellules en culture.

Un chromosome mono-orienté est attaché aux microtubules d'un seul pôle du fuseau, un chromosome bi-orienté est attaché aux microtubules issus de chacun des pôles. NEB (Nuclear Envelope Breakdown) = rupture de l'enveloppe nucléaire.

Question 18 :

Analysez les résultats obtenus.

Quelle(s) information(s) vous donnent-ils sur le point de contrôle étudié ?

Pour aller plus loin, les auteurs ont détruit différentes régions chromosomiques à l'aide d'un laser pendant le déroulement des mitoses. Les résultats suivants ont été obtenus :

Mesure du temps avant l'anaphase	23 min environ entre la bi-orientation spontanée du dernier chromosome et l'anaphase	23 minutes environ entre le traitement et l'anaphase
Traitement effectué		
Aucun traitement	x	
Lésion d'un ou plusieurs bras chromosomique(s)	x	
Destruction du centromère du dernier chromosome mono-orienté		x
Destruction d'un kinétochore d'un chromosome bi-orienté	x	
Destruction du kinétochore non attaché du dernier chromosome mono-orienté		x

Tableau 3 : effet de différents traitements au laser sur la chronologie de la mitose de cellules en culture.

Question 19 :

Analysez les résultats obtenus. Que pouvez-vous en conclure ?

2. Rôle des protéines Mad

Un crible génétique réalisé chez la levure a permis de mettre en évidence l'implication d'une protéine, nommée Mad-2, dans le mécanisme étudié. Cette protéine a été retrouvée chez de nombreux autres organismes, notamment l'Homme. L'étude de sa localisation cellulaire montre les images suivantes :

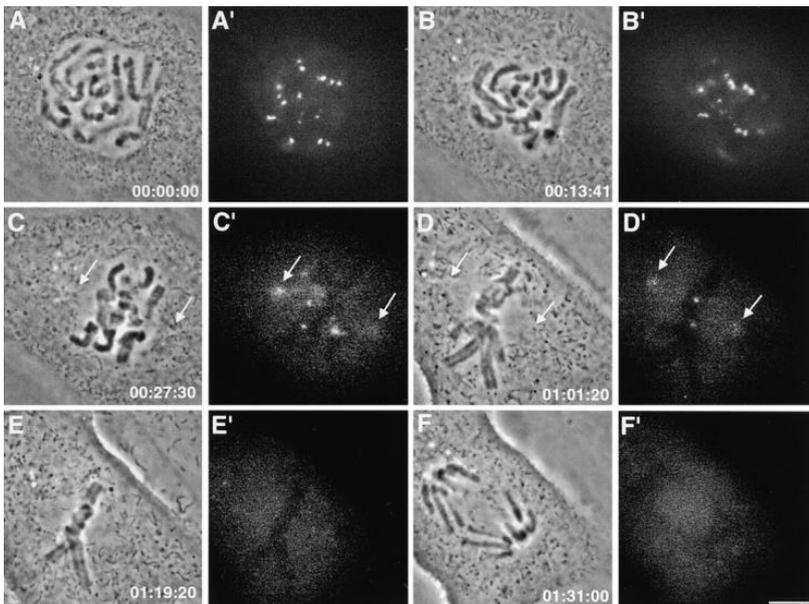
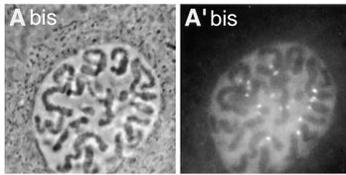


Figure 8 : localisation de Mad-2 au cours du temps dans des cellules exprimant une protéine Mad-2 fluorescente.

A à F : observation d'une même cellule en lumière blanche en cours du temps.

A' à F' : images correspondantes en fluorescence.

Abis et A'bis : même chose que A et A' mais sur une autre cellule, dont le nucléoplasme apparaît artificiellement fluorescent.

Les flèches blanches indiquent la position des centrosomes, la barre représente 3µm et le temps en heures : minutes : secondes est indiqué en bas à droite des images.

Question 20 :

A quelle étape du cycle cellulaire les cellules sont-elles dans les différentes images ?
Que pouvez-vous dire de la localisation de Mad-2 lors de ces différentes phases, sachant qu'une détection de la protéine CENP-A montrerait un signal semblable à celui observé en A' ou A'bis dans cette phase ?

Pour aller plus loin, les auteurs ont micro-injecté dans ces cellules des anticorps anti-Mad-2. Les images suivantes ont été observées :



Figure 9 : Observation d'une cellule à différents temps avant et après micro-injection d'anticorps anti-Mad-2.

La flèche noire représente le moment de l'injection. Les temps avant et après injection sont indiqués en minutes : secondes en bas à droite des images. La barre représente 5µm.

Question 21 :

Analysez les résultats obtenus.

En supposant que l'anticorps bloque l'activité de Mad-2, que pouvez-vous supposer de l'action de cette protéine ?

Afin de mieux comprendre la fonction de Mad-2, son éventuel lien avec le complexe APC a été étudié. Ce complexe est connu pour fixer des radicaux ubiquitine sur ses protéines-cibles, notamment la cycline B1, ce qui constitue un signal de dégradation de celles-ci. Des extraits cellulaires ont été incubés en présence de protéines Mad-2 et Cycline B1. Les résultats suivants ont été obtenus :

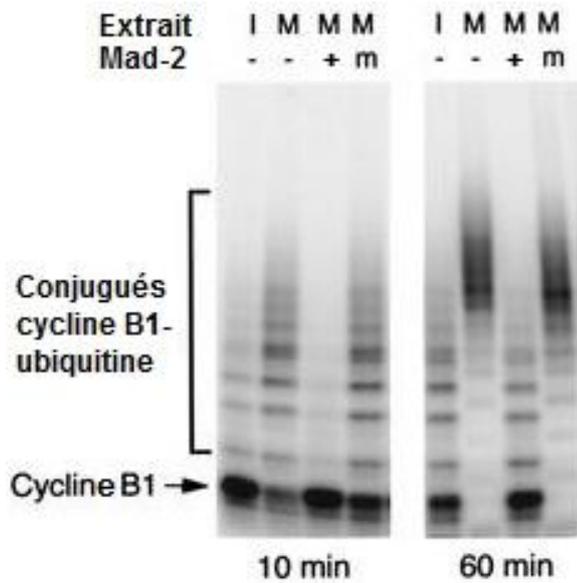


Figure 10 :

Des extraits de cellules en interphase (I) ou en mitose (M) ont été incubés pendant 10 (partie gauche de la figure) ou 60 minutes (partie droite) avec une protéine Cycline B1 radioactive en absence (-), ou en présence d'une protéine Mad-2 sauvage (+) ou mutée (m). L'ensemble a alors été déposé sur gel et soumis à une électrophorèse afin de séparer les protéines selon leur taille. La détection de la radioactivité donne un signal noir.

Question 22

Analysez les résultats obtenus. A quoi attribuez-vous la différence observée entre les extraits interphasique et mitotique ?

Quel semble être l'effet de Mad-2 ?

3. Rôle de la Cohésine

La Cohésine est une protéine capable de s'associer à l'ADN. Des cribles génétiques réalisés chez la levure ont montré que les souches déficientes en Cohésine présentaient de graves défauts mitotiques, apparemment dus à une structure inadéquate des chromosomes. Afin de mieux appréhender sa fonction, des chercheurs ont étudié les conséquences de son absence sur les chromosomes. Les résultats suivants ont été obtenus :

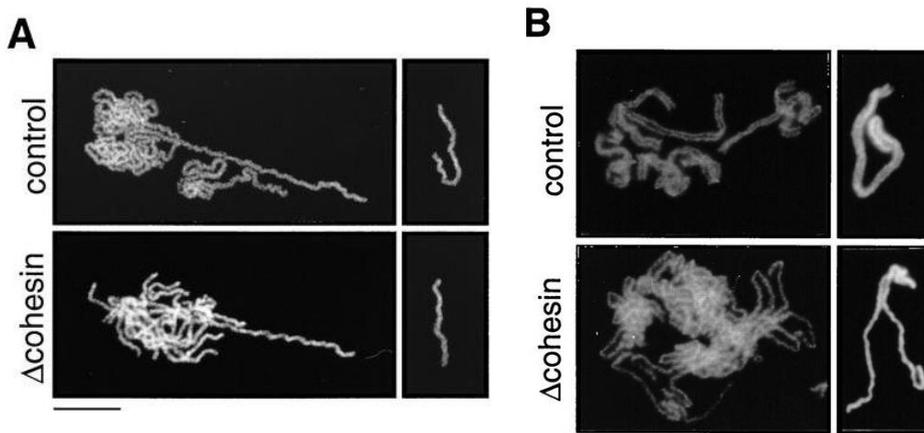


Figure 11 : de la chromatine de spermatozoïdes a été isolée, puis incubée avec des extraits cellulaires normaux (control) ou dépourvus de Cohésine (Δ cohesin), directement (A) ou après induction de la réplication de l'ADN (B). La chromatine a alors été traitée de façon à pouvoir être observée au microscope. La barre représente 10 μ m. Pour chaque image un chromosome isolé est représenté sur la droite.

Question 23

Analysez les résultats obtenus. Quel semble être le rôle de la Cohésine ?

4. Rôles de la Séparase et de la Sécurine

Le devenir de la Cohésine au cours de la mitose a été étudié chez la levure, grâce au marquage de celle-ci par des anticorps fluorescents. Parallèlement à la souche sauvage, une souche mutante a été étudiée, chez laquelle il est possible d'induire une déficience dans une autre protéine, la Séparase. Les résultats suivants ont été obtenus :

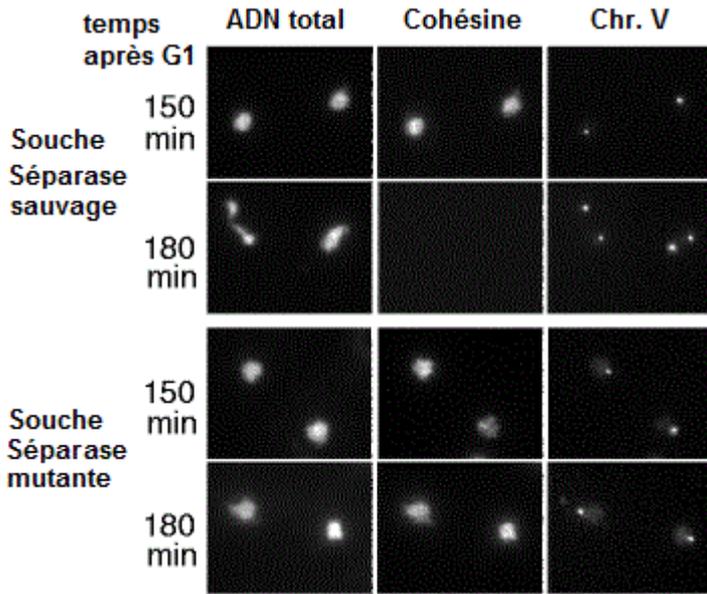


Figure 12 : Observation au microscope à fluorescence de souches haploïdes de levure exprimant une Séparase sauvage (panneaux du haut) ou chez laquelle une expression de Séparase mutante a été induite (panneaux du bas). Les cellules sont initialement bloquées en phase G1, puis le blocage est levé et les cellules sont observées 150 et 180 minutes plus tard, 150 minutes correspondant au temps nécessaire pour atteindre la métaphase. Différents marquages permettent d'observer successivement l'ADN total (panneaux de gauche), la Cohésine (panneaux du milieu) ou le chromosome V (panneaux de droite).

NB : on rappelle qu'en raison de la petite taille des cellules de levures, il n'est pas possible d'observer leurs chromosomes en microscopie optique comme dans les figures 7, 8 ou 9.

Question 24

Analysez les résultats obtenus avec la souche sauvage. A quelle étape semblent être les cellules au temps 180 minutes ?

Question 25

Analysez les résultats obtenus avec la souche mutée.

Afin de mieux comprendre les relations entre Cohésine et Séparase, les auteurs ont purifié et analysé la chromatine des deux souches de levures. Les résultats suivants ont été obtenus :

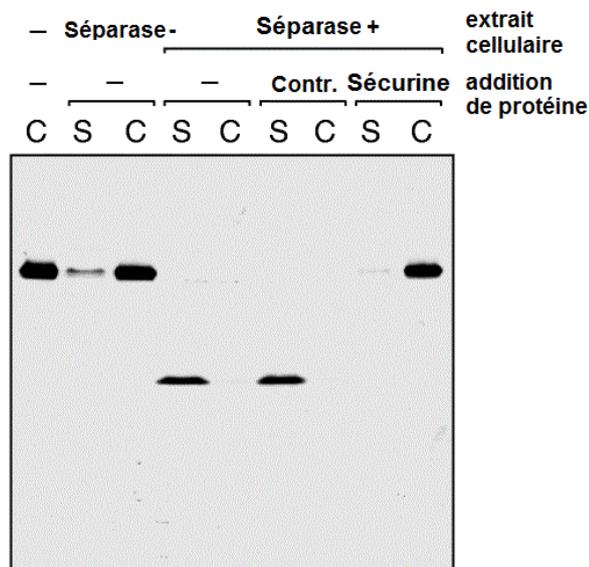


Figure 13 : de la chromatine de levures bloquées en mitose par un traitement au nocodazole (agent dépolymérisant les microtubules) a été extraite, et incubée avec une protéine Séparase sauvage (Séparase +) ou mutée (Séparase -). Une protéine supplémentaire, la Sécurine, ou une protéine quelconque (Contr.) a éventuellement été ajoutée aux extraits. Après incubation les mélanges ont été soumis à une centrifugation permettant de séparer la chromatine (fractions C) du surnageant (fractions S). Les deux types de fractions ont été déposés sur gel de polyacrylamide, et soumis à une électrophorèse afin de séparer les protéines en fonction de leur taille (les plus petites se retrouvant plus rapidement en bas du gel). Après transfert sur membrane la Cohésine est détectée grâce à un anticorps reconnaissant son extrémité C-terminale. La détection donne un signal noir.

Question 26

Analysez les résultats obtenus. Quel(s) effet(s) semble avoir la Séparase sur la Cohésine ?
Quel semble être l'effet de la Sécurine ?

Question 27

Sachant que la Sécurine s'est révélée être une protéine-cible du complexe APC, récapitulez l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie sous forme d'une figure modélisant le mécanisme du SAC.

Références bibliographiques (figures librement adaptées de :)

- Blower MD et al., *Dev. Cell* (2002) **2** : 319–330
Fang G et al., *Genes & Dev.* (1998), **12** : 1871–1883
Griffith JD et al., *Cell* (1999), **97** : 503–514
Howell BJ et al., *J. Cell Biol.* (2000), **150** : 1233–1249
Losada A et al., *Genes & Dev.* (1998), **12** : 1986–1997
Rieder CL et al., *J. Cell Biol.* (1994), **127** : 1301–1310
Rieder CL et al., *J. Cell Biol.* (1995), **130** : 941–948
Uhlmann F et al., *Nature* (1999), **400** : 37–42
van Steensel B et al., *Cell* (1998), **92** : 401–413
Wright WE et al., *Genes & Dev.* (1997), **11** : 2801–2809
Yu GL et al., *Nature* (1990), **334** : 126–132