

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admissions session 2018
Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

L'utilisation de tout document ou de calculatrice est interdit

* * *

Ce livret comprend 12 pages numérotées de 1/1 à 1/12

Cette épreuve comporte 2 parties dont les thématiques sont reliées mais qui peuvent être traitées de façon indépendante. L'introduction est commune aux deux parties. 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. Aspects structuraux et fonctionnels de l'épithélium olfactif des rongeurs (1h45)
- Partie II. Quelques phénomènes relatifs au sens de l'odorat (1h15)

Soyez concis, une brève justification est cependant attendue pour chaque réponse.

INTRODUCTION

L'analyse structurale et fonctionnelle du sens de l'odorat a permis la compréhension d'une grande partie des acteurs et des mécanismes à l'œuvre, tandis que certains points restent incompris.

La figure 1 est une représentation schématique de l'épithélium olfactif de souris, avec la cavité nasale en haut de la figure (issue de (1)). Les différents types cellulaires sont identifiés, au niveau moléculaire, sur la base de marqueurs qu'ils expriment spécifiquement. Les neurones récepteurs olfactifs mNRO (plus simplement : NRO) sont les neurones qui produisent un potentiel d'action à partir d'un signal odorant.

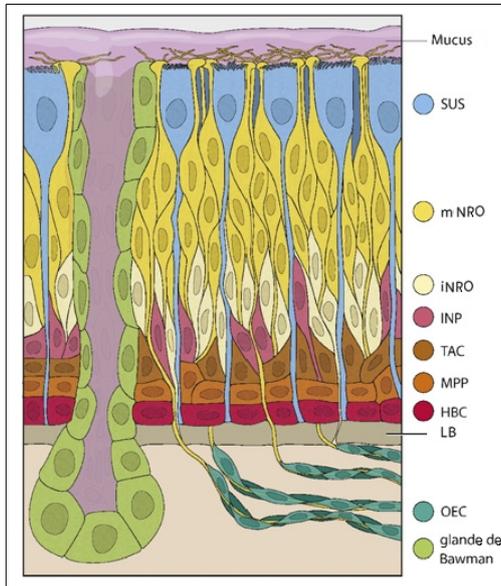


Figure 1 : Épithélium olfactif de souris. Les différents types cellulaires sont indiqués par différentes couleurs. L'épaisseur entre la face apicale (présence de mucus) et la lame basale (LB) est d'environ 100 micromètres. mNRO (plus simplement : NRO) désigne les neurones récepteurs olfactifs, les autres abréviations désignent d'autres types cellulaires présents dans cet épithélium pseudo-stratifié.

Les récepteurs olfactifs (RO) sont des protéines avec 7 domaines transmembranaires, essentiellement exprimés au niveau des épithélia olfactifs par les neurones récepteurs olfactifs (NRO). Ils sont codés par une grande famille de gènes : chez l'humain, on dénombre 384 gènes différents, et 1250 chez la souris. Tous les RO possèdent des motifs d'acides aminés conservés qui constituent des signatures moléculaires les distinguant d'autres protéines transmembranaires.

Partie I

La figure 2 présente la distribution de tous les gènes codant les récepteurs olfactifs (RO) dans le génome humain. Les 23 chromosomes sont représentés par des idéogrammes horizontaux, les gènes codant les RO comme des traits dirigés vers le haut. La figure indique aussi, par des traits dirigés vers le bas, la présence de pseudogènes. Les pseudogènes ont des séquences très proches de celles des gènes mais présentent des mutations (apparitions de codon STOP, entre autres) qui leur enlèvent la capacité à coder des récepteurs fonctionnels. On compte 467 pseudogènes chez l'humain, et 200 chez la souris.

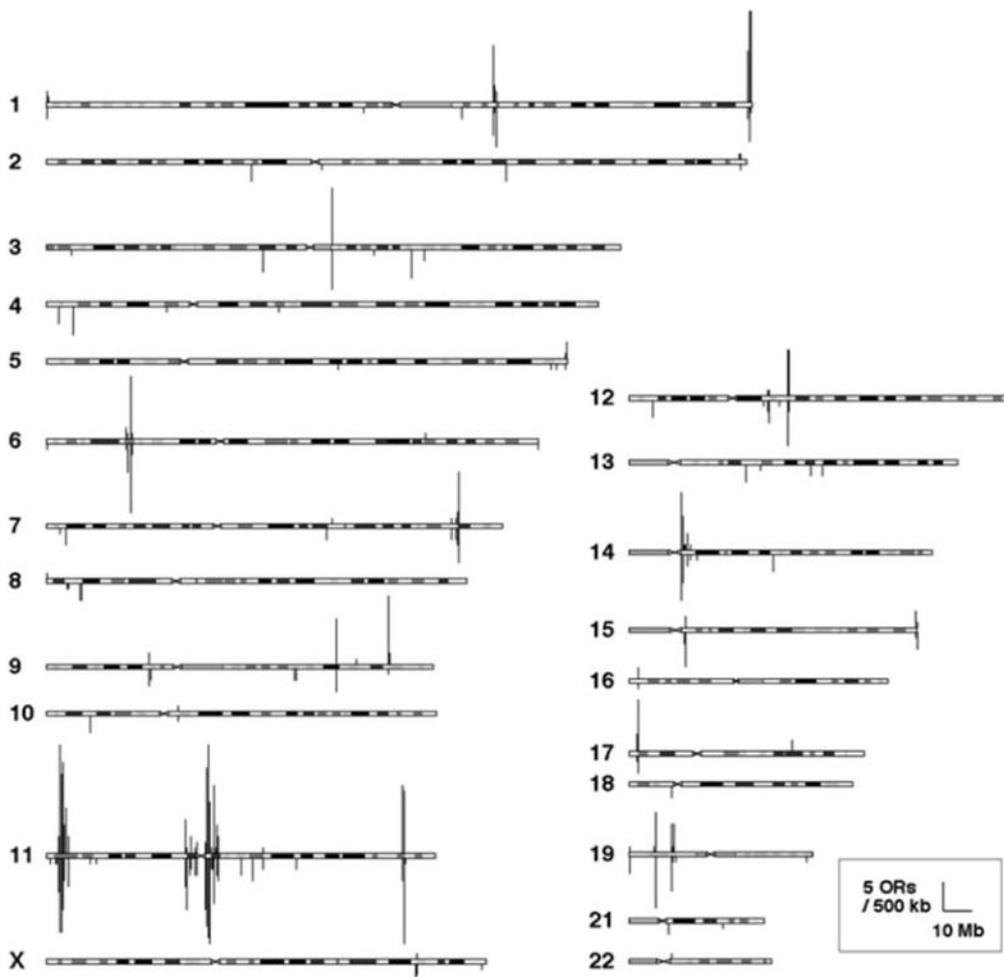


Figure 2: Position dans le génome humain des gènes codant pour les récepteurs aux odeurs.

Question 1: Que pouvez-vous dire de la distribution génomique des gènes et pseudogènes des RO ?

Question 2: Avez-vous une idée de l'origine des pseudogènes des RO ?

Question 3: Quelles hypothèses pouvez-vous énoncer pour expliquer les différences de nombre de gènes et pseudo-gènes entre espèces ?

Il est possible de détecter l'expression d'un gène dans des tissus entiers ou sur des coupes histologiques *via* la détection des transcrits de ce gène. Une technique largement utilisée met en œuvre des sondes nucléiques (c'est-à-dire, des ARN ou des ADN) pour détecter les ARNm.

Question 4: Sur quelle propriété des acides nucléiques cette technique est-elle basée ?

La figure 3, tirée de (2), met ainsi en évidence l'expression du gène codant pour le récepteur *I7* chez le rat. Le cliché de gauche montre la surface de l'épithélium olfactif au niveau des cornets. L'expression de *I7* est visualisée par les points plus sombres. Le cliché de droite est une coupe de l'épithélium. L'expression de *I7* apparaît ici en bleu foncé. La flèche montre la lame basale.

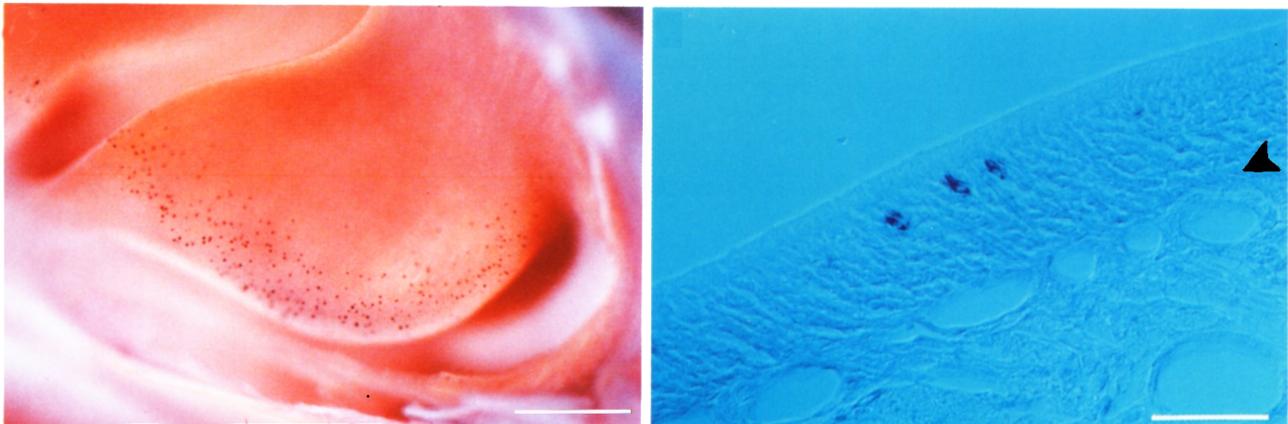


Figure 3 : Mise en évidence de l'expression de *I7* dans l'épithélium olfactif. Barre d'échelle: 0,5 mm à gauche et 65 μ m à droite. La flèche montre la lame basale.

Question 5: Les cornets, grâce aux lamelles osseuses sous-jacentes, sont une structure en relief. A votre avis, quel(s) avantage(s) ce relief peut-il conférer au mécanisme de l'olfaction ?

Question 6: Quelles sont les structures au niveau desquelles le marquage est détecté ?

Question 7: Quel phénomène particulier est mis en évidence par ces résultats ?

Il est possible d'isoler physiquement les différentes cellules de l'épithélium, afin d'obtenir des suspensions très enrichies en NRO. La détection des gènes exprimés par ces cellules est possible par une technique dite de RT-PCR. Les ARNm sont extraits et purifiés à partir des cellules puis ils sont rétro-transcrits *in vitro* par l'enzyme transcriptase-inverse : c'est l'étape appelée RT (pour reverse transcription). L'ADN résultant est « amplifié » par PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, qui utilise une ADN polymérase et des amorces oligonucléotidiques. Cela permet d'obtenir un grand nombre de copies identiques à la séquence d'intérêt. Ces produits de PCR sont ensuite visualisés après électrophorèse en gel d'agarose. La technique est suffisamment sensible pour détecter les ARNm d'une cellule unique. La figure 4, issue de (3), présente le résultat de détection de transcrits de *I7* par RT-PCR menée sur des ARNm extraits de 10 000, 3 000 ou 200 cellules NRO.

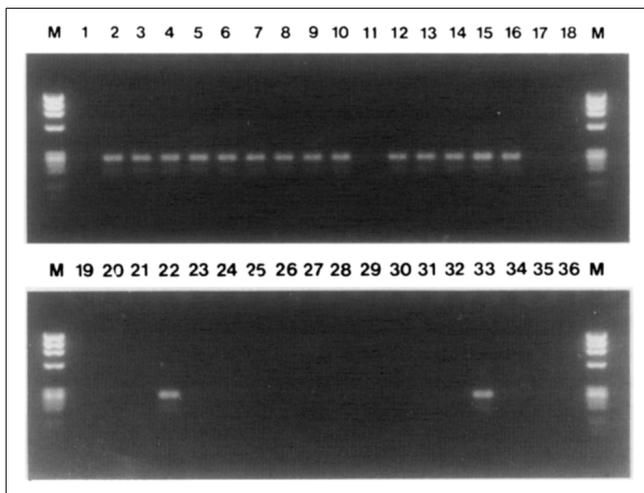


Figure 4 : Détection de transcrits de I7 par RT-PCR à partir de NRO isolés. Pistes 1, 17, et 18 : contrôles négatifs. Produits de RT-PCR obtenus avec des ARNm provenant d'un mélange de 10,000 cellules (pistes 2 à 8) ou 3,000 cellules (pistes 9 à 16) ou 200 cellules (pistes 19 à 36). Les pistes M présentent une échelle de marqueurs de tailles moléculaires.

Question 8: Comment sont réalisés les contrôles négatifs selon vous ?

Question 9: Par rapport aux information de la figure 3, quelle information supplémentaire cette nouvelle figure vous permet-elle d'estimer ?

Un article plus récent présente les résultats de l'analyse de la transcription des RO, par une technique de séquençage à haut débit conduite sur des ARNm extraits de cellules uniques. Par rapport à la RT-PCR, cette technique a l'avantage de pouvoir identifier et de quantifier simultanément tous les transcrits présents dans une cellule. Les auteurs ont isolé 18 NRO de souris, puis purifié et séquencé leurs ARNm. La figure 5 présente en abscisses les 1250 gènes codant les RO, et en ordonnées les 18 NRO étudiés. La couleur des traits verticaux indique, en utilisant une échelle logarithmique, le nombre de copies d'ARNm présentes dans chaque cellule.

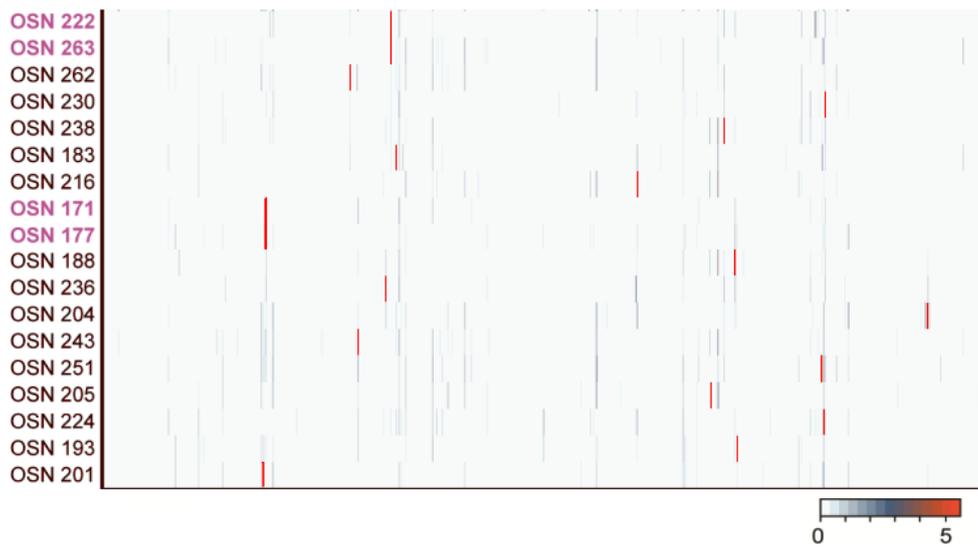


Figure 5 : Analyse de l'expression de 1250 gènes RO dans 18 cellules réceptrices isolées. Echelle de couleur = nombre de copies d'ARNm (échelle log₁₀). Adaptée de (8)

Question 10: Quelles informations nouvelles la figure 5 apporte-t-elle ?

Il est possible de croiser des souris de l'espèce *M. musculus* (la souris domestique) avec l'espèce *M. spretus* (la souris ouest-méditerranéenne). On considère ces deux espèces comme proches, ayant divergé il y a environ un million d'années. La figure 6 représente les résultats d'une analyse dite de « dot-blot ». Les auteurs ont isolé les NRO de 7 souris hybrides *M. musculus* x *M. spretus* (notées de 1 à 7 sur la figure), préparé une suspension de 200 NRO pour chaque souris, extrait les ARNm et réalisé, pour chacun des mélanges, une RT-PCR spécifique du gène *I7*. Puis ils ont préparé deux exemplaires identiques d'une bandelette de nylon sur laquelle sont déposées, séparément, une goutte de chaque produit de RT-PCR spécifique du gène *I7*. Seules sont déposées des réactions ayant donné un signal sur une électrophorèse telle que celle présentée sur la figure 4. Des produits de RT-PCR préparés identiquement, mais à partir de parents non hybrides, sont aussi déposés (indiqués par M et S respectivement sur la figure). Les bandelettes sont ensuite incubées dans un bain contenant soit une sonde spécifique pour *M. musculus* soit pour *M. spretus*. Après détection des sondes, les résultats sont montrés en figure 6.

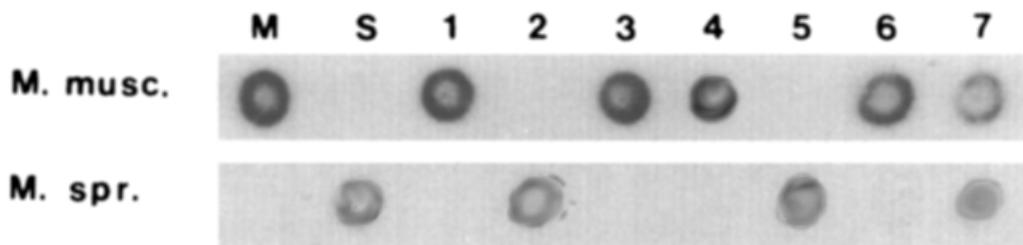


Figure 6: Dot-blot. Deux exemplaires identiques d'une bandelette de nylon avec 7 dépôts de produits de RT-PCR d'hybrides *M. musculus* x *M. spretus* (1 à 7) et de parents purs *M. musculus* (M) ou *M. spretus* (S) sont incubés avec une sonde spécifique de *M. spretus* ou de *M. musculus*.

Question 11: Quel est la nature moléculaires des sondes utilisées ?

Question 12: Quel est l'intérêt des croisements *M. musculus* x *M. spretus* ?

Question 13: Analysez les résultats obtenus avec les souris 1 à 6. Comment expliquez-vous les résultats obtenus avec la souris 7 ?

Question 14: Que conclure de cette analyse ?

La figure 7 présente la molécule d' EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine), couramment utilisée pour marquer, *in vivo* ou *in vitro*, les cellules en prolifération sans effets toxiques immédiats. La molécule est éliminée de la circulation sanguine par des enzymes, et possède une demi-vie d'environ 10 minutes. La présence de EdU incorporée dans une cellule peut être détectée par un marquage chimique spécifique du groupe éthynyle (les carbones qui engagent une triple liaison, visibles sur la figure).

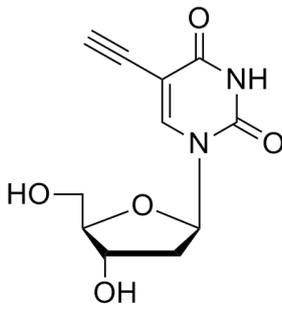


Figure 7 : Formule semi-développée de l'EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine)

Question 15: De quoi cette molécule est-elle chimiquement proche ? Comment croyez-vous qu'elle puisse marquer l'ADN ?

Question 16: Si une cellule qui a incorporé de l'EdU se divise à nouveau, mais dans un milieu sans EdU, comment évoluera l'intensité du signal mis en évidence ?

La figure 8 montre l'évolution du nombre de cellules nerveuses marquées *in vivo* en fonction de la dose d'EdU injectée à des souris (tirée de (4)).

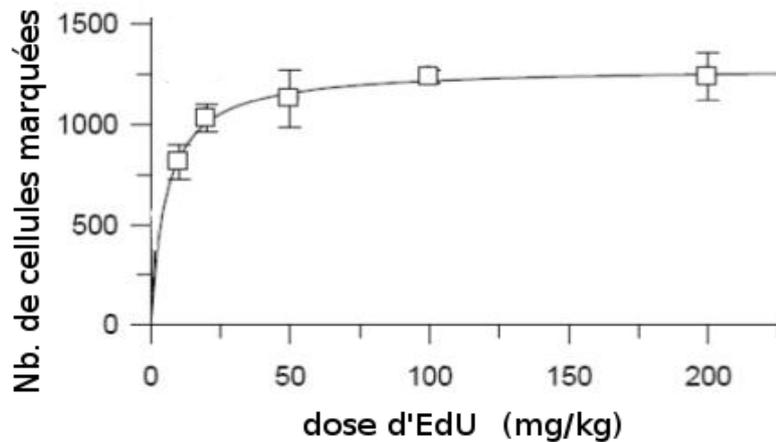


Figure 8 : Nombre de cellules marquées par l'EdU en fonction de la dose employée. La dose est exprimée en mg par kg de masse corporelle. Les souris sont sacrifiées 2h après injection, et les cellules sont comptées en observant des coupes microscopiques après détection chimique de l'EdU.

Question 17: Expliquez l'allure de la courbe.

Question 18: Au bout de combien de temps l'injection d'une dose de 300 mg/kg, considérée comme maximale car à la limite de la toxicité, deviendra inefficace, en considérant qu'il convient de pouvoir marquer au moins les deux tiers des cellules proliférantes ?

Un article récent a utilisé l'EdU pour étudier l'épithélium olfactif de souris : les montages photos de la figure 9, adaptée de (5), présentent les résultats de différentes expériences de marquage. Les souris reçoivent une injection d'EdU puis sont mises à mort après un temps variable. Des coupes sont alors réalisées dans l'épithélium olfactif et l'EdU est détectée en rouge, l'ADN en bleu, et la protéine Lgr5-EGFP en vert. Les panneaux A et A', B et B', et C, C' et C'' représentent respectivement une même zone, mais les auteurs ont choisi de faire apparaître des combinaisons différentes de couleurs ; A, B et C'' sont des images composites des 3 couleurs.

Dans les panneaux A et A' (souris âgée de 2 jours, P2), et B et B' (souris âgée de 3 mois, 3M) la mise à mort a lieu 6 heures après l'injection. Pour le panneau C qui concerne des souris de 3 mois, la mise à mort a lieu 2 semaines après l'injection d'EdU.

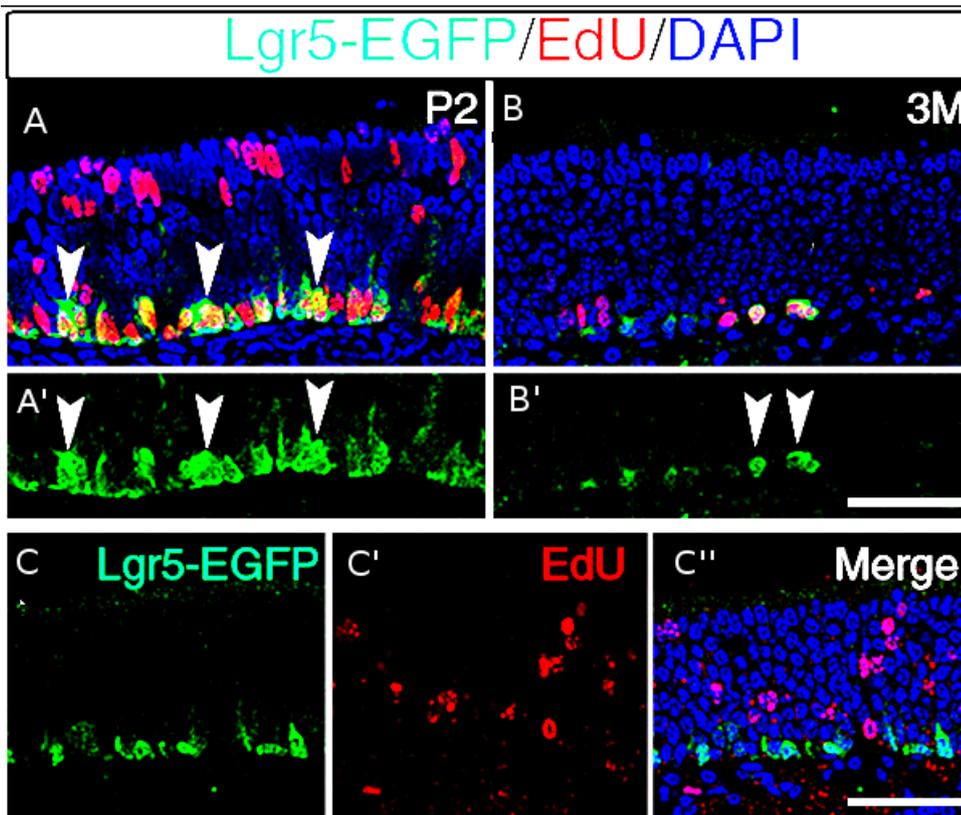


Figure 9 : Le DAPI est un colorant spécifique de l'ADN. « Merge » indique une image composite (comme A et B). Lgr5, ici détectée grâce à une protéine fluorescente verte appelée GFP, est une protéine étudiée par les auteurs. Barre d'échelle = 50 μ m

Question 19: Que vous permet de dire la comparaison des panneaux A et B ?

Question 20 : Quels événements cellulaires sont mis en évidence dans le panneau C ?

Question 21 : Comment qualifieriez-vous les cellules positives pour Lgr5 ?

Après une injection d'EdU chez un adulte, il est possible de détecter des cellules NRO positives pendant longtemps sans que l'intensité du marquage ne faiblisse ; après quelques mois cependant, il n'y a plus de NRO marqués.

Question 22 : Quelle sont les indications fournies par ces observations sur la vie des cellules NRO ?

Partie II

L'acétophénone est une molécule aromatique à l'odeur puissante car détectable à 0,2 partie par million. Elle est très utilisée par les laboratoires travaillant sur différents aspects de la perception olfactive, entre autre parce que son récepteur est connu chez la souris. Une expérience dite SPO la met en œuvre (6). Au premier jour, les souris sont exposées à un son bref et puissant qui les fait sursauter. L'intensité du sursaut, mesurée par un dispositif qui rappelle un sismographe, sert de niveau de référence. Les souris sont ensuite soumises à une nouvelle mesure dite « pretest » : dans un dispositif expérimental *ad hoc* elles sont exposées à l'acétophénone quelques secondes, puis au même son puissant, et l'intensité de leur sursaut est mesurée. Le jour suivant, les souris sont exposées à l'acétophénone quelques secondes puis soumises à un choc électrique sans danger mais désagréable, et ce de manière répétée. Le lendemain, les souris sont à nouveau évaluées comme pour le pretest: c'est le posttest (exposition à l'acétophénone, son, mesure du sursaut). Les résultats des pretests et posttests, visibles sur la figure 10, sont exprimés en pourcentage d'augmentation de l'intensité du sursaut par rapport au niveau de référence du premier jour (noté % SPO).

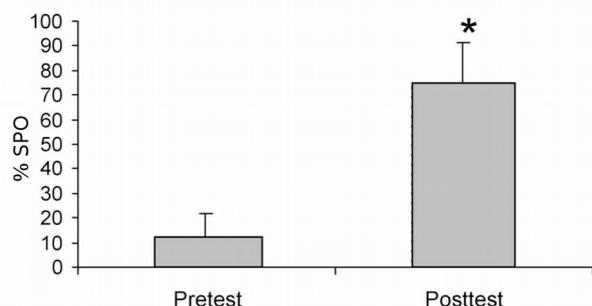


Figure 10. Expérience dite de SPO. L'astérisque montre une différence statistiquement significative. Tirée de(6)

Question 23 : Décrire l'expérience sous forme d'une frise chronologique.

Question 24 : Commentez ces résultats. Comment qualifieriez-vous le phénomène mis en évidence ?

Dans une autre étude (7), des mâles ayant subi le protocole ci-dessus (mâles F0-Ace) ont été accouplés à des femelles qui ne l'ont pas subi. La réaction de sursaut au bruit des descendants (souris F1-Ace) est alors mesurée sans, puis avec, exposition à l'acétophénone (aucun choc électrique n'est utilisé). Un score %SPO est alors calculé en soustrayant l'intensité du sursaut avec odeur à celle sans exposition à l'odeur, et en exprimant cette différence comme un pourcentage du niveau sans odeur. Les mêmes mesures sont faites sur des descendants de souris naïves, qui ont subi un protocole SPO mais dans lequel aucune odeur n'a été utilisée lors du « pretest » (souris F1-Home). Enfin, les auteurs ont aussi remplacé, uniquement pour les mesures de réaction de sursaut, l'acétophénone par du propanol, molécule odorante reconnue par d'autres récepteurs. Les résultats sont présentés figure 11.

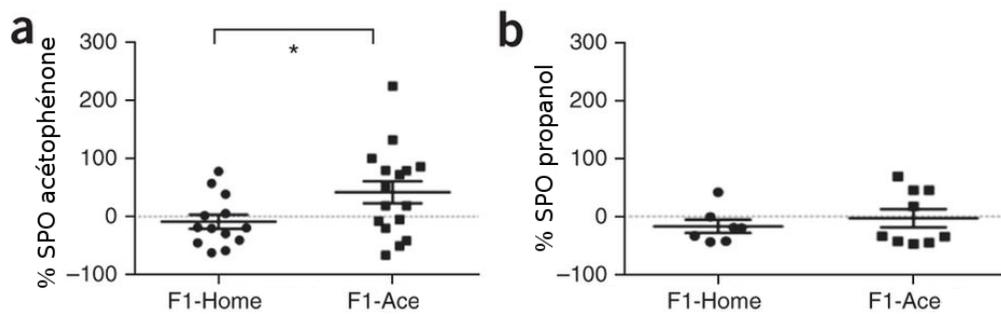


Figure 11 : Réponse SPO de différentes souris à l'acétophénone (a) ou au propanol (b).

Question 25 : Comment qualifieriez-vous le phénomène mis en évidence par la figure 11a? En quoi le résultat est-il surprenant ? Quelle(s) hypothèses pouvez vous formuler pour l'expliquer ?

Question 26 : Qu'apporte le panneau b de cette figure ? En quoi est-il important ?

Les mâles F1-Ace ont été croisés avec des femelles naïves, et leur descendance (F2-Ace) a été testée comme les F1-Ace. Les auteurs ont aussi testé des F2-Prop, dont les grands pères avaient été soumis à un protocole SPO utilisant le propanol à la place de l'acétophénone, puis croisés avec des femelles naïves pendant deux générations successives. Le résultat est donné figure 12.

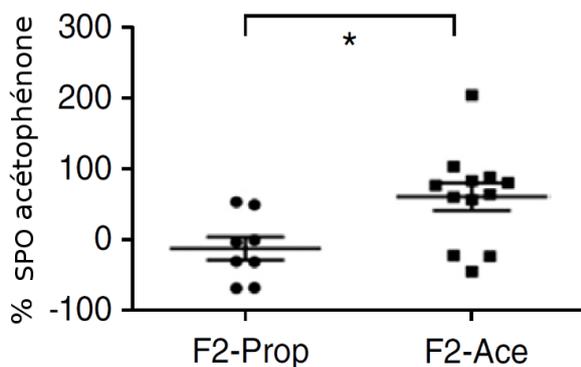


Figure 12 : Réponse SPO de souris de génération F2.

Question 27 : Que montre cette figure, et qu'apporte-t-elle par rapport à la figure 11 ?

Du sperme de mâles F0-Ace a été utilisé pour féconder *in vitro* des femelle naïves. Leur descendance est testée : les résultats sont pratiquement identiques à ceux présentés en figure 11.

Question 28 : Quelle information importante apporte cette expérience ?

Question 29 : En imaginant que vous souhaitiez explorer les pistes ouvertes par cette expérience de fécondation *in vitro*, quelle question aimeriez-vous poser, et quel type d'expérience proposeriez-vous de mener ?

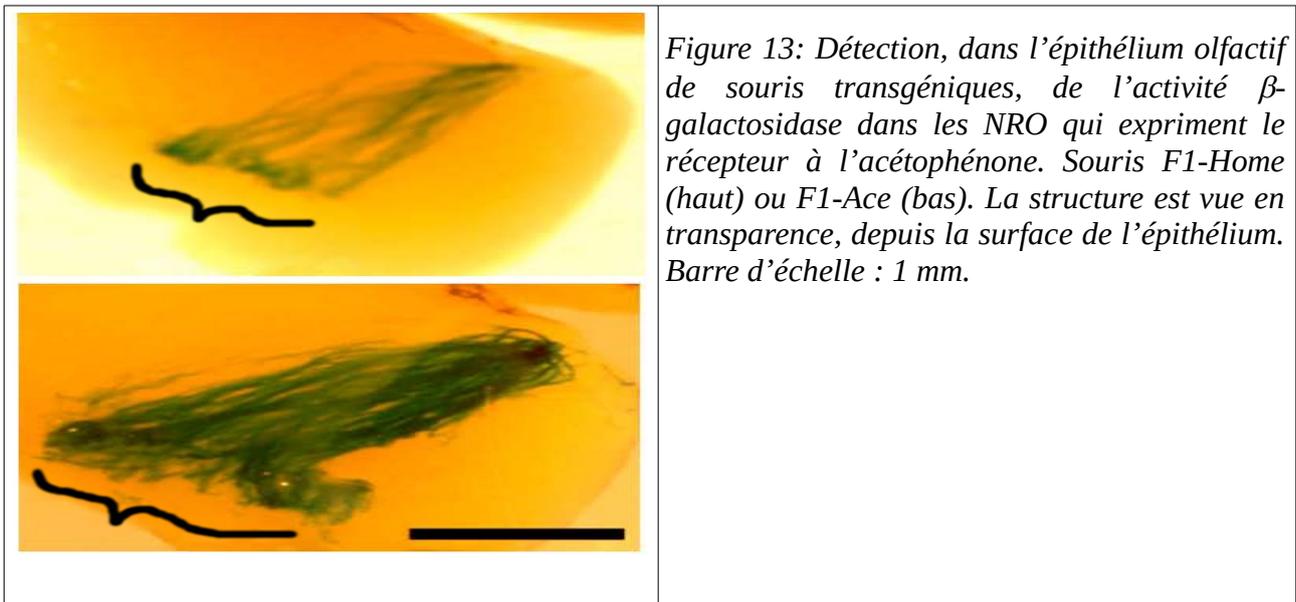
Les auteurs ont ensuite croisé des femelles ayant ou non subi le protocole SPO avec des mâles naïfs. La différence de %SPO observée entre les F1-Home (issus de femelles naïves) et les F1-Ace (issus de femelles avec protocole SPO) est de l'ordre de celle visible en figure 11a.

Question 30 : Quelle(s) information(s) importante(s) cette expérience apporte par rapport aux résultats décrits dans les figures 10 et 11 ?

En plus des animaux F1-Home et F1-Ace élevés par leur mère biologique, les auteurs ont fait adopter dès la naissance, des F1-Home par des femelle ayant subi le protocole SPO, et des F1-Ace par des femelles naïves. La différence de %SPO entre les F1-Home adoptés et les F1-Ace adoptés est également de l'ordre de celle visible en figure 11a.

Question 31 : Quelle information supplémentaire apporte cette expérience, par rapport aux expériences de fécondation *in vitro* de femelles naïves par du sperme de mâles F0-Ace ? Réfléchissez en termes de contrôle expérimental.

Les souris étudiées ont été modifiées génétiquement ; elles produisent l'enzyme β -galactosidase uniquement dans les NRO qui expriment le récepteur à l'acétophénone. La présence de β -galactosidase (enzyme qui diffuse dans l'intégralité d'une cellule) est facilement détectable sur des biopsies en incubant les échantillons avec un substrat spécifique, que l'enzyme hydrolyse en un produit coloré. Sur la figure 13, l'activité β -galactosidase est visualisée en bleu. Les corps cellulaires des NRO se situent en bas à gauche des deux panneaux de la figure, près des accolades.



Question 32 : Pourquoi, et comment, assurer expérimentalement la production de β -galactosidase uniquement dans les NRO exprimant le récepteur à l'acétophénone ?

Question 33 : Que suggère l'organisation histologique des NRO vue dans la figure 13 ?

Question 34 : Que vous suggère la comparaison des deux panneaux de la figure 13 ?

Question 35 : L'ensemble des résultats de cette seconde partie pose de très nombreuses questions encore non-résolues. Si vous en aviez la possibilité, quel(s) aspect(s) souhaiteriez vous aborder ? Avez vous des expériences à proposer ?

– FIN –

Articles utilisés pour la conception de ce sujet :

1. C. R. Yu, Y. Wu, *Exp. Neurol.* **287**, 395–408 (2017).
2. R. Vassar, J. Ngai, R. Axel, *Cell.* **74**, 309–318 (1993).
3. A. Chess, I. Simon, H. Cedar, R. Axel, *Cell.* **78**, 823–834 (1994).
4. C. Zeng *et al.*, *Brain Res.* **1319C**, 21–32 (2010).
5. M. Chen *et al.*, *J. Neurosci.* **34**, 8268–8276 (2014).
6. S. V. Jones, S. A. Heldt, M. Davis, K. J. Ressler, *Behav. Neurosci.* **119**, 329–335 (2005).
7. B. G. Dias, K. J. Ressler, *Nat. Neurosci.* **17**, 89–96 (2014).
8. L. R. Saraiva *et al.*, *Sci. Rep.* **5**, 18178 (2015).