

**ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES
ÉCOLE DES MINES DE PARIS
ÉCOLES CENTRALE**

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2025

**FILIÈRE BCPST
COMPOSITION DE BIOLOGIE**

Épreuve commune aux ENS de Lyon, Paris, Paris-Saclay, à l'ENPC, aux Écoles centrale et aux Mines Paris

Durée : 6 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve.

Le sujet comporte 23 pages numérotées de 1 à 23.

Thème :

Les acides nucléiques et leurs relations

Organisation de l'épreuve

L'épreuve est constituée de **trois parties indépendantes**.

Ces parties peuvent être abordées dans l'ordre de votre choix mais doivent toutes être traitées.

Pour ce faire, le temps à y consacrer est conseillé ci-dessous :

Partie	Thème	Pages	Durée conseillée
Partie S – Sujet de synthèse	Les relations entre les acides nucléiques	p3	2h
Partie A – Sujet sur documents	Qui se ressemble s'assemble	p4 à 13	2h30
Partie B – Sujet sur documents	Quand la fin justifie les moyens	p14 à 23	1h30

Les expériences présentées ont été reproduites plusieurs fois : les graphiques présentent la moyenne des résultats ainsi que l'écart-type sous forme de barres d'erreur. Les images et données brutes sont représentatives de l'ensemble des résultats obtenus.

Lors de l'évaluation, les correctrices et les correcteurs attacheront une importance particulière à :

- la justification des raisonnements
- la clarté et la concision des réponses
- la qualité et la précision des illustrations
- l'orthographe, la grammaire et la présentation

Début de l'épreuve

Partie S : Synthèse

Les relations entre les acides nucléiques

Le terme « relations » sera compris comme l'ensemble des liens, physiques ou non, qui peuvent exister entre deux molécules différentes.

Partie A. Qui se ressemble s'assemble

I. Des chromosomes bien rangés

Chez les Eucaryotes, l'ADN présente une organisation qui varie au cours du cycle cellulaire. Lors de l'interphase, sa structure est encore mal comprise. Cette partie propose de s'y intéresser et d'en envisager les conséquences fonctionnelles.

La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'obtenir des clichés comme celui présenté dans la figure 1 :

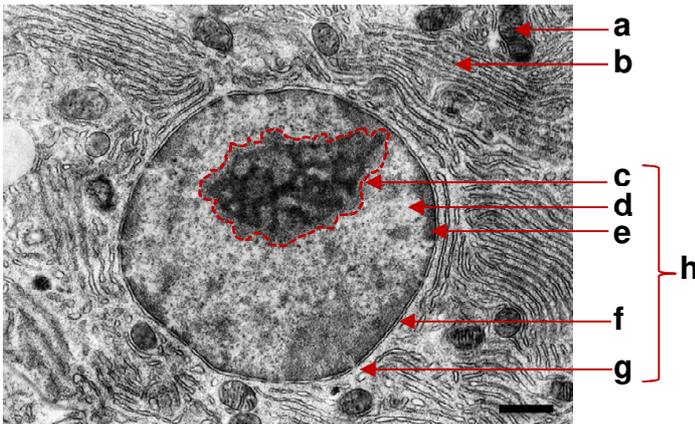


Figure 1 : Image de cellule pancréatique humaine obtenue par MET. La barre d'échelle représente 1µm.

Question 1 :

1a : Attribuez une légende aux lettres a à h de la figure 1.

1b : Définissez rapidement les structures pointées par les lettres c, d et e.

Une technique plus récente, nommée « chromosome painting » consiste à incuber l'ADN avec des sondes (petites molécules d'ADN simple brin portant une séquence connue liée à une molécule fluorescente) reconnaissant spécifiquement un chromosome donné (figure 2) :

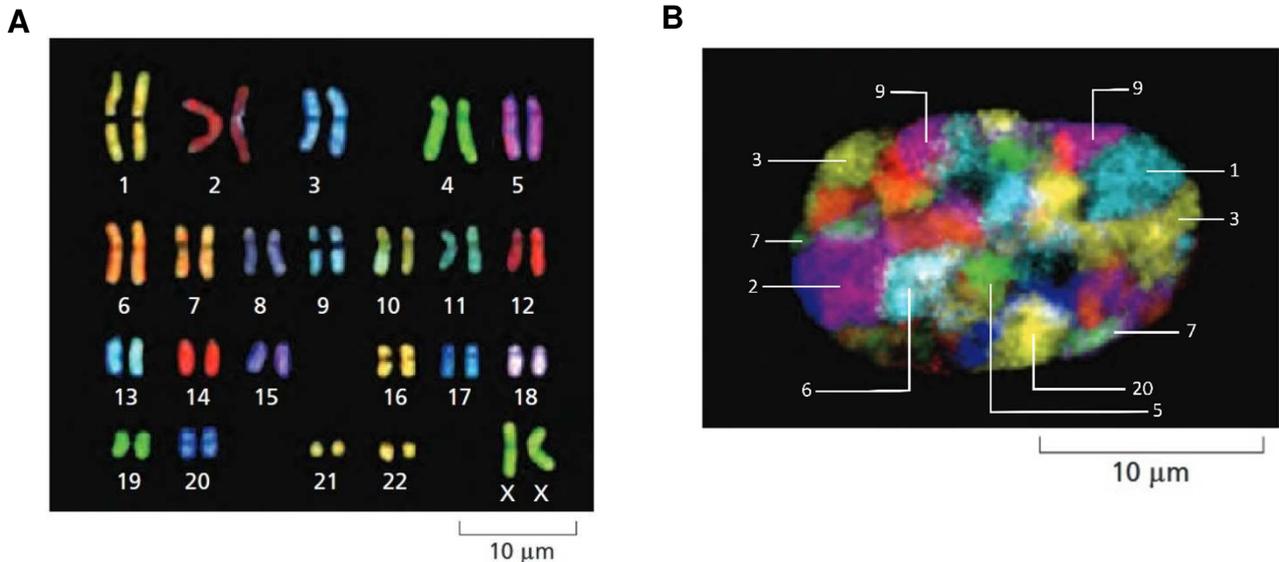


Figure 2 : Images obtenues par chromosome painting à partir de cellules humaines en métaphase de mitose (A) ou en interphase (B). Les différents chromosomes sont identifiés par leur numéro.

Question 2 :

2a : Décrivez le panneau A.

2b : Décrivez l'image B. En quoi cette organisation peut sembler inattendue ? Discutez le cas des deux chromosomes homologues 3. Certains chromosomes, comme le second chromosome 1, n'apparaissent pas sur l'image, comment l'expliquez-vous ?

Afin de mieux comprendre l'organisation de la chromatine, de nouvelles techniques ont été développées, à partir d'une technologie nommée « Chromosome Capture Conformation », dont la méthode Hi-C est dérivée (figure 3).

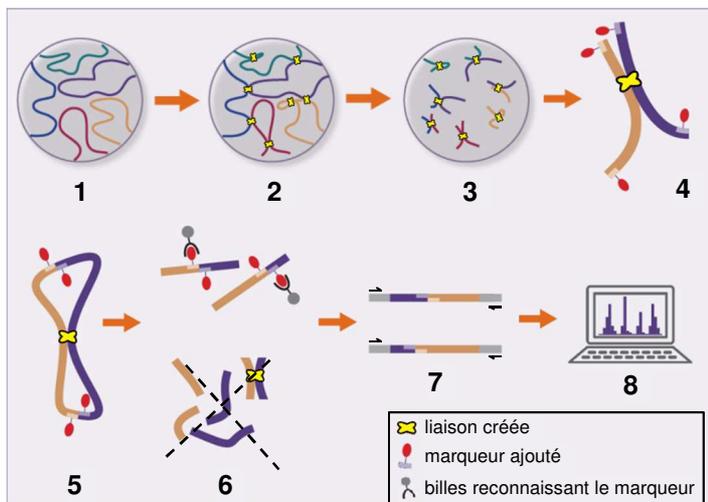


Figure 3 : Représentation de la méthode Hi-C. Dans les noyaux cellulaires (1), les séquences d'ADN voisines sont associées de façon covalente (lien en jaune, 2), puis l'ADN est coupé par des enzymes (3). Un marqueur (en rouge, 4) est ajouté aux extrémités des fragments d'ADN, qui sont ensuite ligaturés (5). Une nouvelle digestion enzymatique est réalisée et les fragments d'ADN sont purifiés par reconnaissance spécifique du marqueur (billes grises, 6). Les fragments non reconnus sont éliminés (croix pointillée). Une fois le marqueur retiré, des adaptateurs (rectangles gris) sont fixés aux extrémités des fragments obtenus et un séquençage est réalisé (amorces représentées par des flèches noires, 7). Par bio-informatique, les séquences sont ensuite identifiées et analysées (8).

Question 3 :

3a : Quel est le but de cette technique ? Quel est le rôle des étapes 5 et 6 ?

3b : Rappelez brièvement le principe de la méthode Sanger de séquençage de l'ADN.

La connaissance de la séquence complète du génome humain permet d'identifier les séquences obtenues (étape 8 de la figure précédente) et de représenter leurs fréquences d'association sur des matrices comme celle présentée dans la figure 4.

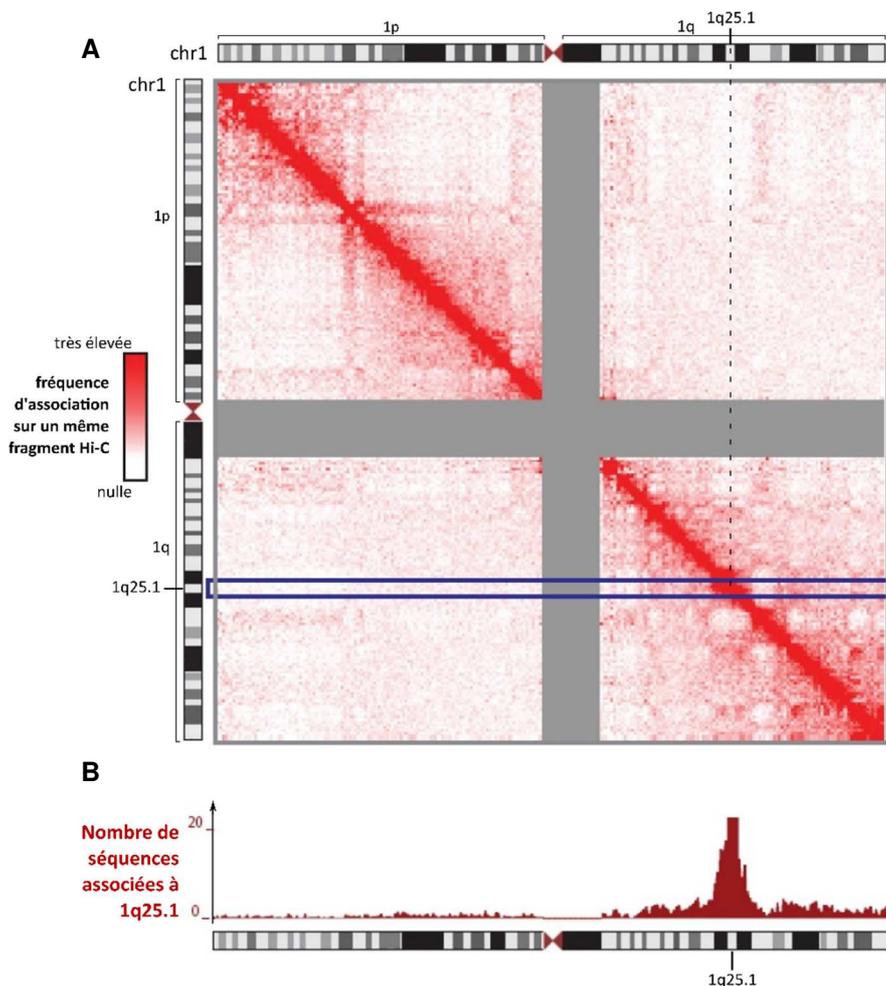


Figure 4 : **A.** Analyse par Hi-C du chromosome 1 humain à partir de nombreuses cellules. Les séquences retrouvées sur la première partie de chaque fragment d'ADN analysé (en violet sur la figure 3) sont positionnées à l'horizontale, et les séquences retrouvées sur la seconde partie du même fragment (en orange sur la figure 3) sont positionnées à la verticale. Une représentation du chromosome étudié (ici le chromosome 1, chr1) permet de repérer les positions des différentes séquences. La fréquence à laquelle ces séquences sont retrouvées sur un même fragment lors du Hi-C est indiquée par un code couleur (rouge plus ou moins foncé). Les zones en gris correspondent à des séquences jamais retrouvées dans le Hi-C.

B. Résultats obtenus par analyse Hi-C pour le chromosome 1, du point de vue d'une position particulière de ce même chromosome, ici 1q25.1. Cette visualisation correspond à la fenêtre bleue représentée sur le panneau A. Seuls les fragments d'ADN (en orange sur la figure 3) contenant la séquence 1q25.1 sont analysés et le nombre des différentes séquences présentes sur le même fragment (en violet sur la figure 3) est représenté graphiquement par une barre verticale de couleur bordeaux.

Question 4 :

Analysez la figure 4.

Les figures 5A et 5B présentent les résultats obtenus par Hi-C respectivement avec trois ou l'ensemble des chromosomes humains :

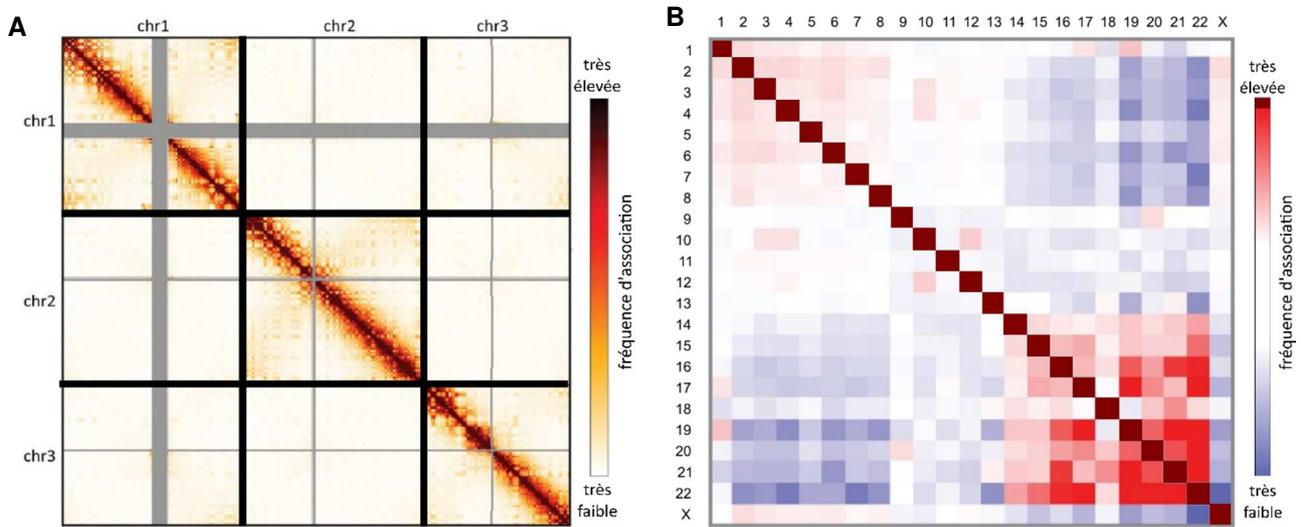


Figure 5 : Matrice des résultats obtenus par Hi-C pour trois chromosomes différents (A) ou pour l'ensemble des chromosomes de cellules humaines (B). Les échelles des fréquences d'association des séquences sont indiquées sur la droite de chaque panneau.

Question 5 :

Analysez les résultats de la figure 5. En quoi pouvez-vous les relier à ceux de la figure 2B ?

La technique Hi-C a rapidement progressé pour passer d'une résolution de la mégabase à la kilobase (10^6 à 10^3 nucléotides, figure 6). Certains motifs reconnaissables et récurrents ont été nommés C et TAD, dont quelques exemples sont présentés sur la figure 6 :

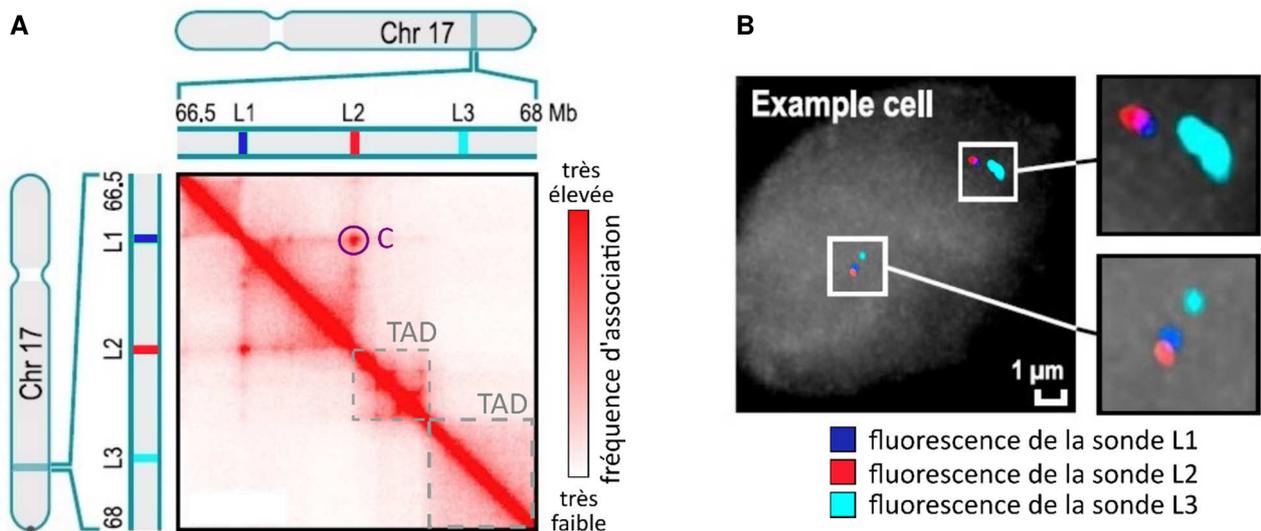


Figure 6 : A. Analyse par Hi-C d'une petite région du chromosome 17 humain, représentée en haut et à gauche du panneau. Les chiffres exprimés en mégabases (Mb) permettent de positionner la région étudiée sur le bras long du chromosome. L'échelle de fréquence d'association est indiquée à droite du panneau. Deux des quatre motifs de type TAD reconnaissables sur le panneau sont encadrés en pointillés gris et un motif de type C est entouré en mauve. B. Trois loci L1, L2 et L3, dont la position sur la région étudiée est représentée en A, ont été détectés par hybridation de sondes d'ADN simple brin fluorescentes sur une cellule en culture.

Question 6 :

Analysez les résultats de la figure 6. A l'aide d'un schéma, donnez une représentation possible des structures d'ADN correspondant aux motifs TAD et C.

Afin de mieux comprendre l'organisation de ces structures, une technique d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP-seq) a été utilisée (décrite figure 7A), en utilisant des anticorps dirigés soit contre la protéine CTCF (une protéine connue pour se lier à l'ADN sur la séquence consensus CCCTC), soit contre des marqueurs de méthylation de l'histone H3 :

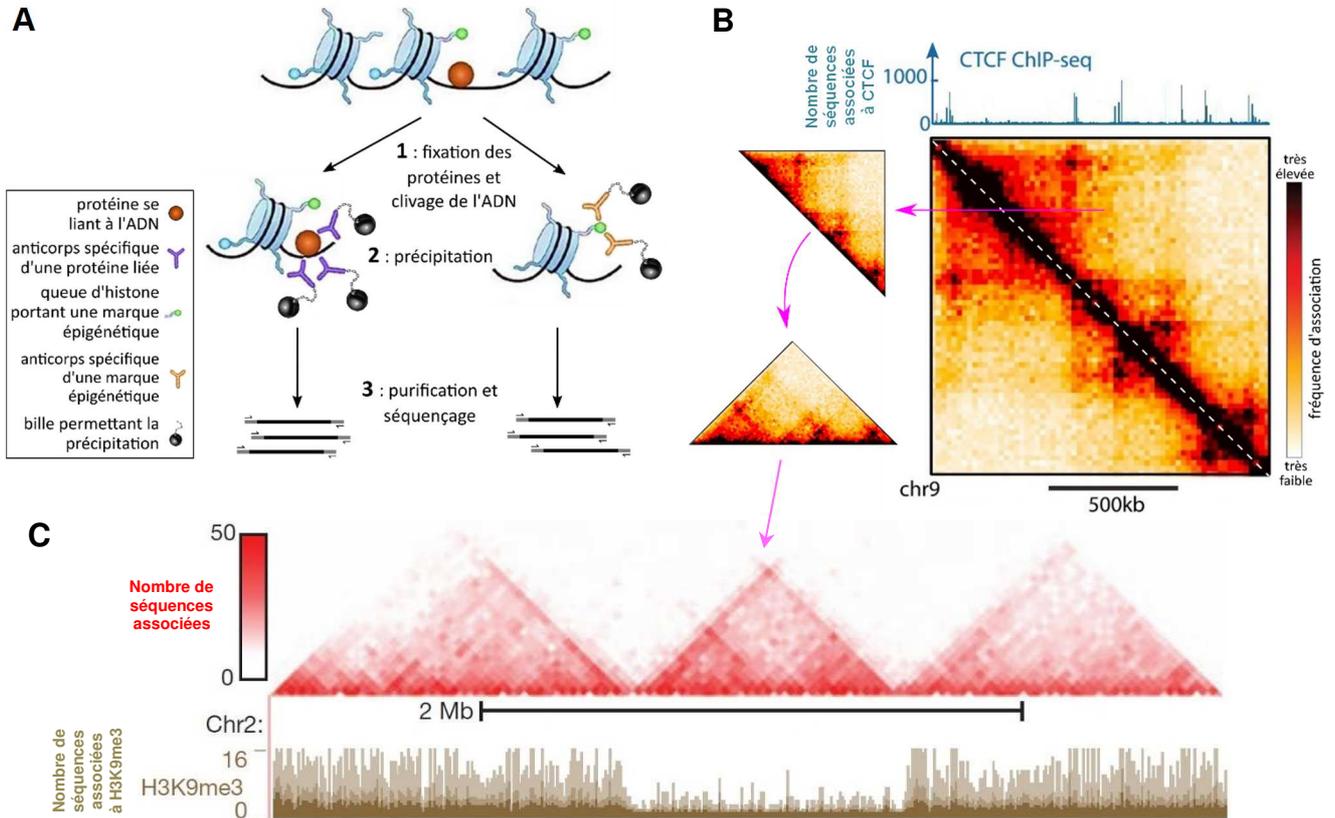


Figure 7 : **A.** Principe de la technique de ChIP-seq : (1) dans les noyaux, les complexes ADN/ protéines sont fixés de façon covalente, puis les cellules sont lysées et la chromatine est extraite et coupée en fragments. (2) des anticorps reconnaissant spécifiquement certaines protéines associées à l'ADN (boule orange) ou bien certaines marques épigénétiques des histones (boule verte) sont mis en présence des morceaux de chromatine. Ces anticorps sont couplés à une bille (boule noire) permettant de les purifier par précipitation. Les fragments d'ADN co-purifiés sont alors séquencés (3). **B.** Résultats obtenus par Hi-C (en bas) et ChIP-seq de la protéine CTCF (en haut) sur une portion d'environ 1,5Mb du chromosome 9 de cellules humaines. Le nombre de séquences de chaque locus du chromosome obtenues par ChIP-seq est représenté par un trait vertical bleu. **C.** Résultats obtenus par Hi-C (en haut) et ChIP-seq (en bas) de la marque H3K9me3 (méthylation de l'histone H3 associée à une structure d'hétérochromatine) sur une portion du chromosome 2 de cellules humaines. Par rapport à la représentation utilisée dans les figures précédentes, les résultats du Hi-C ont été coupés diagonalement et tournés de 45°. L'échelle des fréquences d'association des séquences est indiquée sur la gauche du panneau.

Question 7 :

7a. Analysez les résultats de la figure 7B. Faites une hypothèse sur la position de la protéine CTCF et le rôle qu'elle pourrait y exercer.

7b. Analysez et interprétez les résultats présentés sur la figure 7C.

La cohésine est un complexe composé de trois polypeptides, SCC1, SMC1 et SMC3, capable de s'associer à l'ADN : elle est notamment impliquée dans le maintien de l'association entre les deux chromatides-sœurs des chromosomes métaphasiques. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont permis d'obtenir les résultats suivants :

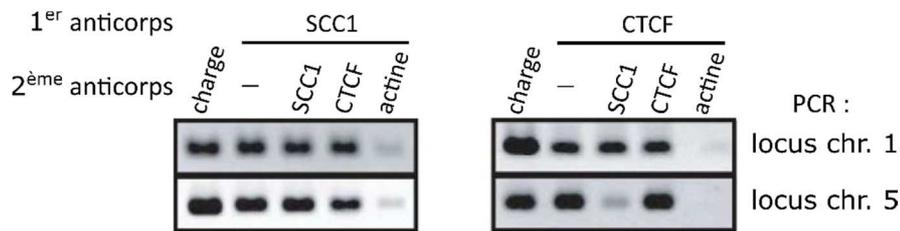


Figure 8 : Analyse par ChIP. La chromatine de cellules humaines a été obtenue, découpée en fragments et utilisée telle quelle (charge) ou immunoprécipitée par un premier anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine indiquée en haut du panneau. Le précipité obtenu a ensuite été resuspendu et utilisé tel quel (« - ») ou soumis à une deuxième immunoprécipitation par un 2^{ème} anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine indiquée sur la 2^{ème} ligne en haut du panneau. Lors de chaque immunoprécipitation, les fragments non précipités sont éliminés. Des PCR ont alors été réalisées sur les ADN obtenus, avec des amorces reconnaissant deux loci différents, sur les chromosomes indiqués dans la colonne « PCR ». Les produits PCR ont enfin été soumis à une électrophorèse et révélés.

Question 8 :

- 8a. Quel est le but de cette expérience ? Quel est l'intérêt de la PCR et comment les loci ciblés ont-ils été choisis ?
- 8b. Analysez et interprétez les résultats présentés sur la figure 8.

La cohésine a été purifiée et observée en microscopie électronique à balayage (figure 9A), et sa structure 3D a été modélisée (figure 9B). Le complexe purifié a été mis en contact avec de l'ADN fluorescent fixé sur une lame de verre (figure 9C). L'ADN a été suivi à différents temps dans un flux de tampon après ajout de la cohésine (figure 9D).

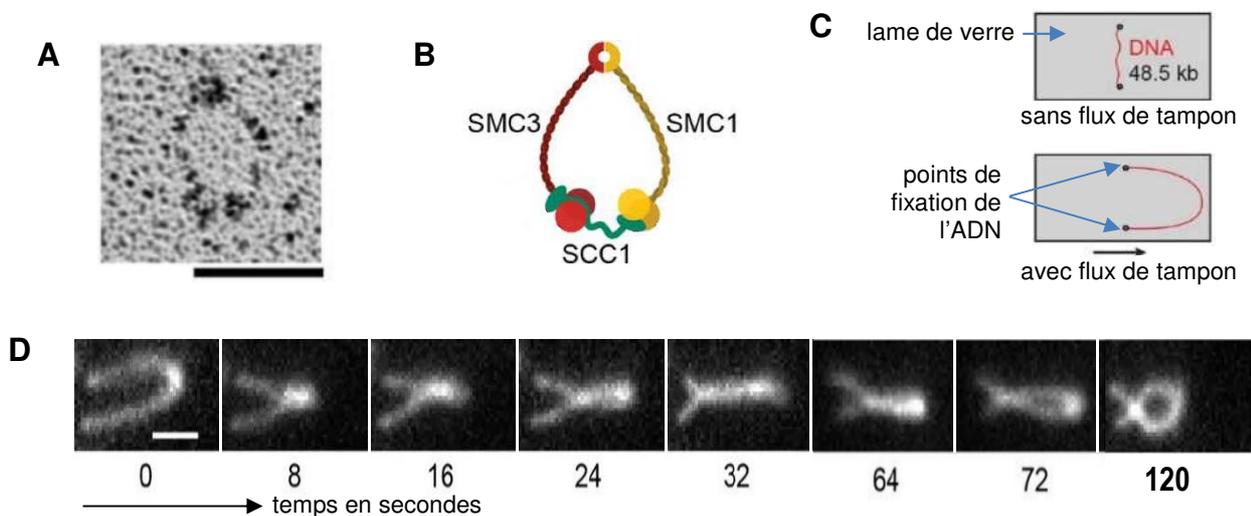


Figure 9 : Structure et fonction de la cohésine. **A :** observation de cohésine purifiée en microscopie électronique à balayage. La barre d'échelle représente 50nm. **B :** modèle structural de la cohésine. **C :** représentation schématique du mode opératoire utilisé : un fragment d'ADN est fixé par ses extrémités à une lame de verre, un flux de tampon est alors généré de façon à tendre la molécule selon un arc de cercle. **D :** images obtenues par microscopie à fluorescence à différents temps (indiqués en secondes en-dessous des images) d'incubation d'une molécule d'ADN rendue fluorescente et soumise au flux de tampon (représentée en C) en présence de cohésine ajoutée à t=0. La barre d'échelle représente 2µm.

Question 9 :

- 9a. Analysez les résultats présentés sur la figure 9, et proposez une fonction pour la cohésine en lien avec sa structure.
- 9b. Les structures observées sur la figure 9D ne sont obtenues que si de l'ATP est ajouté au tampon. Comment interprétez-vous cette donnée ?

Une lignée cellulaire, HCT, a été modifiée génétiquement de façon à exprimer sa protéine SCC1 fusionnée à la GFP (une protéine présentant une fluorescence dans le vert) ainsi qu'à un domaine AID la rendant sensible à l'auxine (une hormone végétale, figure 10A). Les cellules HCT sont observées en microscopie à fluorescence et analysées par Hi-C avec et sans auxine (figures 10B et C). Une construction sans domaine AID donne les mêmes résultats que la construction totale en absence d'auxine.

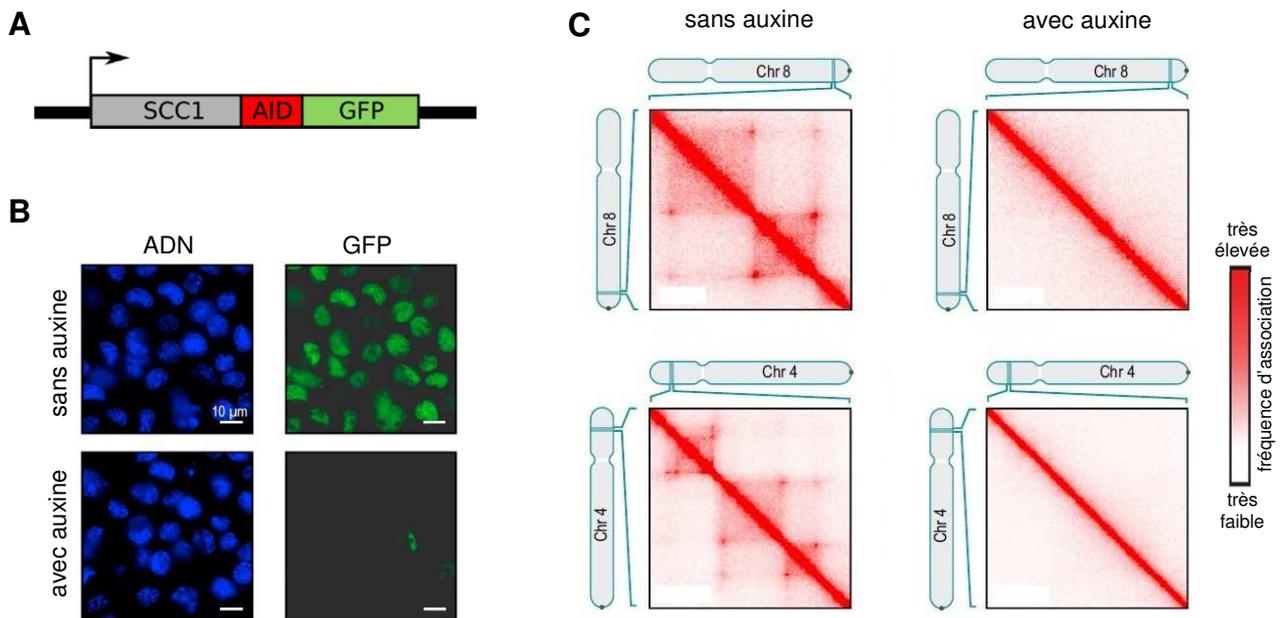


Figure 10 : **A.** représentation schématique de la construction remplaçant le gène SCC1 endogène dans l'ADN des cellules HCT. AID = Domaine de sensibilité à l'auxine, GFP = Green Fluorescent Protein. **B.** images en microscopie à fluorescence de cellules HCT soumises (panneaux du bas) ou non (panneaux du haut) à de l'auxine. Panneaux de gauche : observation de l'ADN, rendu fluorescent dans le bleu, panneaux de droite : observation de la GFP dans le même champ. **C.** résultats de Hi-C obtenus pour une région du chromosome 8 (panneaux du haut) et une autre du chromosome 4 (panneaux du bas) avec des cellules HCT incubées (panneaux de droite) ou non (panneaux de gauche) avec de l'auxine.

Question 10 :

10a. Analysez les résultats présentés sur le panneau 10B et proposez un mécanisme d'action de l'auxine dans ce système.

10b. Analysez les résultats présentés sur le panneau 10C.

10c. En reprenant les résultats obtenus dans les figures 7 à 10, proposez un rôle pour CTCF et la cohésine dans le phénomène étudié.

II. Une pincée de désordre

Une équipe de biologistes s'est intéressée à des malformations de la main chez l'Homme, rares mais handicapantes, d'origine génétique. Trois types de malformations ont été identifiés, et des modifications génétiques dans une même région du chromosome 2q ont été caractérisées. Cette région, schématisée sur la figure 11, contient plusieurs gènes (dont les régions transcrites sont représentées par de petits rectangles), dont trois impliqués dans le développement du squelette des membres : *WNT6*, *IHH* et *PAX3*. Aucune variation dans la séquence de ces trois gènes n'est retrouvée chez les patients. Un autre gène, *EPHA4*, est également présent dans cette région, mais son inactivation ne provoque pas de malformation du squelette. Ce gène présente en outre la particularité de posséder différentes séquences régulant son expression, dont certaines sont assez éloignées de la région transcrite. Chez les patients, des modifications affectant de façon importante la structure de l'ADN du chromosome 2q ont été caractérisées :

- une large délétion, B, dans le cas de la brachydactylie, se manifestant par des doigts très courts
- une inversion dans le cas du syndrome F, se manifestant par une fusion de l'index et du pouce
- une duplication, P, dans le cas de la polydactylie, se manifestant par la présence de doigts surnuméraires

La structure de cette région dans les différents cas de figure, ainsi que son analyse par Hi-C, sont présentées sur la figure 11.

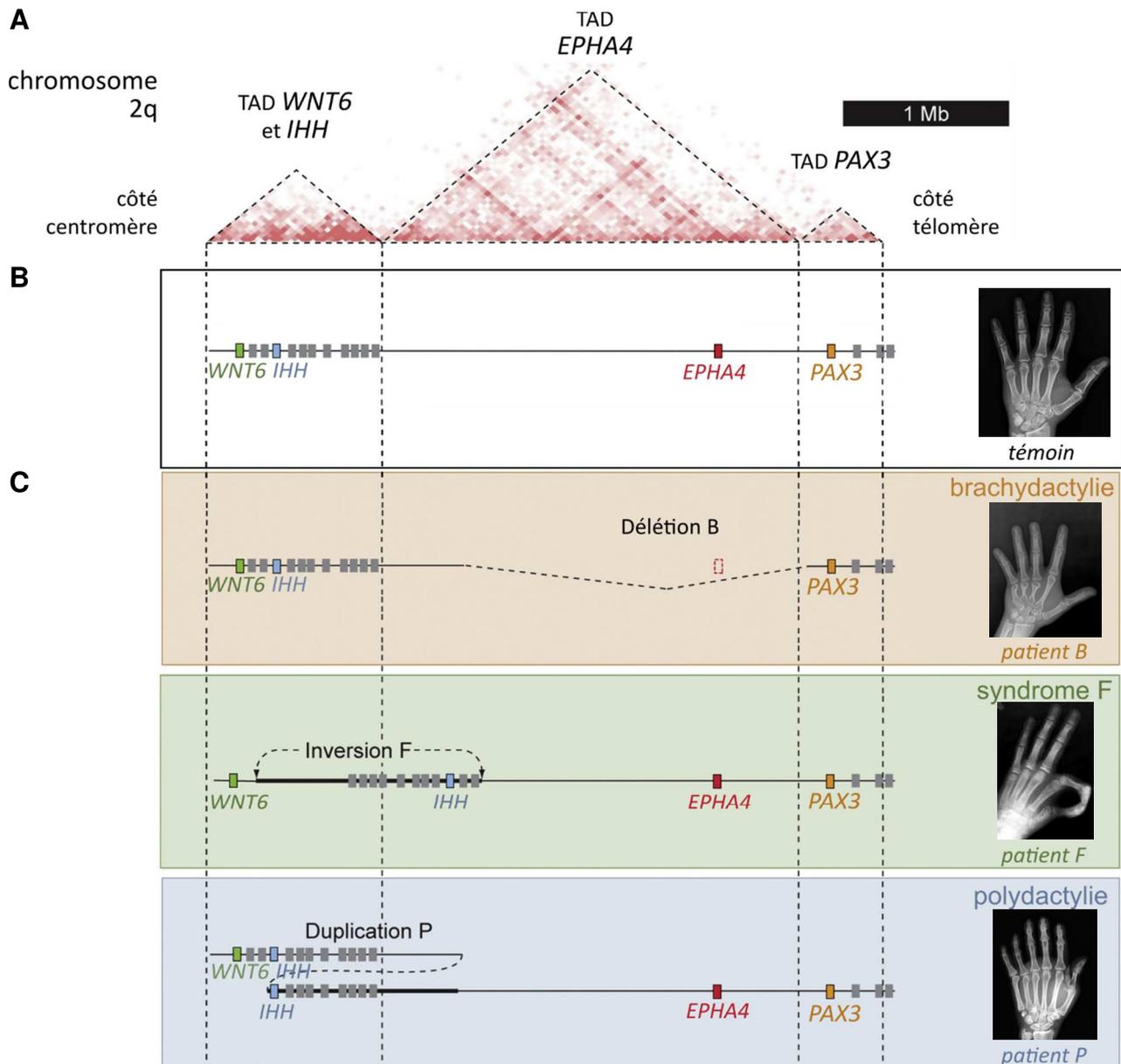


Figure 11 : **A.** Résultats obtenus par Hi-C à partir de cellules de personnes non atteintes (témoins) au niveau de la région étudiée du chromosome 2q. Les trois TAD principaux mis en évidence sont entourés par des triangles en pointillés. **B.** Représentation schématique de la région du chromosome concernée. Les gènes sont représentés par des rectangles gris, et les quatre gènes d'intérêt sont colorés en vert (*WNT6*), bleu (*IHH*), rouge (*EPHA4*) et orange (*PAX3*). Les régions correspondant aux trois TAD identifiés sont positionnées par des pointillés. **C.** Les modifications génétiques mises en évidence chez les patients sont représentées schématiquement. Les pointillés correspondent à la position des TAD identifiés chez les témoins. **B et C :** le phénotype observé par radiographie de la main est présenté sur la droite de chaque panneau.

Question 11 :

Analysez les données présentées dans la figure 11. Quelle(s) hypothèse(s) pourraient expliquer les malformations observées ?

L'équipe a ensuite réalisé une analyse de cette région par Hi-C du point de vue des différents gènes étudiés (voir figure 4B), à la fois sur des cellules de personnes non atteintes (témoins) et sur des cellules de patients. Les résultats suivants ont été obtenus :

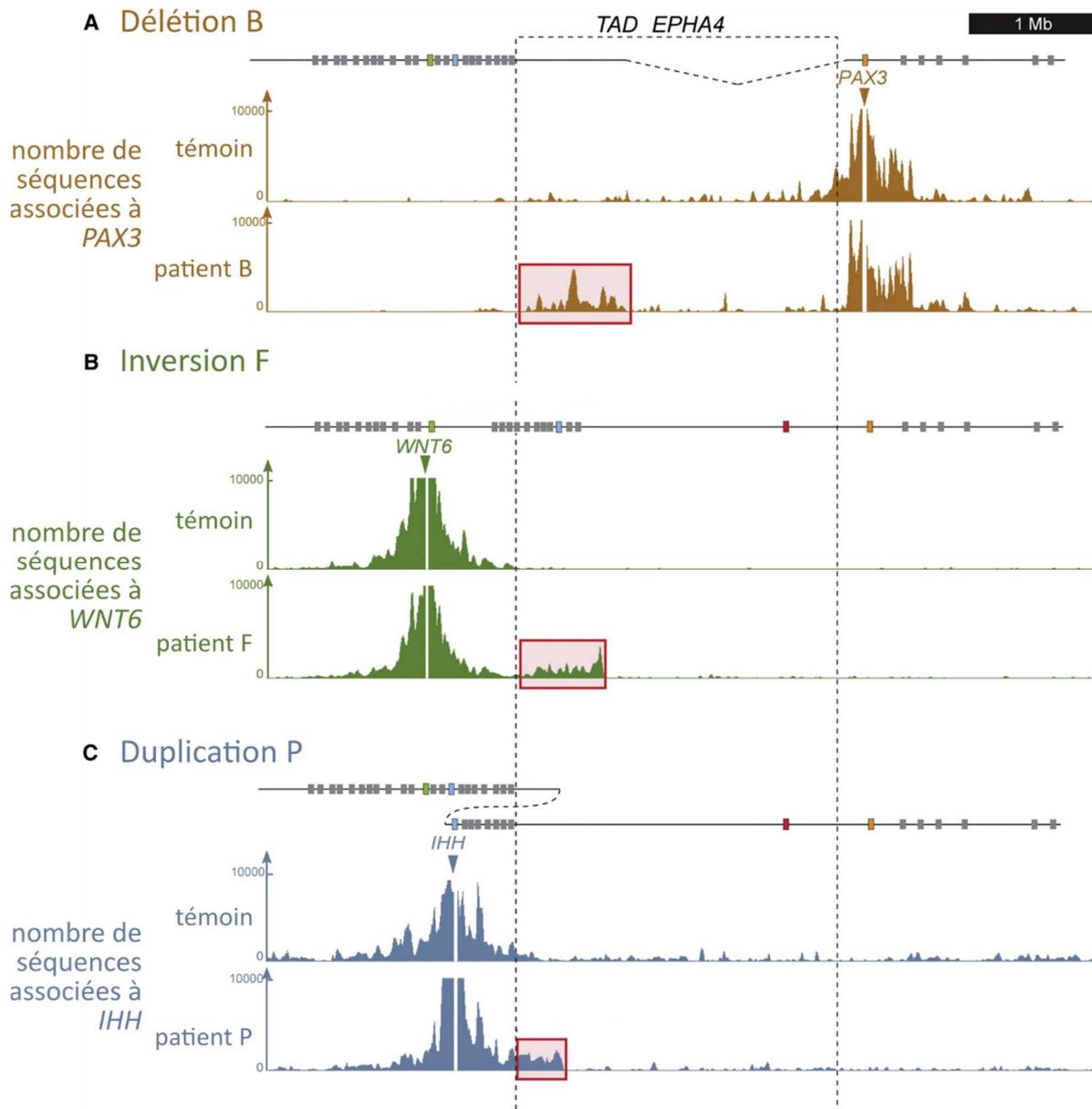


Figure 12 : Résultats obtenus par Hi-C à partir de cellules d'individus témoins ou de patients (indiqués à gauche des panneaux), du point de vue du gène *PAX3* (A), *WNT6* (B) ou *IHH* (C). Dans chaque cas le nombre de séquences associées à la région considérée est indiqué par une barre verticale. La modification génétique étudiée est rappelée au-dessus de chaque panneau. La position du TAD défini sur la figure 11A chez les individus sains, et contenant le gène *EPHA4* est représentée par des pointillés.

Question 12 : Analysez les résultats présentés sur la figure 12. Que représentent les zones encadrées en rouge ?

Afin de mieux comprendre la structure et le fonctionnement du TAD *EPHA4*, une équipe de scientifiques a réalisé une analyse Hi-C du point de vue de *EPHA4* sur l'ensemble de la région (figure 13A), puis une immunoprécipitation de chromatine contre une marque épigénétique de l'histone H3 sur une courte région impliquée dans les trois altérations de l'ADN étudiées (figure 13B). Cette analyse a permis de mettre en évidence deux séquences d'intérêt, nommées hs1507 et mm1036.

Les mécanismes de développement des membres étant semblables chez l'Homme et la Souris, il a été décidé d'utiliser cette dernière comme modèle d'étude. Pour cela, la séquence hs1507 ou mm1036 a été placée en amont du gène *LacZ*, lui-même précédé d'un promoteur minimal (figure 13C). Le gène *LacZ* code pour la β -galactosidase, une enzyme qui n'est pas exprimée chez la Souris. Les constructions ont alors été utilisées pour générer des souris transgéniques, et l'activité de l'enzyme a été révélée dans les embryons de ces souris au 11,5^{ème} jour de développement, au moment de la formation des membres (figure 13D).

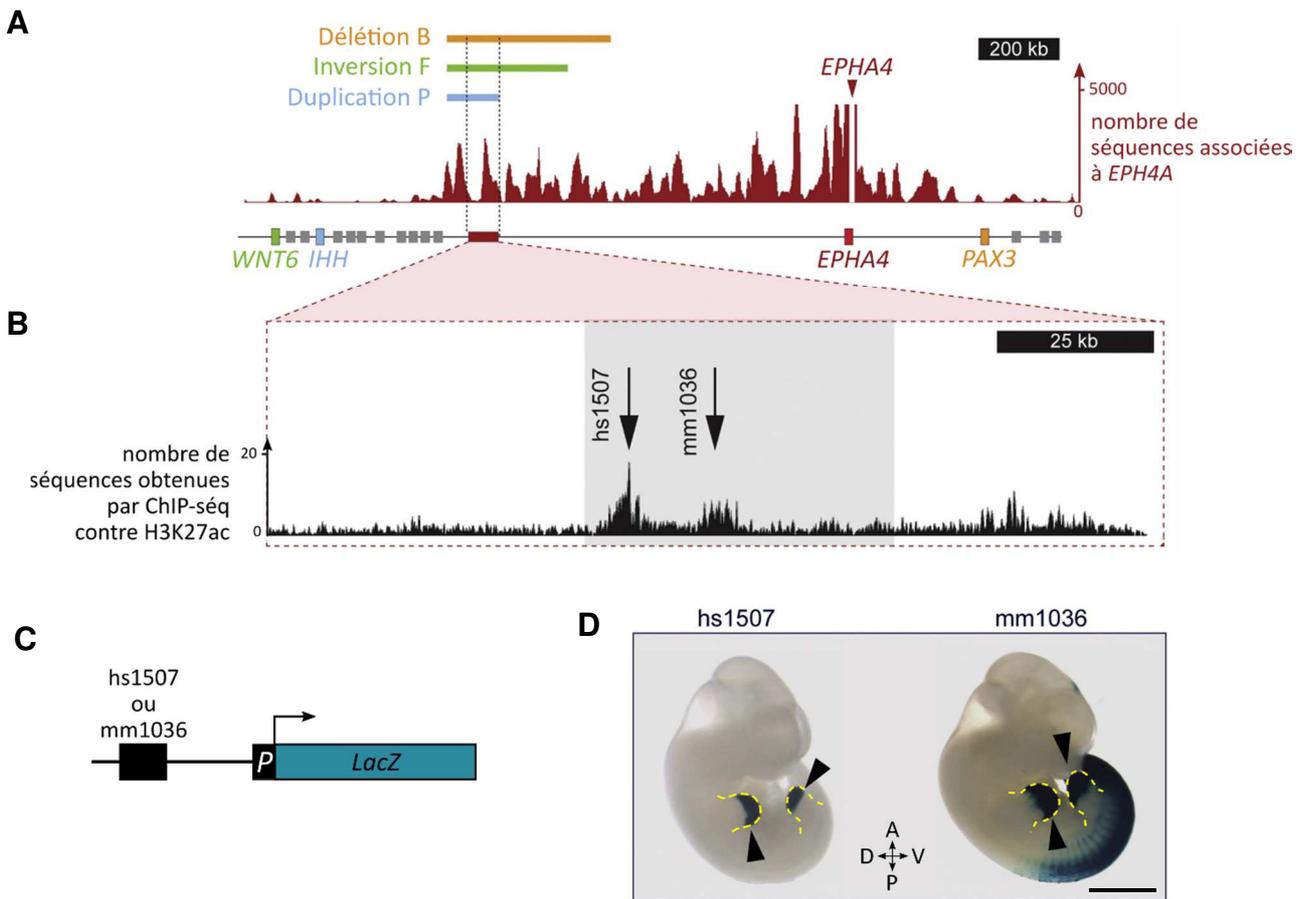


Figure 13 : **A**. Analyse par Hi-C de la région du chromosome 2q étudiée du point de vue du gène *EPHA4* dans des cellules d'individus témoins. L'organisation génétique de la région est représentée sous le panneau. Les régions correspondant aux zones encadrées en rouge dans la figure 12 pour les trois types d'altérations génétiques sont représentées par des barres de couleur orange (délétion B), verte (inversion F) et bleue (duplication P) au-dessus du panneau. La zone de chevauchement des trois régions sur laquelle l'étude s'est ensuite focalisée est représentée par un rectangle bordeaux. **B**. Nombres de séquences obtenues par ChIP-seq contre la marque d'histone H3K27ac (acétylation de la lysine 27 de l'histone 3, associée aux séquences promotrices activatrices de type enhancer) sur la zone du chromosome 2q identifiée en (A). **C**. Représentation schématique de la construction ADN utilisée dans les souris. *P* = promoteur minimal insuffisant pour permettre une expression visualisable du gène. **D**. Photos d'embryons de souris transgéniques pour les constructions présentées en (C) à 11,5 jours de développement (hs1507 à gauche, mm1036 à droite). Un embryon de souris sauvage ou portant le gène *LacZ* en aval d'un promoteur minimal ne présente aucun marquage (non montré ici). L'activité β -galactosidase est révélée par une couleur bleu foncé. Les pointes de flèches indiquent les membres du côté droit, dont le contour est entouré par des pointillés jaunes. A = antérieur, P = postérieur, D = dorsal, V = ventral. La barre d'échelle représente 2mm.

Question 13 :

13a. Quelle est l'hypothèse testée par cette équipe ?

13b. Analysez les résultats présentés sur la figure 13.

Différentes délétions génétiques ont été générées par la technique CRISPR-Cas9 chez la Souris dans la région homologue à celle étudiée chez les patients atteints de malformations de la main. Cet outil, qualifié de « ciseaux moléculaires », permet d'éliminer précisément les séquences ciblées dans l'ADN génomique. Des analyses par ChIP-seq, Hi-C et hybridation *in situ* chez des souris sauvages et génétiquement modifiées montrent les résultats suivants (figure 14) :

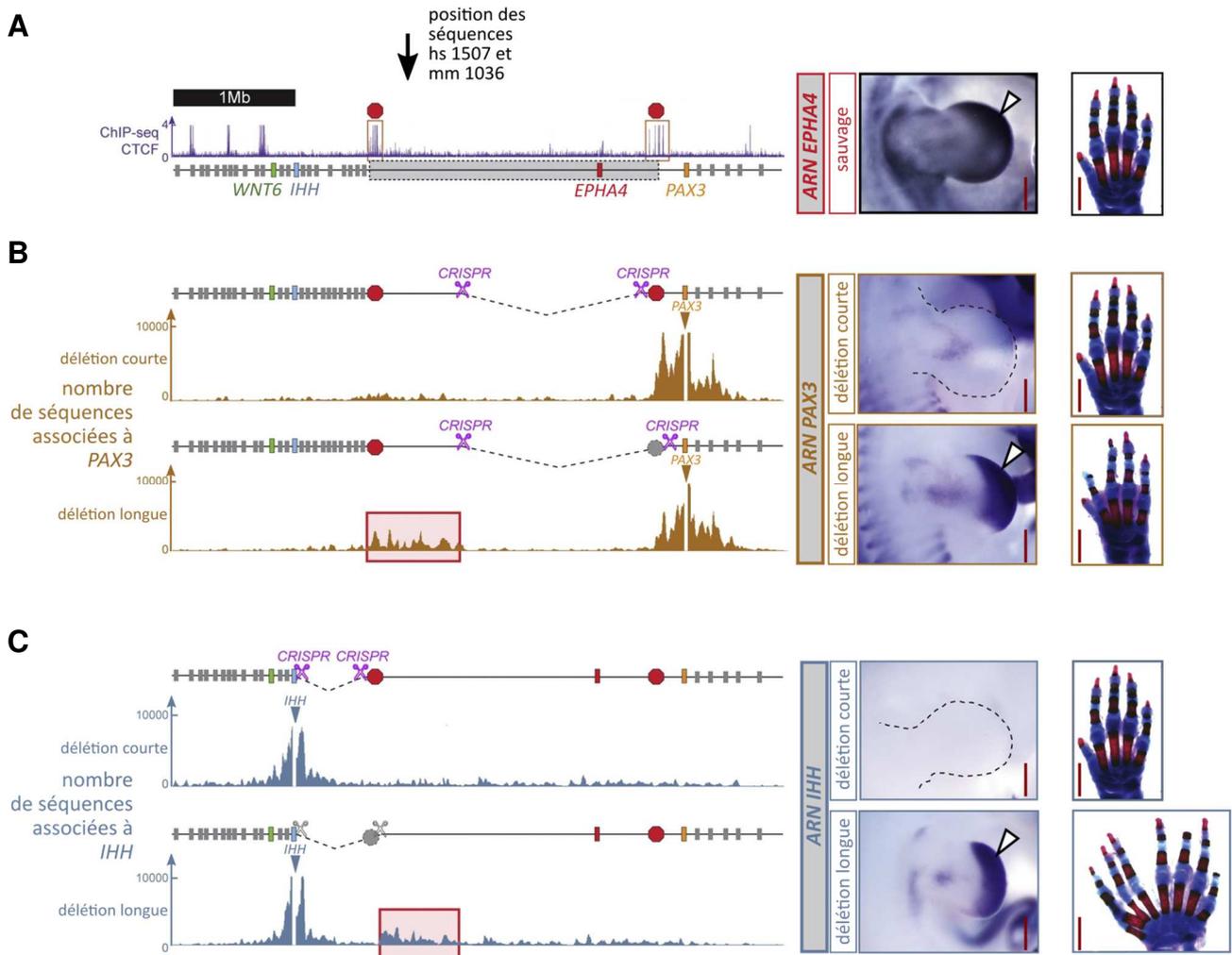


Figure 14 : **A. Panneau de gauche :** résultats obtenus par ChIP-seq chez des souris sauvages avec la protéine CTCF et la région homologue à celle du chromosome 2q étudiée chez l'Homme, dont l'organisation est rappelée sous le panneau. Le rectangle gris en pointillés représente le TAD *EPHA4*, et les hexagones rouges représentent les positions de 2 pics obtenus par ChIP-seq, encadrés en orange sur le panneau. La position des séquences hs1507 et mm1036 (étudiées dans la figure 13) est indiquée par une flèche. **Panneau du milieu :** détection des ARNm *EPHA4* dans le membre supérieur d'un embryon de souris sauvage à 11,5 jours de développement. La présence des ARNm est visualisée par l'apparition d'une couleur noire. **Panneau de droite :** photo du squelette de l'extrémité du membre antérieur d'une souris sauvage de 3 jours. **B et C. Panneaux de gauche :** représentations schématiques des délétions réalisées chez les souris modifiées génétiquement (en haut de chaque panneau) et résultats obtenus par Hi-C du point de vue de *PAX3* (B) et *IHH* (C) chez les différents souris obtenues. **Panneaux du milieu :** détection des ARNm *PAX3* (B) et *IHH* (C) dans le membre supérieur des différents embryons de souris à 11,5 jours de développement. **Panneaux de droite :** photos du squelette de l'extrémité du membre antérieur droit des différentes souris obtenues 3 jours après la naissance. Les barres d'échelle représentent 0,5mm dans les panneaux du milieu et 2mm dans ceux de droite.

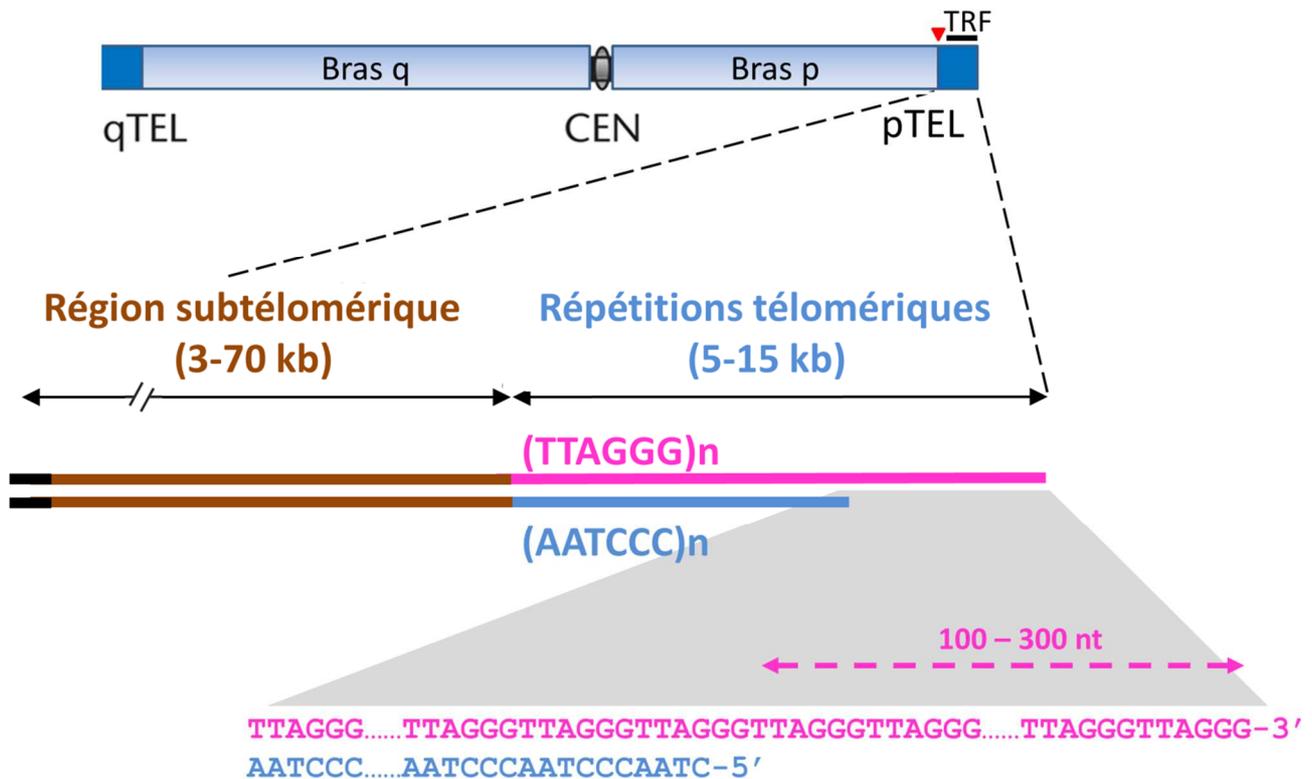
Question 14 :

14a. Analysez les résultats présentés sur la figure 14.

14b. En reprenant l'ensemble des résultats obtenus dans les figures 11 à 14, représentez sur une figure la structure de la chromatine de la région étudiée et son fonctionnement, chez les individus témoins et les trois types de patients.

Partie B. Quand la fin justifie les moyens

Les télomères sont des structures d'hétérochromatine situées aux extrémités des chromosomes eucaryotes et sont essentiels au maintien de leur intégrité. Les cellules ayant des télomères trop courts entrent en sénescence et meurent. L'ADN télomérique humain est formé de plusieurs régions : la région la plus terminale, qui contient plusieurs répétitions $(TTAGGG)_n$ ($n > 100$) d'une longueur allant jusqu'à 15 kilobases (kb) et une région non répétée en amont appelée région subtélomérique de longueur variable. Le brin riche en G est plus long que son complémentaire, et de ce fait se trouve sous forme de simple brin en 3' (préambule 1).



Préambule 1 : Représentation d'un chromosome eucaryote. La région télomérique est constituée d'une région subtélomérique suivie de plusieurs répétitions télomériques ($n > 100$). TRF est un fragment terminal d'ADN télomérique pouvant être isolé par clivage par une enzyme dont le site de coupure est indiqué par la pointe rouge. CEN= centromère, TEL= télomère, p = bras court, q = bras long, kb = kilobases, nt = nucléotides.

La télomérase est une enzyme à activité transcriptase inverse, pouvant synthétiser de l'ADN à partir d'une extrémité 3' libre en utilisant une matrice ARN. La télomérase est formée d'une sous-unité catalytique protéique hTERT et d'un ARN hTR dont la partie servant de matrice est de séquence 5'-CUAACCCUAAC-3'. hTERT et hTR sont nécessaires à l'activité de la télomérase.

La télomérase est exprimée dans les cellules se divisant activement comme les cellules embryonnaires ou les cellules souches. Cependant l'activité de la télomérase diminue fortement dans les cellules somatiques.

Des scientifiques ont inactivé la protéine hTERT dans des cellules embryonnaires humaines. La longueur des télomères est mesurée au cours des divisions cellulaires successives dans des cellules sauvages hTERT^{+/+} (WT) et des cellules homozygotes hTERT^{-/-}. Les télomères sont visualisés par hybridation *in situ* avec une sonde fluorescente s'hybridant sur l'extrémité télomérique terminale simple brin (figure 1A et 1B). Le fragment TRF est révélé par Southern blot dans ces deux lignées au cours des divisions cellulaires successives (figure 1C), et le pourcentage de répétitions TTAGGG est mesuré (figure 1D).

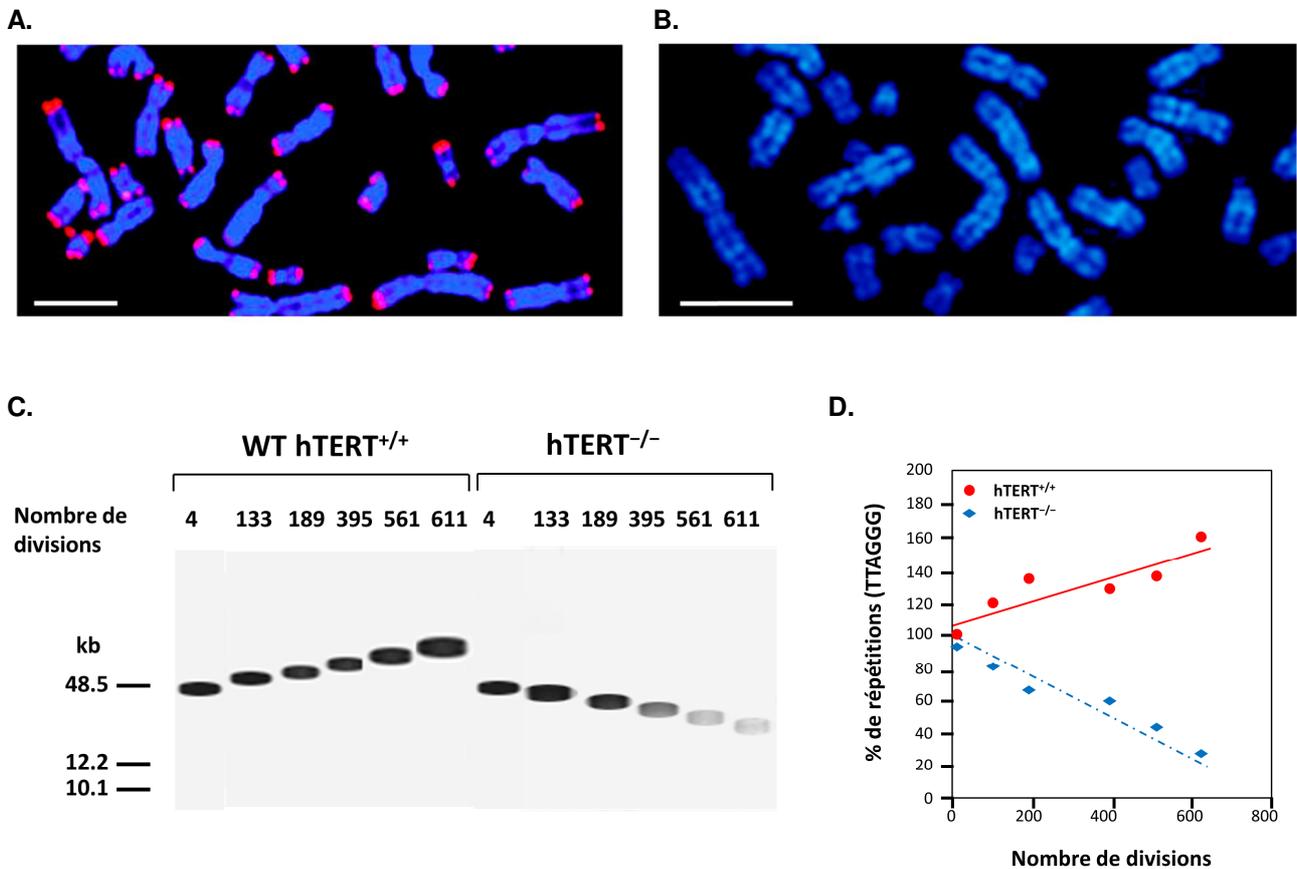


Figure 1 : A et B. Images de microscopie à épifluorescence montrant l'ADN coloré en bleu et une sonde fluorescente rouge s'hybridant aux extrémités simple brin des télomères au bout de 611 divisions dans des cellules en mitose sauvages (A) et hTERT^{-/-} (B). La barre d'échelle représente 5 µm. **C.** Southern blot réalisé sur le fragment TRF avec une sonde radioactive spécifique 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAA-3'. **D.** Estimation de la proportion de répétitions TTAGGG en normalisant le signal de radioactivité par rapport au contrôle (stade 4 divisions) selon la formule :

$$\% \text{ de répétitions (TTAGGG)} = 100 \times \frac{\text{intensité du signal à } n \text{ divisions}}{\text{intensité du signal à 4 divisions}}$$

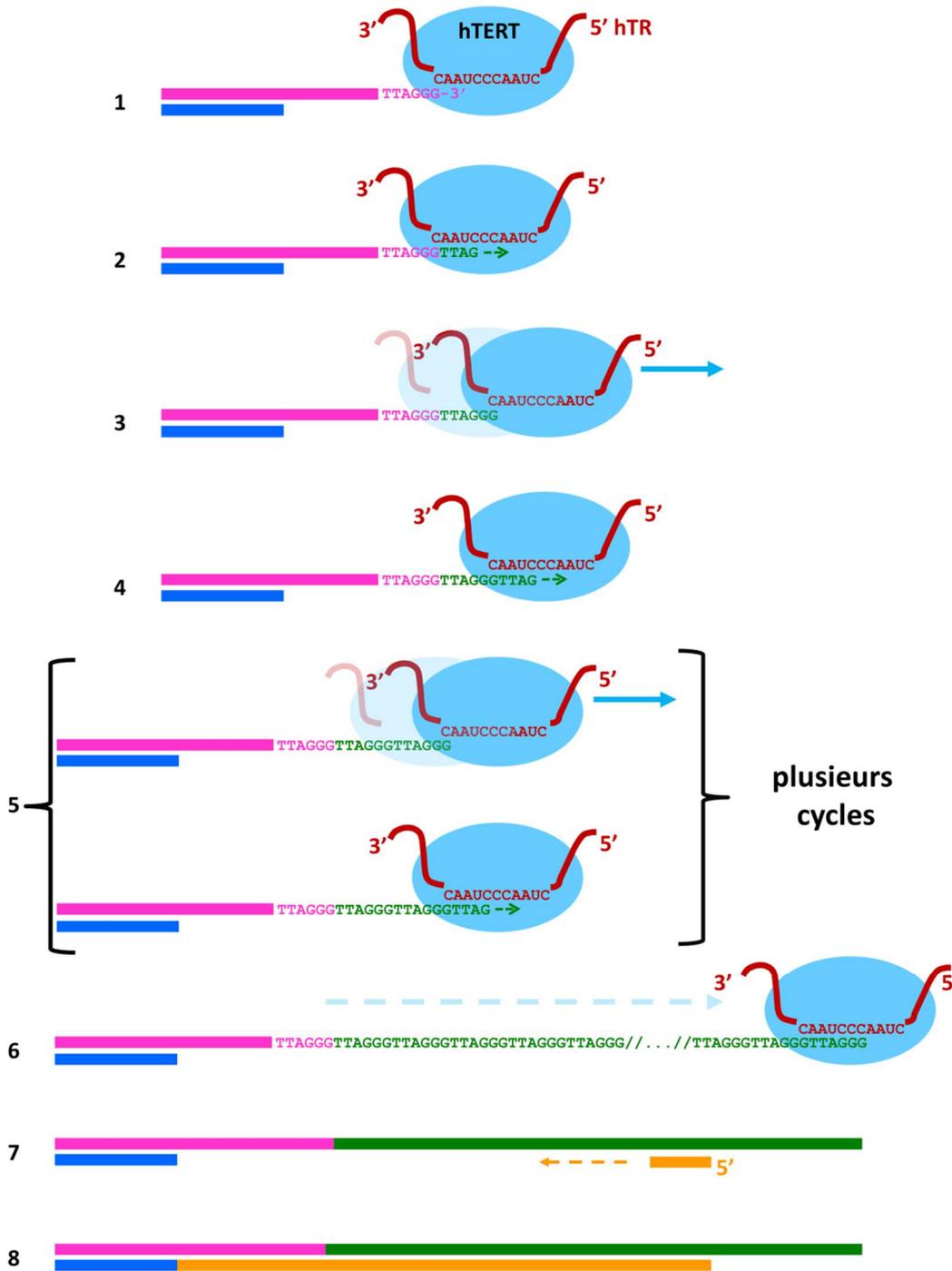
Question 1 :

1a : En reprenant le mécanisme général de progression d'une fourche de réplication de l'ADN, indiquez quel phénomène peut se produire à l'extrémité d'un chromosome à chaque cycle de réplication au niveau du brin retardé.

1b : Analysez la figure 1.

1c : Quelle est l'importance de l'action de la télomérase dans les cellules embryonnaires ?

Dans la cellule, la télomérase peut allonger l'extrémité 3' des télomères selon le mécanisme décrit dans le préambule 2.



1. La télomérase est représentée schématiquement avec sa sous-unité protéique catalytique hTERT (en bleu) et l'ARN hTR (en rouge). Une partie de l'ARN hTR peut s'hybrider avec l'extrémité 3' des télomères.
2. L'ARN hTR sert de matrice pour la synthèse d'ADN (en vert) à partir de l'extrémité 3' libre. Une répétition TTAGGG est ajoutée.
3. Par un mouvement de glissement, la télomérase se positionne à l'extrémité du brin d'ADN néosynthétisé.
4. La télomérase peut ajouter une nouvelle répétition TTAGGG.
5. Synthèse et glissement de la télomérase ont lieu pendant plusieurs cycles.
6. La télomérase se détache du télomère après l'ajout d'un grand nombre de répétitions TTAGGG.
7. Par des mécanismes ne dépendant pas de la télomérase, le brin complémentaire est reconstitué.
8. L'addition de nouvelles répétitions a allongé le télomère du fragment en vert et jaune.

Préambule 2 : Principe de fonctionnement de la télomérase.

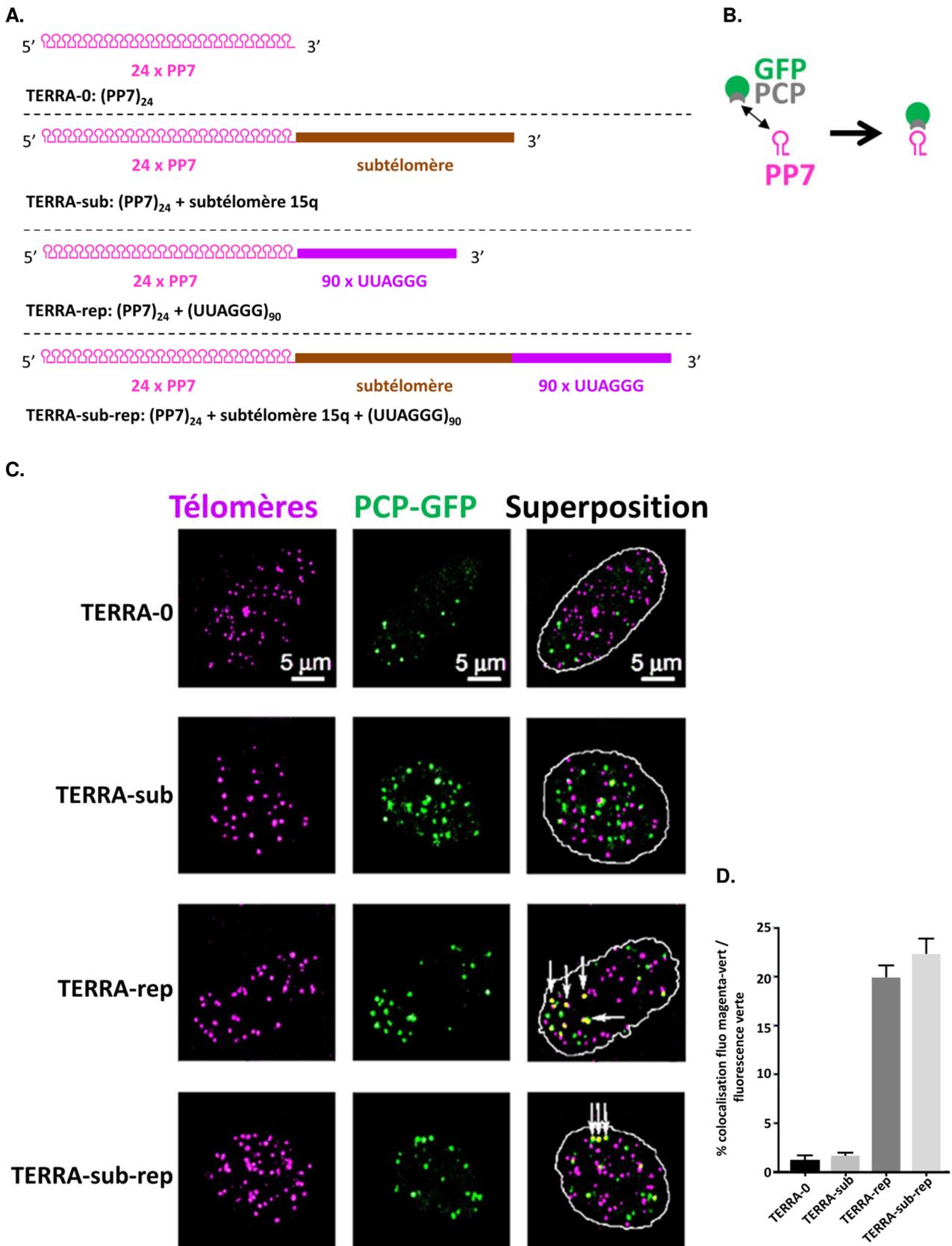


Figure 3 : A. Représentations schématiques des ARN TERRA-0, TERRA-sub, TERRA-rep et TERRA-sub-rep. **B.** Schéma de l'interaction entre l'ARN PP7 et la protéine fusion PCP-GFP. **C.** Images de microscopie à fluorescence obtenues avec les cellules produisant les ARN indiqués à gauche des panneaux montrant le signal de fluorescence de la sonde télomérique (magenta), celui de la protéine PCP-GFP (vert) et la superposition des deux signaux. La combinaison des signaux magenta et vert est indiquée par des flèches blanches. **D.** Statistiques de comptage de colocalisation des points de fluorescence verte avec ceux de fluorescence magenta.

Question 3 :

3a : A quoi correspond la structure entourée en blanc sur les panneaux montrant la superposition des fluorescences ?

3b : Quel est l'intérêt d'utiliser la séquence (PP7)₂₄ ?

3c : Analysez les résultats présentés dans les figures 3C et 3D.

Afin de déterminer quels sont les paramètres importants pour la localisation des ARN TERRA, la même expérience que précédemment est réalisée avec la construction TERRA-sub-rep, mais cette fois l'expression de la protéine RNase H1, enzyme dont l'activité est étudiée sur la figure 4A, est diminuée par interférence ARN (siARN) en même temps que la transfection (figure 4B).

Les résultats des colocalisations sont indiqués sur la figure 4C.

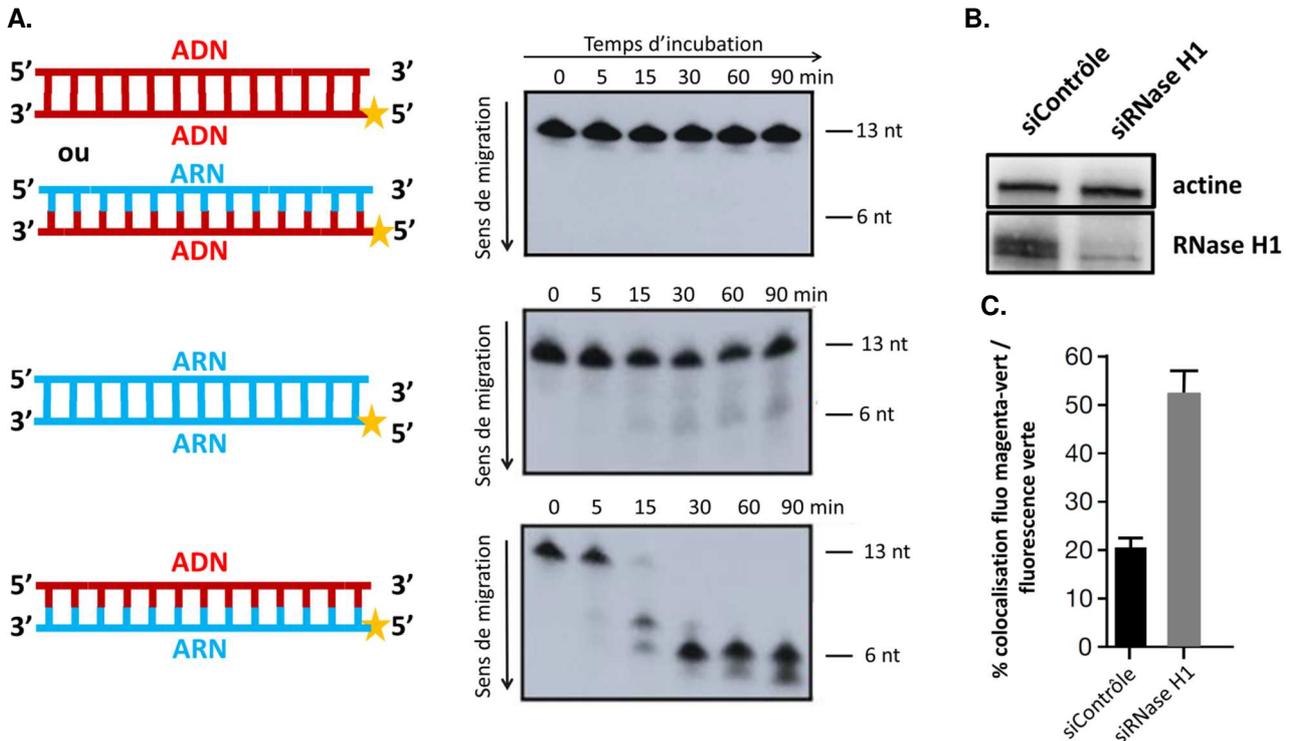


Figure 4 : **A.** Mesure de l'activité de la RNase H1 sur différents substrats représentés à gauche dont un seul brin est marqué radioactivement à l'une de ses extrémités (étoile). A différents temps d'incubation du substrat avec l'enzyme, une partie du mélange réactionnel est prélevée, et les acides nucléiques sont soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (ne conservant que les liaisons covalentes des molécules). La radioactivité est ensuite révélée et apparaît avec une couleur noire. nt = nucléotides. **B.** Après traitement des cellules avec les siARN indiqués en haut des panneaux, les protéines sont soumises à un western blot avec des anticorps spécifiques indiqués à droite des panneaux. **C.** Quantification de la fluorescence verte colocalisée avec la fluorescence magenta après transfection de la construction permettant l'expression des ARN TERRA-sub-rep et traitement aux siARN indiqués en-dessous des histogrammes.

Question 4 :

4a : Analysez la figure 4A et concluez sur l'activité de la RNase H1.

4b : Rappelez le principe de l'interférence ARN. Analysez la figure 4B. Quel est le rôle du western blot contre l'actine ?

4c : Analysez la figure 4C.

Des cellules exprimant TERRA-0 ou TERRA-sub-rep sont mises en culture et transfectées avec des constructions permettant la surexpression de la RNase H1 ou produisant des siARN (siContrôle, siRNase H1). Les cellules sont lysées, les acides nucléiques purifiés et incubés avec un anticorps non spécifique (IgG) ou spécifique des structures hybrides ADN/ARN de 9 nucléotides sans spécificité de séquence. Cet anticorps permet l'immunoprécipitation des acides nucléiques qui s'y sont fixés ; les fractions précipitées sont alors déposées sur une membrane, dénaturées et la présence des séquences télomériques est révélée par hybridation avec une sonde radioactive spécifique (figure 5A) et quantifiée (figure 5B). Le traitement « *in vitro* RNase H1 » consiste à incubier l'extrait en présence de RNase H1 avant l'immunoprécipitation.

Les mêmes fractions immunoprécipitées sont utilisées pour réaliser une PCR avec des amorces spécifiques des séquences subtélomériques de certains chromosomes (10q, 13q et 15q, figure 5C).

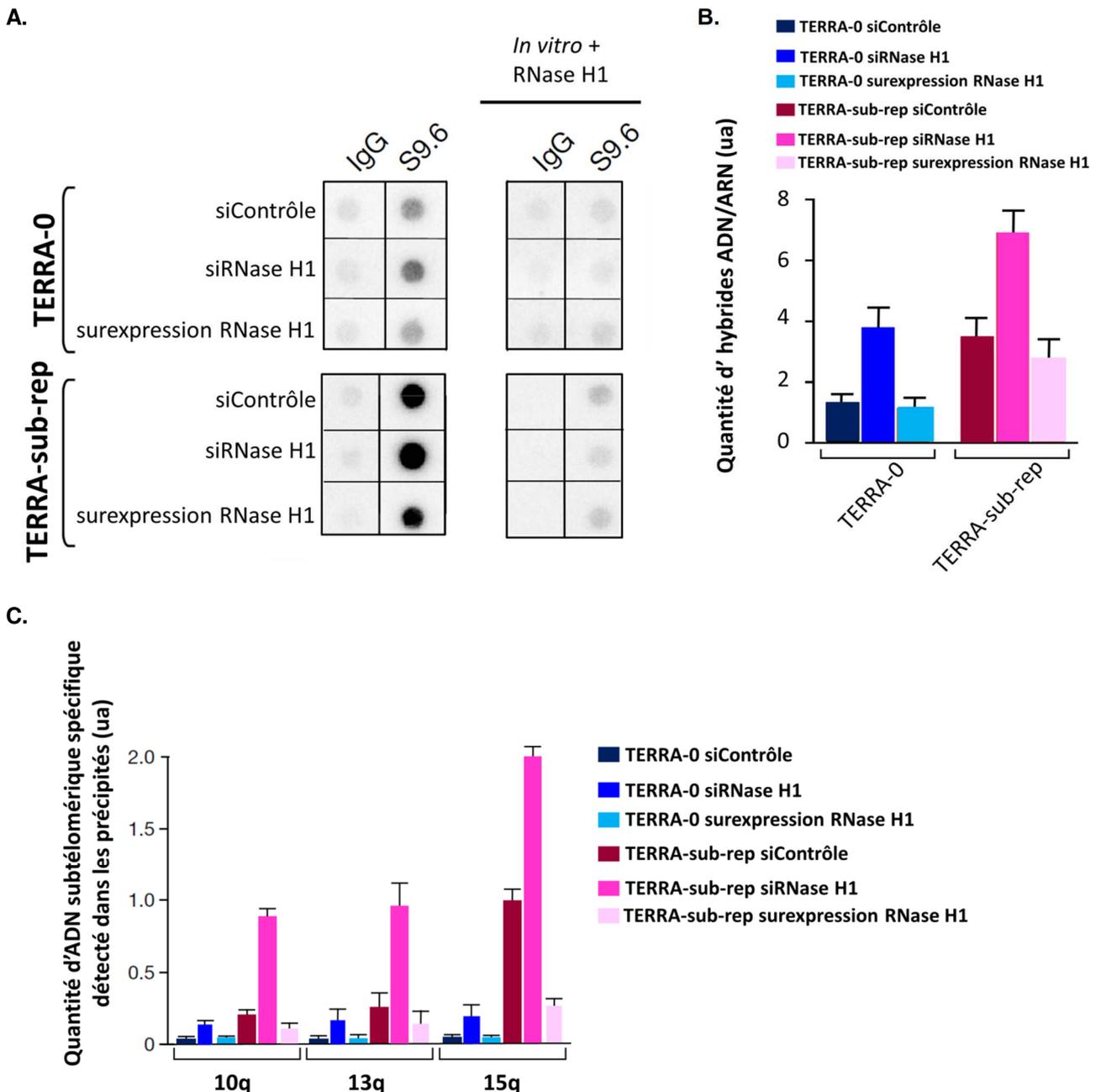


Figure 5 : **A.** Immunoprécipitation des acides nucléiques par un anticorps non spécifique (IgG) ou l'anticorps S9.6 spécifique des structures en hybride ADN/ARN. Les cellules sont traitées au préalable avec des siRNA (siContrôle, siRNase H1) ou transfectées avec un plasmide induisant une surexpression de la RNase H1 et avec un transgène permettant la production des ARN TERRA-0 ou TERRA-sub-rep. Après lyse des cellules et immunoprécipitation, les extraits sont déposés sous forme de dépôts circulaires sur une membrane et dénaturés. Les séquences télomériques sont révélées par hybridation avec une sonde radioactive. Le traitement « *in vitro* RNase H1 » consiste à incuber l'extrait en présence de RNase H1 avant l'immunoprécipitation. **B.** Quantification, en unités arbitraires (ua), des résultats obtenus lors de l'immunoprécipitation par l'anticorps S9.6 dans l'expérience en A. **C.** Quantification par PCR, en unités arbitraires, des régions subtélomériques spécifiques des chromosomes 10q, 13q et 15q sur les fractions obtenues après immunoprécipitation par l'anticorps S9.6. La construction produisant l'ARN TERRA-sub-rep contient la région subtélomérique du chromosome 15q.

Question 5 :

5a : Représentez schématiquement l'expérience réalisée et analysez la figure 5A.

Quelle est l'utilité de l'expérience avec le traitement *in vitro* à la RNase H1 ?

Que permet d'analyser l'expérience avec la surexpression de TERRA-0 ?

5b : Analysez la figure 5B. Schématisez les structures formées par l'ARN TERRA-sub-rep sur les chromosomes.

5c : Analysez la figure 5C. Quelles informations supplémentaires apporte cette expérience sur la position des ARN TERRA-sub-rep sur les chromosomes ?

Certains télomères, appelés « télomères fragiles », présentent une structure désorganisée. Ils sont caractérisés par des marquages télomériques *in situ* diffus, avec parfois des duplications des régions télomériques. Les « télomères fragiles » peuvent conduire à la fusion de chromosomes et à une instabilité génomique. Le pourcentage de « télomères fragiles » est mesuré dans des cellules soumises à différents traitements (figure 6A et 6B).

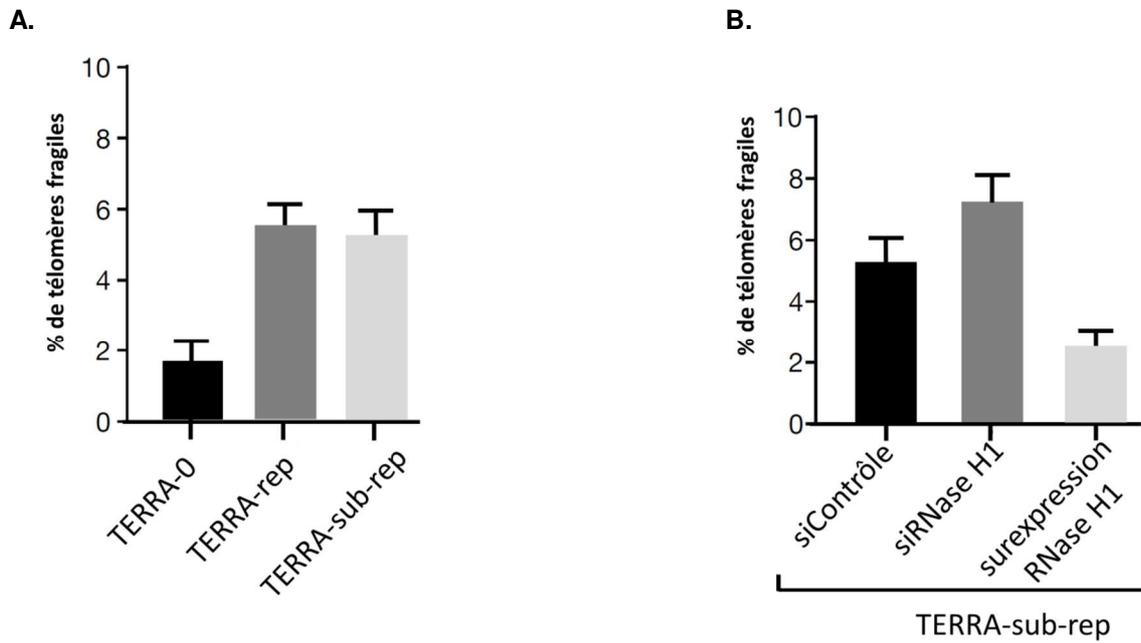


Figure 6 : **A.** Quantification des télomères fragiles dans des cellules exprimant les ARN indiqués en-dessous des histogrammes. **B.** Quantification des télomères fragiles dans des cellules exprimant l'ARN TERRA-sub-rep dans différentes conditions indiquées en-dessous des histogrammes.

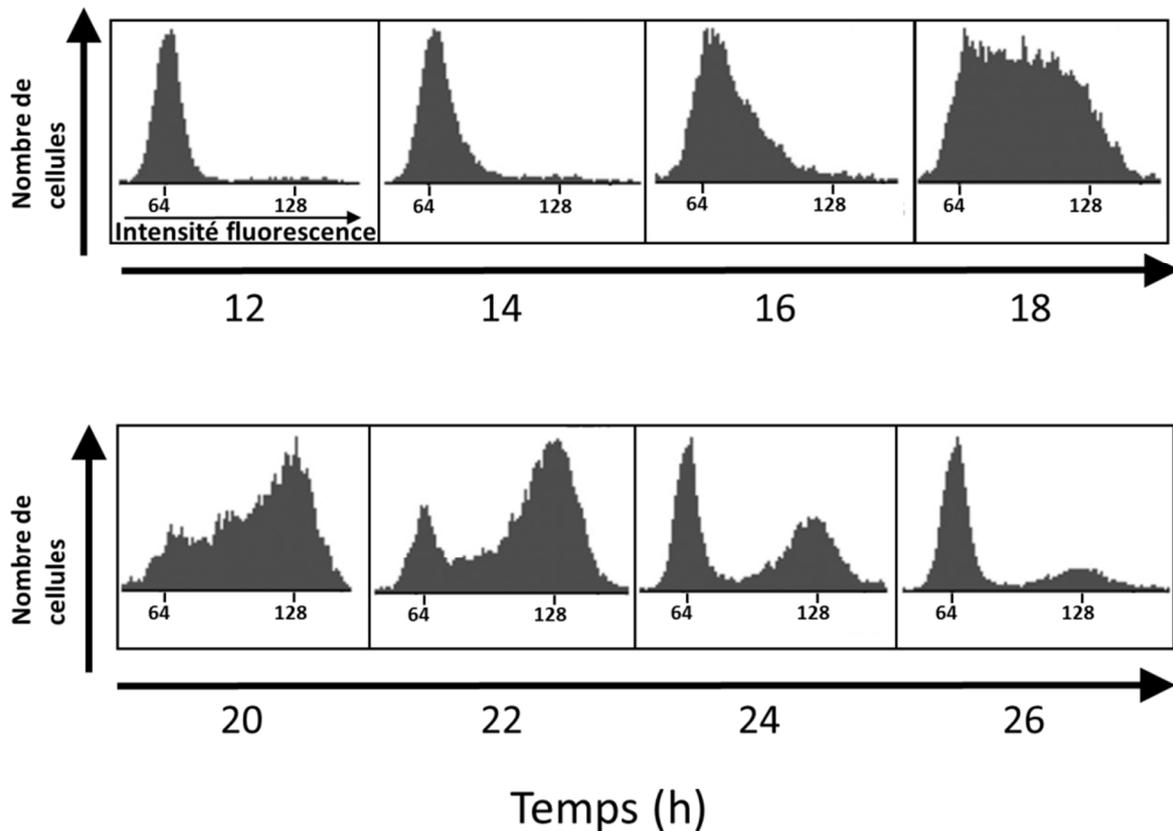
Question 6

6a : Analysez la figure 6.

6b : Proposez des hypothèses pour expliquer ces résultats.

Des cellules embryonnaires en culture ont été synchronisées en utilisant une drogue bloquant le cycle cellulaire. A différents temps à partir de la levée du blocage (temps 0), un échantillon de la population est prélevé. L'ADN est marqué avec une molécule fluorescente dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN puis l'intensité de la fluorescence de chaque cellule de la population est mesurée (figure 7A). Sur chaque échantillon, la quantité d'ARN TERRA endogène de différents chromosomes est mesurée par RT-PCR (figure 7B).

A.



B.

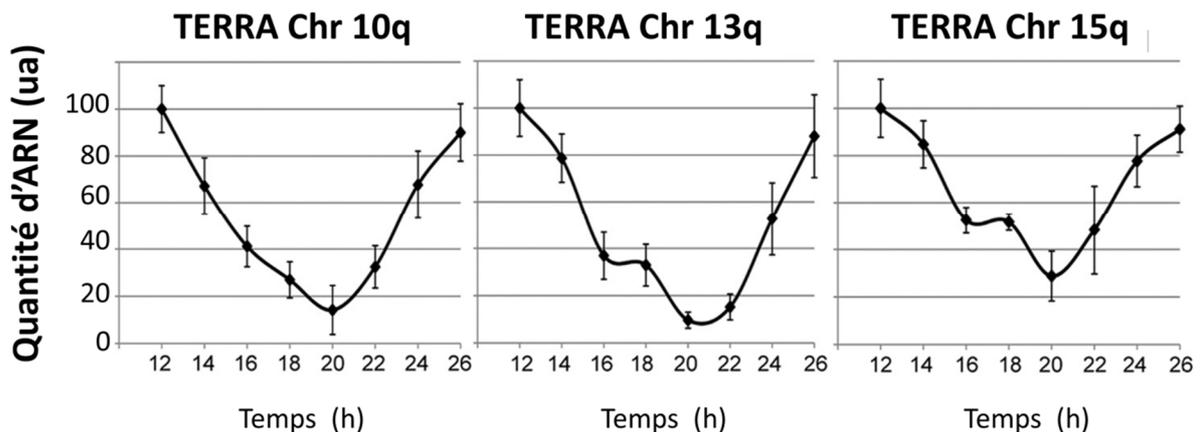


Figure 7 : **A.** Nombre de cellules présentant une intensité de fluorescence donnée (en unités arbitraires) dans la population étudiée après levée du blocage du cycle cellulaire au temps 0. **B.** Quantification des ARN TERRA de différents chromosomes dans les cellules étudiées au cours du temps. L'échelle de temps est la même qu'en A. Le niveau d'expression à 12h est fixé à 100.

Question 7 :

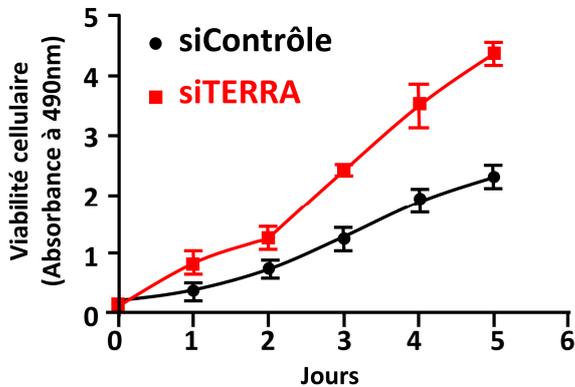
7a : Analysez la figure 7A en lien avec les différentes étapes du cycle cellulaire.

7b : Analysez la figure 7B.

Les cellules cancéreuses peuvent retrouver des caractères de cellules embryonnaires et peuvent se diviser indéfiniment.

Les ARN TERRA ont été inactivés par la méthode d'interférence à ARN dans des cellules cancéreuses et la viabilité et la prolifération des cellules ont été mesurées.

A.



B.

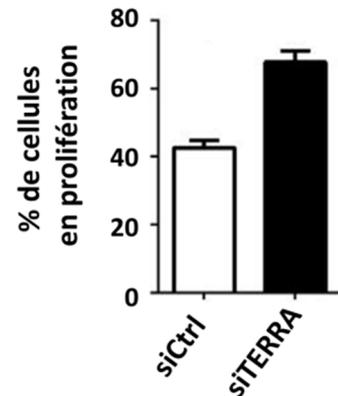


Figure 8 : Mesure de la viabilité cellulaire (**A** par incorporation d'un réactif qui absorbe la lumière à 490nm uniquement dans les cellules vivantes) et de la prolifération (**B**) de cellules cancéreuses traitées avec un siARN Contrôle (siCtrl) ou dirigé contre les ARN TERRA (siTERRA).

Question 8 :

8a : Analysez les résultats présentés sur la figure 8. Par quel mécanisme les ARN TERRA pourraient-ils exercer leur(s) effet(s) dans les cellules cancéreuses ?

8b : En rassemblant l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, schématisez le phénomène étudié.

8c : Proposez un traitement contre le cancer basé sur les expériences présentées.

Fin de l'épreuve.