

L'usage de documents et de calculatrice est interdit.

Consignes générales

Le sujet est composé de trois parties et de 14 pages au total.

Toute réponse sera argumentée, même brièvement. Une réponse correcte mais non justifiée sera jugée incomplète. Chaque partie comporte des questions pouvant être traitées indépendamment.

Si au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signalera sur sa copie et poursuivra l'épreuve en expliquant les raisons des initiatives qu'il aura été amené à prendre.

Le barème suivant sera appliqué : Partie I : 30 points, Partie II : 35 points, Partie III : 35 points.

Partie I – Sujet de synthèse

Les cellules eucaryotes présentent un important cytosquelette. Vous détaillerez les différents éléments du cytosquelette dans les cellules animales, ainsi que leurs rôles dans les fonctions cellulaires.

Vous illustrerez votre rédaction à l'aide de schémas et de quelques exemples.

Partie II – Un point de contrôle en métaphase

Le point de contrôle du fuseau : Chez les cellules eucaryotes, le cycle cellulaire se déroule suivant une succession de phases bien identifiées. Au cours de ce cycle, il existe des points de contrôle qui garantissent qu'une phase soit correctement terminée avant de débiter la phase suivante. Dans cette partie nous détaillerons le mécanisme d'un des points de contrôle du cycle cellulaire qui se déroule en mitose, lors de la métaphase. Appelé « point de contrôle du fuseau » ou « spindle checkpoint », il garantit que les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque métaphasique avant de débiter l'anaphase.

Q 1 : Citer un autre point de contrôle du cycle cellulaire chez les eucaryotes et son emplacement dans le cycle.

Q 2 : Rappeler les différentes phases de la mitose chez les cellules eucaryotes.

Relations in vitro entre les protéines MCAK et Aurora B : Au niveau moléculaire, le point de contrôle du fuseau fait intervenir de nombreuses protéines : des protéines centromériques, des protéines cytoplasmique et des protéines associées aux microtubules. Nous détaillerons les interactions entre deux de ces protéines : la protéine Aurora-B, qui est une protéine kinase et MCAK, une kinésine associée aux centromères mitotiques.

Q 3 : Détaillez la réaction catalysée par une protéine kinase.

Figure 1 : Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées afin de localiser ces deux protéines lors de la mitose. Pour chaque cliché en microscopie de fluorescence, l'intensité de fluorescence associée à une protéine est mesurée selon une ligne passant par les centromères. L'intensité de fluorescence est directement liée à la concentration de la protéine (une forte intensité de fluorescence correspond à une forte concentration protéique). A. Résultats réalisés sur une cellule en début de métaphase (tubulin = tubuline). B. Résultats réalisés sur une cellule en fin de métaphase (DNA = ADN, Aur B = Aurora B et ACA = protéine centromérique).

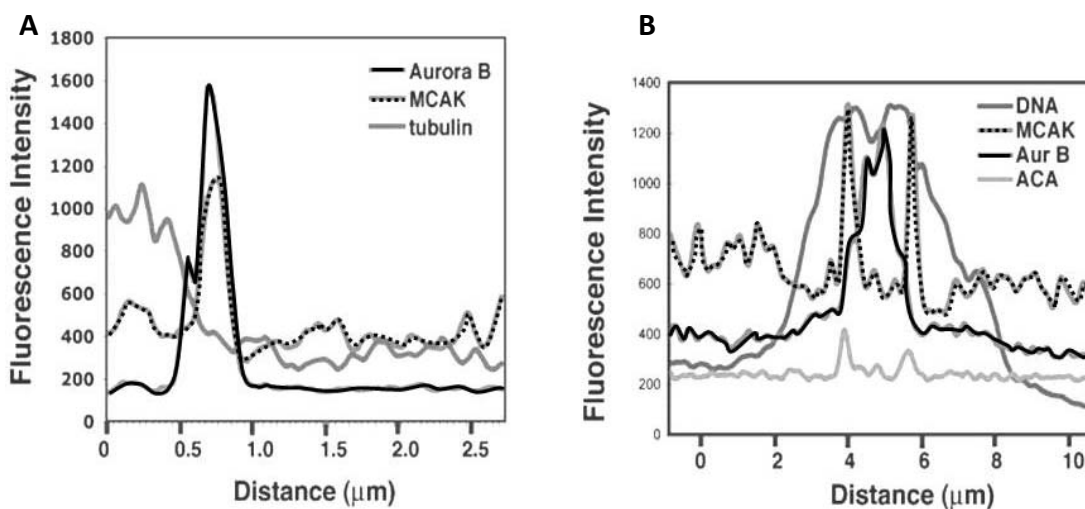


Figure 1 : Localisation des protéines MCAK et Aurora B en métaphase

Q 4 : Rappeler brièvement en vous aidant d'un schéma le principe d'une immunofluorescence.

Q 5 : A l'aide de la figure 1, comparer la localisation des deux protéines MCAK et Aurora B en début et en fin de métaphase.

Figure 2 : Des expériences d'activité enzymatique ont été réalisées in vitro. Une protéine recombinante MCAK a été synthétisée en laboratoire. Lors de cette expérience, elle est mise en présence d'ATP marqué radioactivement (^{32}P – ATP) et de protéine Aurora B purifiée à partir d'œufs de xénope (MCE = œufs en mitose ; ICE = œufs en interphase). Lors de chaque réaction, on vérifie que la concentration de protéine Aurora B est identique. La réaction est laissée une heure à 22°C, puis les solutions sont déposées sur un gel d'électrophorèse. Une autoradiographie est réalisée en fin d'expérience.

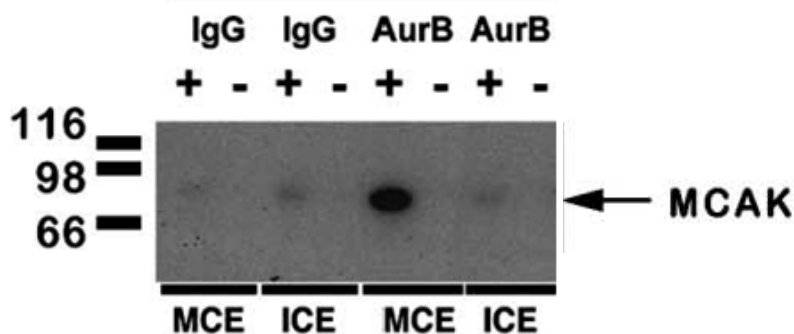


Figure 2 : Test d'activité enzymatique in vitro

Q 6 : A l'aide de la figure 2, proposez des hypothèses sur les relations entre MCAK et Aurora B au cours du cycle cellulaire.

Figure 3 : Afin de préciser les relations entre Aurora B et MCAK, un alignement de séquence a été réalisé entre la protéine MCAK présentée dans la figure 2 et des substrats connus d'Aurora B.

CgMCAK	87	KQKRRSVNSKI
	101	KEGLRSRSTRM
	181	PARRKSCIVKE
Histone H3	5	QTARKSTGGKA
	23	KAARKSAPATG
HsCENP-A	2	GPRRRSRKPEA
ScDam1p	20	TEYRLSIGSAP
	257	KLRRKSILHTI
	267	HTIRNSIASGA
	292	PNNRISLGSGA
Spc34p	199	NQRRKTIFVED
Ndc80p	100	SVSRLSINQLG
Ask1p	200	RKRKISLLLQQ

Figure 3 : Alignement de séquence entre MCAK et des substrats connus d'Aurora B

Q7 : Après avoir rappelé la notion de « séquence consensus », utiliser les informations de la figure 3 pour préciser les relations moléculaires d'Aurora B et de MCAK in vitro.

Relations in vivo entre les protéines MCAK et Aurora B Par la suite, l'activité d'Aurora B a été testée sur des cellules vivantes (in vivo). Plusieurs anticorps ont été utilisés. Le premier anticorps α -P-Ser92 reconnaît la protéine MCAK lorsqu'elle est phosphorylée sur le résidu Serine en 92^{ème} position. Le deuxième anticorps α -Ser92 reconnaît les deux formes (phosphorylée et non phosphorylée) de la protéine MCAK sur ce même résidu. La spécificité de ces deux anticorps est vérifiée par un test Elisa.

Figure 4 : Test Elisa réalisé sur les deux anticorps reconnaissant la protéine MCAK, α -P-Ser92 (Anti-P-Ser 92) et α -Ser92 (Anti-Ser92). Ces deux anticorps ont été testés avec trois peptides différents :

- P-Ser92 : un peptide de 16 acides aminés correspondant à la séquence de MCAK, phosphorylé sur la sérine 92.
- Ser92 : le même peptide de 16 acides aminés correspondant à la séquence de MCAK, sans groupement phosphate en position 92.
- H3 : un peptide de 16 acides aminés correspondant à la séquence de la protéine histone H3, phosphorylée en position 10 sur une sérine.

Pour chaque peptide, une série de dilution a été réalisée. Ces dilutions sont disposées dans des puits sur une plaque Elisa. Après traitement, le fond des puits adsorbe les peptides présents dans la dilution, ce qui permet de disposer d'une série de puits contenant des quantités variables de peptides. A l'intérieur de ces puits, on place une solution de l'anticorps à tester. Les anticorps qui restent attachés au fond du puits après plusieurs lavages sont révélés par fluorescence.

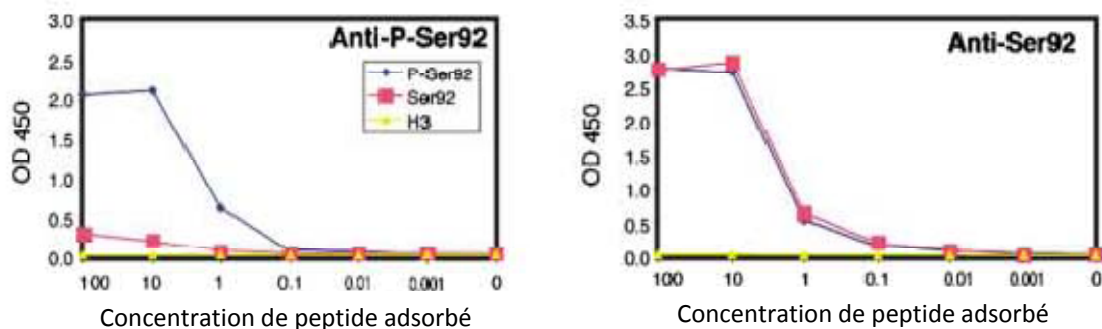


Figure 4 : Résultats des tests Elisa effectués avec les deux anticorps Anti-P-ser92 et Anti-Ser92

Q 8 : Discuter de l'utilisation d'un peptide H3 comme témoin dans cette expérience.

Q 9 : A l'aide de la figure 4, conclure sur la spécificité des deux anticorps Anti-P-Ser92 et Anti-Ser92.

Figure 5 : Dans les expériences suivantes, les deux anticorps Anti-P-Ser92 et Anti-Ser92 sont utilisés en immunofluorescence sur des cellules en mitose. Ces cellules ont préalablement subi un double traitement :

- Elles sont traitées avec du nocodazole, drogue qui bloque le cycle cellulaire en fin de prophase/début de métaphase. Cette drogue n'a pas d'effet sur les interactions entre Aurora B et MCAK.
- Elles sont soumises à un traitement d'ARN interférence (RNAi) dirigé contre la protéine Aurora B, ce qui bloque la traduction de la protéine Aurora B. Ce traitement a une efficacité de 50% environ.

Pour chaque cliché de microscopie de fluorescence, on reporte en haut de colonne la molécule reconnue par l'anticorps utilisé. Ainsi dans la première colonne, seule l'intensité de fluorescence associée à l'ADN est présente (les pixels blancs correspondent à une forte intensité de fluorescence, et les pixels noirs correspondent à une absence de fluorescence). ACA = Anticorps qui reconnaît des protéines centromériques.

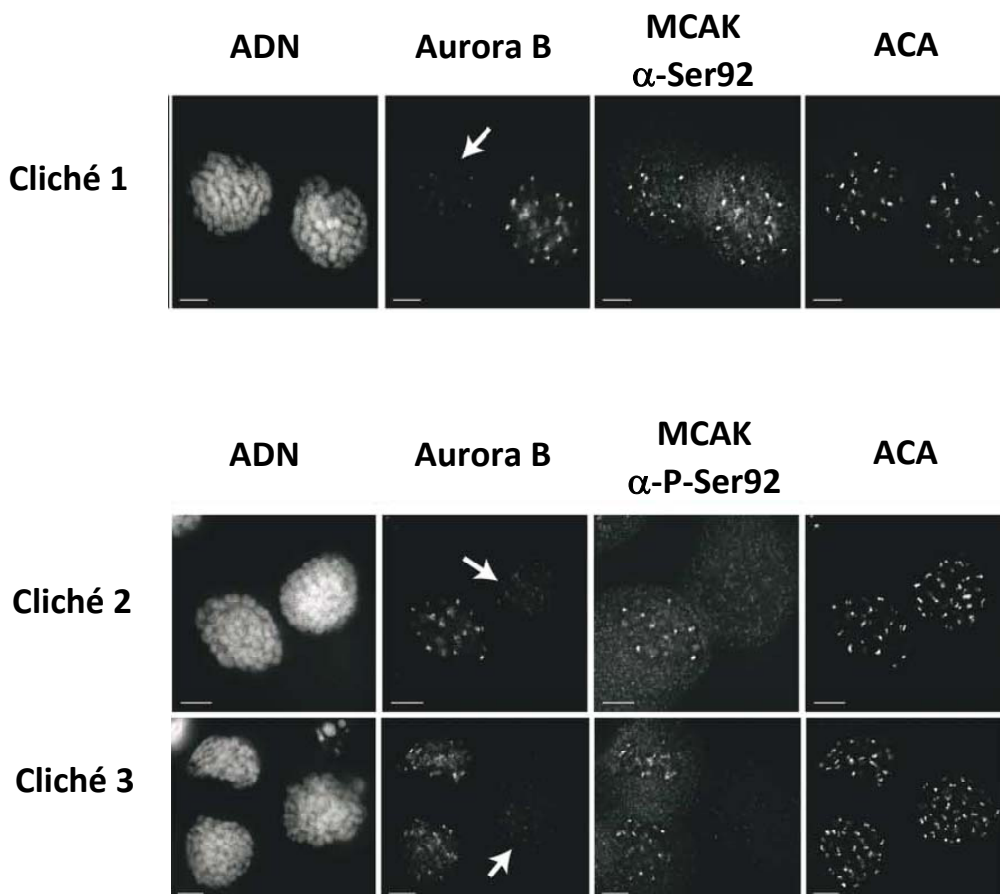


Figure 5 : Expériences d'immunofluorescence sur des cellules en culture

Q 10 : Décrire chaque cliché obtenu en microscopie à fluorescence.

Q 11 : Comparer les résultats obtenus in vivo (figure 5) et les résultats ci-dessus obtenus in vitro.

Figure 6 : Nous allons nous intéresser à l'activité de la protéine MCAK. Cette protéine a une action sur les microtubules au cours de la mitose. Dans l'expérience suivante, on fait réagir in vitro les deux protéines Aurora B et MCAK avec des microtubules. Après incubation pendant 1 heure (temps au bout duquel la réaction de dépolymérisation des microtubules par MCAK est considérée comme complète), la solution est centrifugée ce qui permet de séparer les microtubules (présents dans le culot, noté p), des protéines tubuline, Aurora B et MCAK (présentes dans le surnageant, noté s). Le gel d'électrophorèse ci-dessous présente les résultats de l'expérience. On note + la présence d'une protéine dans la réaction et on note -, l'absence de cette protéine dans la réaction.

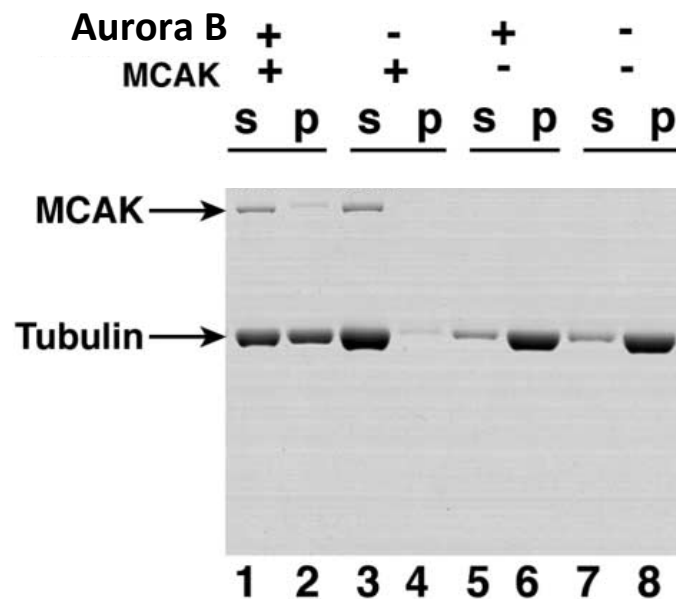


Figure 6 : Test de l'activité de la protéine MCAK in vitro

Q 12 : Après avoir comparé les résultats des quatre tests, proposer une hypothèse sur l'action de la protéine Aurora B sur l'activité cellulaire de la protéine MCAK.

Figure 7 : De nouvelles expériences ont été réalisées avec des protéines mutantes de MCAK. Deux mutants ont été réalisés :

- Une protéine AAA-MCAK. Dans la séquence de cette protéine, les sérines en position 92, 106 et 186 ont été remplacées par des alanines.
- Une protéine EEE-MCAK. Dans la séquence de cette protéine, les sérines en position 92, 106 et 186 ont été remplacées par des glutamates.

Ces deux protéines ont été introduites dans des cellules en culture. Lors de cette expérience, on observe que la cellule régule la quantité de protéines MCAK intracellulaire. En effet, la traduction endogène de protéine MCAK est fortement réduite (5% de sa concentration normale). On considère donc que l'ensemble des protéines MCAK intracellulaire au moment de l'expérience correspondent aux protéines exogènes, introduites artificiellement en fin d'interphase. Une troisième expérience, témoin, est réalisée avec une protéine MCAK non mutée.

Protéine exogène	Structure des microtubules dans les cellules	Etat du cycle cellulaire
AAA-MCAK	Absence de microtubules dans la cellule.	Cellules bloquée en fin de prophase/début de métaphase
EEE-MCAK	Absence de microtubules dans la cellule	Cellules bloquée en fin de prophase/début de métaphase
SSS-MCAK	Présence de microtubules dans la cellule	Les cellules réalisent une mitose, puis poursuivent leur cycle cellulaire.

Figure 7 : Conséquences cellulaires de l'introduction de protéines mutantes AAA-MCAK et EEE-MCAK

Q 13 : Ecrire la formule chimique des acides aminés suivants : sérine, alanine, glutamate.

Q 14 : D'après les résultats précédents, expliquer le choix des mutations (localisation et nature) dans l'obtention des deux protéines mutantes AAA-MCAK et EEE-MCAK.

Q 15 : Comparer les résultats obtenus in vitro (figure 6) et in vivo (figure 7).

Figure 8 : Lors de la métaphase, de nombreuses cascades protéiques permettent de passer d'un stade où les chromosomes sont éparpillés dans la cellule (fin de prophase/début de métaphase) à un stade où les chromosomes sont alignés en plaque métaphasique (fin de métaphase).

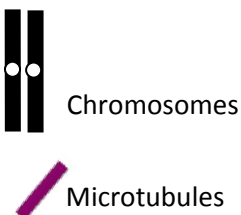


Phase de mitose	Fin de prophase/Début de métaphase	Fin de métaphase
Aspect et position des chromosomes Légendes : 	 Les chromosomes sont visibles, ils ne sont pas alignés en plaque métaphasique.	 Les chromosomes sont visibles et alignés sur la plaque métaphasique.

Figure 8 : Evolution des chromosomes au cours de la métaphase

Q 16 : Reproduire les schémas de la figure 8 pour réaliser un schéma bilan de l'interaction des protéines Aurora B et MCAK au cours de la métaphase. Vous préciserez la localisation et l'activité de ces deux protéines en début et en fin de métaphase.

Partie III – Point de contrôle et aneuploïdie

L'aneuploïdie : Plusieurs voies peuvent mener à une aneuploïdie. Le schéma de la figure 9 reprend trois voies possibles. La première en (a) correspond à un défaut de cohésion des chromatides sœurs lors de la métaphase. Ce défaut de cohésion aboutit à une séparation prématurée des chromatides. La figure (b) présente un défaut d'attachement des microtubules. Ce type de défaut appelé « attachement mérotélique » correspond à l'attachement d'un kinétochore par les deux pôles de la cellule. En (c) le chromosome n'est attaché qu'à un seul pôle (« attachement monopolaire ») et la division cytoplasmique de la cellule intervient avant réparation de cet attachement.

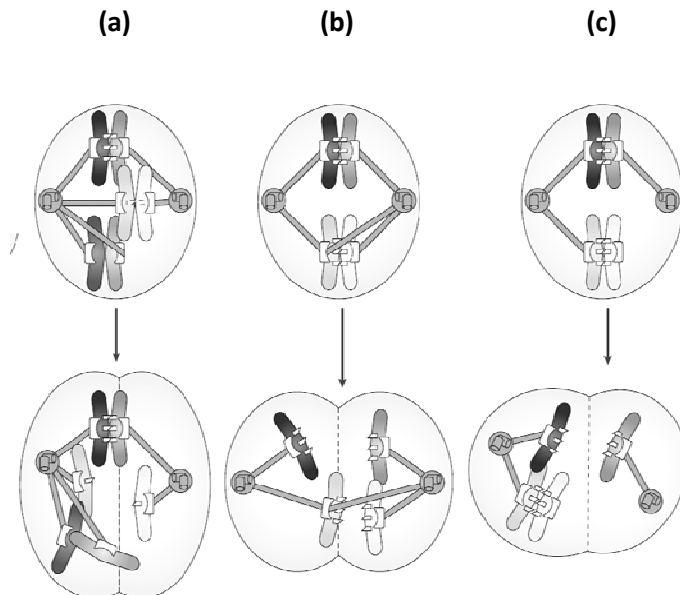


Figure 9 : les différentes voies qui peuvent mener à l'aneuploïdie

Ces aneuploïdies sont évitées dans la plupart des cellules. En effet en cas de défaut en métaphase, le point de contrôle du fuseau est activé, ce qui mène à un arrêt temporaire de la mitose. Des complexes protéiques de réparation du fuseau métaphasique sont alors activés. Le point de contrôle ne sera alors désactivé que lorsque tous les chromosomes seront alignés sur la plaque métaphasique et attachés aux deux pôles de la cellule (« attachement bipolaire »). Si la réparation de la plaque métaphasique n'est pas possible, les cellules entrent en apoptose.

Q 17 : Donner la définition des termes suivants : aneuploïdie, kinétochore, chromatide, apoptose.

Q 18 : Citer une maladie génétique humaine causée par une aneuploïdie.

La protéine Clp1p : Des expériences ont été menées chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) afin de caractériser le rôle de la protéine Clp1p en métaphase. Cette protéine est présente sur les kinétochores en métaphase, puis disparaît des kinétochores dès que les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. Cette protéine est une phosphatase, elle présente une cystéine très conservée dans son site actif en position 286.

Figure 10 : On dispose de plusieurs souches de levure :

- WT : une souche sauvage exprimant une protéine Clp1p fonctionnelle
- *clp1Δ* : une souche mutante n'exprimant pas la protéine Clp1p
- *clp1C286S* : une souche mutante qui exprime une protéine Clp1p portant une sérine en position 286.

Ces souches de levures sont cultivées sur un milieu nutritif nommé YE. Pour chaque souche étudiée, on place la même colonie dans des milieux YE de plus en plus dilués, ce qui permet de visualiser la croissance cellulaire (figure 10 A). Dans un deuxième temps, on réalise une expérience nommée « test de perte de minichromosomes ». Les souches utilisées possèdent une paire de minichromosomes non essentiels, qui donnent une teinte « rouge » à la cellule puis à la colonie. La fréquence de perte de chromosome lors d'une division cellulaire peut alors être déterminée en comptant les colonies qui présentent une moitié rouge et une moitié blanche. Ce phénotype au niveau de la colonie correspond à la perte d'un minichromosome dès les premières divisions cellulaires. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau de la figure 10 B (entre parenthèse est indiqué le nombre de colonies comptées).

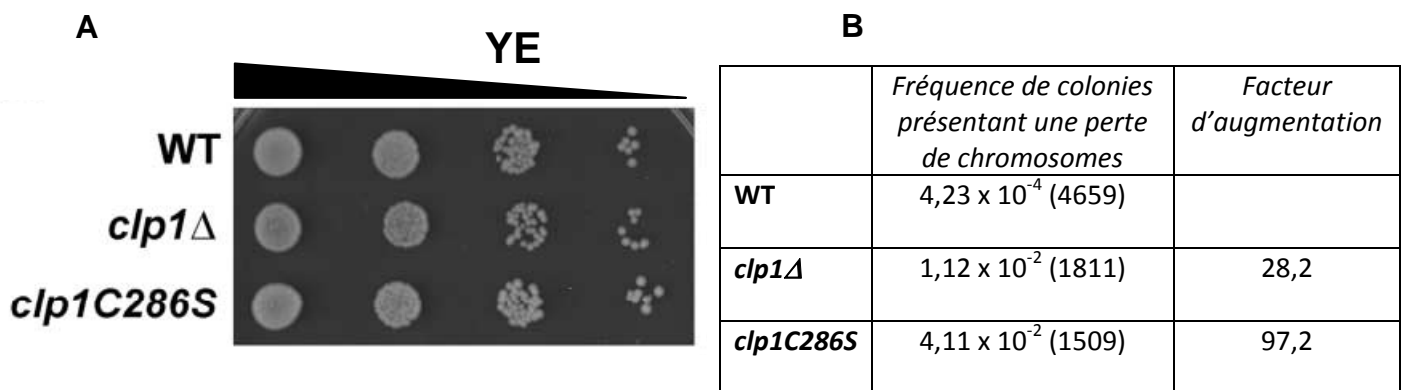


Figure 10 : Caractérisation de deux mutants *clp* chez *S. pombe*

Q 19 : Quelles sont les informations apportées par la figure 10 A.

Q 20 : Résumer sous la forme d'un schéma le « test de perte de chromosome », en faisant figurer les différents phénotypes possibles pour les colonies.

Q 21 : Analyser le tableau de la figure 10 B puis proposer une explication à la différence de résultats observés pour les deux mutants.

Afin de préciser le déroulement de la mitose dans les souches *clp1Δ*, les cellules sont bloquées en phase S par addition d'hydroxy-urée dans le milieu de culture pendant 5 heures. L'action de l'hydroxy-urée est réversible, les cellules reprennent leur cycle cellulaire de manière synchrone après plusieurs lavages. Les cellules sont alors suivies par microscopie et l'on note à intervalle de temps régulier (toutes les 20 minutes) les cellules en métaphase (points en forme de losange sur la figure 11) et les cellules en fin de mitose (points en forme de carré sur la figure 11).

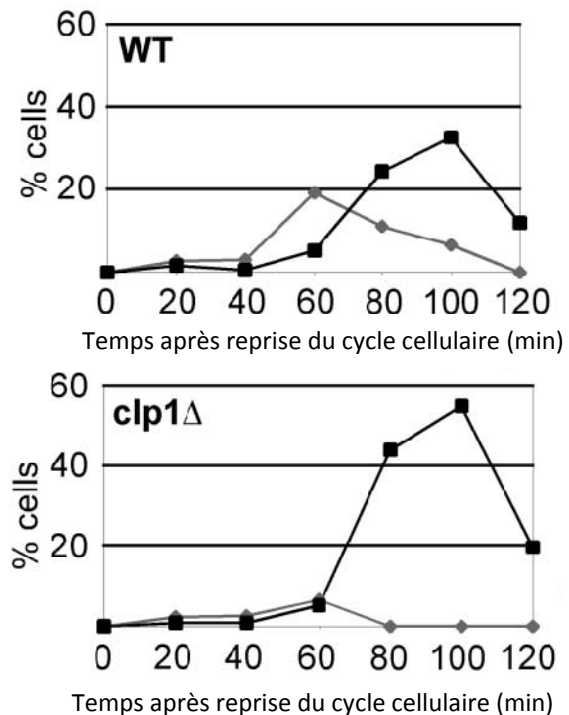


Figure 11 : Suivi du cycle cellulaire après blocage à l'hydroxy-urée dans deux souches de *S. pombe* WT et *clp1Δ*.

Q 22 : Après avoir analysé les résultats de la figure 11, proposez une explication aux fréquences de perte de chromosomes observées pour les mutants *clp1Δ* et *clp1C286S* (figure 10 B).

Interactions protéiques entre Ark1p et Clp1p : Au niveau des kinétochores, plusieurs complexes sont susceptibles d'interagir avec Clp1, notamment le complexe contenant la protéine Aurora de levure, appelée Ark1p. Afin de vérifier si Clp1 et Ark1p interagissent ensemble en mitose, plusieurs expériences d'immunoprécipitation sont réalisées.

Figure 12 : L'immunoprécipitation consiste à mettre en solution un lysat cellulaire et des billes recouvertes d'anticorps. Dans le cas présent, l'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-GFP. Cet anticorps reconnaît spécifiquement une séquence peptidique correspondant à la protéine GFP. Les immunoprécipitations sont réalisées dans des conditions « douces », qui préservent les interactions protéiques. Après réaction, la solution est centrifugée. Un Western Blot est réalisé avec le culot.

Cette expérience a été réalisée avec des souches de levures transfectées, c'est-à-dire qu'une construction génétique a été insérée dans le génome cellulaire. Ces levures génétiquement modifiées expriment alors une protéine dite exogène, issue de la transcription puis la traduction de

cette construction. Il est possible de transférer une ou plusieurs constructions génétiques. Voici la présentation des constructions génétiques utilisées dans cette expérience :

- ark1-GFP : l'ADNc codant la protéine Ark1p est fusionné avec la séquence codant la protéine GFP.
- clp1-myc : l'ADNc codant la protéine Clp1p est fusionné avec une séquence myc.
- clp1C286S-myc : l'ADNc codant la protéine Clp1C286S est fusionné avec une séquence myc.

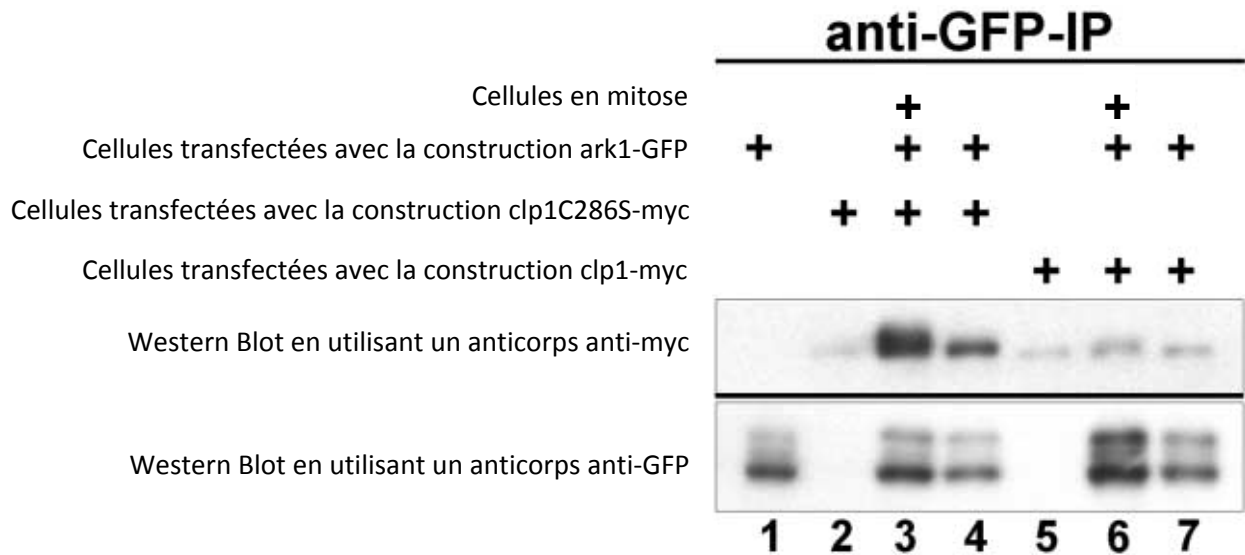


Figure 12 : Expériences d'immunoprécipitations entre Clp1p et Ark1p

Q 23 : Analyser les résultats présentés figure 12.

Q 24 : En quoi ces résultats apportent un nouvel éclairage sur l'action de la protéine Clp1C286S en mitose.

Q 25 : Pensez-vous que la protéine Ark1p puisse être un substrat de la protéine Clp1p ? Quelle expérience nous permettrait de tester cette hypothèse ?

Interactions protéiques entre Dis1p et Clp1p : La protéine Dis1p est une protéine capable de lier les microtubules et qui est localisée sur les kinétochores en métaphase. Les mutants *dis1* ont perdu la faculté d'aligner les chromosomes sur une plaque métaphasique. A la place, on retrouve de nombreux chromosomes en « attachement monopolaire ». La séparation des deux cellules filles se produit donc de manière désordonnée et la plupart des chromatides sœurs ne sont pas séparées, on parle de coségrégation des chromatides. Les mutants *dis1* sont des mutants thermosensibles. A une température permissive, la protéine mutante est fonctionnelle, ce qui permet de propager la mutation. A l'inverse, lorsque l'on se place à une température restrictive, cette protéine perd sa fonction.

Des doubles mutants *dis1* et *clp1Δ* ont été réalisés. Leur croissance est analysée à différentes température : 30°C qui est la température permissive du mutant *dis*, 25°C qui est la température semi-permissive et 19°C qui est la température restrictive. La thermosensibilité du mutant *dis1* est conservée dans les doubles mutants.

Q 26 : Expliquer la méthode d'obtention des doubles mutants *dis1* et *clp1Δ*.

Figure 13 : (En A) La croissance des différents mutants est présentée pour les températures 30°C et 25°C. A 19°C, aucune souche portant la mutation *dis1* ne s'est développée. Par la suite, c'est au niveau cellulaire que les souches mutantes ont été analysées. (En B) un marquage global de l'ADN permet de repérer les cellules présentant un seul noyau (à gauche), les cellules présentant une répartition égale de l'ADN dans ses deux noyaux (au centre) et des cellules présentant deux noyaux de taille différentes (à droite).

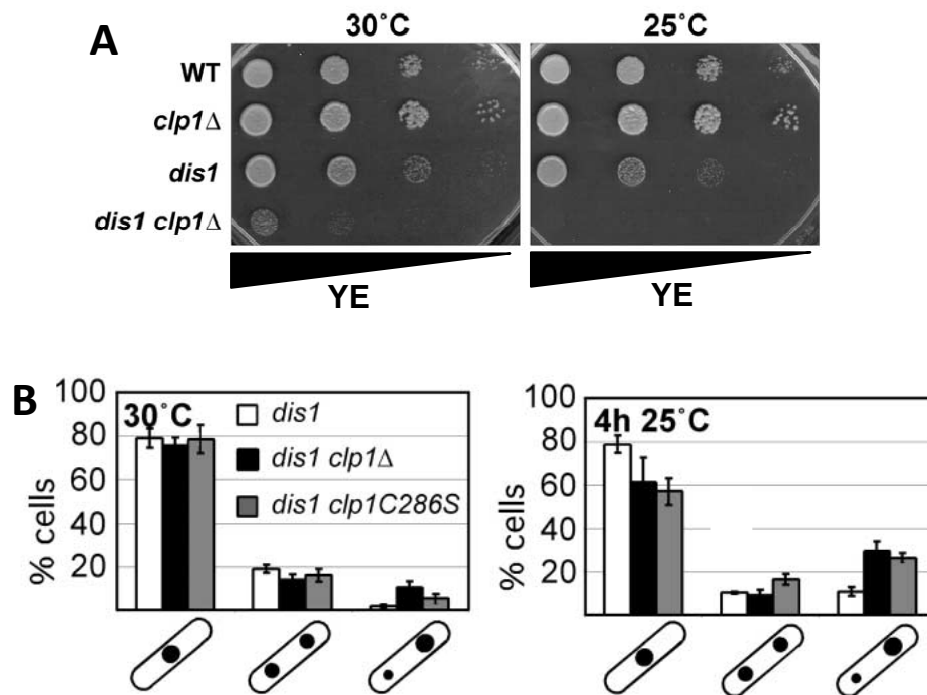


Figure 13 : Etude du cycle cellulaire chez les doubles mutants *dis1* et *clp1Δ*

Q 27 : D'après les données de la figure 13 A, peut-on considérer le mutant *clp1Δ* comme un mutant thermosensible ?

Q 28 : A l'aide des données issues de la figure 13 A, que pouvez vous dire des relations entre les protéines Dis1p et Clp1p au cours de la mitose ?

Q 29 : En reprenant les éléments de la figure 9, identifiez la voie dans laquelle les protéines Dis1p et Clp1p sont impliquées.

La famille des protéines Aurora : La figure 14 présente l'arbre phylogénétique des protéines Aurora chez l'homme et chez les principaux organismes modèles en biologie moléculaire. Cet arbre a été réalisé à partir de l'alignement de séquence de 18 protéines de la famille des Aurora. La longueur des branches de l'arbre entre deux séquences correspond au nombre de substitution observées entre les deux séquences (l'échelle utilisée est : 1cm correspond à 0,1 acide aminé substitué). Chez la levure *S pombe*, une seule représentante de cette famille Ark1p a été mise en évidence. Chez l'homme il existe trois protéines Aurora, toutes impliquées dans la division cellulaire.

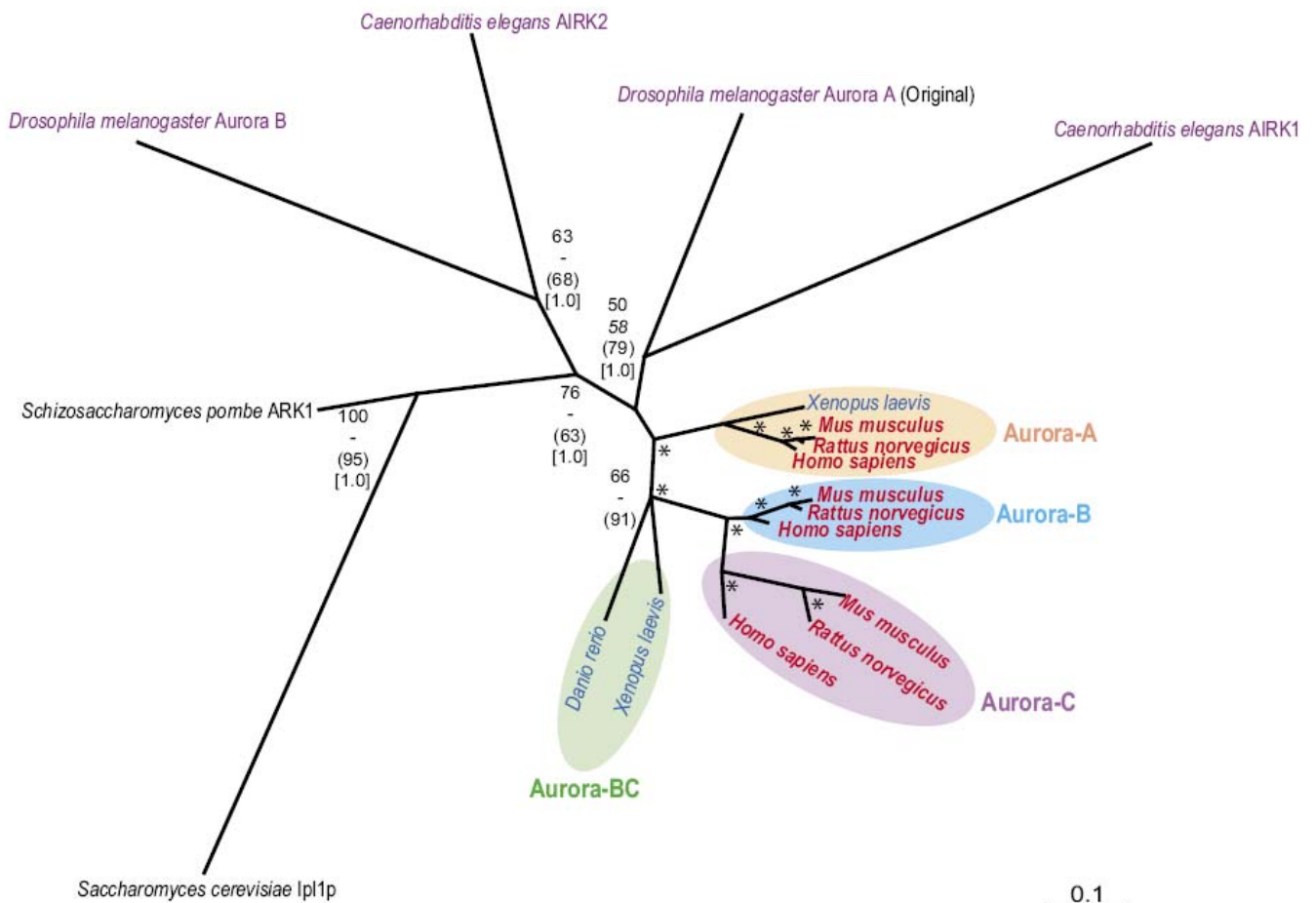


Figure 14 : Arbre phylogénétique de la famille des protéines Aurora

Q 30 : Comparez les informations que vous avez récoltées sur les protéines Aurora B et Ark1p et discutez de la conservation de cette famille de protéines au cours de l'évolution.