

SESSION 2014

SECOND CONCOURS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

BIOLOGIE – BIOCHIMIE

Durée : 4 heures

L'usage de calculatrices électroniques de poche, à alimentation autonome, non imprimante et sans document d'accompagnement, est autorisé.

Consignes générales :

Le sujet est composé de quatre parties et de 16 pages au total.

Les réponses doivent être argumentées. Une présentation sous forme de schéma ou de tableau est bienvenue si elle améliore la clarté de l'analyse.

Pour la partie 1, des réponses courtes sont attendues.

Les parties 1, 3 et 4 comportent des questions pouvant être traitées indépendamment.

Le barème appliqué sera le suivant (160 points au total) :

Partie 1 : 10 points ; Partie 2 : 50 points ; Partie 3 : 50 points ; Partie 4 : 50 points.

Partie 1 – Questionnaire d'introduction (réponses courtes ; durée conseillée : 15 minutes)

Q1-1. Citez au moins 4 différences entre l'organisation du génome eucaryote et celle du génome procaryote.

Q1-2. Donnez une définition du terme « épigénétique ».

Q1-3. Indiquez la localisation subcellulaire de la transcription et la traduction chez les Eucaryotes et les Procaryotes.

Q1-4. Donnez 3 critères faisant de la mouche *Drosophila melanogaster* et de la souris *Mus musculus* de bons organismes modèles en biologie.

Q1-5. En quoi diffère la sensibilité à la lumière entre les cônes et les bâtonnets dans la rétine humaine ?

Q1-6. Quel peut être l'intérêt fonctionnel de l'expression d'un unique récepteur dans une cellule sensorielle (exemples : un seul photopigment dans une cellule photoréceptrice ; un seul récepteur olfactif dans une cellule sensorielle olfactive) ?

Q1-7. Citez l'exemple d'un animal cloné à partir d'un noyau de cellule adulte et son année d'obtention.

Partie 2 - Sujet de synthèse (durée conseillée : 1h15)

La transcription et sa régulation chez les Eucaryotes.

Partie 3 – Expression monoallélique des récepteurs olfactifs chez la souris (durée conseillée : 1h15)

Les neurones sensoriels olfactifs sont localisés dans la muqueuse nasale (Figure 3-1a). Ils possèdent un dendrite apical portant des cils au contact de la cavité nasale ; la réception des molécules odorantes présentes dans l'environnement est réalisée par le biais de récepteurs à 7 segments transmembranaires appelés récepteurs olfactifs, concentrés dans les cils. La famille des récepteurs olfactifs appartient à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et comporte plus de mille gènes chez la souris. Les axones des neurones sensoriels olfactifs sortent de l'épithélium olfactif et viennent former des synapses dans la périphérie des bulbes olfactifs dans le système nerveux central. Chaque neurone sensoriel olfactif n'exprime qu'un seul gène de récepteur olfactif parmi le millier de gènes de récepteurs olfactifs présents dans le génome de la souris et le choix du récepteur exprimé se fait de manière aléatoire donnant un aspect mosaïque à cet épithélium. Les mécanismes de cette expression mono-génique des récepteurs olfactifs dans l'épithélium olfactif ne sont pas à ce jour totalement élucidés.

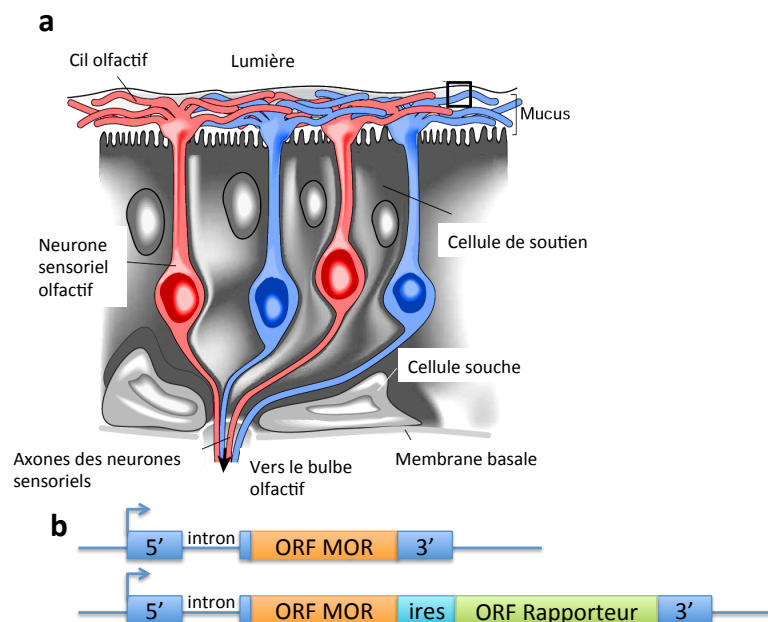


Figure 3-1 : (a) Schématisation de l'organisation de l'épithélium olfactif. (b) Organisation d'un gène de récepteur olfactif de souris (MOR) sauvage (en haut) ou dans les souris génétiquement modifiées (en bas). ORF = phase ouverte de lecture ; 5' = région 5' non traduite ; 3' = région 3' non traduite ; ires = site d'entrée interne des ribosomes.

Caractérisation de l'expression des récepteurs olfactifs dans les neurones sensoriels olfactifs

Pour étudier l'expression des récepteurs olfactifs, on utilise des souris génétiquement modifiées par recombinaison homologe (knock-in ; voir Figure 3-1b) dans lesquelles on a placé à la suite de la séquence codante d'un récepteur olfactif, une cassette constituée d'une séquence « ires » (site d'entrée interne des ribosomes) suivie soit de LacZ, soit de GFP (LacZ est le gène de la beta-galactosidase ; GFP le gène de la protéine fluorescente verte). La présence de beta-galactosidase peut être révélée soit par son activité enzymatique (produit bleu en présence de XGal), soit à l'aide d'un anticorps spécifique. La GFP est suivie par sa fluorescence naturelle (ou à l'aide d'un anticorps

spécifique). La séquence « ires » permet le recrutement de ribosomes et donc l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe située en 5' de l'ARN messager.

Q3-1. Représentez sous forme de schéma la structure de l'ARN messager issu de l'expression d'un gène modifié MOR-ires-GFP. Indiquez notamment les séquences codantes et les sites de recrutement des ribosomes. Quelles sont les protéines obtenues à l'issue de la traduction ? Quelle différence y a-t-il entre cette construction et celle permettant l'expression d'une protéine de fusion entre le MOR et la GFP ?

Pour obtenir les résultats de la figure 3-2, on a utilisé des souris transgéniques où les cassettes précédemment décrites sont insérées à la suite des gènes MOR37A, MOR37B et MOR37C, 3 gènes de récepteurs olfactifs organisés en tandem sur le même chromosome. De même, la cassette a été placée à la suite de la séquence codante du gène OMP (Olfactory Marker Protein), un gène qui est exprimé spécifiquement dans les neurones sensoriels olfactifs. On génère ensuite par croisement des souris doublement transgéniques, exprimant deux rapporteurs différents (Figure 3-2).

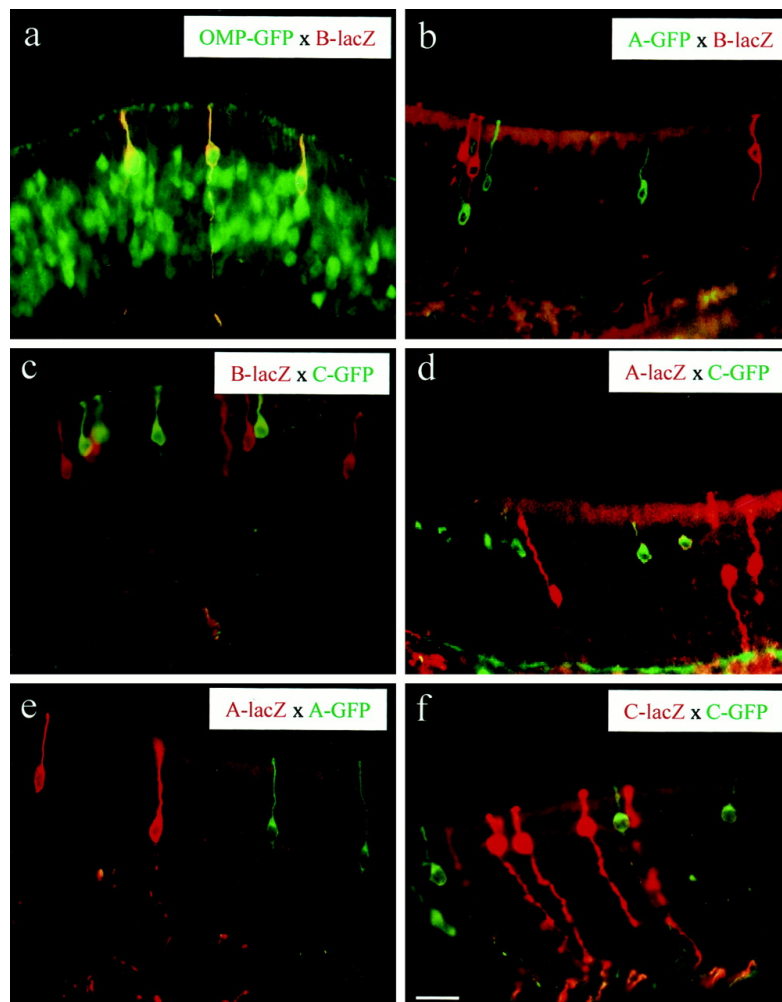


Figure 3-2 : Immuno-marquage révélant la localisation de la GFP (en vert) et de la bêta-galactosidase (en rouge) sur des coupes d'épithélium olfactif de souris doublement transgéniques. a) souris OMP-ires-GFP et MOR37B-ires-LacZ. b) souris MOR37A-ires-GFP et MOR37B-ires-LacZ. c) souris MOR37B-ires-LacZ et MOR37C-ires-GFP. d) souris MOR37A-ires-LacZ et MOR37C-ires-GFP. e) souris MOR37A-ires-LacZ et MOR37A-ires-GFP. f) souris MOR37C-ires-LacZ et MOR37C-ires-GFP. Barre d'échelle = 20 μ m. La lumière (cavité nasale) est en haut des clichés, la base de l'épithélium est en bas des clichés.

Q3-2. Qu'observez vous sur les images de la figure 3-2b, c et d ? Que prouve l'observation d'un signal jaune en figure 3-2a ? Comment peut-on interpréter ces observations en termes d'expression de 2 récepteurs olfactifs ?

Au sein de cette expérience, les auteurs réalisent des croisements pour obtenir des souris dont les 2 allèles d'un même gène (soit MOR37A, soit MOR37C) sont modifiés mais chaque allèle avec un rapporteur différent (Figure 3-2 e et f).

Q3-3. Quelle information supplémentaire apporte ces images e et f ?

Pour essayer de comprendre les mécanismes permettant d'obtenir ce patron d'expression des récepteurs olfactifs, plusieurs séries d'expériences ont été menées.

Clonage de souris à partir de neurones sensoriels olfactifs

Deux équipes concurrentes ont cloné des souris par transfert de noyaux de neurones sensoriels olfactifs dans des cellules embryonnaires. Dans l'expérience présentée, ce sont des noyaux de cellules P2-ires-GFP, donc exprimant le récepteur P2, qui ont été sélectionnés grâce à la fluorescence de la GFP. Les souris obtenues par cette technique sont viables et fertiles. Le patron d'expression (hybridation *in situ*) des gènes de récepteurs olfactifs observé dans les souris clonées à partir d'un neurone sensoriel olfactif exprimant P2 est présenté en parallèle de l'expression de ces mêmes récepteurs dans des souris sauvages dans la figure 3-3.

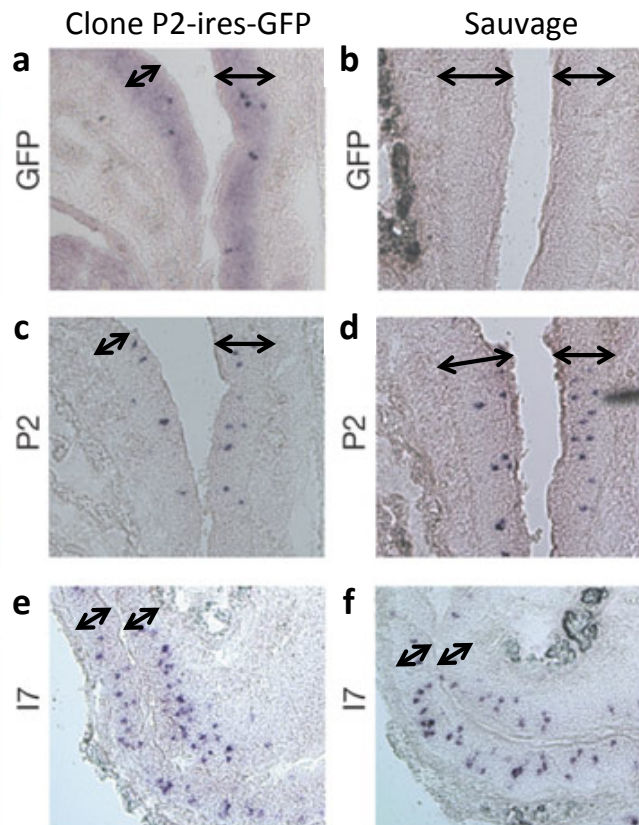


Figure 3-3 : Hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques des ARNm de la GFP (a, b) ou des récepteurs olfactifs P2 (c, d) et I7 (e, f) sur des coupes d'épithélium olfactif de souris sauvage ou de souris clonée à partir d'un neurone sensoriel olfactif exprimant P2 (P2-ires-GFP). L'hybridation est révélée par utilisation d'un substrat chromogène donnant un produit violet foncé. Les doubles flèches indiquent l'épaisseur de l'épithélium olfactif.

Q3-4. Quel est le patron d'expression des récepteurs P2 et I7 chez la souris sauvage ? chez la souris clonée ? Que peut-on en déduire quant à la réversibilité ou à l'irréversibilité du choix de l'expression d'un gène de récepteur olfactif ?

Recherche de séquences activatrices en cis et en trans

D'autres auteurs recherchent de potentielles régions régulatrices en amont de la région comprenant les gènes des récepteurs olfactifs MOR28, MOR10, MOR83 et MOR29 placés en tandem, sur le chromosome 14. Pour cela, ils construisent une série de souris transgéniques avec des YAC (chromosomes artificiels de levure) portant de larges régions d'ADN génomique comprenant les gènes MOR ainsi que des régions environnantes. L'expression de MOR28 à partir de ces YAC est suivie grâce à une cassette ires-LacZ placée en aval de MOR28.

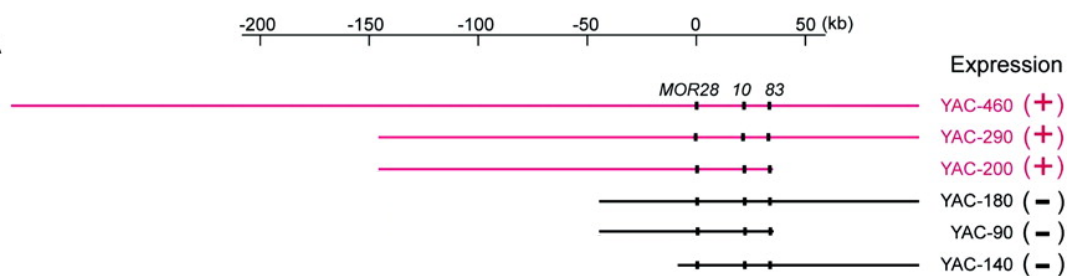


Figure 3-4 : Expression de MOR28 à partir d'un YAC. Comparaison de la structure de 7 constructions et expression (+) ou non (-) du transgène MOR28-ires-LacZ.

Q3-5. D'après la figure 3-4, quelle est la région nécessaire à l'expression de MOR28 à partir d'un chromosome artificiel ?

La région identifiée en Q3-5 est comparée à la région homologue chez l'Homme (analyse de pourcentage d'identité). On détecte alors la présence d'une sous-région de 2 kb très conservée entre l'Homme et la souris, qui est appelée élément H (Homologie). Le pourcentage de similarité est aussi important pour l'élément H que pour les séquences codantes des récepteurs olfactifs alors que le reste des régions intergéniques présente une similarité toujours inférieure à 50%.

Q3-6. Quelle hypothèse peut-on faire concernant le rôle de l'élément H ?

Pour vérifier l'importance des régions identifiées précédemment dans l'expression des récepteurs situés en aval, sont utilisés des YAC dérivés de YAC-290 (voir figure 3-4) où des cassettes différentes sont placées derrière MOR28, MOR10, MOR83 et/ou MOR29 (Figure 3-5). La région H a été déléetée dans la version YAC-290dH. WGA est un rapporteur dont la présence est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques.

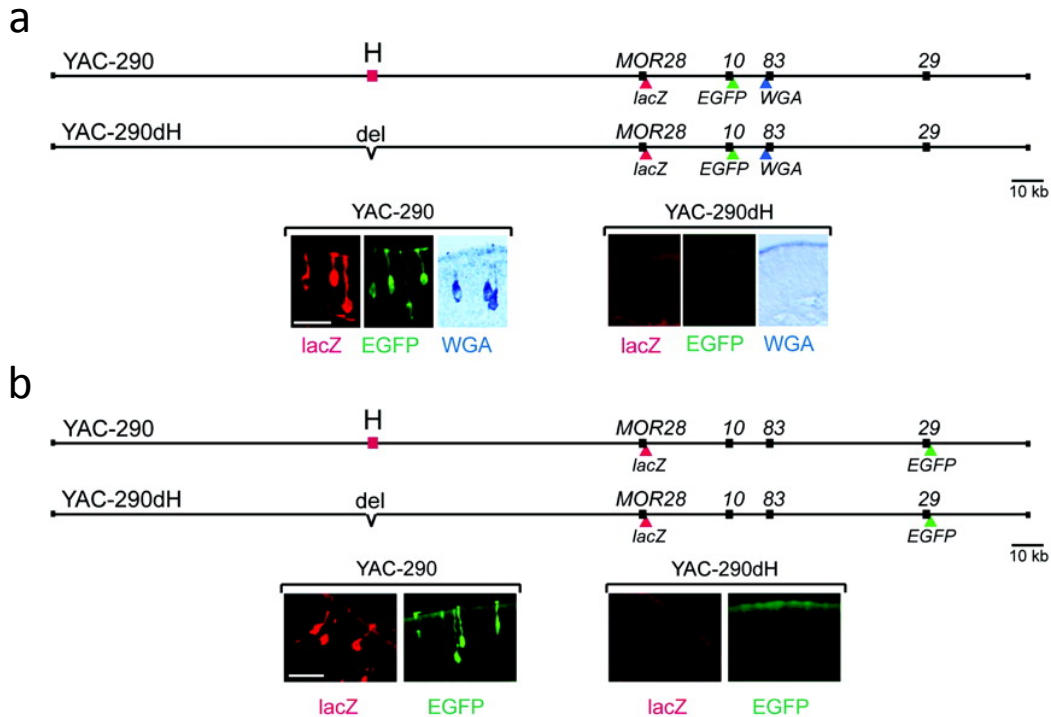


Figure 3-5 : Expression de rapporteurs placés derrière les récepteurs olfactifs de la région du gène MOR28 en présence (YAC-290) ou en absence (YAC-290dH) de l'élément H. En a), suivi de l'expression de MOR28-ires-LacZ, MOR10-ires-GFP et MOR83-ires-WGA à partir du YAC-290 (voir aussi figure 3-3) ou du YAC-290dH ; en b), suivi de l'expression de MOR28-ires-LacZ et MOR29-ires-GFP à partir des mêmes YAC.

Q3-7. Qu'observez-vous en figure 3-5 ? Que peut-on en conclure sur le rôle de l'élément H ?

Les auteurs ajoutent ensuite la région H au YAC-140 pour suivre l'expression des 4 récepteurs olfactifs étudiés suivis de 4 cassettes différentes. DsRed est une protéine fluorescente rouge détectée par sa fluorescence naturelle.

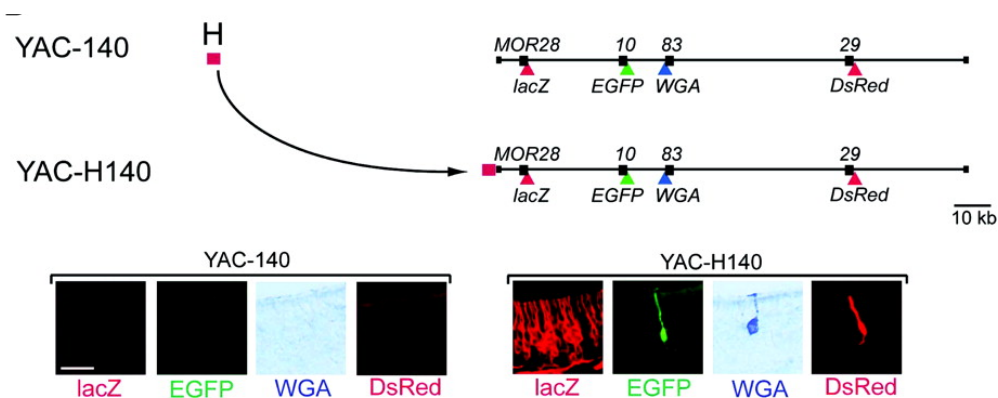


Figure 3-6 : Expression de rapporteurs placés derrière les récepteurs olfactifs de la région du gène MOR28 en absence (YAC-140) ou en présence (YAC-H140) de l'élément H. Suivi de l'expression de MOR28-ires-LacZ, MOR10-ires-GFP, MOR83-ires-WGA et MOR29-ires-DsRed.

Q3-8. Quelle information supplémentaire apporte l'expérience présentée en Figure 3-6 ? Concluez sur le rôle de l'élément H.

Une autre équipe poursuit la caractérisation de l'élément H en regardant les effets de l'élément H en dehors de la région du gène MOR28 précédemment étudiée, c'est-à-dire sur d'autres chromosomes que le chromosome 14. Pour visualiser une éventuelle association de l'élément H aux gènes de récepteurs olfactifs, les auteurs réalisent des hybridations *in situ* fluorescentes (FISH) sur des noyaux de neurones sensoriels olfactifs permettant la localisation de H et celle des gènes des récepteurs olfactifs M50 (chromosome 7) ou MOR23 (chromosome 1) avec des sondes dirigées contre les séquences ADN ou ARN étudiées. On rappelle que le gène OMP (Olfactory Marker Protein) est exprimé dans tous les neurones sensoriels olfactifs.

Q3-9. Dans quels noyaux trouvera-t-on les ARN M50 et MOR23 ? les ADN M50 et MOR23 ? Combien de sites d'hybridation attend-on par noyau pour les ARN ? pour les ADN ?

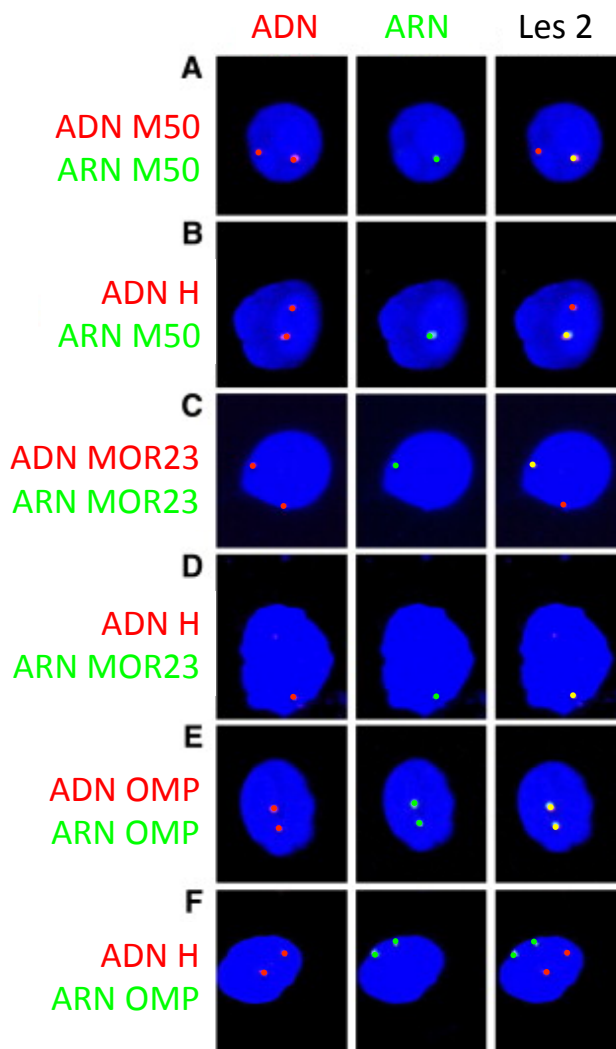


Figure 3-7 : Localisation par hybridation *in situ* fluorescente des ADN (en rouge) et ARN (en vert) de récepteurs olfactifs, d'OMP et de l'élément H dans les noyaux (marqués en bleu) de cellules exprimant M50 (A,B), MOR23 (C,D) ou OMP (E,F). Rappel : tous les neurones sensoriels olfactifs expriment OMP de manière ubiquitaire. Une superposition des images obtenues dans les canaux rouge et vert est présentée dans la colonne de droite.

Q3-10. Qu'observez-vous en figure 3-7 A, C et E ? Cela est-il compatible avec les résultats discutés en Q3-3 ?

Q3-11. Quelle information est apportée par les figures 3-7 B,D,F concernant la localisation de l'élément H ? Les résultats présentés démontrent-ils l'hypothèse où l'élément H pourrait agir en trans, c'est-à-dire sur d'autres chromosomes ?

Pour vérifier l'implication de l'élément H dans l'expression des récepteurs olfactifs, une troisième équipe a créé des souris transgéniques où les 2 copies de l'élément H ont été délétées (Δ/Δ). Les souris obtenues présentent un développement normal et se portent bien. Ils ont regardé l'expression de différents gènes de récepteurs olfactifs par hybridation *in situ* dans l'épithélium olfactif (Figure 3-8).

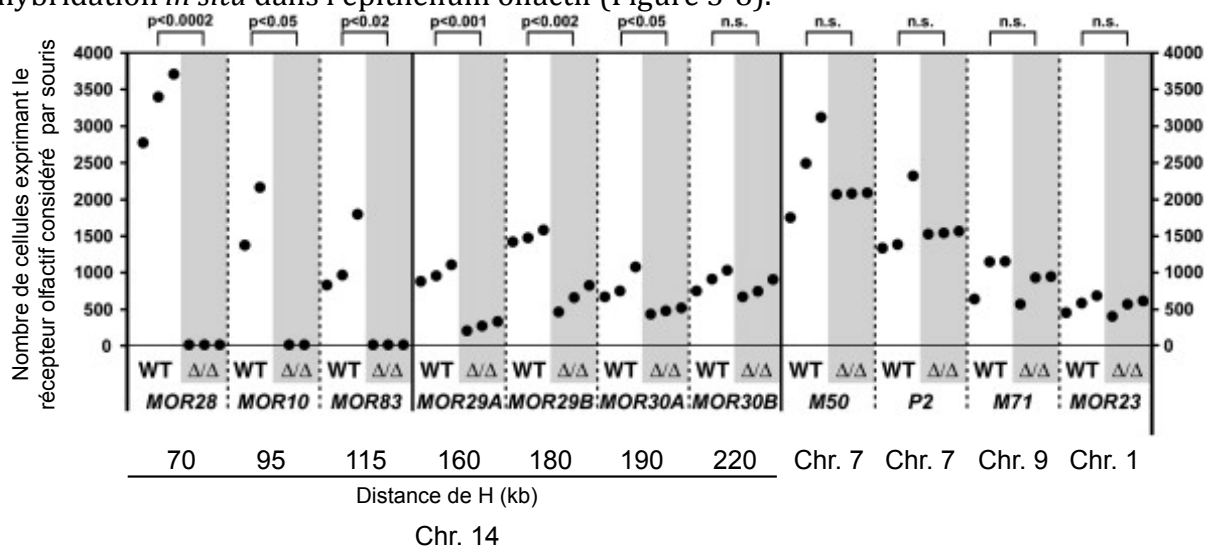


Figure 3-8 : Nombre de cellules exprimant le récepteur olfactif considéré dans des souris sauvage (WT) ou des souris présentant une délétion des éléments H (Δ/Δ) en fonction du récepteur (MOR28, MOR10, MOR83, MOR29A, MOR29B, MOR30A, MOR30B, M50, P2, M71, MOR23). Le chromosome et la distance par rapport à l'élément H le cas échéant sont indiqués pour chaque récepteur olfactif. Les p<... indiquent des résultats significativement différents entre les 2 génotypes alors que n.s. indique des différences non significatives.

Q3-12. Quel est l'effet de la délétion de l'élément H sur l'expression des gènes MOR28, MOR10, MOR83 ? On pourra comparer ces résultats à ceux obtenus avec les YAC.

Q3-13. Quel est l'effet de la délétion de l'élément H sur l'expression des gènes MOR29A, MOR29B, MOR30A et MOR30B ? Que peut-on remarquer concernant la distance entre H et les gènes de récepteurs olfactifs et l'expression de ces gènes ? On pourra comparer ces résultats à ceux obtenus avec les YAC.

Q3-14. Quel est l'effet de la délétion de l'élément H sur l'expression des gènes de récepteurs situés sur d'autres chromosomes ? Concluez sur le rôle de l'élément H dans l'expression des gènes de récepteurs olfactifs.

Une régulation épigénétique ?

Enfin, il a été démontré sur des extraits d'épithélium olfactif que les histones portent des modifications particulières dans les régions de gènes de récepteurs olfactifs : H3K9m3 et H4K20m3 (méthylations sur des lysines des histones H3 et H4). Ces modifications sont spécifiques de l'hétérochromatine constitutive, habituellement caractéristique des centromères et télomères.

Dans des neurones sensoriels olfactifs exprimant P2-ires-GFP (isolés par repérage de leur fluorescence), on observe en revanche une absence de la modification H4K20me3 et une présence de la modification H3K4me3 au niveau du locus P2.

Q3-15. Proposez une hypothèse pour expliquer le rôle de ces modifications des histones.

Partie 4 – Choix de l'expression des photopigments dans les photorécepteurs chez la drosophile (durée conseillée : 1h15)

Chez la *Drosophile*, l'œil est composé d'ommatidies qui regroupent une vingtaine de cellules dont 8 cellules photoréceptrices. Ces photorécepteurs (PR) sont organisés de manière stéréotypée avec 6 photorécepteurs externes (PRe, numérotés R1 à R6) et 2 photorécepteurs internes (PRi, numérotés R7 et R8, R7 se situant au-dessus de R8). Alors que les PRe expriment tous le même photopigment, Rh1, qui a une sensibilité large dans les longueurs d'onde bleu-vert, les PRi peuvent exprimer de manière exclusive 4 photopigments différents : Rh3, Rh4, Rh5 et Rh6. Dans les ommatidies pâles, R7 exprime Rh3, qui est sensible aux UV, alors que R8 exprime Rh5, sensible au bleu. Dans les ommatidies jaunes, R7 exprime Rh4, sensible aux UV lointains, alors que R8 exprime Rh6, sensible au vert (Figure 4-1A). On cherche à comprendre quelles sont les voies de signalisation qui permettent cette expression exclusive d'un photopigment dans les photorécepteurs. **Dans la suite de l'exercice, on ne tiendra pas compte de la région dorsale délimitée par des pointillés en figure 4-1B ou en rose dans la figure 4-2a,b.**

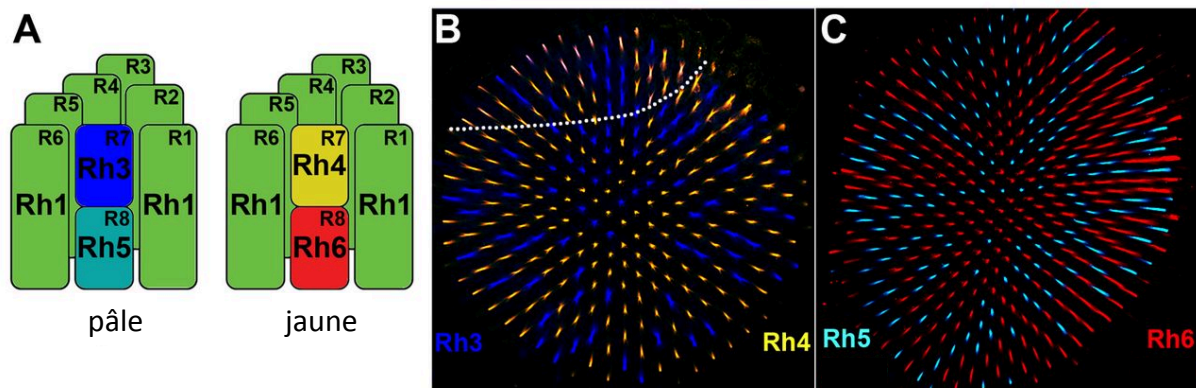


Figure 4-1 : A. Organisation des photorécepteurs et pigments exprimés dans une ommatidie pâle (à gauche) ou jaune (à droite). **B.** Une immuno-révélation sur une coupe d'œil au niveau des photorécepteurs R7 montre l'expression des pigments Rh3 (en bleu) et Rh4 (en jaune). **C.** Une immuno-révélation sur une coupe d'œil au niveau des photorécepteurs R8 montre l'expression des pigments Rh5 (en turquoise) et Rh6 (en rouge). (en haut = dorsal ; en bas = ventral). NB : les yeux observés en B et C proviennent de 2 mouches différentes mais le même patron serait observé en comparant les 2 yeux d'une même mouche. **On ne tiendra pas compte de la région dorsale délimitée par des pointillés en figure 4-1B.**

Q4-1. D'après la figure 4-1B et 4-1C, quel est le pourcentage d'ommatidies pâles et d'ommatidies jaunes dans l'œil composé de la *Drosophile* ? Explicitez votre calcul. Selon quel principe ces 2 types d'ommatidies sont-ils répartis dans l'œil ?

Pour élucider les mécanismes permettant de mettre en place un tel patron d'expression, les chercheurs décident d'étudier le rôle du gène *spineless* (*ss*) car un mutant nul de ce gène présente des traits phénotypiques communs avec un mutant d'un gène déjà connu pour être impliqué dans la spécification des ommatidies. Ils créent des mutants (perte de fonction), où le gène *ss* n'est muté que dans les disques imaginaires des yeux.

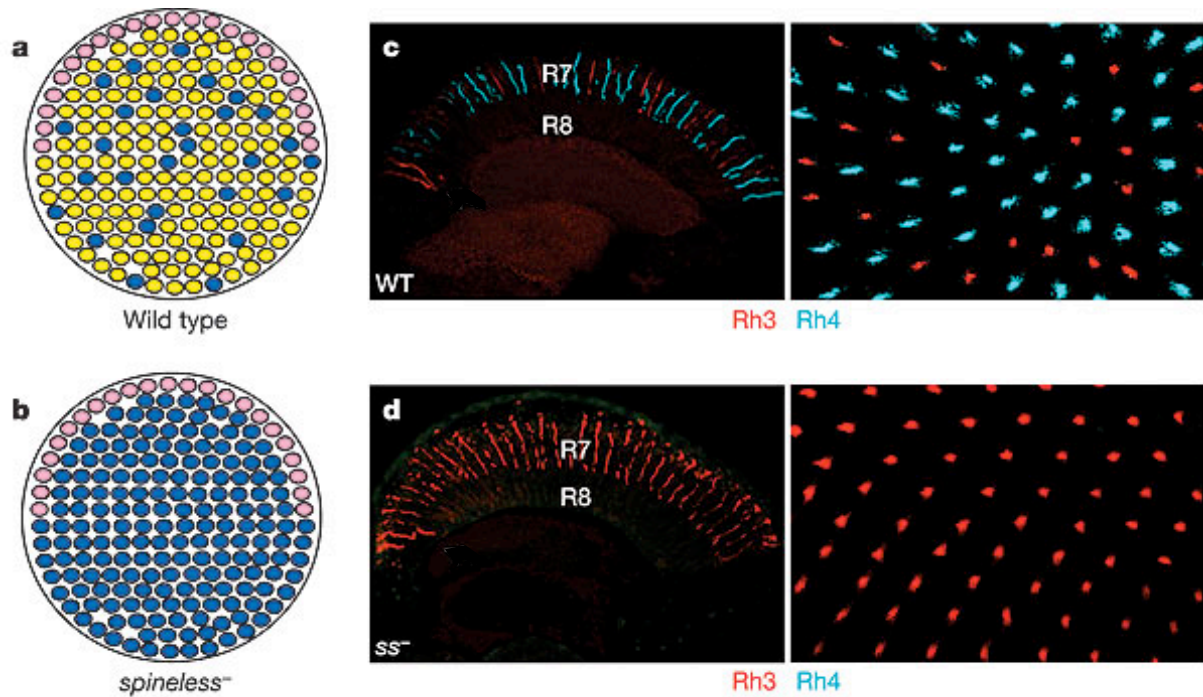


Figure 4-2 : Phénotype des yeux de mutants perte de fonction *spineless* (*ss-*) par rapport aux sauvages (WT=wild type). (a,b) Schématisation des phénotypes : les ommatidies pâles sont représentées en bleu et les ommatidies jaunes en jaune. (c,d) Immuno-révélation sur des coupes transversales d'œil (panneau de gauche ; à gauche = dorsal) ou des rétines entières (panneau de droite ; en haut = dorsal) montrant l'expression des pigments Rh3 (en rouge) et Rh4 (en turquoise). **On ne tiendra pas compte de la région dorsale représentée en rose dans la figure 4-2a,b**

Q4-2. Décrivez le phénotype du mutant perte de fonction *spineless*. Proposez au moins une hypothèse concernant les ommatidies présentes chez ce mutant.

Les auteurs précisent que le nombre et la morphologie des ommatidies sont inchangés chez les mutants *ss-*. Par ailleurs, chez les mutants, une large majorité des photorécepteurs R8 expriment Rh5 (Figure 4-3c).

Q4-3. Que peut-on conclure de cette expérience de mutation perte de fonction sur le rôle du gène *spineless* concernant la formation des ommatidies ?

Les chercheurs disposent d'un autre mutant perte de fonction affectant le gène *sevenless* (*sev*). Dans ce mutant *sev-*, les photorécepteurs R7 sont absents des ommatidies (Figure 4-3b).

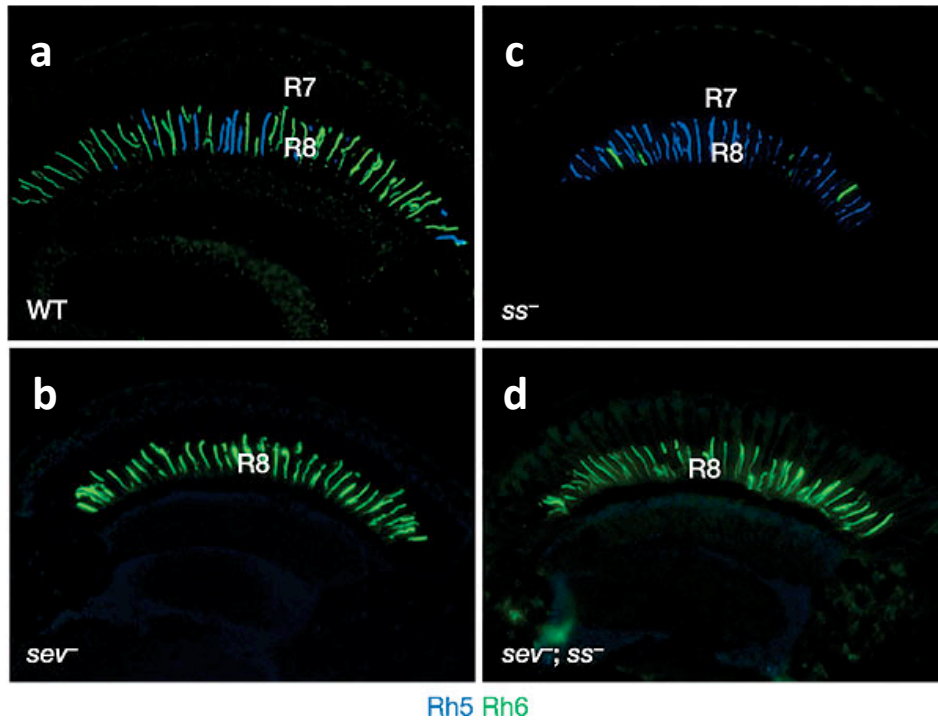


Figure 4-3 : Phénotype des yeux de mutants perte de fonction *sevenless* (*sev-*) et/ou *spineless* (*ss-*) par rapport aux sauvages (WT) par immuno-révélation sur des coupes transversales d'œil (à gauche = dorsal) montrant l'expression des pigments Rh5 (en bleu) et Rh6 (en vert).

Q4-4. Quel est le phénotype des mutants *sev-*, concernant l'expression de pigments dans les photorécepteurs R8 ? Quelle hypothèse peut-on formuler quant à l'échange d'information entre les R7 et les R8 pour le choix du photopigment exprimé dans les R8.

Les mutants *sev-* et *ss-* sont croisés pour obtenir des doubles mutants *sev-; ss-* (Figure 4-3d).

Q4-5. Quel est le phénotype des doubles mutants *sev-; ss-* ? Que peut-on en conclure quant au choix d'expression des pigments Rh5 et Rh6 dans les R8 des mutants *ss-* ? Conclure sur le photorécepteur (R7 ou R8) dans lequel *spineless* joue son rôle.

On réalise ensuite une surexpression ectopique de *ss* dans la majorité des photorécepteurs (R7 et R8) en utilisant un promoteur spécifique *sGMR*. Dans ces nouveaux mutants appelés *sGMR>ss*, la morphologie des yeux paraît normale. On réalise également le croisement de ce mutant avec le mutant *sev-*.

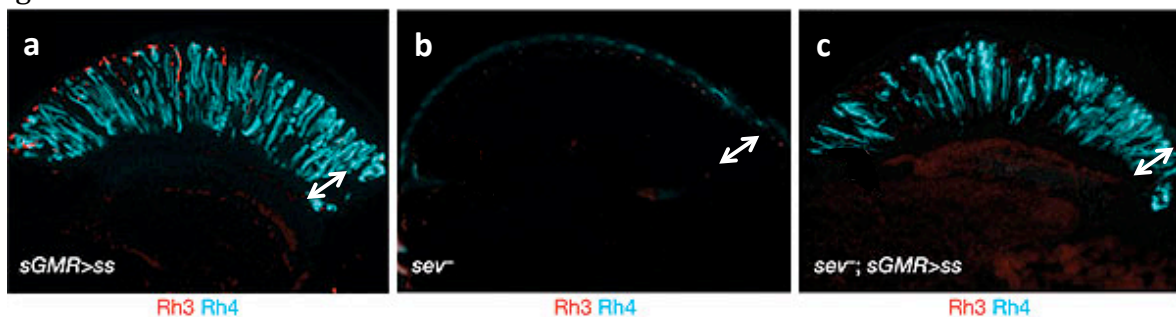


Figure 4-4 : Phénotype des yeux de mutants perte de fonction *sevenless* (*sev-*) et/ou expression ectopique de *spineless* (*sGMR>ss*) par immuno-révélation sur des coupes transversales d'œil (à gauche = dorsal) montrant l'expression des pigments Rh3 (en rouge) et Rh4 (en turquoise). L'épaisseur de la couche des R8 est indiquée par une double flèche.

Q4-6. Quelle est l'image à utiliser en contrôle de la figure 4-4 ?

Q4-7. D'après la figure 4-4a, quel est le phénotype d'expression de pigments dans les R7 chez les mutants *sGMR>ss* ? dans les R8 ? Comment peut-on interpréter ce résultat ?

Q4-8. Qu'apportent les résultats obtenus pour les mutants *sev-* en figure 4-4b ? D'après la figure 4-4c, quel est le phénotype d'expression de pigments dans les R8 chez les doubles mutants *sev-; sGMR>ss* ? Ceci confirme-t-il l'interprétation donnée en question 4-7 ?

Les auteurs font aussi l'observation que dans les R7 exprimant Rh4, ils n'observent jamais en même temps l'expression de Rh3.

Q4-9. Dessinez le schéma correspondant à la figure 4-2a,b dans le cas de l'expression ectopique de *spineless* dans les photorécepteurs. Concluez sur le rôle de *spineless*.

Enfin, les chercheurs utilisent un promoteur spécifique des R7 (PanR7) pour exprimer *spineless* dans tous les R7, et exclusivement dans les R7, à un stade tardif de leur différenciation. On réalise également le croisement de ces mutants avec les mutants *ss-*.

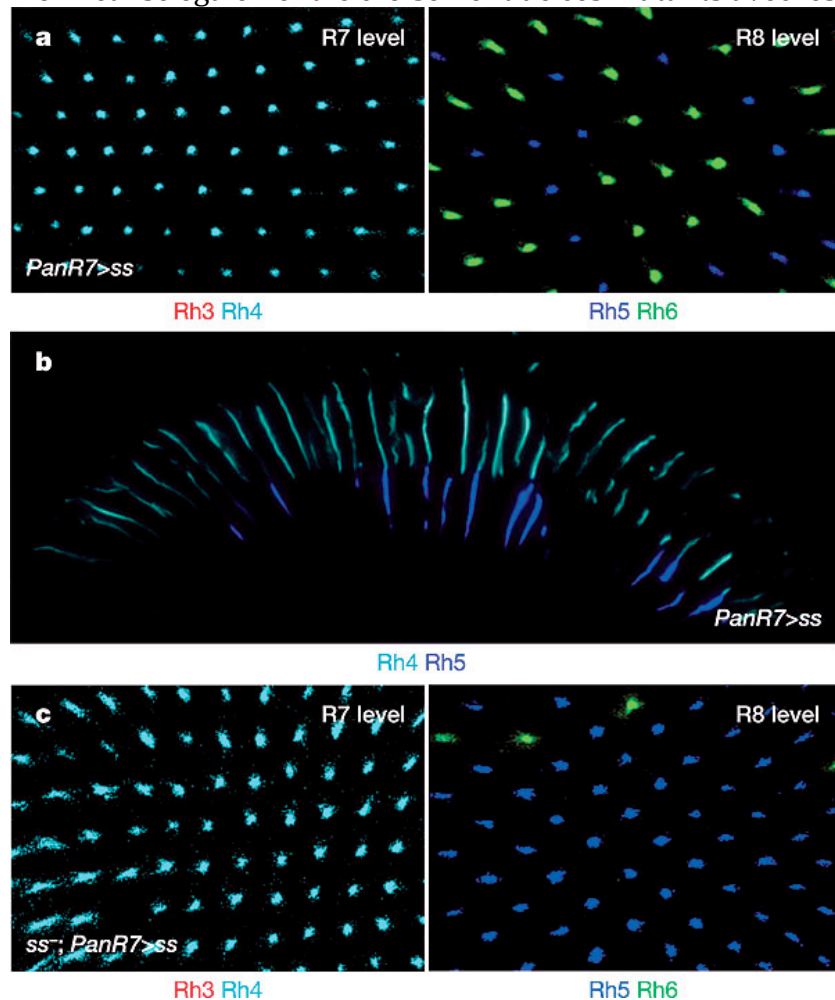


Figure 4-5 : Phénotype des yeux de mutants d'expression ectopique de *ss* dans les R7 *PanR7>ss* (a et b) et de doubles mutants d'expression ectopique et perte de fonction *ss-*; *PanR7>ss* (c). Pour a et c : Immuno-révélation sur coupes de rétine (panneau de gauche, au niveau des R7 ; panneau de droite au niveau des R8 ; en haut = dorsal) montrant l'expression des pigments Rh3 (en rouge)-Rh4 (en turquoise) ou Rh5 (en bleu)-Rh6 (en vert). Pour b : Immuno-révélation sur une coupe transversale d'œil (à gauche = dorsal) montrant l'expression des pigments Rh4 (en turquoise) et Rh5 (en bleu).

Q4-10. Quel est le phénotype des R7 dans les mutants *PanR7>ss* et *ss-; PanR7>ss* ? est-ce en accord avec le rôle précédemment démontré pour *ss* ?

Q4-11. Quel est le phénotype des R8 dans les mutants *PanR7>ss* ? et dans les doubles mutants *ss-; PanR7>ss* ? Quelle est la conséquence de l'expression tardive de *ss* dans les R7 sur le choix du pigment exprimé par les R8 ? Existe-t-il une période précise pour l'échange d'information entre les R7 et les R8 proposé en question 4-4 ?