

SESSION 2015

SECOND CONCOURS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

BIOLOGIE – BIOCHIMIE

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 22 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 3 et 4 peuvent 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.

Partie1-Questionnaire d'introduction (réponses courtes; durée conseillée: 15 minutes)

Q1-1. Citez 4 évènements principaux du cycle de division cellulaire des cellules eucaryotes.

Q1-2. Qu'est-ce qu'un point de contrôle du cycle cellulaire? Citez deux points de contrôle majeurs du cycle cellulaire et définissez leur fonction.

Q1-3. Définissez le mode d'organisation et les propriétés principales des composantes du cytosquelette.

Q1-4. Comment le cytosquelette contribue-t-il à la division cellulaire?

Q1-5. Quels évènements nucléaires accompagnent l'entrée en mitose?

Q1-6. Définissez la nature d'un kinétochore.

Q1-7. Quelle pathologie est associée à des altérations de la division cellulaire. Quelles altérations y sont fréquemment rencontrées?

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

La division cellulaire eucaryote, du développement embryonnaire aux pathologies.

Partie 3-Capture des kinétochores lors de la formation du fuseau mitotique (durée conseillée: 1h15)

A l'issue d'une division, les deux cellules filles héritent d'une copie de chaque chromosome. Cet aspect essentiel de la mitose est assuré par le fuseau mitotique. Lorsque la cellule entre en mitose, cette structure doit être assemblée. Elle est principalement constituée de polymères, les microtubules, qui émanent des centrosomes. A l'entrée en mitose les centrosomes se séparent et constituent les deux pôles du fuseau.

Les deux chromatides sœurs d'un chromosome dupliqué sont liées au niveau des centromères. Elles possèdent chacune une structure, le kinétochore, qui peut capturer des microtubules qui peuvent alors tirer dessus. Cette force permet, au moment où les chromatides se séparent en anaphase, de déplacer chaque chromatide vers le pôle auquel elle est liée. Entre l'entrée en mitose et l'anaphase, chaque kinétochore doit être capturé par un faisceau de microtubules émanant d'un pôle.

Cette série d'évènements est décrite dans la Figure 1

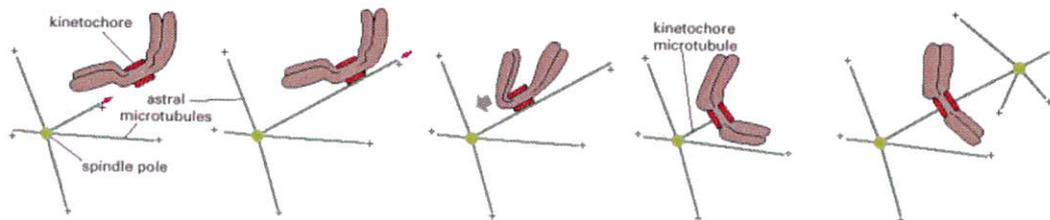


Figure 1: La capture d'une paire de kinétochores par les microtubules émanant des deux pôles du fuseau. Sur cette série de schémas qui se lit de gauche à droite, les microtubules sont représentés par des traits verts, les chromosomes en marron, les kinétochores en rouge ; les pôles ('spindle pole') sont représentés par des ronds vert clair. La petite flèche rouge au bout du microtubule qui capture le kinétochore signifie que ce microtubule est en train de s'allonger, par polymérisation. Sur le deuxième schéma la flèche est inversée, ce qui signifie que le microtubule dépolymérise ; La flèche grise indique un mouvement du kinétochore et du chromosome vers le pôle. Les bouts des microtubules au niveau des pôles sont les bouts moins, ils sont ancrés et statiques. Les bouts qui sont loin des pôles sont les bouts plus et ils sont constamment en train de s'allonger (polymérisation) puis de raccourcir (dépolymérisation). Ces microtubules qui émanent des pôles sont appelés microtubules astraux ('astral microtubule'). Une fois qu'un microtubule est attaché par son bout plus à un kinétochore, il devient un microtubule kinétochorien ('kinétochore microtubule'). La capture par un pôle est présentée dans les quatre premiers schémas, puis le second pôle est représenté uniquement dans le dernier schéma. Lorsque les deux kinétochores d'un même chromosome sont chacun reliés à un pôle opposé, on dit qu'ils sont bi-orientés, et le chromosome est prêt pour l'anaphase. Chaque chromosome doit être capturé de cette manière avant que la cellule déclenche l'anaphase (la séparation des chromatides sœurs). La structure formée par les chromosomes et les microtubules s'appelle le fuseau mitotique. Lorsque les chromosomes sont tous capturés et placés à égale distance des pôles, on dit qu'ils forment la plaque métaphasique.

Q3-1 : Décrivez succinctement, en vous aidant du schéma ci-dessus, les étapes essentielles qui permettent, en partant d'une distribution des kinétochores a priori aléatoire dans la cellule après l'entrée en mitose, de relier chaque paire de kinétochores aux deux pôles opposés du fuseau.

Q3-2 : Décrivez trois défauts possibles qui peuvent survenir lors de la capture des kinétochores et qui mèneraient à une mauvaise répartition des chromatides sœurs dans les deux cellules filles.

La description de ces étapes de l'assemblage du fuseau a été proposée au départ sur la base d'images de cellules fixées et de l'étude des effets de perturbations moléculaires. Mais pendant longtemps, il n'a pas été possible de suivre ce processus directement, dans des cellules vivantes. L'article sur lequel est basé cet exercice a présenté pour la première fois des images des kinétochores, des chromosomes, des microtubules et des pôles du fuseau (les centrosomes) suivis simultanément, tout au long de l'assemblage du fuseau et en trois dimensions. Il s'agit donc avant tout d'un article descriptif, dans lequel l'observation des images joue un rôle très important et conduit à formuler et à tester des hypothèses. Pour répondre aux questions, il faut donc que vous preniez bien le temps d'observer les images, et à partir de ces images, il vous faudra formuler un scénario plus complet que celui décrit au début de cette partie. Aidez-vous de dessins !

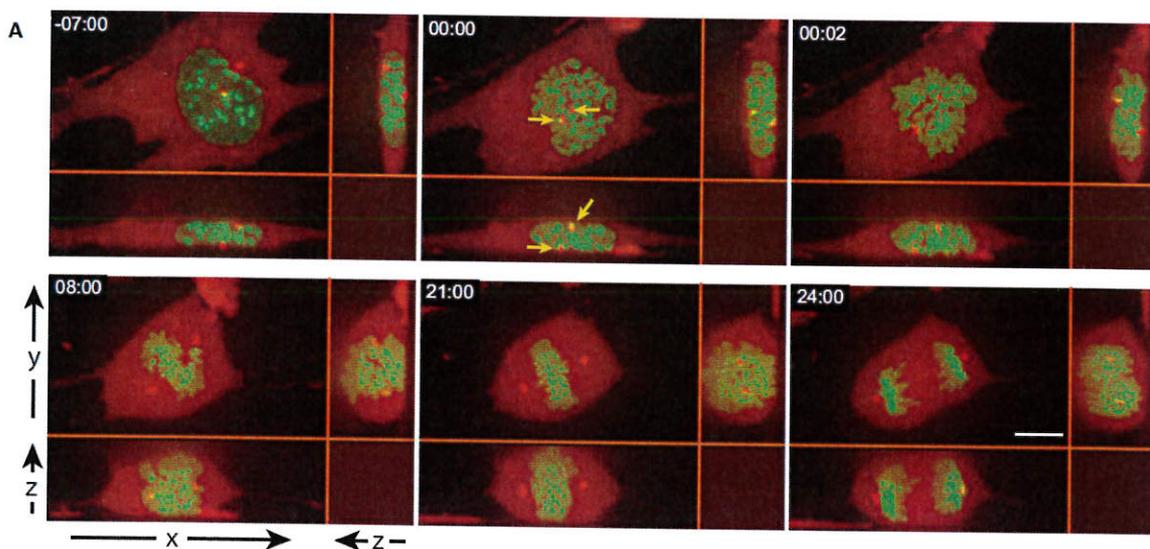


Figure 2: Images séquentielles et en trois dimensions d'une cellule humaine de type RPE1 (lignée cellulaire immortalisée, issue de la rétine). Les centrosomes (qui contiennent deux centrioles et forment les pôles du fuseau) sont visualisés grâce à l'expression d'une protéine centriolaire, la centrine fusionnée à une protéine qui fluoresce dans le rouge (tdTomato). La centrine se concentre aux centrioles qui apparaissent comme des points rouges intenses, mais elle est aussi présente dans tout le cytoplasme, ce qui donne le fond général rouge de la cellule. Les kinétochores sont visualisés grâce à l'expression d'une protéine, CENP-A, fusionnée à la GFP. Les kinétochores sont les points verts intenses, mais les chromosomes sont aussi marqués de manière plus diffuse en vert. Le temps est donné en minutes:secondes, en haut à gauche de chaque groupe d'images. Les images sont des reconstructions effectuées à partir de séries d'images prises à différents plans focaux en faisant bouger

l'objectif selon l'axe z. Pour chaque groupe, l'image en haut à gauche est une vue du dessus, et les images à droite et en bas sont des vues de côté. Les flèches jaunes sur le deuxième groupe d'images (temps 00:00) indiquent les deux centrosomes, qui se trouvent de chaque côté du noyau. Le temps 00:00 correspond à l'entrée en mitose.

Q3-3 : Décrire l'évolution dans le temps de la position des pôles du fuseau (points rouges dans les images).

Q3-4 : Décrire l'évolution dans le temps de la position des kinétochores (vert intense) et des chromosomes (vert plus pâle).

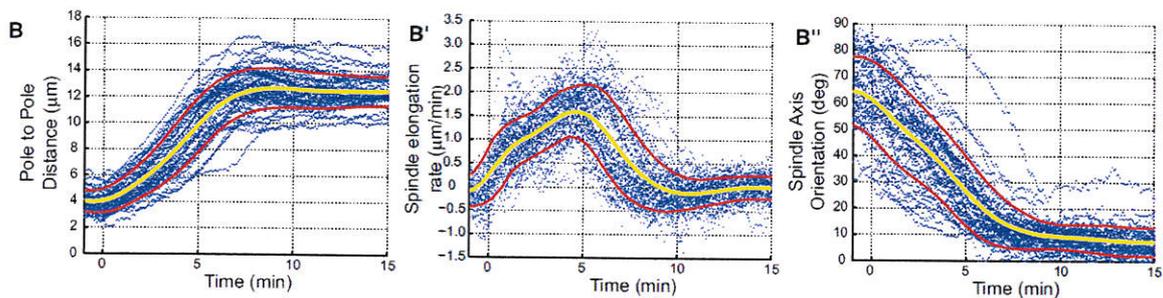


Figure 3 : ces graphes sont des quantifications de films similaires à celui présenté en figure 2. Le temps (Time) est sur l'axe horizontal en minutes (min). En B, l'axe vertical représente la distance entre les deux centrosomes (ou pôles du fuseau) en micromètres (μm). En B', l'axe vertical correspond à la vitesse d'élongation du fuseau mitotique (la dérivée dans le temps de la courbe montrée en B), en micromètre par minute ($\mu\text{m}/\text{min}$). En B'', l'axe vertical correspond à l'angle de l'axe du fuseau (axe formé par les deux centrosomes) par rapport à l'horizontale, en degrés. Chaque courbe bleue correspond à une cellule, la courbe jaune est la moyenne sur toutes les cellules observées et les courbes rouges indiquent une déviation standard.

Q3-5 : Quel est l'intérêt des quantifications présentées dans la figure 1 B, B', B''.

Q3-6 : En combien de temps est-ce que le fuseau atteint une configuration stable ?

Les figures 4 à 8 présentent des images très riches en information et demande beaucoup d'attention pour être comprise.

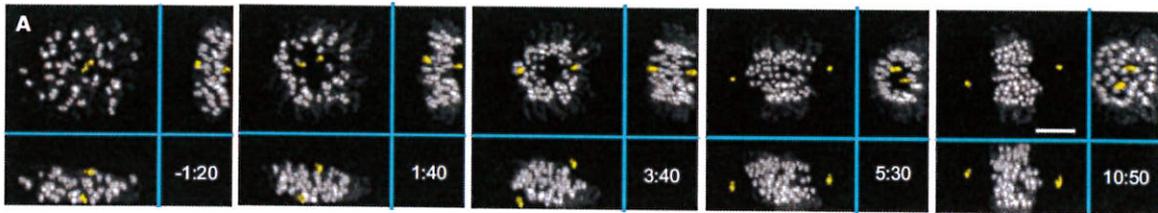


Figure 4: Images séquentielles des kinétochores (points blancs) et des pôles (points jaunes) d'une cellule RPE1 pendant la première phase de l'assemblage du fuseau. De même que dans la figure 3, le temps est en minutes:secondes, l'image en haut à gauche de chaque groupe (les images d'un même groupe sont séparées par des traits bleus et les groupes d'images sont séparés par un trait blanc épais) est une vue de dessus et les images à droite et en bas sont des vus de côté. La barre d'échelle, données sur l'image la plus à droite, représente 5 μm .

Q3-7 : Considérez les images du panneau A aux temps -1:20 (le temps zéro correspond à l'entrée en mitose) et le temps 1:40. Décrivez l'évolution de la distribution des kinétochores (points blancs).

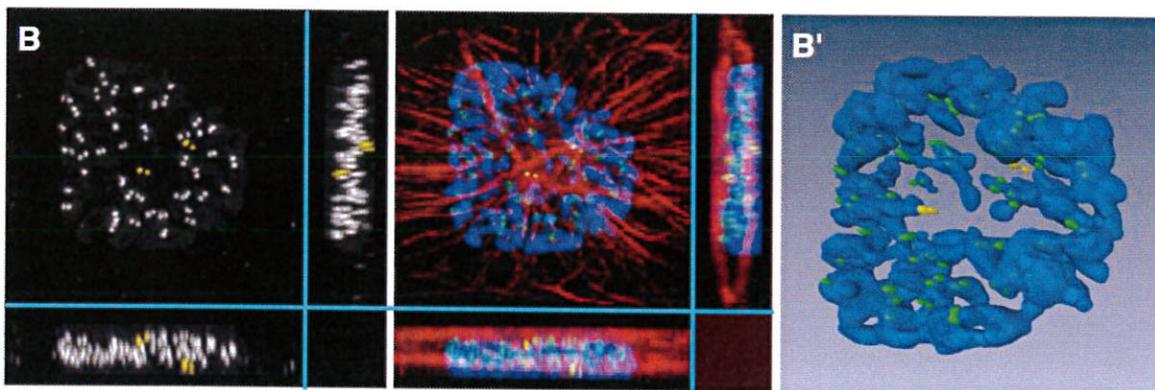


Figure 5: Les images présentées dans cette figure, ainsi que dans les figures 6 à 8 correspondent à des cellules fixées. Les kinétochores apparaissent comme des points blancs sur l'image de gauche, puis des points verts sur les images du milieu et de droite, les pôles sont en jaune et les microtubules apparaissent en rouge. Comme la cellule a été fixée, une image de meilleure résolution dans toutes les dimensions de l'espace a pu être acquise. Sur le panneau B, dans chaque groupe d'images, l'image en haut à gauche est une vue du dessus, celles à droite et en bas sont des vues de côté. Dans le panneau central et dans celui de droite, les chromosomes apparaissent en bleu. Le panneau B' est un rendu surfacique tridimensionnel généré par ordinateur à partir des images de fluorescence, en plaçant la surface à un certain niveau de fluorescence (procédé de seuillage).

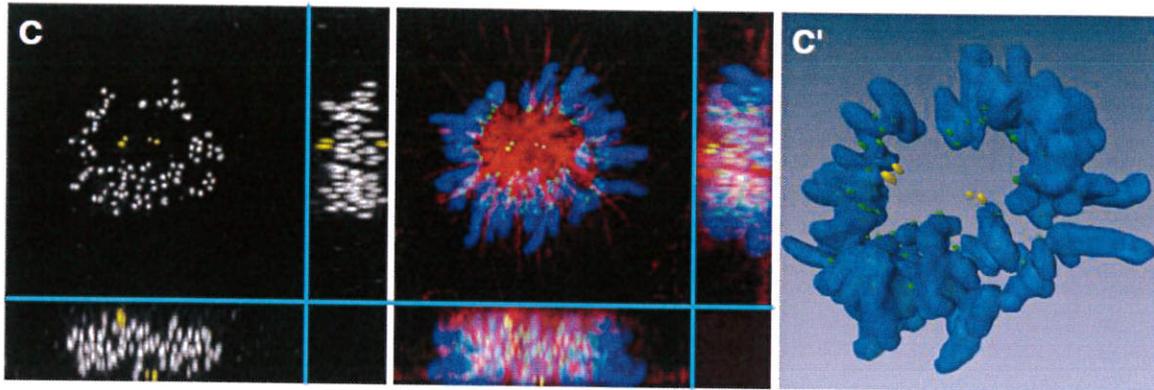


Figure 6: Même légende que pour la figure 5

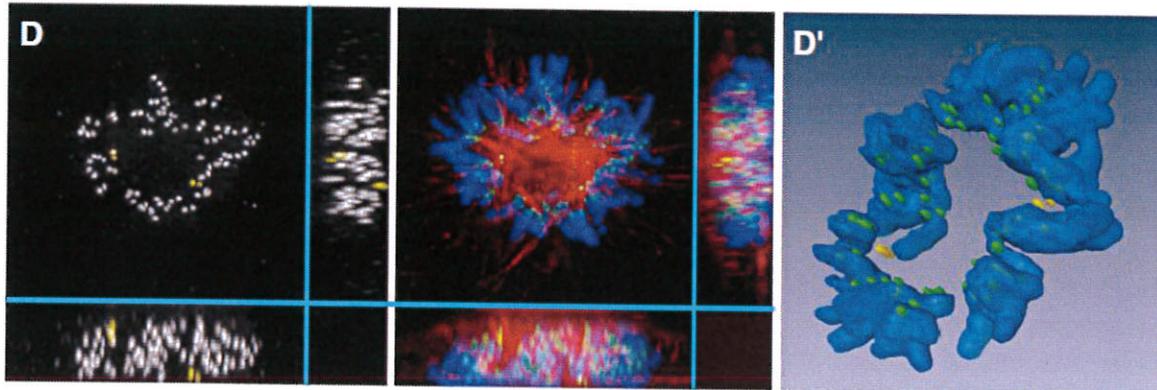


Figure 7: Même légende que pour la figure 5

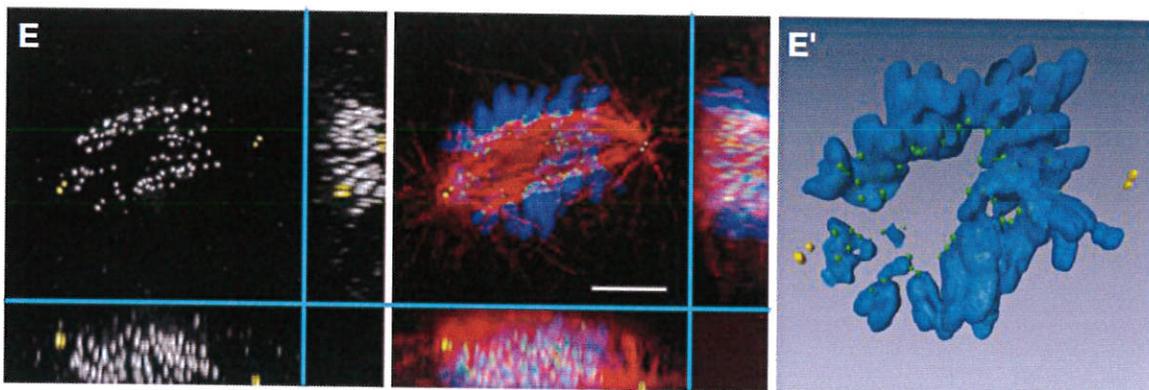


Figure 8: Même légende que pour la figure 5. La barre d'échelle représente 5 μm .

Q3-8 : A quels temps du panneau A (Figure 4) correspondent selon vous les images de cellules fixées montrées dans les panneaux B à E (Figures 5 à 8) ?

Q3-9 : Décrivez les positions respectives des pôles (jaune), des kinétochores (verts) et des chromosomes dans les images des panneaux B' (Figure 5) et C' (Figure 6) (vous pouvez vous aider d'un dessin).

Q3-10 : Décrivez la distribution des microtubules (rouge) et leur évolution entre les images des panneaux B (Figure 5) et C (Figure 6).

Q3-11 : Décrivez l'évolution de l'organisation des microtubules entre les panneaux D (Figure 7) et E (Figure 8).

Q3-12 : Décrivez l'évolution de la distribution relative des chromosomes et des microtubules entre les panneaux D (Figure 7) et E (Figure 8).

Q3-13 : Décrivez ce qui vous semble le plus important dans la transition d'organisation du fuseau mitotique (l'ensemble des éléments : pôles, microtubules, chromosomes) entre les temps 3:40 et 10:50 du panneau A (Figure 4) et entre les panneaux D, D' (Figure 7) et E, E' (Figure 8).

La Figure 9 présentée sur la page suivante demande un œil de spécialiste pour être correctement interprétée. Lisez attentivement sa légende.

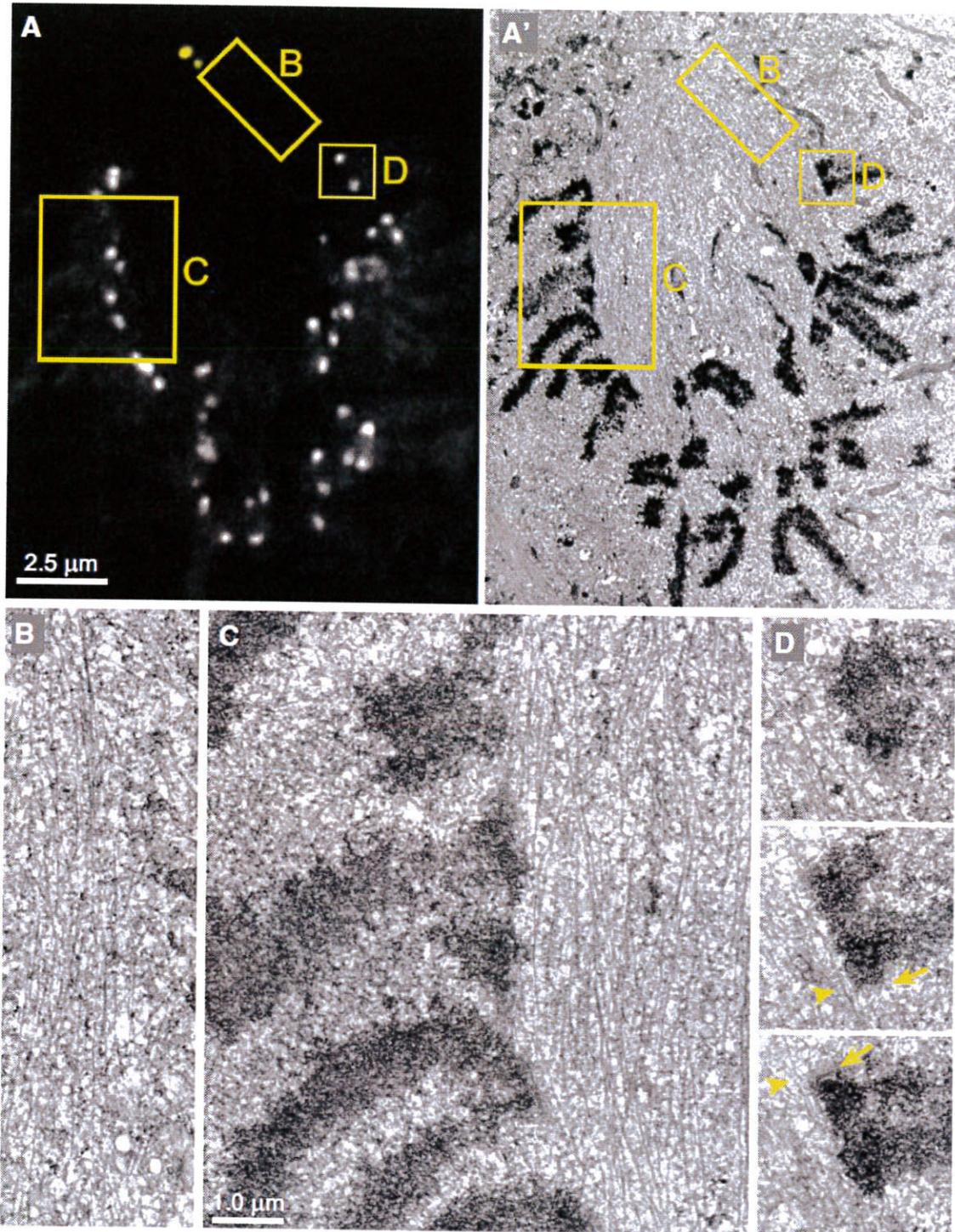


Figure 9 (Figure 3 de l'article) : Images corrélatives en fluorescence et en microscopie électronique, d'une cellule en mitose. Le panneau A montre l'image en fluorescence des kinétochores (points blancs intenses, on voit aussi en gris les bras des chromosomes). Sur le panneau A', on voit la même cellule, en microscopie électronique. Les chromosomes apparaissent comme des masses noires et les microtubules comme des ensembles de fibres qui relient les pôles. Les cadres jaunes indiquent des régions d'intérêt montrées à plus fort grossissement dans les panneaux B à D. Le panneau B correspond à une région où on voit bien le faisceau de microtubules. Le panneau C montre les chromosomes accrochés sur le côté du faisceau de microtubules. Le panneau D correspond à un plus fort grossissement de la région des kinétochores (masses sombres), on peut voir des coupes à

différentes hauteurs d'une paire de kinétochores. Les deux kinétochores sont attachés uniquement latéralement sur le faisceau de microtubules (tête de flèche jaune) et aucun bout plus de microtubule n'a été capturé par les kinétochores (flèche complète jaune). Cela signifie que cette paire n'est pas encore 'bi-orientée'. Elle n'est pas prête à entrer en anaphase. Il faut encore que des microtubules se fixent par leurs bouts plus sur chacun des kinétochores.

Q3-14 : A quelle étape, décrite dans les figures précédentes, correspondent les images de la Figure 9 ?

Ces images suggèrent qu'il y a une étape importante entre l'état où un kinétochore est libre et l'état où un kinétochore est attaché au bout plus d'un faisceau de microtubules : le kinétochore s'attache latéralement sur le faisceau de microtubules.

Q3-15 : Décrivez la disposition relative des bras des chromosomes, des kinétochores et des microtubules dans la figure 9. Pourquoi cette disposition est-elle favorable à la capture des kinétochores par les bouts plus des microtubules ?

Pour bouger des éléments dans la cellule, il faut exercer des forces dessus. Dans le cas des chromosomes et des kinétochores ces forces sont exercées par des moteurs moléculaires qui peuvent bouger le long des microtubules. Il s'agit des kinésines. Ces moteurs ont la particularité de bouger vers les bouts plus des microtubules (ceux qui sont loin des pôles). Il y a des moteurs de ce type au niveau des bras des chromosomes, et d'autres au niveau des kinétochores. Ces moteurs vont faire glisser vers les bouts plus des microtubules (qui sont au centre du fuseau, à égale distance des deux pôles) les kinétochores qui sont en contact latéral avec un faisceau de microtubules. Ils vont aussi écarter les bras des chromosomes en les repoussant vers le milieu et vers l'extérieur du fuseau.

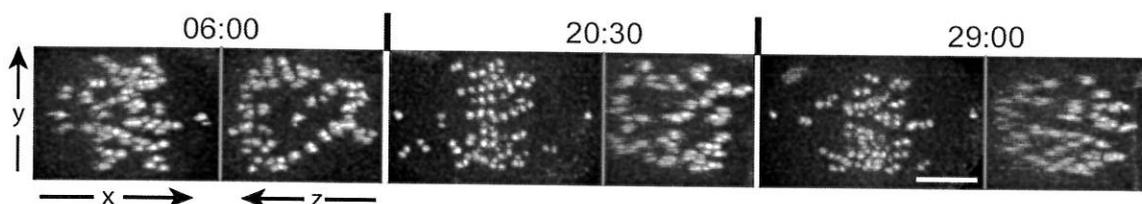


Figure 10: Images séquentielles des kinétochores (points blancs) et de pôles (en jaune). Chaque paire d'images séparées par une ligne bleue correspond à une vue de dessus (à gauche) et une vue de côté prise selon l'axe pôle-pôle du fuseau (à droite). La cellule a été traitée pour supprimer la protéine Nuf2 qui permet aux kinétochores de capturer des bouts plus de microtubules. Les temps indiqués au-dessus des images sont en minutes : secondes. La barre d'échelle est de 5 μm .

Q3-16 : Dans la cellule présentée dans la figure 10, une protéine essentielle des kinétochores, Nuf2, qui sert à leur interaction avec le bout plus des microtubules (mais pas à leur interaction latérale sur les microtubules), a été supprimée. Pourtant les chromosomes se positionnent correctement en anneau entre les deux pôles. Comment expliquez-vous ce résultat ? Est-ce que la cellule pourra poursuivre sa progression et entrer en anaphase ?

Q3-17 : A partir de toutes les images que vous avez commentées dans les Figures 2 à 10, proposez un scénario pour la mise en place du fuseau de microtubules entre les deux pôles, pour la capture des chromosomes et leur positionnement sur ce fuseau et enfin pour la capture des paires de kinétochores par des microtubules émanant de deux pôles opposés. Soyez schématiques et n'indiquez que les étapes qui vous semblent les plus importantes.

Une manière de tester un scénario détaillé, lorsqu'on connaît suffisamment les propriétés des éléments qui composent le système (ce qui est le cas ici), consiste à construire une simulation numérique. Dans la simulation présentée dans la Figure 11, trois éléments sont représentés, les chromosomes (cylindres gris), les kinétochores (points bleus), les centrosomes (ou pôles du fuseau, points jaunes) et les microtubules (en rouge).

Dans cette simulation, les microtubules polymérisent dans des directions aléatoires à partir des centrosomes et les pôles du fuseau sont déjà séparés. Les bouts plus des microtubules sont capturés lorsqu'ils rencontrent un kinétochore. Un point important est que les microtubules ne peuvent pas traverser la masse des chromosomes (les cylindres gris), ce qui fait que les chromosomes peuvent 'cacher' des kinétochores. Dans le premier cas, les chromosomes ont une disposition initiale aléatoire dans l'espace de la cellule, dans le deuxième, ils ont la disposition toroïdale observée expérimentalement. La formation du fuseau et les mouvements initiaux des chromosomes ne sont pas simulés. Le but de la simulation est d'estimer le temps de capture des kinétochores par les microtubules dans les deux configurations.

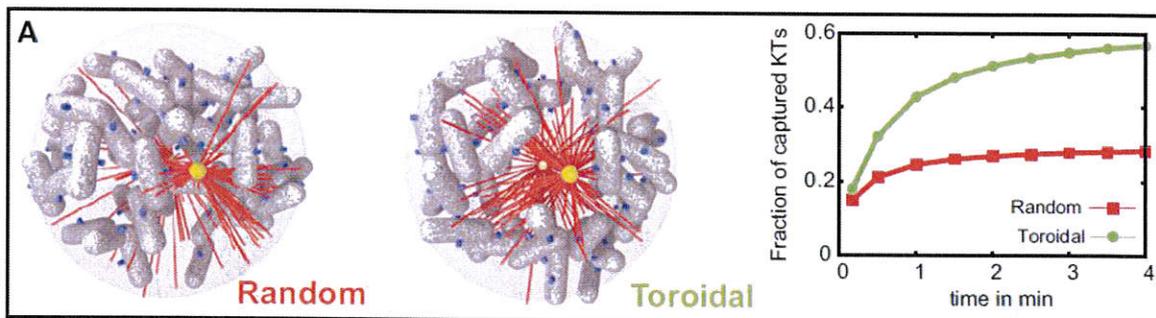


Figure 11: Images des simulations effectuées en partant d'une répartition aléatoire des chromosomes (à gauche, 'random') ou en partant d'une répartition toroïdale (à droite, 'toroidal'). Les chromosomes sont les cylindres gris, les kinétochores sont les points bleus, les pôles sont les points jaunes et les microtubules sont les traits rouges. Le graphique de droite représente le résultat des simulations. Il indique, dans les deux cas, la fraction de kinétochores capturés en fonction du temps après le début de la simulation (time), donné en minutes (min).

Q3-18 : Quelle hypothèse les auteurs veulent-ils tester avec cette simulation ?

Q3-19 : Décrivez qualitativement le résultat de la simulation, présenté sous forme du graphe dans la figure 11.

Q3-20 : Donnez plusieurs raisons qui peuvent expliquer le résultat de la simulation.

Les auteurs de cette étude veulent ensuite tester expérimentalement leur hypothèse. L'expérience qu'ils présentent consiste à supprimer la kinésine Kid, normalement présente sur les bras des chromosomes.

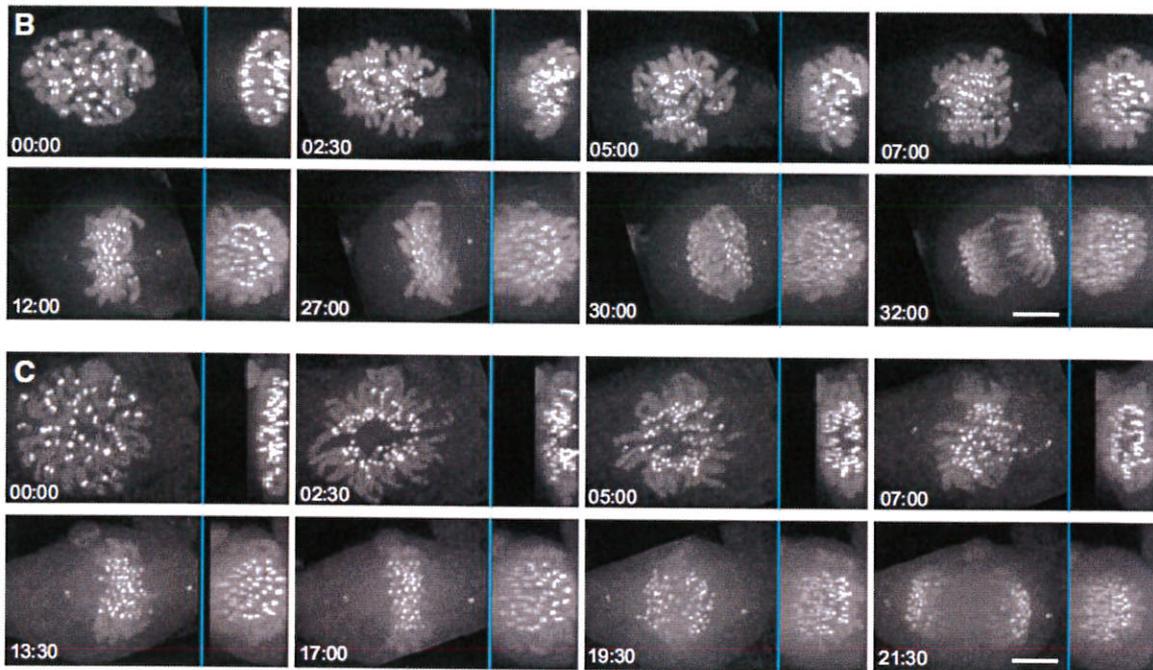


Figure 12: Images séquentielles des kinétochores (points blancs intenses) dans des cellules en mitose. En B) la protéine Kid, un moteur de type kinésine situé sur les bras des chromosomes, a été supprimée. En C) la protéine Kid est présente (cas contrôle). Le temps est donné en minutes:secondes. Le temps 00:00 correspond à l'entrée en mitose. Les traits bleus séparent des paires d'images qui correspondent à une vue de dessus (à gauche) et à une vue de côté selon l'axe pole-pole du fuseau (à droite). Les bras des chromosomes sont aussi visibles en gris clair. La barre d'échelle représente 5 μ m.

Q3-21 : Décrivez la différence de distribution des kinétochores entre les panneaux B (sans Kid) et C (avec Kid), en particulier aux temps 02:30 et 05:00.

Les auteurs indiquent dans le texte de l'article que le temps entre l'entrée en mitose et l'anaphase est allongé de 6 minutes environ lorsque Kid est supprimée, et que cela correspond à la différence de temps calculée pour la capture des kinétochores dans la simulation, entre les configurations aléatoires et toroïdales.

Q3-22 : En quoi cette expérience constitue un test de l'hypothèse qui est aussi testée par la simulation ?

Les données exactes obtenues par l'expérience sont des temps entre l'entrée en mitose et l'anaphase de 19,4 \pm 2,9 min pour 8 cellules observées dans le cas avec Kid (le contrôle), et de 25 \pm 3,3 min pour 10 cellules observées dans le cas sans Kid.

Q3-23 : Comment savoir si ces temps sont vraiment significativement différents (d'un point de vue statistique) ?

Q3-24 : Qu'est-ce qui a permis aux auteurs d'observer cette différence de temps, alors qu'elle est relativement petite (par rapport au temps total) ?

Q3-25 : Au regard de cette petite différence de temps dans l'exécution de la mitose, vous semble-t-il que la disposition toroïdale des chromosomes dans l'espace décrite par ces auteurs a une fonction importante pour la mitose ? Pourquoi ce processus a t'il été sélectionné au cours de l'Evolution (quels avantages apporte-t-il à la cellule) ? Formulez au moins deux hypothèses.

Partie 4 : Etude de la fonction de la kinase Aurora B pendant la mitose.

(durée conseillée: 1h15)

La kinase Aurora a été découverte chez la drosophile. Chez l'homme il en existe plusieurs formes, Aurora A, Aurora B et Aurora C possédant de multiples fonctions. La kinase Aurora B peut être inhibée spécifiquement par une petite molécule inhibitrice nommée l'hésperadine que l'on utilise pour étudier la fonction spécifique d'Aurora B pendant la mitose.

Q4-1 : Rappelez le mode de fonctionnement des kinases et proposez des mécanismes d'inhibition par lesquels l'hésperadine pourrait bloquer la fonction d'Aurora B.

Des cellules humaines HeLa sont soumises pendant 1 heure à l'hésperadine ou au DMSO, un solvant dans lequel l'hésperadine est dissoute, avant de fixer les cellules et de colorer les chromosomes au Giemsa.

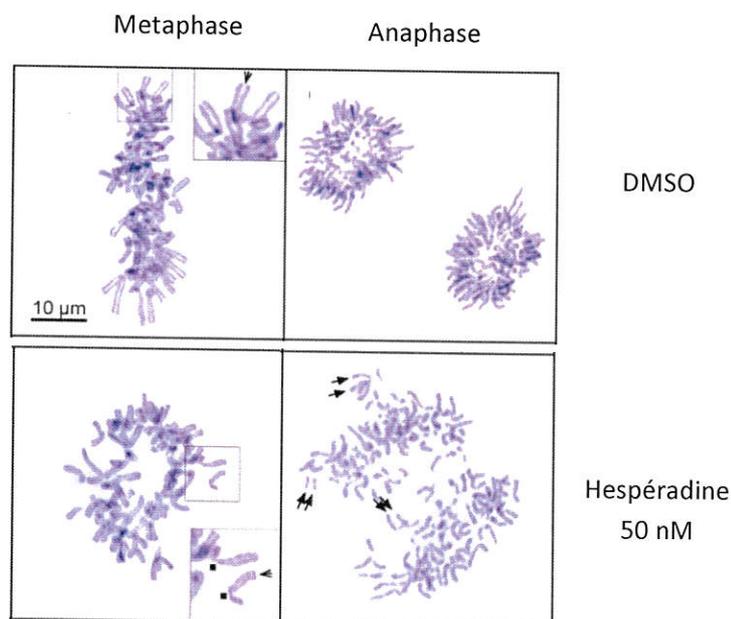


Figure 1 : Micrographes de cellules HeLa traitées avec du DMSO ou 50 nM d'hésperadine pendant une heure puis fixées. Les chromosomes ont été colorés au Giemsa.

Q4-2 : Quel est l'intérêt de l'expérience avec le DMSO? Quelle différence majeure observe-t-on entre la métaphase et l'anaphase dans les cellules traitées au DMSO? Quels sont les effets de l'hésperadine sur les chromosomes et que peut-on exclure comme rôle pour Aurora B à partir de cette expérience?

Des cellules HeLa traitées à l'héspéradine pendant une heure sont également soumises à un marquage par un anticorps reconnaissant la tubuline afin de visualiser les microtubules kinétochoriens. Un second anticorps reconnaissant le premier, couplé à la fluorescéine qui émet de la lumière verte quand elle est excitée, est utilisé pour suivre la distribution de l'anticorps anti-tubuline dans les cellules par microscopie à épifluorescence (technique de marquage par immuno-fluorescence). Les chromosomes sont aussi marqués au DAPI qui se fixe sur l'ADN et émet de la lumière bleu quand il est excité. On sélectionne alors des cellules en métaphase pour l'observation.

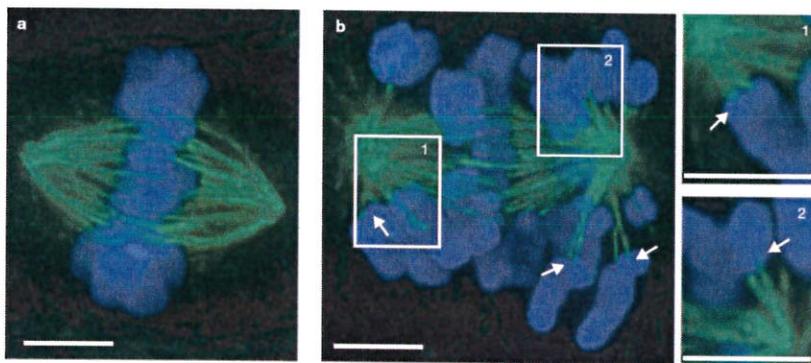


Figure 2 : Des cellules HeLa traitées au DMSO (a) ou à l'héspéradine (b) pendant une heure sont marquées par un anticorps anti-tubuline et du DAPI. Les deux cellules sont en métaphase. Echelle : 10 μm . Les encarts 1 et 2 en b sont agrandis sur la droite.

Q4-3 : Qu'observe-t-on dans les cellules traitées au DMSO et à l'héspéradine.

On réalise le même traitement d'une heure par l'héspéradine sur des cellules exprimant de la tubuline fusionnée à la GFP qui émet de la lumière verte quand elle est activée. L'inhibiteur est alors lavé et les cellules sont filmées par microscopie à épifluorescence ainsi que par microscopie à contraste interférentiel pour visualiser les chromosomes non marqués.

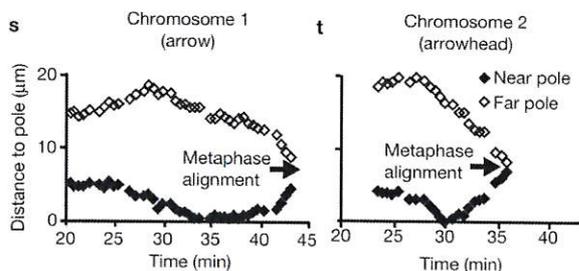
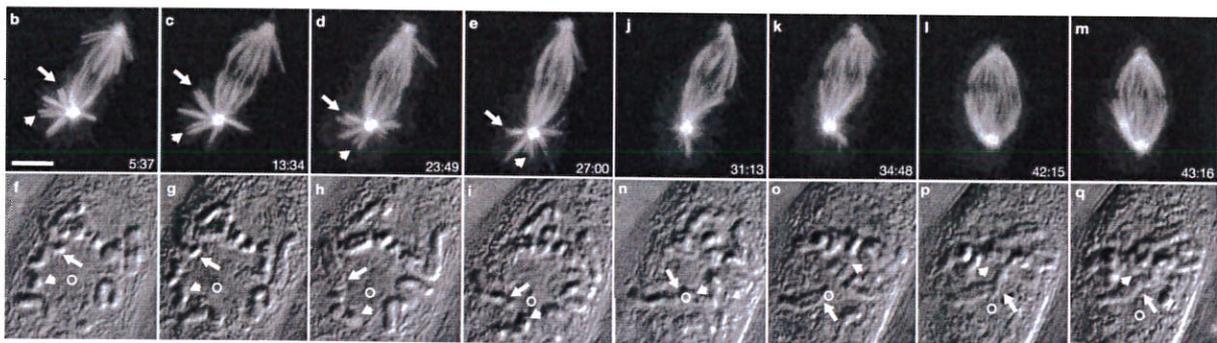


Figure 3 : Des cellules HeLa exprimant la tubuline-GFP sont filmées après traitement pendant une heure à l'héspéradine suivi du lavage de l'héspéradine à $t=0$ et d'un film par microscopie à épifluorescence (b à m) et contraste interférentiel (f à q). Le temps auquel les clichés ont été pris est indiqué en bas à droite en minutes. Les chromosomes 1 (arrow : flèche) et 2 (arrowhead : tête de flèche) et leurs microtubules kinétochoriens sont pointés sur les clichés. Leur distance par rapport aux deux poles du fuseau (Distance to pole) est mesurée en s et t au cours du temps (Time, min) (Near pole : pole le plus proche du chromosome; far pole : pole le plus éloigné).

Q4-4 : Quels sont les avantages et inconvénients de l'utilisation de la GFP-tubuline par rapport au marquage de la tubuline par immuno-fluorescence utilisé précédemment?

Q4-5 : Qu'observe-t-on au cours du temps pour les chromosomes 1 et 2. Schématisez le comportement d'un tel chromosome comparé au comportement normal d'un chromosome en métaphase. Concluez sur la fonction d'Aurora B pendant la mitose.

La kinase Aurora B est associée à la partie interne des centromères des chromosomes. Un anticorps spécifique peut reconnaître exclusivement la forme modifiée par Aurora B de Cenp-A qui est l'une de ses cibles, associée à tous les kinétochores. Des cellules HeLa sont traitées pendant 1 heure à l'héspéradine puis marquées par immunofluorescence pour tous les kinétochores et pour la forme de Cenp-A modifiée par Aurora B.

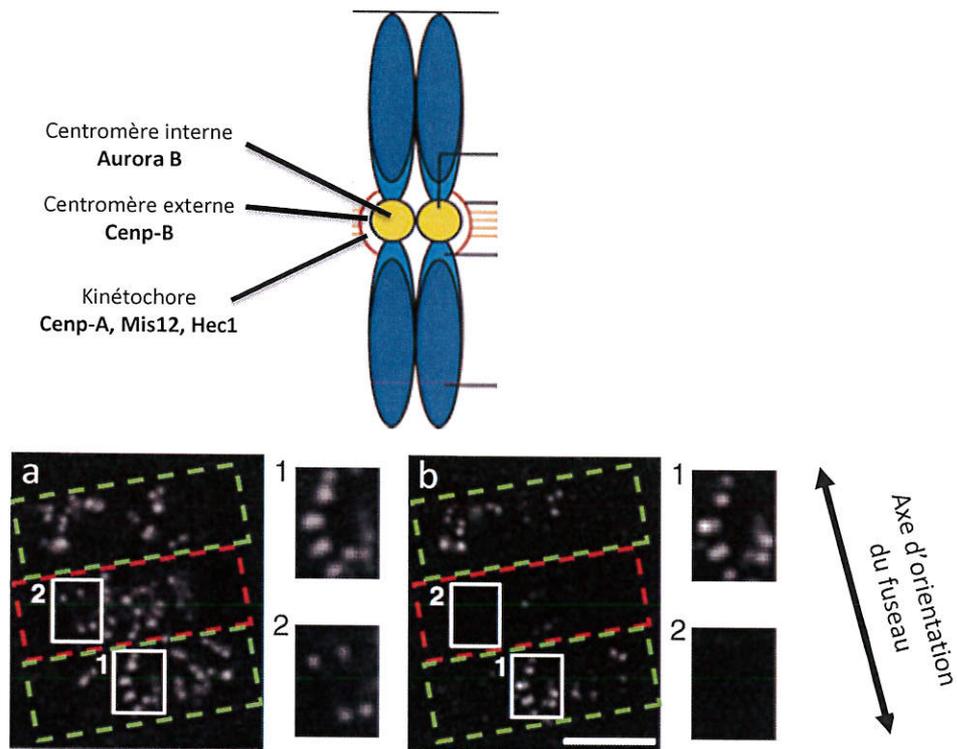


Figure 4 : En haut : schéma d'un chromosome métaphasique précisant la localisation d'Aurora B au centromère interne, de Cenp-A au kinétochoire, de même que Hec1 et Mis12 montrés en Figure 5, et de Cenp-B au centromère externe.

En bas : Marquage par immunofluorescence des kinétochores (a) et de Cenp-A modifiée par Aurora B (b) dans une cellule métaphasique. Les zones encadrées en blanc sont agrandies sur la droite. L'axe pôle-pôle du fuseau est indiqué sur la droite par une flèche. Sur ces micrographes, chaque point blanc correspond à un kinétochoire.

Q4-6: Que se passe-t-il dans la partie centrale du fuseau (encadrée en rouge) par rapport aux zones proches des poles du fuseau (encadrées en vert).

Q4-7: Que peut-on en déduire sur l'activité de la kinase Aurora B envers Cenp-A ?

Il existe un capteur protéique synthétique qui permet de mesurer l'activité locale de la kinase Aurora B. Il fonctionne par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) c'est-à-dire transfert d'énergie entre deux protéines fluorescentes, la YFP et la CFP. La longueur d'onde d'émission de l'une correspond à celle d'excitation de la seconde. Le FRET correspond à une émission de lumière par la deuxième protéine quand on excite la première. Un signal FRET peut être émis uniquement si la CFP et la YFP sont très proches l'une de l'autre. Le niveau de FRET de ce capteur varie de plus en fonction du niveau d'activité locale de la kinase Aurora B.

Q4-8 : Quelles doivent être les propriétés essentielles du domaine protéique qui relie les deux protéines fluorescentes pour que ce type de capteur FRET fonctionne?

Les capteurs FRET peuvent être ciblés à une localisation cellulaire de choix par fusion avec une protéine y résidant. Le capteur d'Aurora B est ainsi ciblé soit à la partie externe du centromère par fusion avec la protéine Cenp-B, soit au kinétochose par fusion avec la protéine Mis12. L'émission simple de fluorescence de la YFP permet de localiser le capteur FRET dans des cellules en métaphase qui sont également marquées par immuno-fluorescence pour Aurora B ou pour une protéine de kinétochose nommée Hec1.

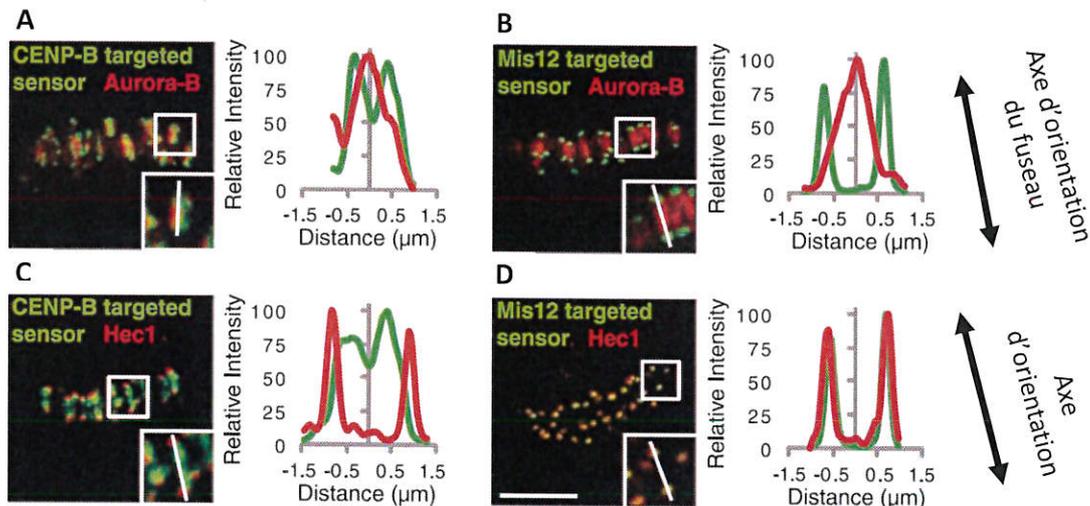


Figure 5 : Partie du haut : Localisation d'Aurora B (en rouge) et du capteur d'activité d'Aurora B (en vert) fusionné à Cenp-B (A, CenB-targeted sensor) ou à Mis12 (B, Mis12-targeted sensor) dans des cellules dont les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. On note que dû à leur très grande proximité, les deux centromères internes d'un même chromosome ne peuvent pas être distingués par microscopie optique et forment un seul point de fluorescence rouge alors que les deux kinétochores sont résolus et forment deux points distincts de fluorescence verte.

Partie du bas : Localisation de la protéine de kinétochose Hec1 (en rouge) et du capteur d'activité d'Aurora B (en vert) fusionné à Cenp-B (C) ou à Mis12 (D) dans des cellules en métaphase dont les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique.

Des agrandissements des kinétochores d'un ou plusieurs chromosomes encadré en blanc sont montrés en bas à droite des images.

Des graphes représentant l'intensité relative de fluorescence (Relative intensity) le long de la ligne blanche tracée parallèlement à l'axe du fuseau mitotique dans les agrandissements sont montrés sur la droite.

Q4-9 : Décrivez la distribution relative des 2 senseurs d'activité d'Aurora B par rapport à Aurora et à Hec1. Quel est l'objectif de cette expérience?

Les cellules en métaphase sont soumises à trois conditions expérimentales distinctes :
1/ traitement par le nocodazole qui induit une dépolymérisation des microtubules
2/ traitement par le monastrol qui provoque la formation d'un fuseau mitotique contenant un pôle unique au lieu de deux pôles.
3/ traitement par le MG132 qui bloque indéfiniment le passage en anaphase et maintient ainsi les cellules en métaphase.
La distance entre les 2 kinétochores des chromosomes est alors mesurée ainsi que le signal FRET émis par les deux senseurs d'activité d'Aurora B. Ce signal est mesuré sous forme d'un ratio de fluorescence qui décroît inversement au niveau d'activité de la kinase Aurora B.

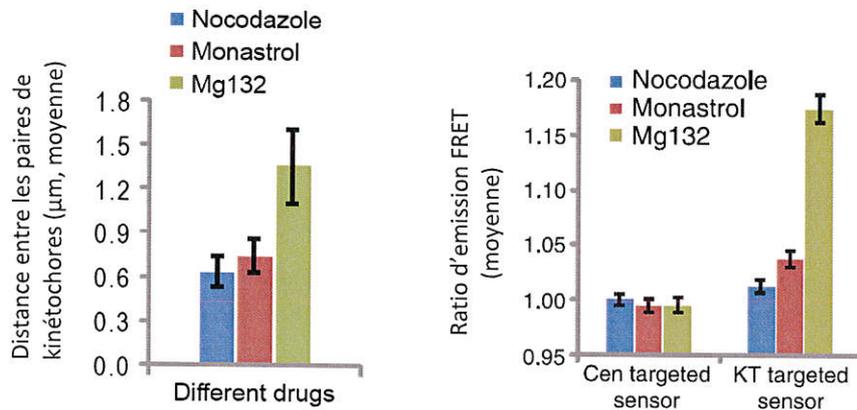


Figure 6 : A gauche : Distance moyenne entre les deux kinétochores d'un chromosome métaphasique en présence de drogues différentes (different drugs) : nocodazole, de monastrol ou MG132. A droite : Ratio d'émission FRET par les senseurs d'activité d'Aurora ciblés au centromère (Cen targeted sensor) et au kinétochore (KT targeted sensor) après traitement des cellules avec les mêmes drogues. Les barres noirs représentent la deviation standard entre les distances ou ratio mesurés sur différents chromosomes.

Q4-10 : Interprétez comment les traitements par les différentes drogues affectent la distance entre les kinétochores et émettez une hypothèse sur les causes des modifications induites par ces traitements sur le niveau d'émission des senseurs FRET.

On traite aussi les cellules HeLa avec l'héspéradine pendant une heure puis on mesure l'émission FRET des deux senseurs dans des cellules métaphasiques après son lavage.

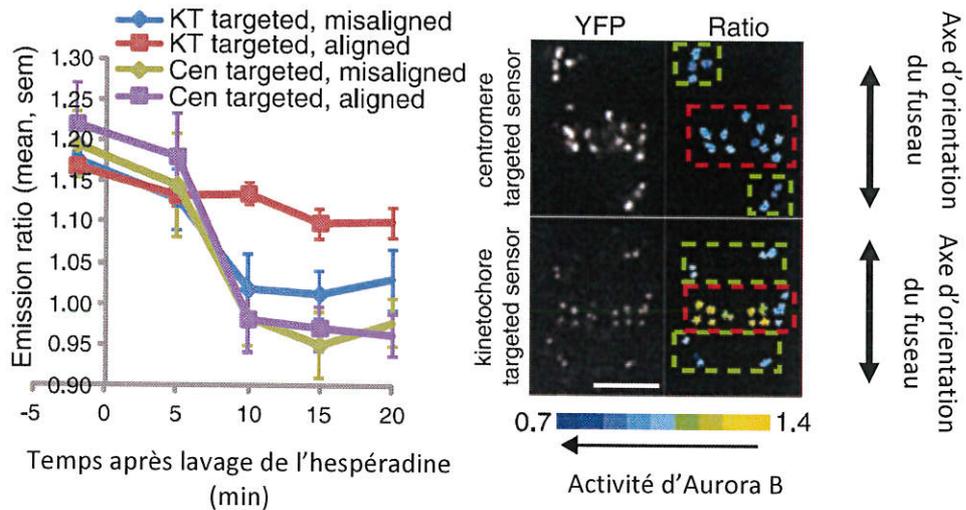


Figure 7 : A gauche : Ratio d'émission FRET par les deux senseurs d'activité d'Aurora ciblés au centromère (Cen targeted) et au kinétochore (KT targeted) après traitement des cellules à l'héparadine pour une heure puis lavage. L'évolution du ratio est alors mesurée au cours du temps pour des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique (aligned) ou non alignés (misaligned). A droite, localisation des sondes de FRET (YFP) et ratio d'émission de FRET dans des cellules métaphasiques, représenté par un code couleur selon l'échelle indiquée.

Q4-11 : Qu'observe-t-on avec les 2 senseurs d'activité d'Aurora B au cours du lavage de l'héparadine? Que peut-on en conclure?

Q4-12 Proposez un modèle mécanistique permettant d'expliquer ce phénomène fondé sur votre analyse des expériences présentées dans les figures 4 à 7.

Des expériences complémentaires sont réalisées pour valider ce modèle. Dans ces expériences, on modifie de manière artificielle le partenaire principal d'Aurora B, la protéine centromérique INCENP. Le domaine d'adressage de cette protéine à la partie interne des centromères est remplacé par le domaine d'adressage de Cenp-B (CB) au centromère externe ou par celui d'adressage au kinétochore de Mis12. Les cellules qui expriment ces versions modifiées d'INCENP sont marquées pour Aurora B et pour le marqueur de kinétochores Hec1.

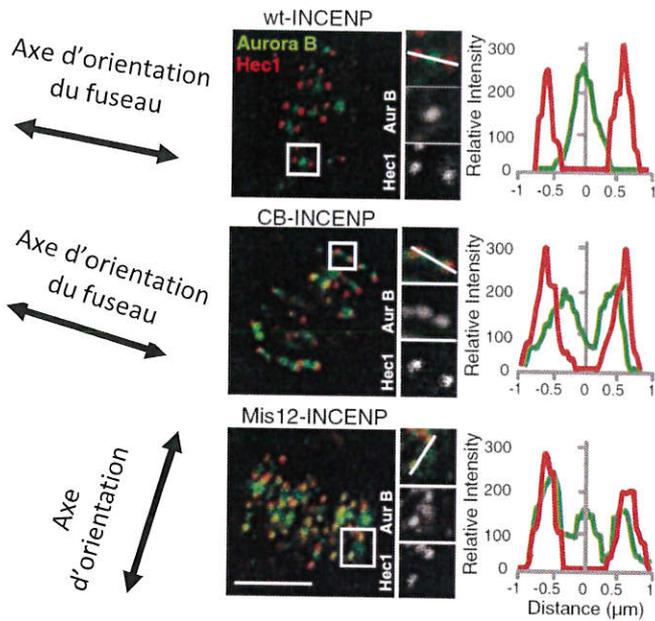


Figure 8 : Cellules métaphasiques exprimant les versions modifiées d'INCENP, marquées pour Aurora B (en vert) et pour la protéine de kinétochore Hec1 (en rouge). Des agrandissements des kinétochores d'un chromosomes encadré en blanc sont montrés à droite des images. Des graphes représentant l'intensité relative (Relative intensity) de fluorescence le long de la ligne blanche tracée parallèlement à l'axe du fuseau mitotique dans les agrandissements sont montrés sur la droite.

Q4-13 : Qu'observe-t-on ? Emettez une hypothèse sur l'objectif de cette expérience.

On traite alors cellules exprimant la protéine INCENP modifiée à l'hésperadine pendant 14 heures et on mesure le nombre de cellules mitotiques dans la population de cellules.

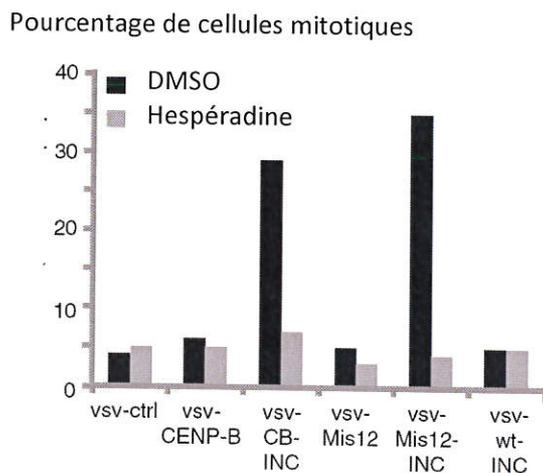


Figure 9 : Pourcentage de cellules en mitose dans la population de cellules exprimant les versions modifiées d'INCENP et traitées au DMSO ou à l'hésperadine pendant 14 heures. Les versions modifiées d'INCENP exprimées dans les cellules portent toutes des étiquettes vsv.

Q4-14 : Interprétez les résultats de l'expérience. L'hypothèse émise en question 4-13 est-elle validée ou invalidée par cette expérience ?

On marque finalement par immuno-fluorescence les microtubules kinétochoriens dans ces cellules ainsi que les protéines INCENP modifiées.

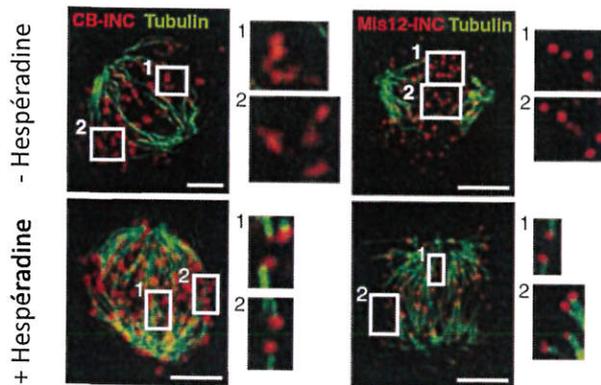


Figure 10 : Marquage par immuno-fluorescence de la tubuline en vert et des versions modifiées d'INCENP (en rouge) en absence (en haut) ou en présence (en bas) d'hespéradine.

Q4-15 : Quel est le comportement des microtubules kinétochoriens dans ces cellules? Conclure sur le mécanisme d'action d'Aurora B pendant la mitose et sur son rôle physiologique. Accompagnez votre conclusion d'un schéma.

Q4-16 : Quelle expérience complémentaire proposeriez-vous pour affiner le mécanisme d'action d'Aurora B pendant la mitose ?

Q4-17 : Quelle utilisation clinique pourrait-on faire d'inhibiteurs d'Aurora B comme l'hespéradine. Quels effets secondaires peut-on craindre ?