

## **Sujet n°1**

### **Biologie Epreuve de culture scientifique**

L'auxine est une hormone vitale qui régule de nombreux aspects du développement des plantes. Des expériences conduites à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle ont conduit à l'hypothèse que la croissance en réponse à la lumière et à la gravité est régulée par une substance endogène, appelée auxine. La molécule responsable a été identifiée comme étant l'acide 3-indole acétique dans les années 1930. Depuis lors, l'identification d'un récepteur à l'auxine a constitué un objectif fondamental de la recherche sur l'auxine.

1 - L'auxine induit une transcription qui lui est spécifique en provoquant la dégradation des répresseurs transcriptionnels de la famille Aux/IAA. Les protéines Aux/IAA peuvent dimériser avec les activateurs transcriptionnels de la famille ARF (Auxin Response Factor) qui se lie à l'ADN, réprimant de ce fait leur activité. Ainsi la dégradation des protéines Aux/IAA dérègle la transcription permise par les protéines ARF.

Les protéines Aux/IAA sont dégradées après ubiquitinylation catalysée par une ubiquitine-protéine-ligase de type SCF (**Figure 1**). L'interaction entre les protéines Aux/IAA et SCF<sup>TIR1</sup> est par conséquent essentielle à l'activité biologique de l'auxine. Les mutations des protéines Aux/IAA qui affectent sévèrement l'interaction avec SCF<sup>TIR1</sup> accroissent également leur stabilité et perturbent l'expression génique induite par l'auxine. Toutes les mutations des protéines Aux/IAA qui affectent l'interaction avec SCF<sup>TIR1</sup> se situent dans une région conservée appelée domaine II, qui possède un motif caractéristique GWPPV reconnu par la protéine TIR1 du complexe SCF.

**Résumez en un schéma synthétique la voie de signalisation de l'auxine.**

2 – Pour explorer le mécanisme par lequel l'auxine interagit avec SCF<sup>TIR1</sup>, la protéine SCF<sup>TIR1</sup> est immunoprécipitée, en utilisant des anticorps anti-Myc, à partir d'extraits cellulaires de plants transgéniques mutants *tir1-1* d'*Arabidopsis* exprimant la protéine TIR1 étiquetée Myc (*tir1-1*[TIR-Myc]). Les plants mutants *tir1-1* non transgéniques n'expriment pas la protéine TIR1. Le précipité est ensuite resuspendu dans le tampon d'extraction et l'interaction des protéines ainsi purifiées avec un peptide biotinylé du domaine II est testée par capture de type « pull-down » en présence de billes d'agarose recouvertes de streptavidine. La quantité de TIR1-Myc copurifiée est déterminée par western blot en présence d'auxines naturelle et synthétiques (**Figure 2**). 2,4-D et 1-NAA sont des analogues actifs de l'auxine, alors que 2-NAA et BA sont utilisés comme témoins négatifs.

Le peptide du domaine II a la séquence suivante : NH<sub>2</sub>-AKAQVVGWPPVRNYRKN-COOH

**Résumez en un schéma synthétique le processus de purification utilisé au cours de ces expériences. Que pouvez-vous déduire de ces expériences quant au rôle de l'auxine dans l'interaction SCF<sup>TIR1</sup>-Aux/IAA ?**

3 – Dans une première série d'expériences, de l'auxine radiomarquée [<sup>3</sup>H]-IAA est ajoutée aux captures de type « pull down » réalisées à partir d'extraits de plants contenant la protéine TIR1-Myc, avant de quantifier la radioactivité associée au complexe protéique et recouvrée en présence de concentrations croissantes d'auxine non marquée (**Figure 3a**). Les captures de type « pull-down » sont réalisées en mélangeant des extraits bruts de semence *tir1-1*[TIR1-Myc] avec la protéine de fusion GST-IAA7 immobilisée sur des billes de sépharose greffées glutathion. IAA7 est une protéine qui appartient à la famille Aux/IAA.

Dans une deuxième série d'expériences, la liaison de l'auxine est quantifiée par capture de type « pull-down » en augmentant la quantité de protéine TIR1-Myc dans des extraits par ailleurs identiques de semences mutantes *tir1-1*. Dans ces expériences, les captures de type « pull-down » sont réalisées soit avec des extraits *tir1-1* (0% TIR1-Myc), soit avec 2/3 d'extraits *tir1-1* et 1/3 d'extraits *tir1-1*[TIR1-Myc] (33% TIR1-Myc), soit avec des extraits *tir1-1*[TIR1-Myc] (100% TIR1-Myc) (**Figure 3b**). Par ailleurs, aucune liaison spécifique de [<sup>3</sup>H]-IAA n'est observée dans des expériences de contrôle réalisées en absence d'extraits de semence.

**Commentez ces résultats.**

**A ce stade, quelle protéine ou quel complexe protéique pourrait être considéré comme étant le récepteur de l'auxine ?**

4 – Ensuite la protéine TIR1 est exprimée dans le système d'expression qu'est l'embryon de *Xenopus laevis*. De l'ARNm coiffé, codant pour la protéine TIR1-Myc, est injecté dans des embryons de xénope au stade deux cellules. Les embryons sont récoltés au stade 13 et des extraits protéiques sont réalisés, destinés à être utilisés dans les captures de type « pull-down » présentées à la **question 2** (**Figure 4a**). Ensuite, les expériences de liaison de [<sup>3</sup>H]-IAA présentées à la **question 3** sont répétées en utilisant des extraits de xénope dans lesquels de l'ARNm a, ou non, préalablement été injecté (**Figure 4b,c**).

**Pourquoi est-il important d'utiliser un système hétérologue ?**

**Justifiez l'importance de l'expérience présentée dans la Figure 4b.**

**Concluez quant à l'identité du récepteur de l'auxine.**

5 – L'interaction TIR1-IAA est ensuite étudiée en gel de polyacrylamide en conditions natives (**Figure 5**).

**Commentez ces résultats.**

**Que confirment-ils quant au rôle joué par l'auxine dans l'interaction TIR1-Aux/IAA ?**

6 – Les structures cristallographiques du complexe TIR1-IAA7 seul ou avec de l'auxine et avec un peptide dérivé de la protéine IAA7 ont été obtenues (**Figure 6**).

Le peptide substrat IAA7 a la séquence suivante : NH<sub>2</sub>-QVVGWPPVRNYRK-COOH

**Quelles interactions sont impliquées dans la fixation de l'auxine à TIR1 et dans la liaison du peptide IAA7 au complexe auxine-TIR1 ? Résumez ces interactions en un schéma synthétique et commentez vos observations sur la base de la nature chimique de l'auxine.**

**Discutez l'importance des résidus S462 et A464 dans la liaison du peptide IAA7 à la protéine TIR1.**

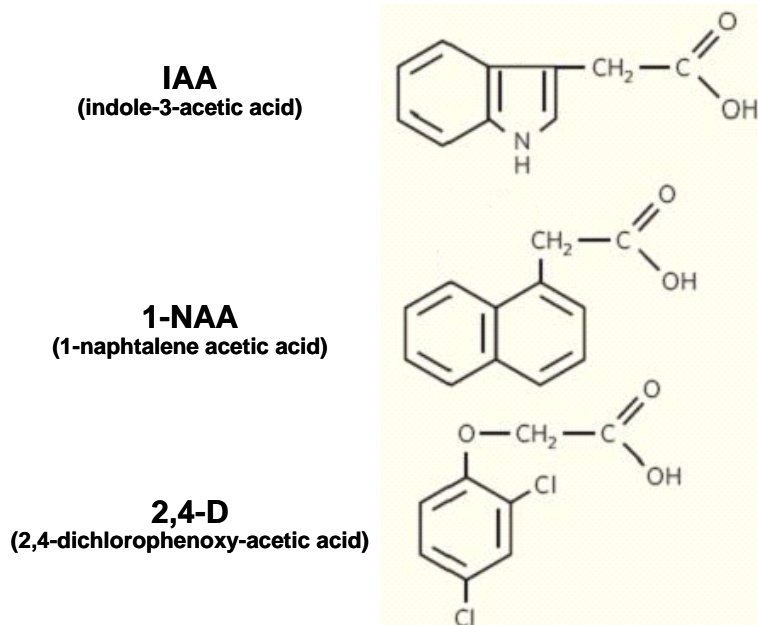
**Commentez les changements conformationnels induits par la liaison de l'auxine, ainsi que la contribution de la liaison de l'auxine à l'interaction TIR1-peptide IAA7.**

**Définiriez-vous l'auxine comme un « effecteur allostérique » ou comme une « colle moléculaire » ? Justifiez votre réponse.**

### **Question subsidiaire :**

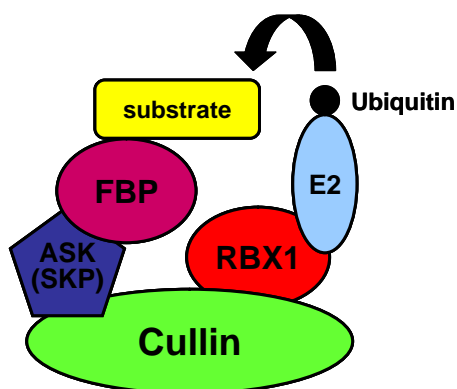
**Discutez de possibles implications pharmacologiques des résultats présentés en sachant que de nombreuses maladies humaines ont été associées à des interactions ubiquitine ligase – substrat perturbées.**

Annexe 1 – Auxines naturelles et synthétiques actives

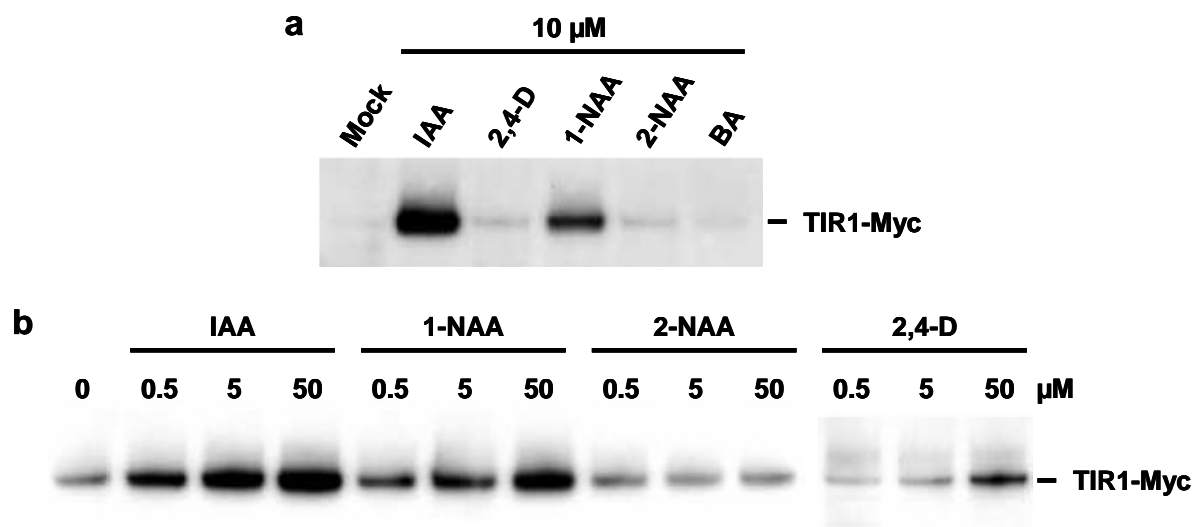


Annexe 2 – Acides amines, codes à une lettre & à trois lettres

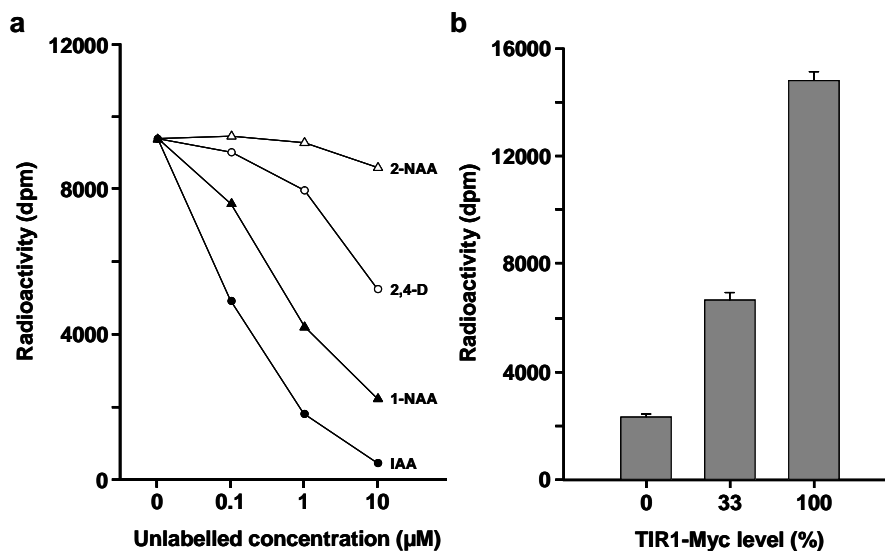
Amino acid	Three letter code	One letter code
alanine	Ala	A
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	N
aspartic acid	Asp	D
cysteine	Cys	C
glutamic acid	Glu	E
glutamine	Gln	Q
glycine	Gly	G
histidine	His	H
isoleucine	Ile	I
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
methionine	Met	M
phenylalanine	Phe	F
proline	Pro	P
serine	Ser	S
threonine	Thr	T
tryptophan	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V



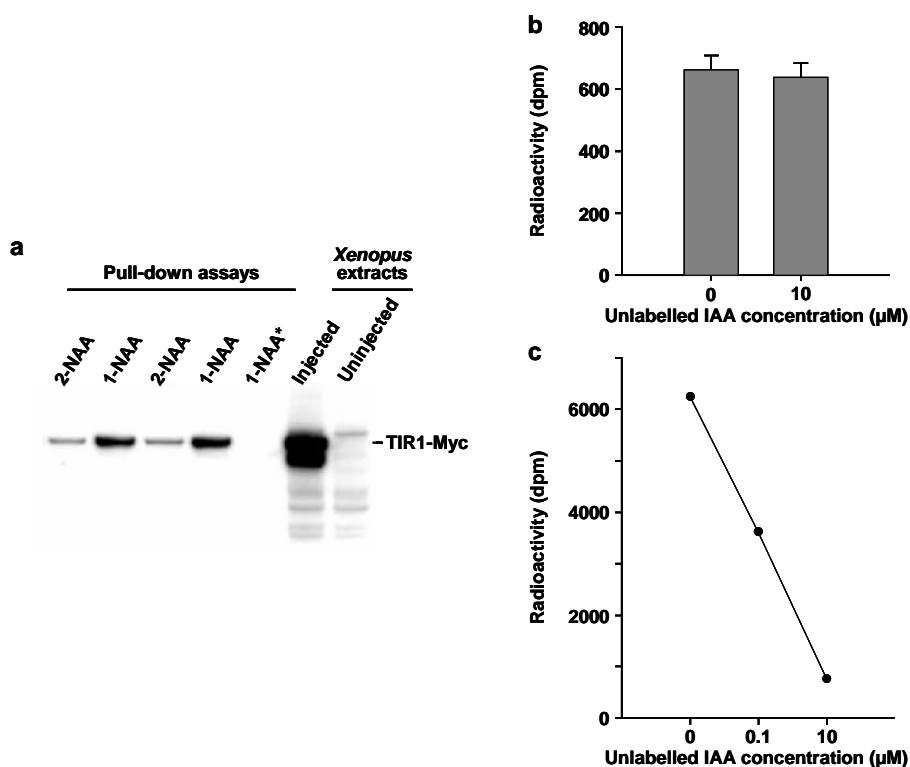
**Figure 1** – Les ubiquitine-protéine-ligases de type SCF. Leur nom dérive de trois de leurs quatre sous-unités : SKP1 (chez les plantes ASK1 pour *Arabidopsis* SKP1), la culline et la FBP (E-box protein). La quatrième sous-unité est la protéine RBX1 (Ring-box 1). SKP1 lie la FBP à la culline qui interagit à son tour avec RBX1. Un dimère RBX1-culline catalyse le transfert de l'ubiquitine activée depuis une enzyme de conjugaison (E2) vers la protéine cible (substrat). La spécificité est conférée par la FBP qui possède un motif F-box à son extrémité N-terminale assurant l'interaction avec SKP1, et un domaine d'interaction protéine-protéine à son extrémité C-terminale impliqué dans la sélection de la cible. Chez *Arabidopsis* la protéine TIR1, à domaines LRR (leucine-rich repeats), est la FBP associée aux cibles Aux/IAA et l'ubiquitine-protéine-ligase correspondante, SCF<sup>TIR1</sup>, est connue pour être impliquée dans la voie de signalisation de l'auxine.



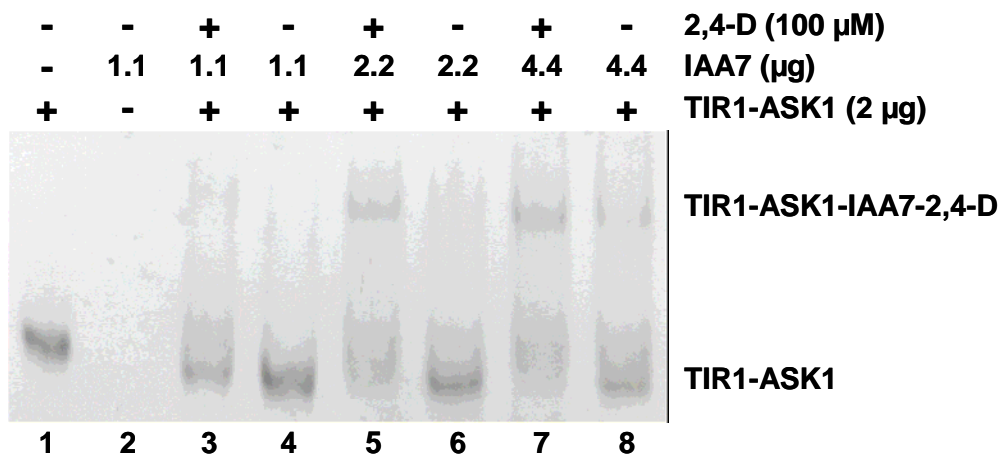
**Figure 2** – (a) Captures de type « pull-down » de la protéine TIR1-Myc immunopurifiée, en présence d'un peptide du domaine II et de 10 μM de IAA, 2,4-D, 1-NAA, 2-NAA ou d'acide benzoïque (BA) comme indiqué. La quantité de protéine Myc-TIR1 recouvrée est évaluée par immunoblot avec des anticorps anti-Myc. (b) Mêmes captures qu'en (a), mais montrant un effet dose-réponse pour IAA, 1-NAA, 2-NAA et 2,4-D sur une gamme de concentrations allant de 0 à 50 μM comme indiqué.



**Figure 3** – (a) Captures de type « pull-down » sur des extraits de semences *tir1-1*[*TIR1-Myc*] en présence de GST-IAA7, de [<sup>3</sup>H]-IAA à une concentration constante de 0,1 µM et de concentrations croissantes en IAA (cercles pleins), 2,4-D (cercles vides), 1-NAA (triangles pleins) ou 2-NAA (triangles vides) non marqués. (b) Captures de type « pull-down » sur des extraits de semences *tir1-1* en présence de GST-IAA7, de [<sup>3</sup>H]-IAA à une concentration constante de 0,1 µM et de quantités croissantes de protéine TIR1-Myc comme indiqué. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n=3).

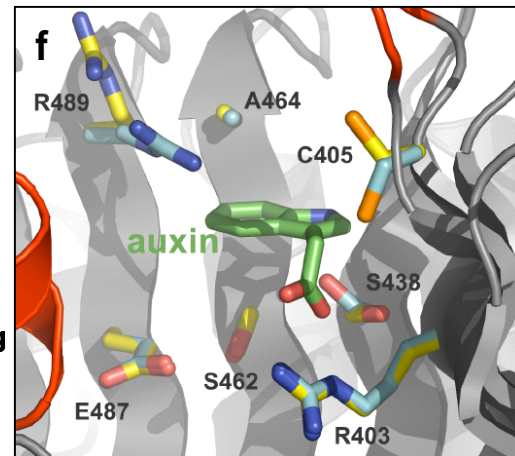
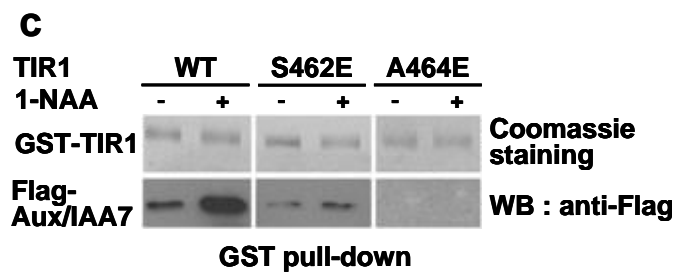
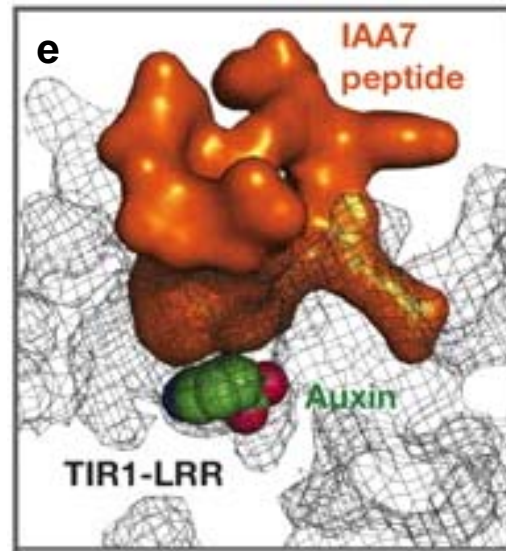
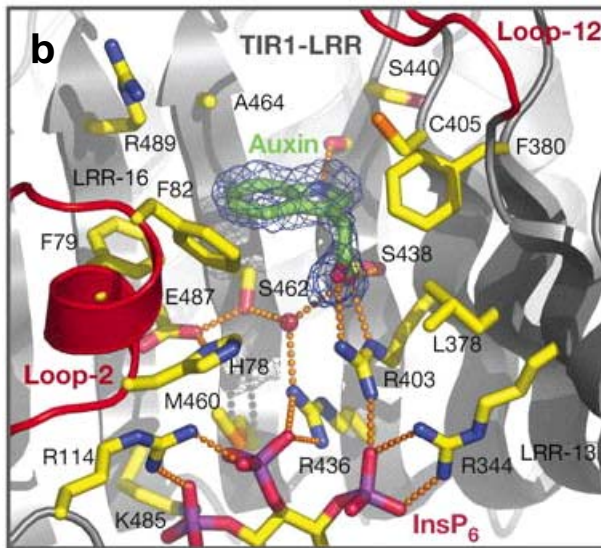
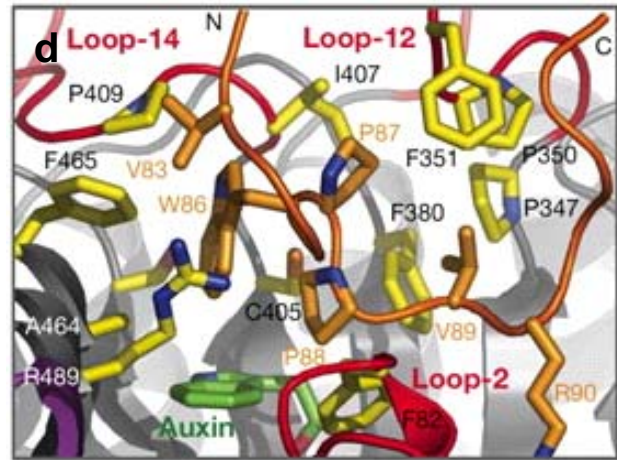
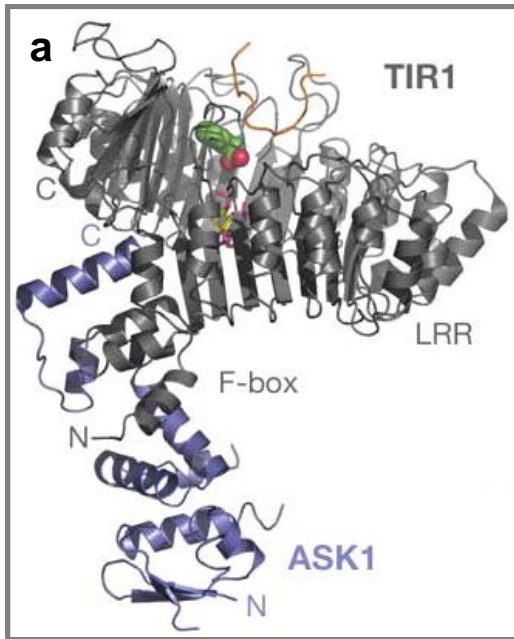


**Figure 4** – (a) Immunoblot anti-Myc. Dans les cinq pistes de gauche, captures de type « pull-down » sur des extraits d'embryons de xénope exprimant la protéine TIR1-Myc en présence de peptide du domaine II et de 1-NAA ou 2-NAA à la concentration de 10 µM comme indiqué. La piste marquée d'un astérisque est un contrôle réalisé avec un extrait d'embryons dans lesquels il n'y a pas eu d'ARNm injecté. Dans les deux pistes de droite, extraits bruts d'embryons de xénope dans lesquels de l'ARNm a ou non préalablement été injecté comme indiqué. (b) Captures de type « pull-down », en présence de 0,1 µM [<sup>3</sup>H]-IAA et avec ou sans 10 µM IAA non marquée comme indiqué, sur des extraits d'embryons de xénope dans lesquels il n'y a pas eu d'ARNm injecté. (c) Captures de type « pull-down », en présence de 0,1 µM [<sup>3</sup>H]-IAA et de concentrations croissantes en IAA non marquée, sur des extraits d'embryons de xénope exprimant TIR1-Myc. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (n=3).



**Figure 5** – Le complexe TIR1-ASK1 est mélangé à différentes quantités de protéine IAA7. Du 2,4-D est ajouté comme il est précisé. Après une heure d'incubation, tous les milieux réactionnels sont mélangés avec du glycérol, déposés sur un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et séparés pendant 2 heures sous une tension de 100 V en tampon Tris-Glycine. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

**Figure 6** – (a) Représentation en ruban de la structure du complexe. Les protéines TIR1 et ASK1, ainsi que le peptide substrat IAA7, sont représentés respectivement en gris, bleu et orange. La F-box et les domaines LRR de TIR1 sont indiqués. L'auxine est représentée en sphères pleines (CPK). La molécule InsP6 co-cristallisée est représentée en modèle bâtons. (b) Vue rapprochée du site de liaison de l'auxine à proximité de la molécule InsP6. La molécule d'auxine (IAA) est représentée en bâtons verts avec sa densité électronique. Les résidus de TIR1 entourant l'auxine sont représentés en bâtons jaunes. Une molécule d'eau est représentée sous forme d'une sphère rouge. Le réseau de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques liant l'auxine et InsP6 est figuré par des lignes pointillées orange. (c) Captures de type « pull-down » en présence (+) ou en absence (-) de 50  $\mu$ M 1-NAA. Les protéines recombinantes purifiées GST-TIR1 sauvages (WT) ou mutantes sont rendues visibles par coloration au bleu de Coomassie (haut). La protéine IAA7 étiquetée Flag précipitée par GST-TIR1 est détectée par western blot avec des anticorps anti-Flag (bas). (d) Vue rapprochée du motif central GWPPV du peptide IAA7 après liaison à TIR1. Les résidus du peptide IAA7 et de la protéine TIR1 sont respectivement représentés en bâtons oranges et jaunes. L'auxine est représentée en bâtons verts. (e) Vue du complexe TIR1-auxine-peptide IAA7. La surface moléculaire de TIR1 est figurée par un maillage gris. La surface moléculaire du peptide IAA7 est figurée en orange, l'auxine est représentée en sphères pleines vertes (CPK). (f) Superposition du site de fixation de la protéine TIR1 en absence ou en présence d'auxine. Les résidus de TIR1 sont représentés en jaune (avec auxine) ou en cyan (sans auxine).





**Sujet n°2**

**Sujet proposé par Régis Ferrière. Version française.**

---

*Les trois parties peuvent être traitées indépendamment.*

**PARTIE A**

- A1. Quand dit-on d'une interaction écologique qu'elle est *symbiotique* ?
- A2. Donner trois exemples d'interactions symbiotiques, en expliquant brièvement les mécanismes au niveau individuel.
- A3. Commenter cette phrase tirée de l'ouvrage de Lynn Margulis et Dorian Sagan, *Microcosmos: Four Billion Years of Evolution from Our Microbial Ancestors* (Summit Books, New York, 1986) : "Life did not take over the globe by combat, but by networking."

**PARTIE B**

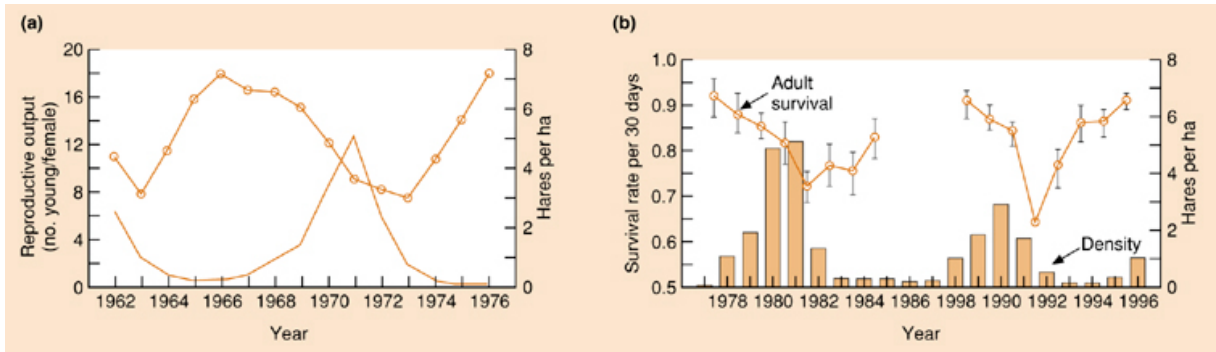
L'introduction d'une espèce exotique peut réduire la diversité d'une communauté.

- B1. Quels sont les mécanismes écologiques potentiellement impliqués dans ce phénomène?
- B2. En quoi la théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie peut-elle aider les gestionnaires des milieux naturels face à ce problème ?

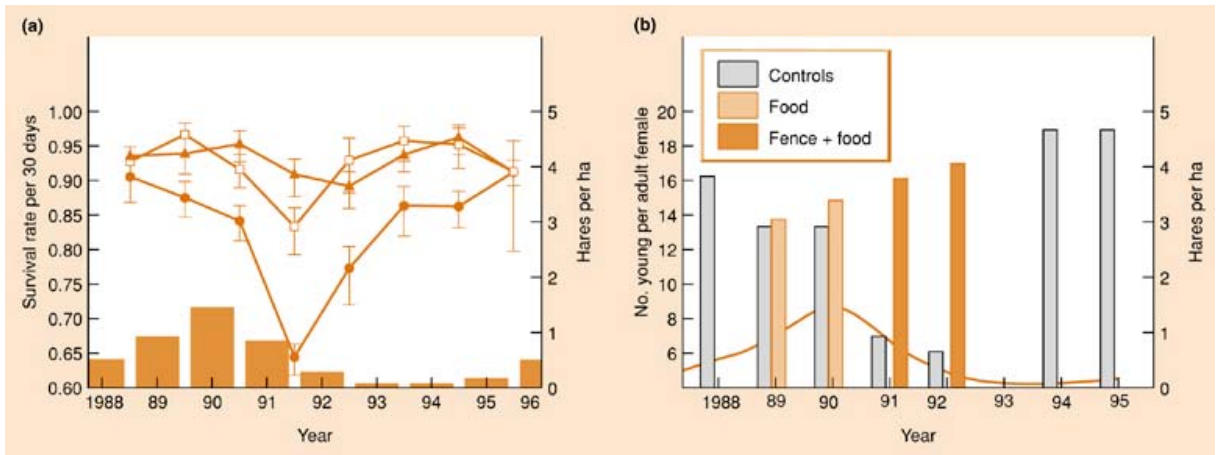
**PARTIE C**

Les données suivantes concernent la dynamique de populations du Lièvre variable au Canada.

C1. La figure (a) ci-dessous représente la dynamique de la densité (courbe continue) du lièvre et la dynamique de sa fécondité (courbe avec ○). La figure (b) représente la dynamique de la densité du lièvre (barres verticales) et la dynamique de la moyenne annuelle (et erreur standard) de la probabilité mensuelle de survie adulte (courbes avec barres d'erreur). Analysez ces résultats et proposez au moins deux hypothèses alternatives pour les expliquer.



C2. La figure (a) ci-après montre la dynamique de la densité d'une population de lièvres (barres verticales), les moyennes annuelles (et erreur standard) de la probabilité mensuelle de survie adulte : dans un site de contrôle (●), dans un site dont sont exclus les prédateurs (□), dans un site dont sont exclus les prédateurs et dont le sol est fertilisé (□). La figure (b) montre la densité d'une population de lièvres (courbe) et la fécondité individuelle annuelle en réponse à deux traitements : fertilisation du sol ("Food"), fertilisation du sol et exclusion des prédateurs ("Fence + Food"). Analysez et interprétez ces résultats.



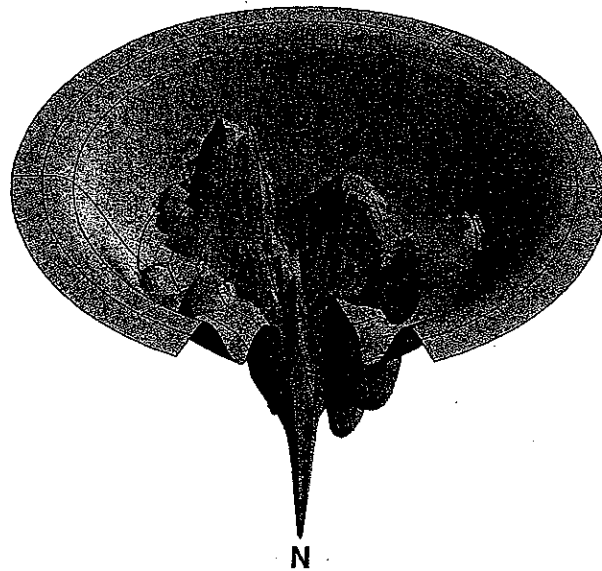
**Lexique:** *Year*, Année. *Reproductive output (no. young/female)*, Reproduction (nombre de jeunes par femelle). *No. young per adult female*, Nombre de jeunes par femelle adulte. *Hares per ha*, Lièvres par hectare. *Survival rate per 30 days*, Taux de survie par trentaine de jours. *Adult survival*, Survie adulte. *Density*, Densité.

(Fin du sujet.)

**Sélection internationale**  
**Sujet de Biologie n°3**

Différents modèles ont été proposés pour rendre compte du repliement des protéines. Aujourd'hui, le modèle privilégié est celui du paysage énergétique, représenté sur la Figure 1 (N est l'état natif; l'axe y correspond à l'énergie libre). Commentez ce modèle. Que nous dit-il sur le repliement des protéines ?

**Figure 1**



Comme cela est représenté sur la Figure 2, la constante de vitesse du repliement varie beaucoup suivant les protéines. Cependant, il existe une relation entre la valeur de cette constante de vitesse et l'ordre de contact relatif des protéines (L'ordre de contact relatif est la distance qui sépare les acides aminés qui sont en contact dans la protéine repliée, divisée par la longueur totale de la protéine). Dans la Figure 2, les cercles noirs représentent les protéines en hélice  $\alpha$ , les carrés les protéines en feuillets  $\beta$ , et les losanges et les triangles les protéines contenant à la fois des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ .

Quelle est la différence de constante de vitesse de repliement entre la protéine qui se replie le plus vite et celle qui se replie le plus lentement ? Quelles sont les caractéristiques structurales d'une hélice  $\alpha$  et d'un feuillet  $\beta$  ? Donnez, si vous les

connaissez, des exemples de protéines appartenant aux trois types structuraux décrits précédemment.

Comparez les vitesses de repliement des différents types de protéines. Peut-on expliquer ces différences ?

Sur la Figure 3 sont représentées deux protéines. A quel type structural appartiennent-elles ? Quelle est celle qui a l'ordre de contact le plus faible ?

Figure 2

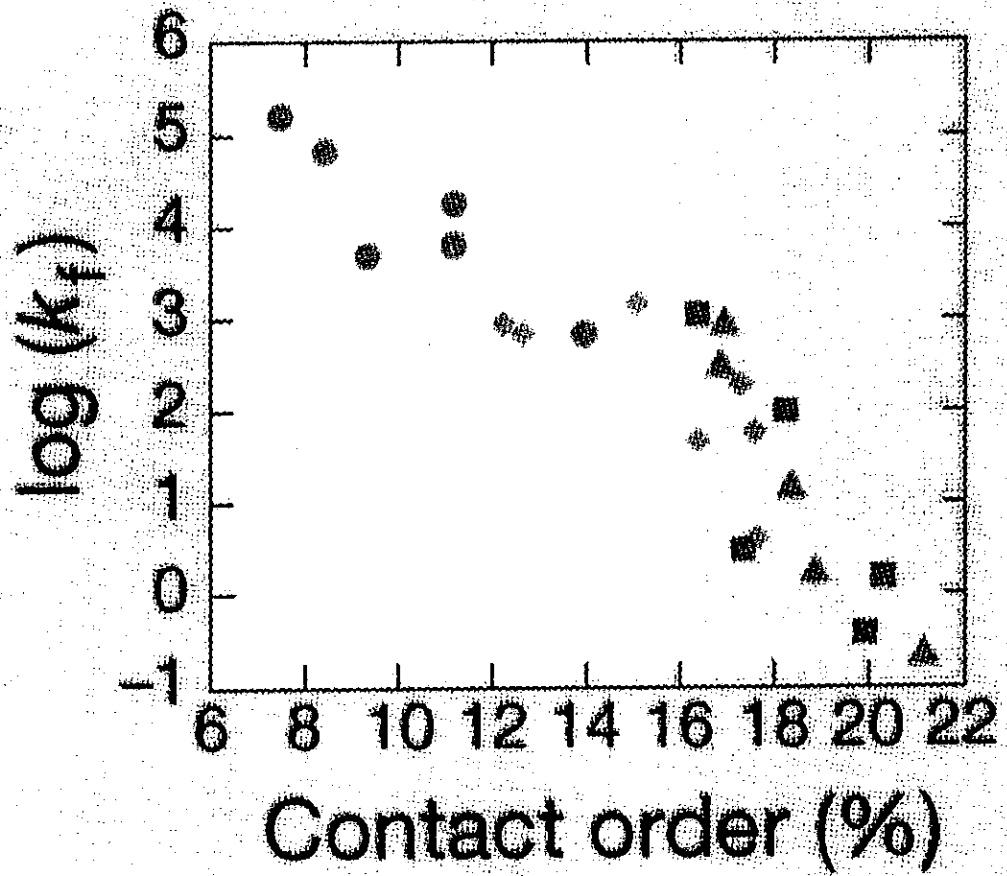
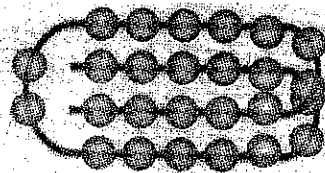
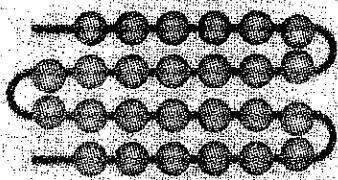


Figure 3



## **Test n°1**

### **Biology Scientific culture assessment**

Auxin is a vital hormone that regulates many aspects of plant development. Experiments conducted in the late 1800s led to the hypothesis that growth responses to light and gravity are regulated by an endogeneous substance later termed auxin. The responsible molecule was identified as indole-3-acetic acid (IAA) in the 1930s. Since then, a fundamental goal of auxin research has been the identification of an auxin receptor.

1 – Auxin induces a specific transcription by targeting for degradation members of the Aux/IAA family of transcriptional repressor proteins. Aux/IAAs can dimerize with, and repress the activity of, transcriptional activators of the auxin response factor (ARF) family of DNA-binding proteins. Thus the degradation of Aux/IAAs leads to the derepression of ARF-mediated transcription.

Aux/IAAs are targeted for degradation by ubiquitination, catalysed by an SCF-type ubiquitin protein ligase (**Figure 1**). Therefore, the interaction between Aux/IAAs and SCF<sup>TIR1</sup> is central to auxin biology. Mutations in Aux/IAAs that severely reduce their interaction with SCF<sup>TIR1</sup> also increase their stability and confer defects in auxin-induced gene expression. All of the Aux/IAA mutations that disrupt the interaction with SCF<sup>TIR1</sup> map to a conserved region known as domain II, which has a hallmark GWPPV amino-acid motif that is recognized by TIR1 in the SCF<sup>TIR1</sup> complex.

**Summarize the auxin signalling pathway using a simple sketch.**

2 – To explore the mechanism by which auxin interacts with SCF<sup>TIR1</sup>, the SCF<sup>TIR1</sup> protein is immunoprecipitated, using anti-Myc antibodies, from extracts prepared from *Arabidopsis tir1-1* mutant plants complemented to transgenically express Myc-tagged TIR1 proteins (*tir1-1[TIR1-Myc]*). Uncomplemented *Arabidopsis tir1-1* mutant plants don't express the TIR1 protein. The immunoprecipitate is then resuspended in extraction buffer and the ability of the recovered proteins to support interaction with a biotinylated Aux/IAA domain II peptide is tested in a pull-down assay. The domain II peptide is recovered on streptavidin-coated agarose beads, and the amount of copurified TIR1-Myc in the presence of natural auxin or various synthetic auxins is determined by western blotting (**Figure 2**). 2,4-D and 1-NAA are active auxin analogs, whereas 2-NAA and BA are used as negative controls.

The domain II peptide has the following sequence : NH<sub>2</sub>-AKAQVVGWPPVRNYRKN-COOH

**Summarize the purification process used in these experiments using a simple sketch.**

**What can be deduced from these experiments as to the role of auxins in the SCF<sup>TIR1</sup>-Aux/IAA interaction ?**

3 – In a first series of experiments radiolabelled auxin ([<sup>3</sup>H]-IAA) is added to pull-down assays from TIR1-Myc-containing plant extracts before quantifying the radioactivity associated to the protein complex in the presence of increasing concentrations of unlabelled auxin (**Figure 3a**). Pull-down assays are performed by combining crude *tir1-1[TIR1-Myc]* seedling extracts and the fusion protein GST-IAA7 immobilized on glutathione-Sepharose beads. IAA7 is a member of the Aux/IAA protein family.

In a second series of experiments auxin binding is quantified in pull-down assays while increasing the level of TIR1-Myc in otherwise identical *tir1-1* mutant seedling extracts. In these experiments [<sup>3</sup>H]-IAA pull-down assays are performed with either *tir1-1* extract (0% TIR1-Myc), two-thirds *tir1-1* extract, one third *tir1-1[TIR1-Myc]* extract (33% TIR1-Myc) or *tir1-1[TIR1-Myc]* extract (100% TIR1-Myc) (**Figure 3b**). Furthermore, no binding of [<sup>3</sup>H]-IAA is observed in control assays performed without seedling extracts.

**Comment on these results.**

**At this stage, which protein or protein complex can be hypothesized to be the auxin receptor ?**

4 – Next TIR1 is expressed in a *Xenopus laevis* embryo expression system. Two-cell *Xenopus* embryos are bilaterally injected with capped TIR1-Myc mRNA. The embryos are harvested at stage 13 and protein extracts are made for use in the pull-down assay presented in **question 2 (Figure 4a)**. Subsequently the [<sup>3</sup>H]-IAA-binding experiments presented in **question 3** are repeated with the use of uninjected or injected *Xenopus* extracts (**Figure 4b,c**).

**Why is it important to use a heterologous system ?**

**Justify the importance of the experiments presented in Figure 4b.**

**What can be concluded as to the auxin receptor identity ?**

5 – The TIR1-IAA7 interaction is subsequently investigated in a native gel shift assay (**Figure 5**).

**Comment on these results.**

**What do they confirm about the role of auxin in the TIR1 – Aux/IAA interaction ?**

6 – The crystal structures of the *Arabidopsis* TIR1-ASK1 complex alone and with auxin as well as with a peptide derived from the IAA7 protein have been determined (**Figure 6**).

The IAA7 peptide has the following sequence : NH<sub>2</sub>-QVVGWPPVRNYRK-COOH

**What kind of interactions are involved in docking auxin to TIR1 and in the binding of the IAA7 peptide to the auxin-bound TIR1 ? Summarize these interactions using a simple sketch and comment on your observations according to the chemical nature of auxin.**

**Discuss the importance of S462 and A464 in the binding of the IAA7 peptide to TIR1.**

**Comment on the conformational changes induced by auxin binding and on the auxin binding contribution to the TIR1-IAA7 peptide interaction.**

**Would you define auxin as an “allosteric effector” or as a “molecular glue” ? Justify your answer.**

**Subsidiary question :**

**Discuss possible pharmacological implications of the results presented considering that numerous human disorders have been associated with defective ubiquitin-ligase-substrate interactions.**

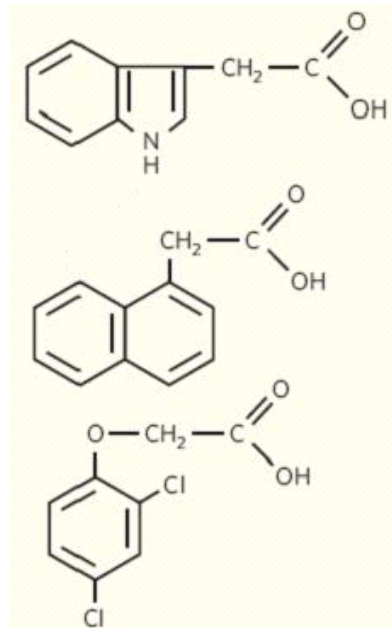


**Annex 1 – Natural and synthetic active auxins**

**IAA**  
(indole-3-acetic acid)

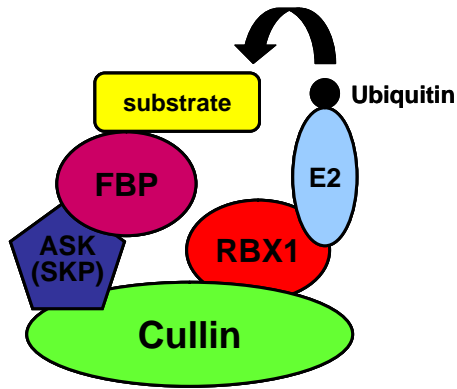
**1-NAA**  
(1-naphtalene acetic acid)

**2,4-D**  
(2,4-dichlorophenoxy-acetic acid)

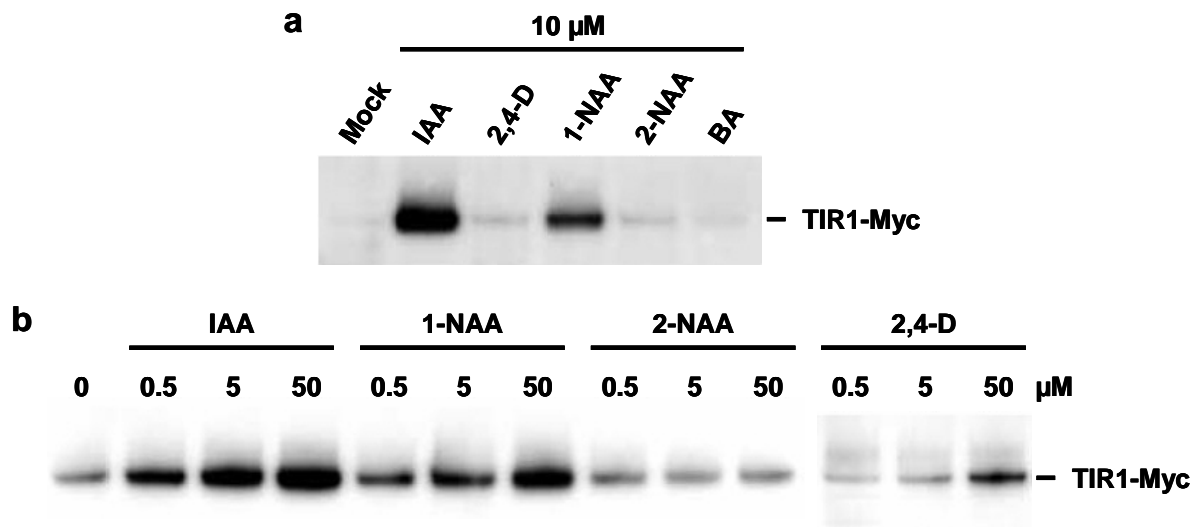


**Annex 2 – Amino acids, one & three letter codes**

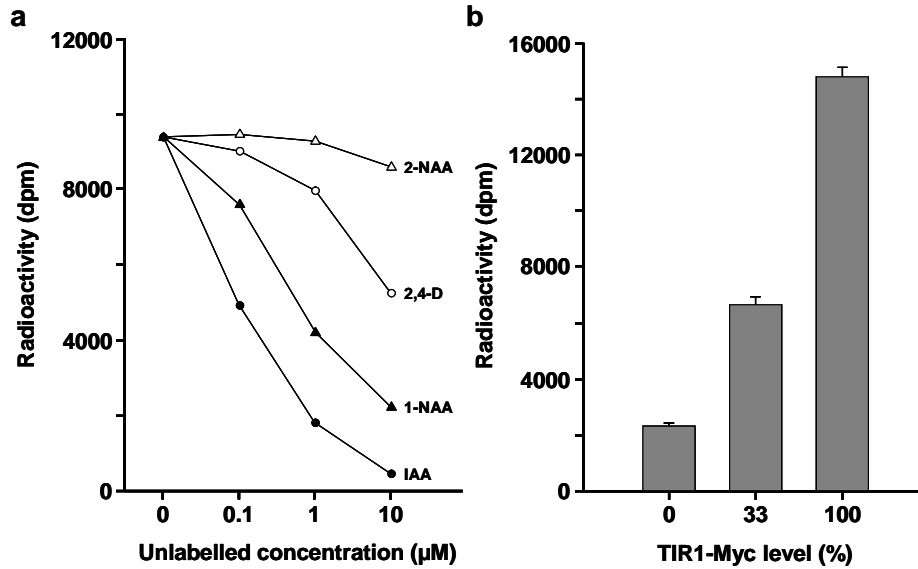
Amino acid	Three letter code	One letter code
alanine	Ala	A
arginine	Arg	R
asparagine	Asn	N
aspartic acid	Asp	D
cysteine	Cys	C
glutamic acid	Glu	E
glutamine	Gln	Q
glycine	Gly	G
histidine	His	H
isoleucine	Ile	I
leucine	Leu	L
lysine	Lys	K
methionine	Met	M
phenylalanine	Phe	F
proline	Pro	P
serine	Ser	S
threonine	Thr	T
tryptophan	Trp	W
tyrosine	Tyr	Y
valine	Val	V



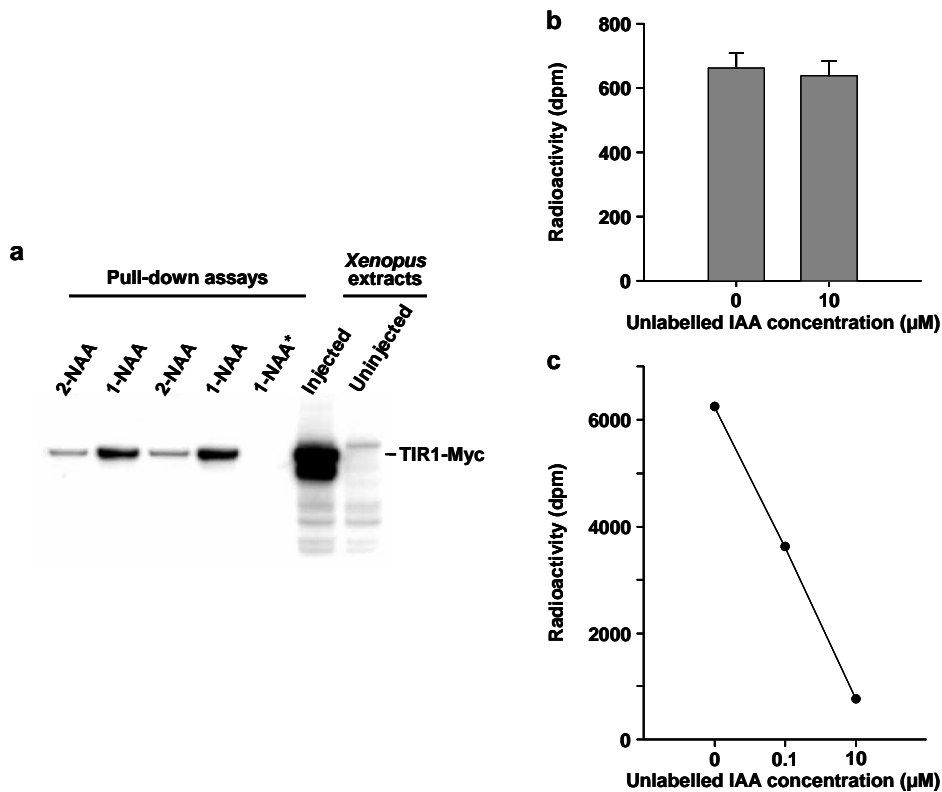
**Figure 1** – The SCF class of ubiquitin protein ligases. The name is derived from three of its four subunits : SKP1 (ASK1 in plants for *Arabidopsis* SKP1), the Cullin, and the E-box protein (FBP). The fourth subunit is the protein RBX1 (for Ring-box 1). SKP1 links the FBP to the Cullin, which in turn interacts with RBX1. The RBX1-Cullin dimer catalyses the transfer of activated ubiquitin from a ubiquitin-conjugating enzyme (E2) to the target protein (substrate). Target specificity is conferred by the FBP, which includes an amino-terminal F-box motif mediating interaction with SKP1, and a carboxy-terminal protein-protein interaction domain involved in target selection. For *Arabidopsis* Aux/IAA targets, the relevant FBP is the leucine-rich repeat (LRR) TIR1 protein and the corresponding SCF<sup>TIR1</sup> ubiquitin protein ligase is known to be involved in auxin signaling.



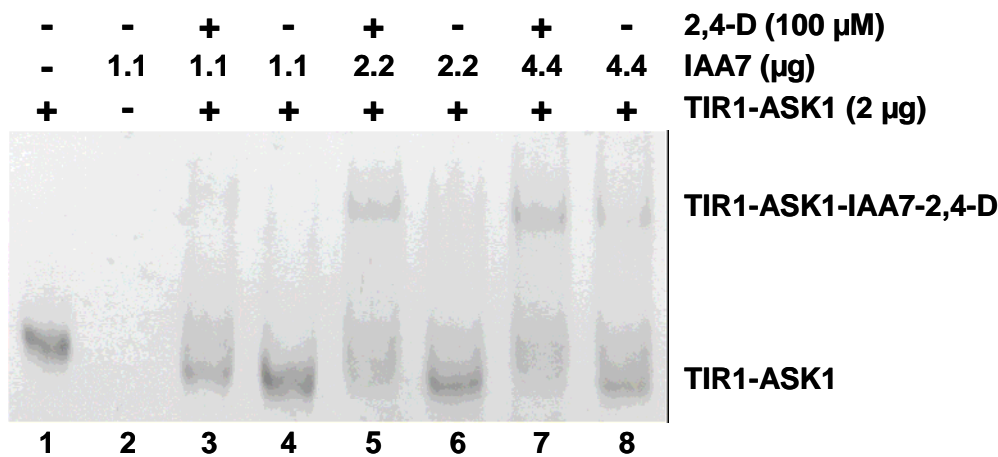
**Figure 2** – (a) Domain II peptide pull-down assays with immunopurified TIR1-Myc in the presence of 10  $\mu$ M IAA, 2,4-D, 1-NAA, 2-NAA or benzoic acid (BA) as indicated. The recovery of TIR1-Myc is assessed by immunoblotting with anti-Myc antibody. (b) As in (a) but showing dose responses for IAA, 1-NAA, 2-NAA and 2,4-D over the concentration range 0 - 50  $\mu$ M as indicated.



**Figure 3** – (a) GST-IAA7 pull-down assays from *tir1-1*[*TIR1-Myc*] seedling extract with the [<sup>3</sup>H]-IAA concentration held constant at 0.1 µM and with increasing concentrations of unlabelled IAA (filled circles), 2,4-D (open circles), 1-NAA (filled triangles) or 2-NAA (open triangles) as indicated. (b) GST-IAA7 pull down-assays from otherwise identical *tir1-1* seedling extracts containing 0.1 µM [<sup>3</sup>H]-IAA and increasing levels of TIR1-Myc as indicated. Error bars indicate s.e.m (n=3).

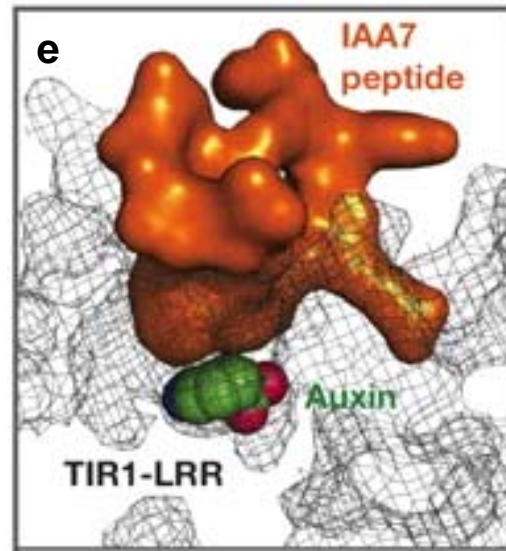
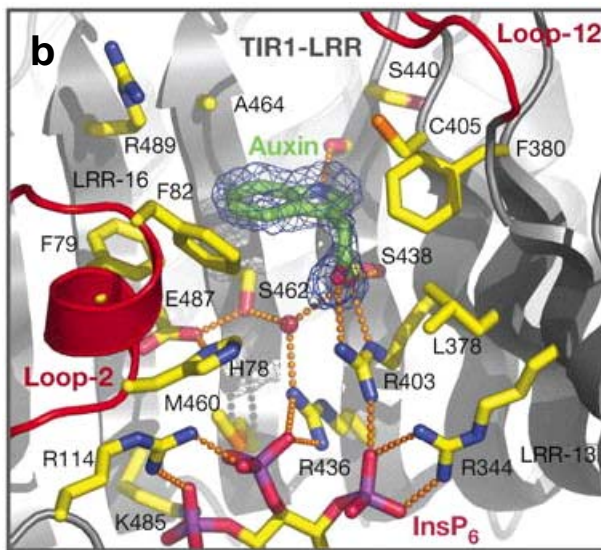
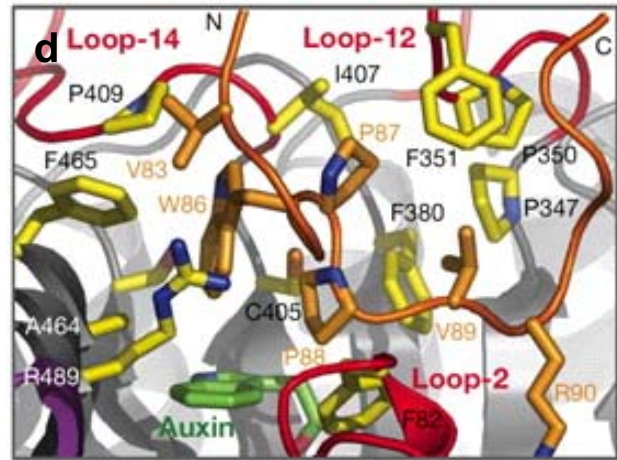
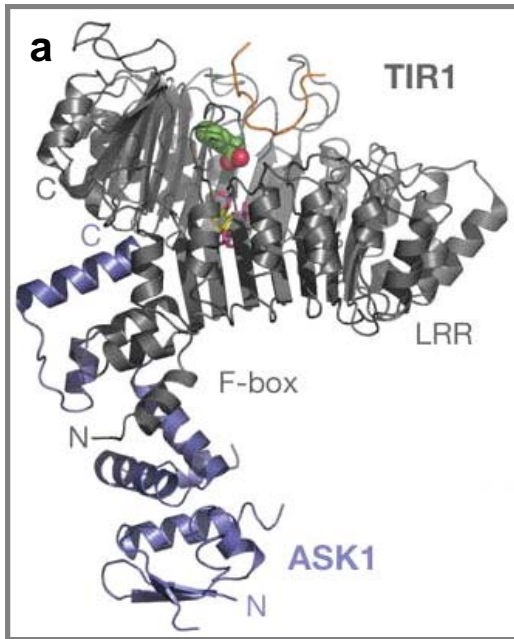


**Figure 4** – (a) Anti-Myc immunoblot. Left five lanes, domain II peptide pull-down assays, in the presence of 10 µM 1-NAA or 2-NAA as indicated, with extracts prepared from *Xenopus* embryos expressing TIR1-Myc. The lane marked with an asterisk is a control pull-down assay with an extract of uninjected embryos. Right two lanes, crude extracts of *Xenopus* embryos either uninjected or injected with capped TIR1-Myc mRNA as indicated. (b) Pull-down assays, in the presence of 0.1 µM [<sup>3</sup>H]-IAA and either with or without 10 µM unlabelled IAA as indicated, with extracts prepared from uninjected *Xenopus* embryos. (c) Pull-down assays, in the presence of 0.1 µM [<sup>3</sup>H]-IAA and increasing concentrations of unlabelled IAA as indicated, with extracts prepared from injected *Xenopus* embryos expressing TIR1-Myc. Error bars indicate s.e.m (n=3).



**Figure 5** – The purified TIR1-ASK1 is mixed with different amounts IAA7. 2,4-D is added where indicated. After 1 hour incubation, all the reactions are mixed with glycerol, loaded on a non-denaturing acrylamide gel and run for 2 hours at 100 V voltage in a Tris-glycine buffer. Coomassie staining is used to visualize the gel.

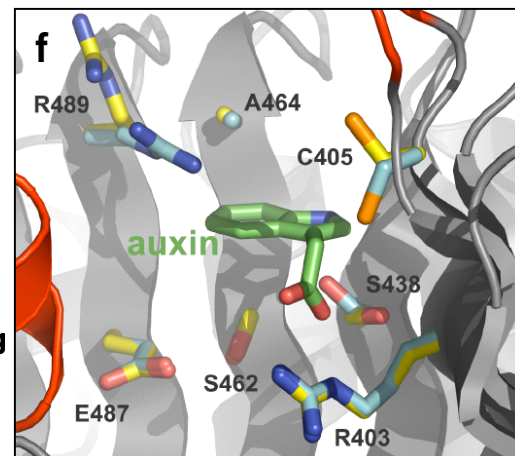
**Figure 6** - (a) A view of the complex structure is shown as a ribbon diagram. TIR1, ASK1 and the IAA7 substrate peptide are coloured grey, blue and orange, respectively. The F-box and LRR domains of TIR1 are labelled. Auxin is represented by a space-filling model (CPK). The co-crystallized InsP6 molecule is shown as a stick model. (b) A close-up view of the auxin-binding site with its nearby InsP6 molecule. The auxin molecule (IAA) is shown as a green stick model, together with its electron density. The TIR1 residues surrounding auxin are shown as a yellow stick model. A water molecule is shown as a red sphere. The hydrogen-bond and salt-bridge network connecting auxin and InsP6 are indicated by orange dashed lines. (c) GST pull-down assay with (+) or without (-) 50  $\mu$ M 1-NAA. In the upper panel, purified recombinant wild-type (WT) or mutants GST-TIR1 are visualized by Coomassie staining. In the lower panel, Flag-tagged IAA7 pulled down by GST-TIR1 is detected by western blot. (d) A close-up side view of the central GWPPV motif in the IAA7 peptide upon binding to TIR1. Interacting residues of the IAA7 peptide and TIR1 are shown as orange and yellow stick models, respectively. Auxin is shown as a green stick model. (e) A slab view of the TIR1-auxin-IAA7 peptide complex. The molecular surface of TIR1 is shown in grey mesh. The IAA7 peptide and auxin are shown in orange surface representation and green CPK, respectively. (f) Superposition of TIR1 in the absence and presence of auxin with a view focusing on the auxin-binding site. TIR1 residues are coloured in yellow (with auxin) and cyan (without auxin).



**c**

TIR1	WT		S462E		A464E		
1-NAA	-	+	-	+	-	+	
GST-TIR1							Coomassie staining
Flag-Aux/IAA7							WB : anti-Flag

GST pull-down



**Test n°2**

**Ecology Test. Questions entered by Régis Ferrière. English version.**

---

*All three parts can be treated independently of each other.*

**PARTIE A**

A1. How are *symbiotic* interactions defined?

A2. Give three examples of symbiotic interactions. For each of them, concisely explain what individual-level mechanisms make them symbiotic.

A3. Comment this sentence from Lynn Margulis and Dorian Sagan's book, *Microcosmos: Four Billion Years of Evolution from Our Microbial Ancestors* (Summit Books, New York, 1986) : "Life did not take over the globe by combat, but by networking."

**PARTIE B**

The introduction of exotic species into a natural community can cause a loss of native species diversity.

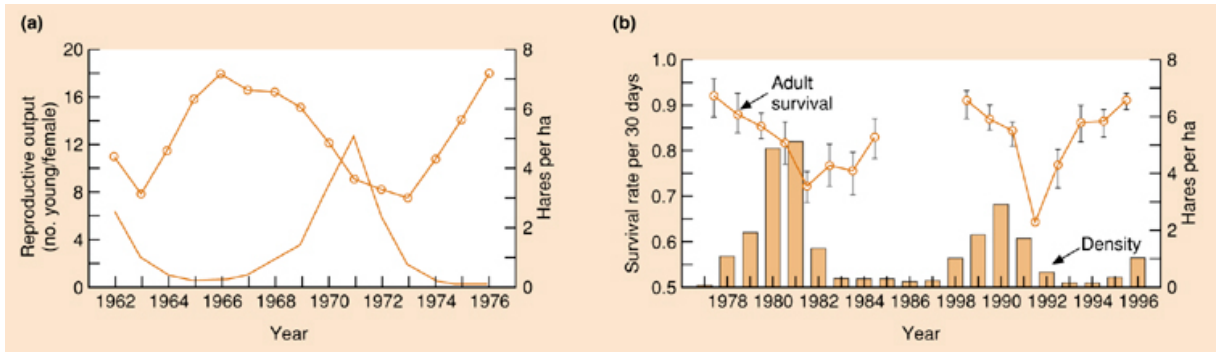
B1. Explain what ecological mechanisms may be involved in this effect.

B2. Explain how life-history theory can help wildlife managers deal with the threat of biodiversity loss caused by exotic invaders.

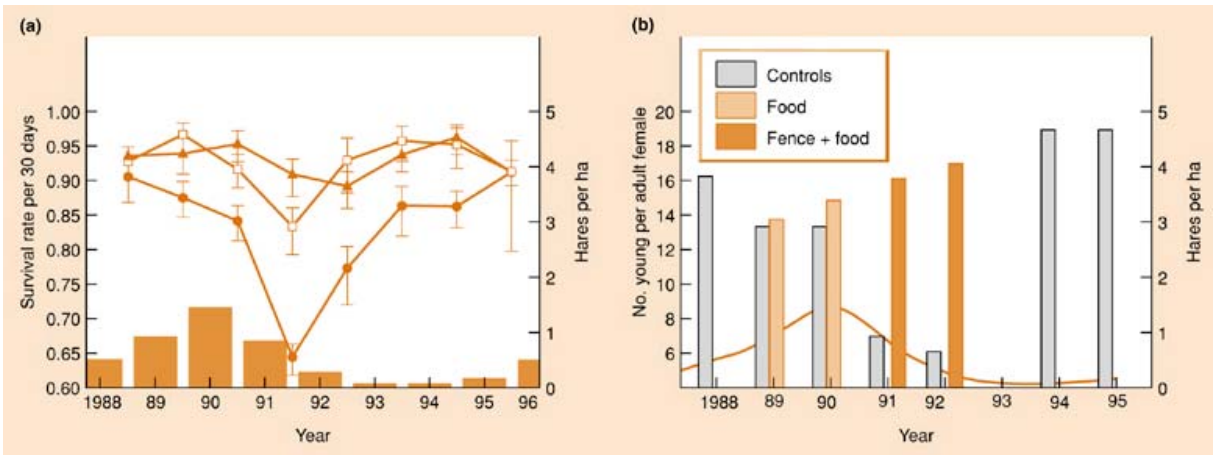
**PARTIE C**

The following data provide information about the dynamics of a population of snowshoe hare in Canada.

C1. Figure (a) below shows the dynamics of hare density (plain curve) and the dynamics of hare fecundity (curve with ○ symbols). Figure (b) shows the dynamics of hare density (vertical bars) and the dynamics of the annual mean (and standard deviation) of monthly survival probabilities for adults (curves with error bars). Describe and comment these results. Propose two alternative hypotheses that could explain them.



C2. Figure (a) below shows the dynamics of hare density (vertical bars) and the dynamics of the annual mean (and standard deviation) of monthly survival probabilities for adults (curves with error bars) : in a control site (●), in an experimental site where predators have been excluded (□), in an experimental site where predators have been excluded and soil has been fertilized (□). Figure (b) shows the dynamics of hare density (plain curve) and the mean individual fecundity in response to two experimental treatments: soil fertilization (bars labeled "Food"), soil fertilization and predator exclusion (bars labeled "Fence + Food"). Describe and comment these results.



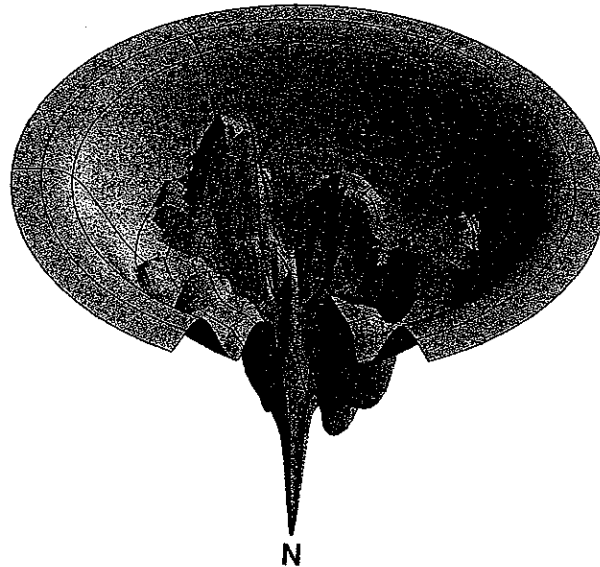
*(End of Ecology Test.)*



Test n°3  
**International selection**  
**Biology**

Different models have been successively proposed to account for protein folding. The model that is privileged today is the energy landscape model shown on Figure 1 (N corresponds to the native state ; y-axis corresponds to the free energy). Comment this model. What does it tell about protein folding ?

**Figure 1**



As shown on Figure 2, the rate of protein folding is highly different from one protein to another. However, there is a relation between folding rates and the relative contact order of proteins (The relative contact order is the average separation along the sequence of residues in physical contact in a folded protein, divided by the length of the protein). On Figure 2, black circles correspond to all-helical proteins, squares to  $\beta$ -sheet proteins, triangles and diamonds to proteins containing both  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets.

What is the difference in folding rates between the protein that folds the most rapidly, and the one that folds the most slowly ?

What are the major structural characteristics of an  $\alpha$ -helix and of a  $\beta$ -sheet? Give examples of proteins belonging to the three different structural families.

Compare the folding rates of the three structural families of proteins. How can you explain these differences?

Two proteins are represented on Figure 3. To what family do they belong? Which one has the highest relative contact order?

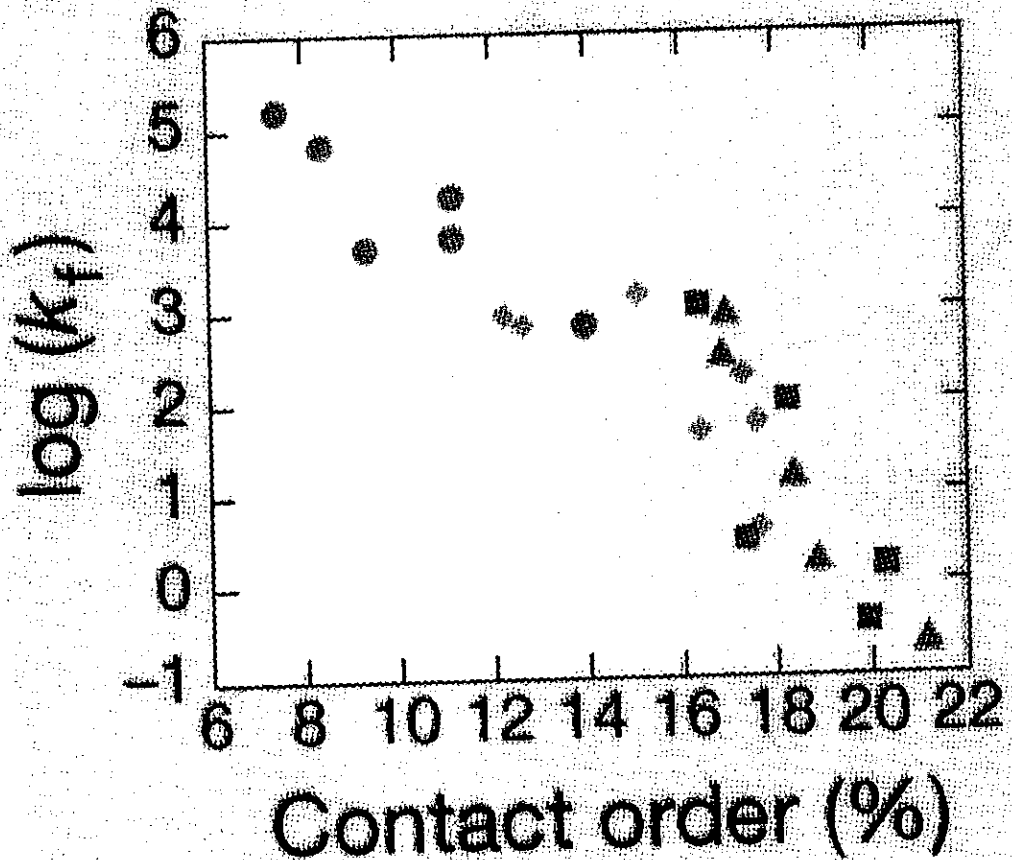


Figure 2



Figure 3