

ULC 541

SESSION 2005

Filière BCPST

BIOLOGIE

Epreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage de calculatrices électroniques de poche à alimentation autonome, non imprimantes et sans document d'accompagnement, est autorisé. Cependant, une seule calculatrice à la fois est admise sur la table ou le poste de travail, et aucun échange n'est autorisé entre les candidats.

Tournez la page S.V.P.

Métabolisme de l'ADN et cycle cellulaire

L'épreuve de biologie qui vous est proposée comporte :

- **un sujet de synthèse (page 3)**
- **trois sujets avec documents** (identifiés par les lettres A, B et C), totalement indépendants, que vous pouvez donc aborder dans l'ordre de votre choix. Les figures relatives à ces trois sujets sont regroupées en annexe.

Sujet	Pages	Thème
A	4 à 11	Contrôle de la mort programmée des cellules par le facteur de transcription NFκB.
B	12 à 17	Etude chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la réplication d'un ADN endommagé.
C	18 à 22	Réponses aux lésions induites par les rayons ultraviolets chez l'Homme.

Il vous est fortement recommandé de bien **gérer votre temps** de composition afin de pouvoir aborder correctement les différentes parties de l'épreuve. Les durées conseillées sont de 1 h 30 pour la synthèse et 4 h 30 pour l'ensemble des analyses de documents.

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

- la justification des raisonnements,
- la clarté, la précision et la concision des réponses et des schémas,
- la construction, l'orthographe, la grammaire et la présentation.

SUJET DE SYNTHÈSE

Le cycle cellulaire chez les eucaryotes.

Vous construirez votre devoir en vous appuyant sur les connaissances acquises sur les cellules somatiques et les cellules germinales chez les animaux, sur les cellules végétatives et les cellules reproductrices chez les végétaux. Vous discuterez l'importance biologique de la division cellulaire tout au long de la vie des organismes.

N. B. : Le contrôle du cycle cellulaire n'est pas demandé.

SUJET A :
***Contrôle de la mort programmée des cellules
par le facteur de transcription NFκB***

**Première partie : Etude des mécanismes d'activation
du facteur de transcription NFκB**

La protéine NFκB (*nuclear factor kappa B*) est un facteur de transcription dont l'activité est hautement régulée. NFκB a tout d'abord été décrit comme un facteur essentiel à la mise en place de la réponse immunitaire. Par la suite, il a été démontré qu'il joue également un rôle important au cours du développement des organismes, intervenant dans de nombreux types cellulaires pour contrôler la prolifération, la différenciation, ainsi que la mort programmée des cellules ou apoptose.

L'inducteur physiologique le plus puissant - et le mieux étudié - de NFκB est le facteur de nécrose des tumeurs (TNF, *tumor necrosis factor*). Le TNF a été découvert chez la souris, comme un facteur sécrété par les macrophages et présentant une forte toxicité vis-à-vis des cellules tumorales. Le TNF est un inducteur d'apoptose : il se lie à son récepteur à la surface des cellules et déclenche, par une cascade complexe d'événements intracellulaires, la mort programmée des cellules ou apoptose. Parallèlement, le TNF lié à son récepteur active NFκB, qui exerce un effet modulateur sur le déroulement de l'apoptose.

En l'absence de TNF, NFκB est associé dans le cytoplasme à une protéine inhibitrice appelée IκB. L'activation du facteur de transcription NFκB en réponse au TNF s'effectue en plusieurs étapes que nous nous proposons d'étudier sur des fibroblastes de souris en culture *in vitro*.

A-1. Une protéine présente dans des extraits acellulaires peut être mise en évidence et quantifiée par immunodétection sur membrane (technique du *Western blot*).

Principe de la technique d'immunodétection sur membrane. Les protéines présentes dans l'échantillon à analyser sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine d'intérêt est détectée sur la membrane grâce à un anticorps spécifique couplé à un enzyme. L'activité de cet enzyme est révélée en présence d'un substrat dont la transformation s'accompagne d'une émission de lumière qui impressionne un film photographique appliqué contre la membrane.

Des fibroblastes sauvages cultivés *in vitro* sont répartis en trois lots équivalents, avant d'être traités par le TNF. Les protéines totales sont extraites des cellules du premier lot au temps zéro, des cellules du second lot après 5 minutes de traitement par le TNF et des cellules du troisième lot après 10 minutes de traitement par le TNF. Chacune des trois préparations de protéines est ensuite séparée en deux fractions équivalentes qui sont analysées par immunodétection sur membrane. Pour les trois préparations, l'immunodétection effectuée sur l'une des deux fractions permet de mettre en évidence l'inhibiteur IκB grâce à un anticorps qui

reconnaît la protéine sous sa forme non phosphorylée, tandis que l'immunodétection effectuée sur l'autre fraction permet de détecter I κ B sous sa forme phosphorylée. I κ B est le substrat d'une protéine kinase spécifique, l'IKK (I κ B kinase), dont l'activité est induite en présence de TNF. La même expérience est réalisée sur des fibroblastes mutants (*mIKK*) dans lesquels l'activité de l'IKK, même après induction par le TNF, est très faible. Les résultats des deux expériences sont présentés sur la figure 1.

Question 1 : Décrivez et analysez les résultats obtenus sur les fibroblastes sauvages.

Question 2 : Comparez ces résultats à ceux obtenus sur les fibroblastes mutants mIKK.

Question 3 : Expliquez quel est le devenir de la protéine I κ B au cours du traitement des cellules par le TNF.

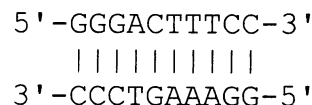
A-2. Des fibroblastes sauvages cultivés *in vitro* sont répartis en huit lots identiques, avant d'être traités par le TNF. Les protéines totales sont extraites des cellules de quatre de ces lots au temps zéro, et après 15, 30 ou 60 minutes de traitement par le TNF. Les protéines nucléaires sont extraites des cellules des quatre autres lots au temps zéro, et après 15, 30 ou 60 minutes de traitement par le TNF. Les huit échantillons de protéines sont ensuite analysés par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps dirigé contre NF κ B. Les résultats sont présentés sur la figure 2.

Question 4 : Décrivez et analysez les résultats obtenus avec les protéines totales et avec les protéines nucléaires extraites des fibroblastes au cours du traitement par le TNF.

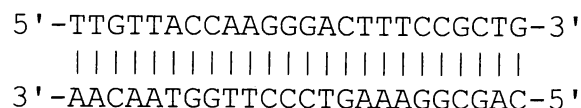
Question 5 : Quel effet le TNF exerce-t-il sur NF κ B ?

Question 6 : Quel lien faites-vous entre cette observation et l'action du TNF sur I κ B dans les fibroblastes sauvages (figure 1) ?

A-3. NF κ B contrôle la transcription d'un grand nombre de gènes en se fixant à l'ADN au sein des promoteurs de ces gènes, au niveau d'une séquence de dix paires de bases qu'il reconnaît spécifiquement :



Les protéines nucléaires de fibroblastes sauvages, traités ou non par le TNF, sont extraites et incubées en présence d'un fragment d'ADN double brin, κ B, purifié et marqué radioactivement pour servir de sonde, dans des conditions où seules les interactions moléculaires spécifiques peuvent s'établir. La séquence nucléotidique du fragment κ B est la suivante :

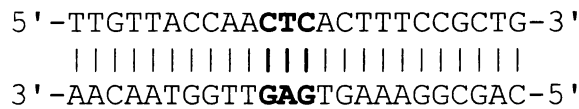


Le mélange d'incubation est ensuite soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant, qui préserve ces interactions. La fixation d'une protéine sur la sonde d'ADN

modifie sa mobilité électrophorétique. A l'issue de l'électrophorèse, le gel est autoradiographié.

La figure 3 montre le résultat obtenu à l'issue des sept incubations effectuées comme indiqué ci-après :

- (1) sonde nucléotidique seule ;
- (2) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes non traités par le TNF ;
- (3) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes traités par le TNF ;
- (4) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes traités par le TNF, incubées en présence d'un grand excès de fragment κB non marqué radioactivement ;
- (5) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes traités par le TNF, incubées en présence d'un grand excès de fragment muté $m\kappa B$ non marqué radioactivement, de séquence :



- (6) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes traités par le TNF, incubées en présence d'immunoglobulines n'ayant aucune affinité pour NF κ B ;
- (7) sonde nucléotidique + protéines nucléaires de fibroblastes traités par le TNF, incubées en présence d'un anticorps dirigé contre NF κ B.

Question 7 : Pourquoi le fragment d'ADN κB utilisé comme sonde se déplace-t-il dans le gel sous l'effet du champ électrique ?

Question 8 : A quoi correspond le signal identifié par la lettre A ? Que révèle la comparaison des profils de migration obtenus dans les pistes 1, 2 et 3 ?

Question 9 : Décrivez et interprétez les profils de migration obtenus dans les pistes 4 et 5.

Question 10 : Interprétez le profil de migration obtenu dans la piste 7. Que pouvez-vous en déduire concernant l'espèce moléculaire B ? Schématisez les espèces moléculaires A, B et C.

Question 11 : Quel effet du TNF est démontré par cette expérience ?

A-4. En présence d'ATP, le facteur de transcription NF κ B peut être phosphorylé, sur son résidu sérine en position 311, par la protéine kinase C. Son état de phosphorylation est étudié, en présence ou en l'absence de TNF, dans des fibroblastes sauvages ou dans des fibroblastes homozygotes dont le facteur NF κ B porte une mutation sur la sérine 311 (substituée par une alanine : mutation S311A). Les fibroblastes sauvages sont répartis en deux lots identiques, dont l'un est traité par le TNF. Les fibroblastes mutants homozygotes *S311A* sont traités par le TNF. Les protéines totales sont extraites de chacun de ces trois lots de cellules. Chaque extrait

La chromatine de fibroblastes de souris contenant le gène κB -Luc, exprimant NF κ B sauvage ou NF κ B mutant S311A, et traités ou non par le TNF, est extraite et soit conservée telle quelle (chromatine totale), soit immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre NF κ B (chromatine immunoprécipitée). Les fragments d'ADN contenant le promoteur du gène κB -Luc sont quantifiés dans les deux échantillons (chromatine totale et chromatine immunoprécipitée). Les résultats sont présentés sur la figure 6.

Question 15 : Décrivez et interprétez les résultats obtenus.

A-7. La protéine p300 est essentielle à l'activation de la transcription de certains gènes mais ne présente aucune affinité pour l'ADN pur. Pour savoir si le facteur de transcription NF κ B interagit *in vivo* avec p300, une expérience de co-immunoprécipitation est réalisée.

Principe de la technique de co-immunoprécipitation. Les protéines totales extraites des cellules dans des conditions qui préservent les interactions protéine-protéine existantes sont immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps Ac1 reconnaissant spécifiquement l'un des partenaires de l'interaction étudiée et fixé sur des billes d'agarose. Les billes sont séparées du mélange, lavées, et les protéines retenues par l'anticorps lié aux billes sont éluées et analysées par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps Ac2 qui reconnaît spécifiquement l'autre partenaire de l'interaction étudiée.

Des fibroblastes sauvages et des fibroblastes mutants homozygotes dont le facteur NF κ B porte la mutation S311A sont traités ou non par le TNF. Les protéines totales sont extraites de ces cellules et réparties en trois fractions égales. Dans chaque cas, la première fraction est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps qui reconnaît NF κ B, qu'il soit phosphorylé ou non, et l'immunoprécipité est analysé par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps dirigé contre p300. La seconde fraction est immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps qui reconnaît NF κ B, qu'il soit ou non phosphorylé, et l'immunoprécipité est analysé par immunodétection sur membrane à l'aide du même anticorps (anti-NF κ B). La troisième fraction est immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps dirigé contre p300 et l'immunoprécipité est analysé par immunodétection sur membrane à l'aide du même anticorps (anti-p300). Les résultats sont présentés sur la figure 7.

Question 16 : Décrivez et interprétez les résultats obtenus.

A-8. La même expérience que celle décrite dans le paragraphe A-6 est réalisée, mais cette fois, l'anticorps utilisé pour immunoprécipiter la chromatine reconnaît spécifiquement l'ARN polymérase II cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 8.

Question 17 : Décrivez et interprétez les résultats obtenus.

Question 18 : En intégrant les réponses apportées aux questions 1 à 17, expliquez et illustrez par un schéma l'ensemble des étapes qui interviennent dans l'activation du facteur NF κ B et la transcription d'un gène cible de NF κ B lors du traitement des fibroblastes sauvages par le TNF. Précisez quelles sont les conséquences de la substitution d'une sérine par une alanine en position 311 du facteur NF κ B dans ce processus.

A-9. Le gène *BCL-XL* code un inhibiteur de l'apoptose. Son promoteur contient la séquence κB . L'expression du gène *BCL-XL* est étudiée dans des fibroblastes sauvages traités ou non par le TNF. Les ARN messagers (ARNm) de ces cellules sont purifiés et analysés par la technique du *Northern blot*. Les ARNm sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose dénaturant puis transférés sur une membrane de nylon. La membrane est incubée avec une sonde nucléotidique radioactive qui s'hybride spécifiquement à l'ARNm du gène *BCL-XL*. La quantité de sonde hybridée à la surface de la membrane est proportionnelle à la quantité d'ARNm du gène *BCL-XL* présente sur cette membrane. Elle est révélée par autoradiographie (figure 9 : *BCL-XL*, en haut). La même expérience est effectuée avec une sonde nucléotidique radioactive complémentaire de l'ARNm qui code la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), un enzyme dont la synthèse est constitutive dans toutes les cellules (figure 9 : *GAPDH*, en bas).

Question 19 : *Décrivez et interprétez les résultats présentés sur la figure 9.*

Question 20 : *Quel lien pouvez-vous faire entre ces résultats et le rôle inducteur d'apoptose du TNF ?*

A-10. Les conséquences physiologiques de l'activation du facteur NF κ B par le TNF ont été étudiées sur des souris transgéniques chez lesquelles les deux allèles du gène qui code NF κ B ont été inactivés (souris homozygotes *NF κ B*^{-/-}). Ces souris meurent au cours du développement embryonnaire du fait de destructions tissulaires massives par apoptose. En revanche, des souris transgéniques *NF κ B*^{-/-} chez lesquelles on a également inactivé les deux allèles du gène qui code le TNF (souris homozygotes *NF κ B*^{-/-} *TNF*^{-/-}) ne présentent aucune destruction tissulaire massive par apoptose et sont viables jusqu'à une quarantaine de jours après la naissance.

Question 21 : *Interprétez les résultats obtenus chez les souris *NF κ B*^{-/-}. Sont-ils en accord avec ceux de l'expérience A-9 ?*

Question 22 : *Interprétez les résultats obtenus chez les souris *NF κ B*^{-/-} *TNF*^{-/-}. Quels sont les effets exercés par le TNF au cours du développement embryonnaire de la souris ?*

Question 23 : *Quelle signification physiologique attribuez-vous à l'action du TNF et à l'activation de NF κ B au cours du développement ?*

Deuxième partie : Action de la doxorubicine sur les cellules cancéreuses

La doxorubicine, une molécule de la famille des anthracyclines, est couramment utilisée pour le traitement d'une grande diversité de cancers. L'action de la doxorubicine est ici étudiée sur des cellules tumorales humaines en culture *in vitro*, les cellules de myélome KBM-5.

A-11. Des cellules KBM-5 cultivées *in vitro* sont réparties en huit lots équivalents qui sont traités par différentes concentrations de doxorubicine. Après 24 heures de traitement, les cellules de chaque lot sont dénombrées sous microscope, en présence de bleu Trypan, un colorant qui permet de distinguer les cellules viables des cellules non viables. Les résultats de ces dénombrements sont présentés sur la figure 10.

Question 24 : Analysez l'effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules KBM-5. Proposez deux hypothèses permettant de rendre compte de cet effet.

A-12. L'activité du facteur NF κ B est étudiée dans les cellules KBM-5 traitées par la doxorubicine. Dans les cellules non traitées, NF κ B est associé dans le cytoplasme à la protéine inhibitrice I κ B. Des cellules KBM-5 sont réparties en six lots identiques et sont traitées par la doxorubicine à la concentration de 50 μ M. Les protéines totales sont extraites des cellules des six lots à différents temps (0, 30 minutes, 1, 2, 4 et 8 heures) après le début du traitement et analysées par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps dirigé contre I κ B. Pour servir de témoin, la même expérience est effectuée avec un anticorps reconnaissant l'actine. Les résultats de ces expériences sont présentés sur la figure 11.

Question 25 : Décrivez et analysez les résultats de l'expérience d'immunodétection effectuée avec l'anticorps anti-I κ B, en précisant le rôle du témoin. Quel effet la doxorubicine exerce-t-elle sur la protéine I κ B ?

Question 26 : Comparez cet effet à celui exercé par le TNF sur I κ B dans les fibroblastes de souris sauvages (paragraphe A-1, figure 1).

A-13. La localisation subcellulaire du facteur NF κ B est analysée dans les cellules KBM-5 traitées par la doxorubicine à la concentration de 50 μ M. Pour cela, deux lots de cellules sont cultivés sur des lamelles de verre. Un lot est traité par la doxorubicine pendant 4 heures, le second lot est non traité. Dans les deux cas, les cellules sont fixées sur les lamelles, perméabilisées, et incubées avec un anticorps fluorescent reconnaissant spécifiquement NF κ B. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence. Les images obtenues sont présentées sur la figure 12.

Question 27 : Indiquez quelle est la distribution subcellulaire du marquage par l'anticorps fluorescent, dans les cellules traitées ou non par la doxorubicine. Que pouvez-vous en déduire quant à l'effet de la doxorubicine sur le facteur NF κ B ?

Question 28 : Quel lien faites-vous entre cette observation et le résultat présenté sur la figure 11 ?

A-14. Des cellules KBM-5 sont traitées pendant 4 heures par différentes concentrations de doxorubicine. Les protéines nucléaires sont extraites de ces cellules à l'issue du traitement. Pour chaque concentration de doxorubicine utilisée, une même quantité de protéines nucléaires est incubée avec la sonde nucléotidique κB et soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant comme précédemment décrit (paragraphe A-3, figure 3). La figure 13 présente l'autoradiographie du gel.

Question 29 : *Analysez ces résultats. Quel effet de la doxorubicine est démontré par cette expérience ?*

A-15. Le dithiocarbamate de pyrrolidine (DTCP) est un inhibiteur chimique qui empêche l'activation du facteur $NF\kappa B$, quel que soit l'inducteur utilisé. L'expérience permettant d'évaluer l'effet de la doxorubicine sur la viabilité cellulaire, telle qu'elle est décrite dans le paragraphe A-11, est répétée, mais cette fois du DTCP est ajouté dans tous les lots de cellules. On observe, dans ces conditions, que le nombre de cellules viables mesuré au bout de 24 heures est identique dans tous les lots (il est égal au nombre de cellules viables obtenu en l'absence de doxorubicine dans l'expérience A-11).

Question 30 : *Que pouvez-vous déduire de cette expérience ?*

Question 31 : *D'après les conclusions tirées des expériences A-11 à A-15, récapitulez en quelques lignes les mécanismes d'action de la doxorubicine sur les cellules KBM-5. Proposez une ou plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'effet exercé par le facteur $NF\kappa B$ dans la réponse des cellules à la doxorubicine.*

Question 32 : *Pour conclure, comparez les rôles joués par $NF\kappa B$ dans la réponse des cellules au TNF (expériences A-1 à A-10) et à la doxorubicine (expériences A-11 à A-15).*

SUJET B :

Etude chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de la réplication d'un ADN endommagé

Même en l'absence de stress, les cellules comportent en permanence des altérations chimiques de l'ADN. Par exemple, l'énergie calorifique libérée par le métabolisme cellulaire est suffisante pour induire plusieurs milliers de dépurinations par génome nucléaire et par jour. La dépurination consiste en l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique établie entre une base purique (A ou G) et un D-ribose. Lorsqu'elle se produit sur un désoxyribonucléotide présent dans une double hélice d'ADN, la dépurination conduit donc à la formation d'un site abasique (figure 14). L'objectif de cette étude est d'analyser les conséquences de la présence d'un site abasique sur le processus de réplication de l'ADN.

B-1. L'ADN polymérase δ (Pol δ) et l'ADN polymérase ζ (Pol ζ) sont deux enzymes essentiels à la réplication du génome nucléaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans un premier temps, on se propose d'étudier l'influence de la présence d'un site abasique sur la réplication de l'ADN par Pol δ et Pol ζ *in vitro*. Deux molécules d'ADN synthétiques, appelées S₁ et S₂, sont utilisées.

S₁ résulte de l'appariement de deux brins :

- un brin long (noté M₁) de 75 nucléotides (*cf.* figure 15), non radioactif,
- un brin court (noté A₁*) de 29 nucléotides, radioactif, complémentaire des 29 nucléotides situés en 3' du brin long.

S₂ résulte de l'appariement du même brin court (A₁*) avec un brin long, noté M₂, identique à M₁, exception faite de la présence d'un site abasique en position +45 (*cf.* figure 15).

Question 33 : *Schématisez la structure des molécules d'ADN synthétiques S₁ et S₂.*

L'ADN S₁ est incubé pendant 5 minutes à 30°C en présence des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dXTP) et d'une ADN polymérase purifiée, Pol δ ou Pol ζ . Les concentrations des dXTP ne sont pas limitantes, et la durée d'incubation est très supérieure au temps nécessaire à la synthèse d'un polymère de 75 nucléotides par chacune des deux ADN polymérases utilisées. A l'issue de la synthèse, les brins d'ADN sont séparés par chauffage, puis les molécules d'ADN monocaténaire radioactif sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'autoradiographie du gel est présentée sur la figure 16a.

Question 34 : *Expliquez succinctement le principe de l'électrophorèse et de l'autoradiographie.*

Question 35 : *A quoi correspondent les espèces moléculaires I et II repérées sur la figure 16a ? Comment sont-elles obtenues ?*

L'ADN S_2 est incubé, dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de Pol δ , de Pol ζ ou d'un mélange de Pol δ et de Pol ζ . La figure 16b présente le résultat obtenu après électrophorèse et autoradiographie du gel. On montre par ailleurs qu'en présence de Pol δ seule, le brin d'ADN radioactif le plus long comporte dans 95% des cas une adénosine à son extrémité 3'-terminale.

Question 36 : Quelle est la conséquence de la présence d'un site abasique sur la réaction catalysée par Pol ζ ?

Question 37 : Quelle est la conséquence de la présence d'un site abasique sur la réaction catalysée par Pol δ ?

Question 38 : Quel produit est obtenu après incubation de l'ADN S_2 avec Pol δ et Pol ζ ? Expliquez les interventions respectives des deux ADN polymérases permettant l'obtention de ce produit.

B-2. Afin de mieux caractériser le rôle de Pol ζ , on réalise l'expérience ci-après qui se déroule en trois temps :

- 1- L'ADN monocaténaire M_2 est apparié avec l'un des ADN monocaténaires A_2^* , A_3^* , A_4^* ou A_5^* (figure 17). Les quatre ADN monocaténaires A_2^* à A_5^* sont radioactifs et présentent la même radioactivité spécifique. Ils ont une longueur de 45 nucléotides, sont complémentaires des 44 nucléotides 3'-terminaux de M_2 , et ne divergent que par la nature du nucléotide situé à leur extrémité 3'.
- 2- L'ADN polymérase ζ est incubée en présence de chacun des ADN hybrides.
- 3- Une concentration définie de dTTP est ajoutée au milieu réactionnel. Le dTTP est le seul nucléoside triphosphate présent. Après 1 minute d'incubation, la réaction est arrêtée, et les produits radioactifs sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une autoradiographie. Pour chaque ADN synthétique, l'expérience est réalisée avec différentes concentrations de dTTP. L'autoradiographie du gel est présentée sur la figure 18.

Question 39 : A quelles espèces moléculaires correspondent les différentes bandes visibles sur l'autoradiographie ? Comment sont-elles obtenues ?

Question 40 : Expliquez comment il est possible, à partir de cette expérience, de déterminer, pour chaque ADN synthétique, la constante de Michaelis (K_M) de Pol ζ pour le dTTP et la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction.

Les valeurs de K_M et de V_{max} , déterminées à partir de l'expérience présentée sur la figure 18, sont reportées dans le tableau 1 (page suivante).

Tableau 1 : Valeurs de K_M et de V_{max} déterminées à partir de l'expérience présentée sur la figure 18. La vitesse maximale est exprimée en unités arbitraires de radioactivité (ua) par minute.

ADN radioactif apparié à M_2	K_M (μM) pour le dTTP	V_{max} (ua.min ⁻¹)
A_2^*	6,5	12,0
A_3^*	2,3	13,0
A_4^*	49,0	6,8
A_5^*	21,0	8,4

Question 41 : Calculez l'efficacité catalytique (V_{max}/K_M) obtenue avec chaque type d'ADN synthétique.

Question 42 : Quelle est l'influence du nucléotide positionné face au site abasique sur l'efficacité catalytique de Pol ζ ?

B-3. Les expériences présentées dans les paragraphes B-1 et B-2 permettent d'évaluer l'influence de la présence de certaines lésions de l'ADN sur le processus de réplication.

Question 43 : Dans l'hypothèse où les conclusions tirées de cette étude *in vitro* s'appliquent également *in vivo*, expliquez pourquoi le phénomène que vous venez d'étudier permet une tolérance des sites abasiques lors de la réplication de l'ADN.

In vivo, ces lésions sont normalement réparées par des enzymes cellulaires avant la réplication de l'ADN.

Question 44 : Toujours dans l'hypothèse où les conclusions tirées de cette étude *in vitro* s'appliquent également *in vivo*, imaginez quelle conséquence peut avoir un dysfonctionnement des systèmes de réparation de l'ADN.

B-4. Le méthyl-méthane-sulfonate (MMS) est un agent alkylant qui pénètre dans les cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* et modifie chimiquement les bases des désoxyribonucléotides de l'ADN. Dans des cellules sauvages, ces lésions sont réparées efficacement par un mécanisme non mutagène, la voie de réparation par excision de base (REB), qui permet d'obtenir un ADN non muté. Néanmoins, il arrive que certaines de ces lésions ne soient pas réparées par la voie REB. Nous nous proposons à présent d'étudier *in vivo*, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les conséquences de la présence d'un site abasique non réparé.

Les cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être cultivées en suspension en milieu liquide, ou sous forme de colonies à la surface d'un milieu de culture solide (gélosé). Chaque colonie correspond à un clone, c'est-à-dire à un ensemble de cellules génétiquement identiques, obtenues par mitoses à partir d'une seule cellule.

Dans les expériences qui suivent, quatre souches de levure haploïdes sont utilisées (Sc1, Sc2, Sc3 et Sc4). Leurs génotypes sont précisés dans le tableau 2.

Tableau 2. Génotype des souches de levure haploïdes utilisées.
Les gènes sont notés en lettres majuscules et en italique. Un allèle écrit avec un exposant + est un allèle sauvage. Un allèle noté avec un exposant - est un allèle non fonctionnel.

	Souches	Génotypes
souche sauvage	Sc1	<i>CAN1</i> ⁺ <i>APN</i> ⁺ <i>POL32</i> ⁺
souches mutantes	Sc2	<i>CAN1</i> ⁺ <i>APN</i> ⁻ <i>POL32</i> ⁺
	Sc3	<i>CAN1</i> ⁺ <i>APN</i> ⁺ <i>POL32</i> ⁻
	Sc4	<i>CAN1</i> ⁺ <i>APN</i> ⁻ <i>POL32</i> ⁻

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le gène *CAN1* code une perméase (Can1) essentielle au transport de l'arginine du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des cellules. La protéine Can1 est également essentielle au transport de la canavanine, un analogue de l'arginine exerçant un effet cytotoxique lorsqu'il pénètre dans les cellules.

On dispose d'une culture liquide de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* sauvages (Sc1). Une fraction de cette culture est prélevée et les cellules sont réparties sur une boîte de culture contenant de la canavanine à une concentration toxique. Après 4 jours d'incubation à 30°C, on observe la présence de clones sur le milieu de culture gélosé.

Question 45 : Prédisez la sensibilité à la canavanine d'une cellule sauvage (*CAN1*⁺) et d'une cellule dans laquelle le gène *CAN1* est inactif (*CAN1*⁻). Quel est le génotype des cellules présentes dans les clones obtenus en présence de canavanine ?

10⁸ cellules sauvages Sc1 sont incubées pendant 20 minutes à 30°C en présence de MMS puis la totalité de la préparation est étalée sur une boîte de milieu gélosé contenant de la canavanine à une concentration toxique. Après 4 jours d'incubation à 30°C, on dénombre 1020 clones. Lorsque la même expérience est conduite à partir de 10⁸ cellules sauvages en omettant l'agent alkylant, neuf clones sont obtenus.

Question 46 : Analysez et interprétez ces résultats.

B-5. Dans une cellule sauvage, l'ADN modifié par le MMS est réparé majoritairement par excision de base, processus qui se déroule en cinq étapes (figure 19) :

- 1- la base modifiée (repérée par une étoile dans la figure 19) est éliminée par hydrolyse de la liaison covalente entre la base et le pentose, ce qui conduit à la formation d'un site abasique (repéré par un losange vide) ;
- 2- un enzyme, appelé Apn, reconnaît le site abasique et hydrolyse la liaison phosphoester située en 5' du site abasique (flèche droite) ;
- 3- l'ADN polymérase ϵ synthétise un brin d'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3'OH ainsi générée, déplaçant le brin qui comporte le ribose abasique ;
- 4- le brin déplacé est excisé par l'endonucléase Rad27 ;
- 5- l'ADN ligase Cdc9 rétablit la continuité du brin réparé en catalysant la formation de la liaison phosphoester manquante (repérée par une flèche courbe).

La souche de levure haploïde Sc2 présente un gène *APN* (codant la protéine Apn) inactif (cf. tableau 2). Lorsqu'elles sont traitées par le MMS, les cellules mutantes Sc2 présentent environ 100 fois plus de sites abasiques que des cellules sauvages Sc1 traitées dans les mêmes conditions.

Question 47 : La voie REB est-elle fonctionnelle dans la souche Sc2 ? Pourquoi le nombre de sites abasiques est-il plus élevé dans la souche Sc2 que dans la souche Sc1 ?

10^8 cellules mutantes Sc2 sont incubées pendant 20 minutes à 30°C en présence de MMS. Une fraction de la culture, correspondant au 100^{ème} des cellules, est étalée sur une boîte de culture contenant de la canavanine à une concentration toxique. Après 4 jours d'incubation à 30°C, on dénombre 1318 clones.

Question 48 : En vous appuyant sur les conclusions de la question 44, analysez et interprétez ce résultat.

La séquence nucléotidique du locus *CAN1* des clones ainsi sélectionnés a été déterminée. Les clones 1 et 2 mentionnés sur la figure 20b portent le type de modification génétique le plus souvent observé.

Question 49 : En vous référant à la séquence du gène CAN1 sauvage (figure 20a) et au tableau qui présente le code génétique (figure 20c), prédisez l'effet, sur la séquence de la protéine Can1, des modifications génétiques mises en évidence dans les clones 1 et 2. Ces observations sont-elles conformes aux hypothèses que vous aviez formulées en répondant à la question 44 ?

Moins fréquemment, d'autres modifications génétiques sont obtenues, dont celles portées par les clones 3 et 4 mentionnés sur la figure 20b.

Question 50 : Prédisez l'effet, sur la séquence de la protéine Can1, des modifications génétiques mises en évidence dans les clones 3 et 4.

B-6. Pol δ est une ADN polymérase multimérique dont une des sous-unités (Pol32) est codée par le gène non essentiel *POL32*. En l'absence de Pol32, une ADN polymérase δ incomplète est présente dans les cellules. La souche de *Saccharomyces cerevisiae* Sc3 comporte un gène *POL32* inactif ; la souche Sc4 comporte des gènes *APN* et *POL32* inactifs (cf. tableau 2). 10^8 cellules mutantes Sc3 sont incubées pendant 20 minutes à 30°C en présence de MMS puis la totalité de la préparation est étalée sur une boîte de milieu gélosé contenant de la canavanine à une concentration toxique. Après 4 jours d'incubation à 30°C, on dénombre 802 clones. Lorsque la même expérience est réalisée à partir de 10^8 cellules mutantes Sc4, 927 clones sont obtenus.

Question 51 : Présentez dans un tableau les taux de mutations obtenus avec chacune des souches. Quel rôle de Pol32 est suggéré par ces expériences ?

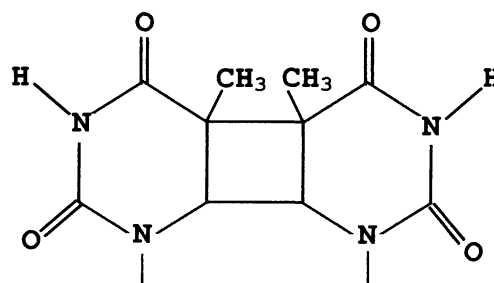
Question 52 : Les conclusions de ces expériences sont-elles en accord avec celles que vous aviez formulées lors de l'étude in vitro de la réplication d'un site abasique ? Justifiez votre réponse.

B-7. Les études réalisées sur les cellules procaryotes ont permis d'énoncer la " règle du A " : " La machinerie de réplication incorpore préférentiellement une adénosine face à un site abasique non réparé ".

Question 53 : D'après l'ensemble des conclusions tirées des expériences B-1 à B-6, pensez-vous que cette règle s'applique également à un eucaryote comme Saccharomyces cerevisiae ? Justifiez votre réponse.

SUJET C :
***Réponses aux lésions induites par
les rayons ultraviolets chez l'Homme***

Les rayons ultraviolets (UV) sont capables d'endommager l'ADN. Un des principaux effets des UV est de conduire à la formation de dimères de thymine (dont la formule est donnée ci-contre), qui sont responsables d'un blocage des processus de transcription et de réplication de l'ADN. Dans ce sujet, on étudie le rôle de la protéine ATR dans la détection des dommages induits par de faibles doses d'UV (UV-C d'intensité inférieure ou égale à 20 J.m^{-2}) et le recrutement de la machinerie de réparation. La protéine ATR est une protéine kinase qui phosphoryle ses substrats sur des résidus sérines ou thréonines. La caféine est un inhibiteur spécifique de la protéine ATR.



**Formule développée d'un
dimère de thymine**

C-1. Des cellules humaines cultivées *in vitro* sont ensemencées sur deux lamelles de verre à la surface desquelles elles adhèrent. Les cellules des deux lots sont incubées 16 heures en présence d'hydroxyurée, un inhibiteur de la réplication de l'ADN ; l'hydroxyurée est présente pendant toute la durée de l'expérience. Une des deux lamelles est soumise à une irradiation par les UV. Immédiatement après, les cellules sont incubées pendant 3 heures en présence de thymidine tritiée ; ce nucléoside radioactif pénètre dans les cellules, où il permet la synthèse de dTTP radioactif. Les cellules sont fixées, lavées de manière à éliminer les désoxyribonucléotides libres et autoradiographiées (figure 21). Des « grains » ou « foyers » radioactifs sont alors révélés.

Question 54 : *Dans ces conditions, la radioactivité détectée rend compte des processus de réparation de l'ADN. Justifiez-le d'après le protocole de marquage.*

Question 55 : *Analysez et interprétez les images obtenues.*

La même expérience est conduite, mais en ajoutant ou non de la caféine préalablement à l'irradiation par les UV. On détermine, pour chaque condition expérimentale, le nombre de foyers radioactifs par cellule ; les résultats sont reportés dans le tableau 3.

Tableau 3. Dénombrement des grains radioactifs par cellule dans différentes conditions expérimentales.

Condition expérimentale n°	1	2	3	4
Irradiation par les UV	non	oui	non	oui
Traitement par la caféine	non	non	oui	oui
Nombre moyen de foyers radioactifs par cellule	2	220	4	40

Question 56 : *A partir de l'analyse de ces résultats, quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer le rôle de la protéine ATR dans la réponse cellulaire aux UV ?*

C-2. La protéine ATR pure est incubée en présence d'ADN bicaténaire linéaire ou circulaire. Une expérience témoin, dans laquelle la protéine ATR est omise, est également réalisée. Les échantillons sont ensuite analysés directement par microscopie électronique, qui permet de visualiser les objets présents dans un échantillon grâce à leur densité électronique. Les images obtenues sont présentées figure 22.

Question 57 : *Décrivez les images et identifiez les différents objets visibles.*

Question 58 : *Quelle propriété de la protéine ATR est révélée par cette expérience ?*

C-3. Un anticorps reconnaissant la protéine ATR est fixé de manière covalente sur des billes d'agarose. Les billes ainsi recouvertes sont incubées en présence de protéine ATR purifiée. Après 4 heures d'incubation à 4°C, les billes sont récupérées et lavées.

Question 59 : *Schématisez les protéines présentes sur les billes avant et après incubation avec la protéine ATR.*

Les billes ainsi préparées sont ensuite incubées en présence d'un excès de l'un des deux ADN bicaténaires radioactifs (ADN₁ et ADN₂) décrits sur la figure 23. Ces deux ADN diffèrent uniquement par la présence ou l'absence d'un dimère de thymine. Après 30 minutes d'incubation à 30°C, les billes sont lavées, et la radioactivité qui leur est associée est quantifiée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 (page suivante), lignes 1 et 2. La même expérience est réalisée en omettant la protéine ATR (tableau 4, lignes 3 et 4).

Tableau 4. Etude *in vitro* de l'interaction d'ATR avec un ADN synthétique endommagé ou non. La radioactivité associée aux billes est exprimée en unités arbitraires.

Conditions expérimentales			Radioactivité
1	+ ATR	ADN ₁	34
2	+ ATR	ADN ₂	100
3	- ATR	ADN ₁	16
4	- ATR	ADN ₂	17

Question 60 : *Pour chaque condition expérimentale, expliquez à quoi correspond la radioactivité retenue sur les billes ? Illustrez-le à l'aide d'un schéma.*

Question 61 : *Quelles conclusions pouvez-vous tirer de cette expérience ?*

C-4. La protéine p53 est une protéine clé dans la réponse cellulaire aux UV ; des études ont montré que la protéine p53 est un substrat de la protéine kinase ATR. On étudie *in vitro* la phosphorylation de p53 par ATR, en présence d'une molécule d'ADN bicaténaire non endommagée (ADN₁) ou endommagée (ADN₂). Après 30 minutes d'incubation à 30°C en présence d'ATP radioactif, les différents constituants sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. L'autoradiographie du gel est présentée sur la figure 24.

Question 62 : *Quel phosphate de l'ATP doit être marqué radioactivement pour que l'on puisse, par cette expérience, analyser la phosphorylation de p53 ?*

Question 63 : *Analysez et interprétez les résultats présentés sur la figure 24.*

Question 64 : *D'après les propriétés de la protéine ATR révélées jusqu'à présent par cette étude, proposez un modèle synthétisant le rôle de la protéine ATR dans la réponse cellulaire aux UV.*

C-5. On étudie à présent les relations entre la protéine kinase ATR et p21, une protéine indispensable à la réparation de l'ADN endommagé par les UV. Dans un premier temps, on étudie l'effet des UV sur la concentration intracellulaire de p21 grâce à une analyse par immunodétection sur membrane.

Principe de la technique d'immunodétection sur membrane. Les protéines présentes dans l'échantillon à analyser sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La protéine d'intérêt est détectée sur la membrane grâce à un anticorps spécifique couplé à un enzyme. L'activité de cet enzyme est détectée en présence d'un substrat dont la transformation s'accompagne d'une émission de lumière qui impressionne un film photographique appliqué contre la membrane.

Pour analyser l'effet des UV sur la concentration intracellulaire de la protéine p21, des cellules humaines en culture *in vitro* sont réparties en quatre lots équivalents. Le premier lot de cellules ne subit aucun traitement. Le deuxième lot de cellules est soumis à une dose de rayons ultraviolets d'intensité 20 J.m^{-2} . Les troisième et quatrième lots de cellules sont traités de la même façon que les lots 1 et 2 respectivement, mais de la caféine est ajoutée dans les cultures. Les cellules maintenues en culture pendant six heures sont ensuite lysées. Les protéines de chaque extrait sont analysées par immunodétection sur membrane. L'analyse est menée en parallèle avec un anticorps dirigé contre la protéine p21 et avec un anticorps dirigé contre l'actine. Des études antérieures ont permis de montrer que la concentration intracellulaire d'actine n'est pas affectée par le traitement préalable des cellules par les UV ou par la caféine dans les conditions utilisées pour cette expérience. Le résultat des immunodétections sur membrane est présenté sur la figure 25.

Question 65 : Analysez et interprétez ces résultats.

C-6. Des cellules humaines en culture *in vitro* sont traitées par la cycloheximide. A différents temps après le début du traitement, une fraction des cellules est récupérée et la concentration intracellulaire de protéine p21 est analysée par immunodétection sur membrane. Les résultats sont présentés sur la figure 26a, panneau supérieur. La courbe représentant l'intensité des bandes en fonction du temps est également donnée (figure 26b, cercles vides). La cycloheximide est une molécule qui pénètre dans les cellules et inhibe la traduction des ARN messagers : dans les conditions de l'expérience, l'inhibition de la synthèse protéique est immédiate.

Lorsque les cellules sont irradiées aux UV (20 J.m^{-2}) juste avant le traitement par la cycloheximide, on obtient les résultats présentés sur la figure 26a, panneau inférieur et sur la figure 26b (cercles pleins).

Question 66 : Expliquez en quoi ce protocole expérimental permet d'étudier la dégradation de la protéine p21. Déterminez le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de la protéine p21 dans chacune des conditions.

Question 67 : Analysez et interprétez les résultats de ces deux expériences.

C-7. La localisation subcellulaire de la protéine p21 est analysée par immunofluorescence. Des cellules humaines sont cultivées sur deux lamelles de verre. Une des deux lamelles est soumise à une irradiation par les UV. Les cellules sont ensuite analysées par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine p21. Les cellules sont également incubées en présence d'iodure de propidium, une molécule fluorescente s'intercalant dans l'ADN. Les images obtenues après observation des cellules avec un microscope à fluorescence sont présentées sur la figure 27.

Question 68 : Que pouvez-vous dire de la localisation subcellulaire de p21 en l'absence d'irradiation par les UV ?

Question 69 : Commentez l'effet des UV. Ce résultat est-il en accord avec les conclusions de l'expérience C-6 ? Justifiez votre réponse.

C-8. Deux vecteurs recombinants, appelés V_1 et V_2 , sont construits :

- le vecteur V_1 permet l'expression, dans les cellules humaines, d'une protéine p21 étiquetée, notée p21-HA. Il comporte en effet la séquence codante de p21 fusionnée à une séquence codant une étiquette de 10 acides aminés (étiquette HA).
- le vecteur V_2 permet l'expression, dans les cellules humaines, d'une protéine p21 étiquetée mutante, notée p21^{K6R}-HA. Dans la protéine p21^{K6R}, les six résidus lysines (K) de p21 sont remplacés par six résidus arginines (R) ; ces mutations ne modifient pas le niveau d'expression de la protéine p21.

L'étiquette HA ne modifie pas le comportement de p21 en réponse aux UV.

Dans deux expériences séparées, chacun de ces deux vecteurs recombinants est introduit par transfection dans des cellules humaines en culture. On étudie par immunodétection sur membrane, de la même façon que précédemment (expérience C-5), l'influence des UV sur les différentes formes de protéine p21 (figure 28).

Question 70 : *A quelles protéines correspondent les deux bandes notées p1 et p2 ?*

Question 71 : *Comparez le comportement des différentes formes de protéine p21 en réponse aux UV.*

C-9. PCNA est un facteur protéique, associé *in vivo* à l'ADN polymérase δ , qui est recruté au niveau des sites de réparation de l'ADN. Lorsque des cellules cultivées *in vitro* sont traitées par le Triton X100, un détergent non ionique, le facteur PCNA est éliminé sauf s'il est associé aux sites de réparation de l'ADN.

Des cellules humaines transfectées par le vecteur V_1 ou par le vecteur V_2 sont cultivées sur lamelles puis irradiées ou non par les UV. Les protéines non éliminées par le Triton X100 sont ensuite analysées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre PCNA en présence d'iodure de propidium. Les images obtenues après observation des cellules au microscope à fluorescence sont présentées dans la figure 29.

Question 72 : *Analysez et interprétez ces images.*

Question 73 : *Sachant qu'en l'absence d'irradiation par les UV, les protéines PCNA et p21 forment un complexe stable, proposez un modèle expliquant par quel mécanisme p21 contrôle l'activité de PCNA.*

Question 74 : *Proposez une synthèse des conclusions tirées des expériences C-1 à C-9, à l'aide d'un schéma présentant la séquence des événements qui interviennent dans la réponse cellulaire aux UV chez l'Homme.*

ANNEXE :

Figures relatives aux sujets avec documents

Figures relatives au sujet A

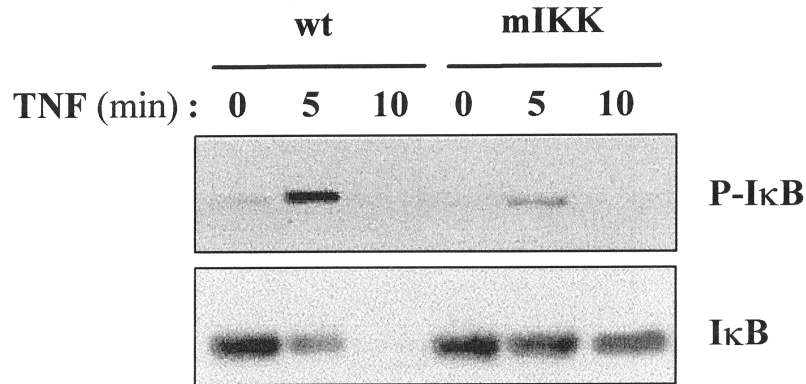


Figure 1. Effet du TNF sur IκB. Les protéines totales de fibroblastes de souris sauvages (wt, à gauche) ou mutants (mIKK, à droite) traités par le TNF sont extraites aux temps zéro, 5 et 10 minutes après le début du traitement et analysées par immunodétection sur membrane avec un anticorps qui reconnaît IκB sous sa forme non phosphorylée (IκB, en bas) ou avec un anticorps qui reconnaît IκB sous sa forme phosphorylée (P-IκB, en haut). La même quantité de protéines a été déposée dans toutes les pistes.

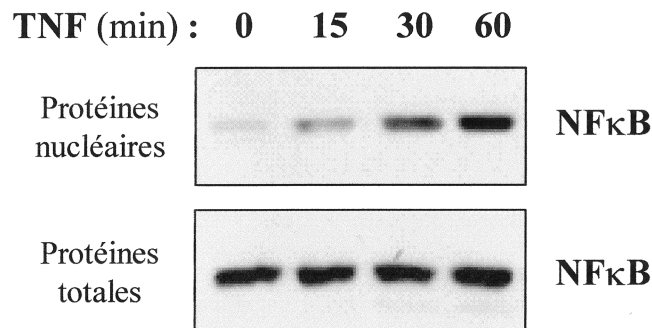


Figure 2. Effet du TNF sur le facteur de transcription NFκB. Les protéines totales (en bas) ou nucléaires (en haut) sont extraites de fibroblastes de souris sauvages traités par le TNF aux temps 0, 15, 30 et 60 minutes après le début du traitement et analysées par immunodétection à l'aide d'un anticorps dirigé contre NFκB. Pour chaque type d'extrait, la même quantité de protéines a été déposée dans les quatre pistes.

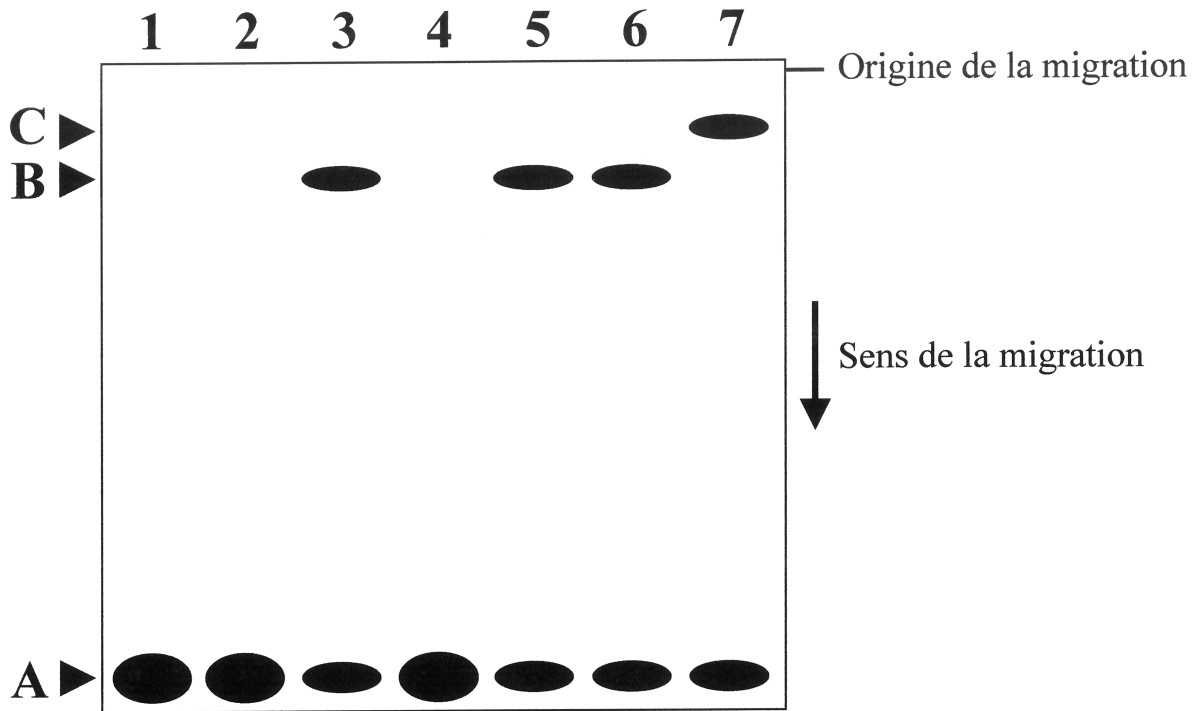


Figure 3. Etude de l'interaction des protéines nucléaires de fibroblastes de souris traités par le TNF avec la sonde nucléotidique κB . Les mélanges d'incubation 1 à 7 décrits dans le texte (paragraphe A-3) sont analysés par électrophorèse. Les espèces moléculaires A, B et C sont révélées par autoradiographie comme indiqué à gauche de la figure.

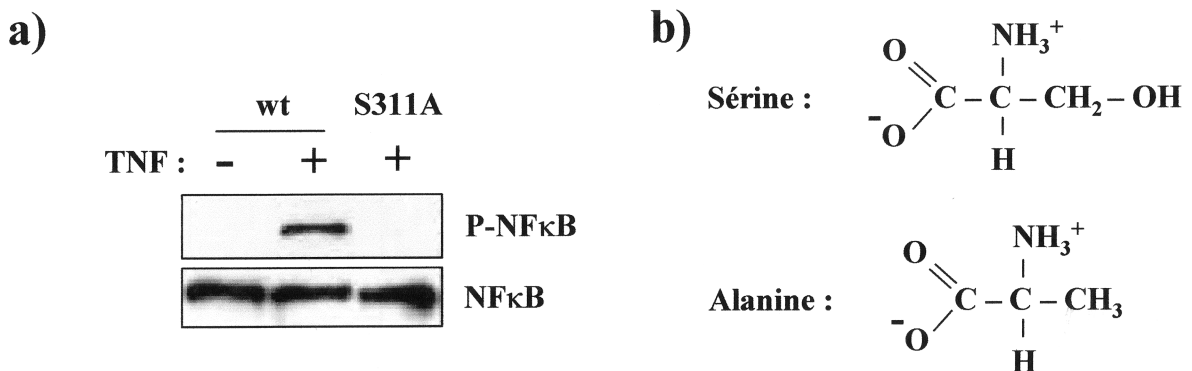


Figure 4. Effet du TNF sur l'état de phosphorylation du facteur de transcription NFκB. a) Les protéines totales extraites de fibroblastes de souris sauvages (wt, à gauche) ou dont le facteur NFκB est muté sur son résidu sérine 311 (S311A, à droite), traités (+) ou non (-) par le TNF, sont analysées par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps qui reconnaît NFκB, qu'il soit ou non phosphorylé (NFκB, en bas), ou à l'aide d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement NFκB phosphorylé en position 311 (P-NFκB, en haut). La même quantité de protéines a été déposée dans toutes les pistes. b) Formules de la sérine et de l'alanine.

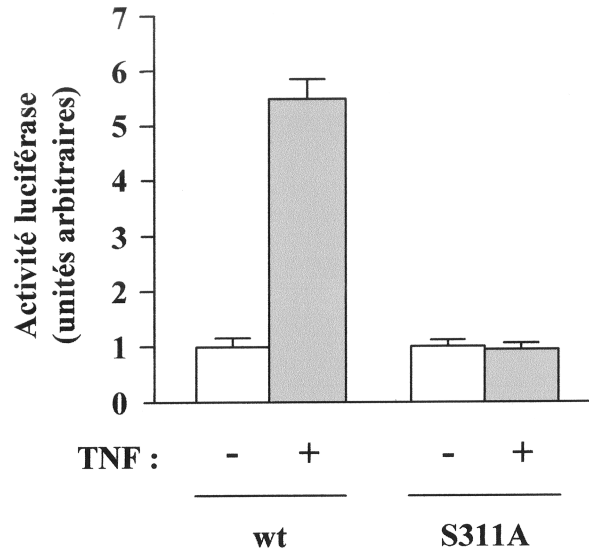


Figure 5. Effet du TNF sur la transcription du gène κB -Luc dans les cellules exprimant NF κ B sauvage ou NF κ B mutant S311A. L'activité luciférase de lysats de fibroblastes contenant le gène κB -Luc, exprimant le facteur NF κ B sauvage (wt, à gauche) ou le facteur NF κ B mutant (S311A, à droite), et traités (+) ou non (-) par le TNF est dosée. Des quantités identiques de cellules sont analysées dans les différentes conditions. Chaque barre du diagramme représente la moyenne de trois dosages, la barre d'erreur indique l'écart-type.

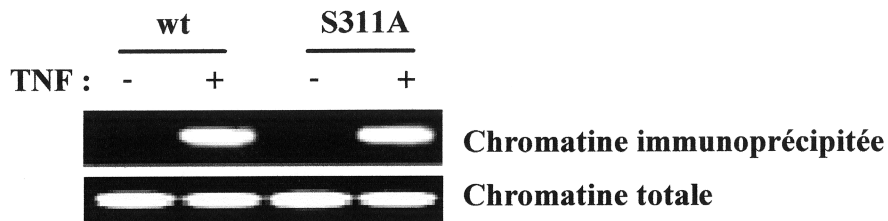


Figure 6. Immunoprécipitation de chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre NF κ B. Quantification des fragments d'ADN contenant le promoteur du gène κB -Luc, dans la chromatine totale (en bas) et dans la chromatine immunoprécipitée par un anticorps anti-NF κ B (en haut) préparées à partir de fibroblastes de souris contenant le gène κB -Luc, exprimant le facteur NF κ B sauvage (wt, à gauche) ou le facteur NF κ B mutant (S311A, à droite), et traités (+) ou non (-) par le TNF.

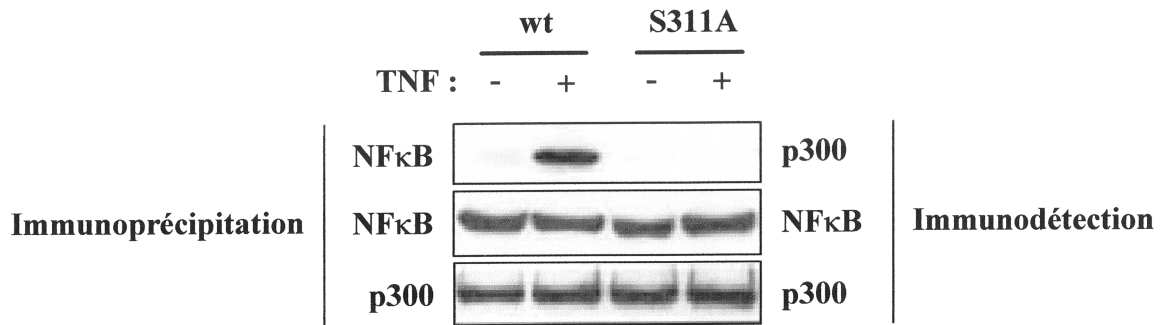


Figure 7. Etude de l'interaction éventuelle entre NFκB et p300. Les protéines totales extraites de fibroblastes de souris exprimant NFκB sauvage (wt, à gauche) ou NFκB mutant (S311A, à droite), traités (+) ou non (-) par le TNF, sont immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre NFκB (en haut et au milieu) ou à l'aide d'un anticorps dirigé contre p300 (en bas), comme indiqué à gauche de la figure. L'immunoprécipité est analysé par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps dirigé contre p300 (en haut et en bas) ou à l'aide d'un anticorps dirigé contre NFκB (au milieu), comme indiqué à droite de la figure. Dans tous les cas, la même quantité de protéines a été immunoprécipitée et la totalité de l'immunoprécipité a été analysée.

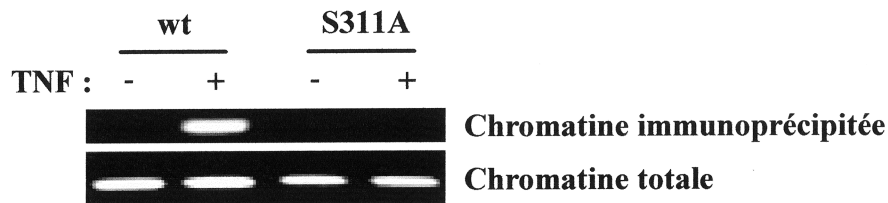


Figure 8. Immunoprécipitation de chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'ARN polymérase II. Quantification des fragments d'ADN contenant le promoteur du gène *κB-Luc* dans la chromatine totale (en bas) et dans la chromatine immunoprécipitée par un anticorps anti-ARN polymérase II (en haut) préparées à partir de fibroblastes de souris contenant le gène *κB-Luc*, exprimant le facteur NFκB sauvage (wt, à gauche) ou le facteur NFκB mutant (S311A, à droite), et traités (+) ou non (-) par le TNF.

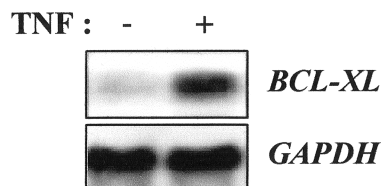


Figure 9. Détection de l'ARNm du gène BCL-XL par Northern blot. Les ARNm extraits de fibroblastes de souris sauvages traités (+) ou non (-) par le TNF sont analysés par Northern blot à l'aide d'une sonde spécifique de l'ARNm du gène *BCL-XL* (en haut) ou à l'aide d'une sonde spécifique de l'ARNm du gène *GAPDH* (en bas).

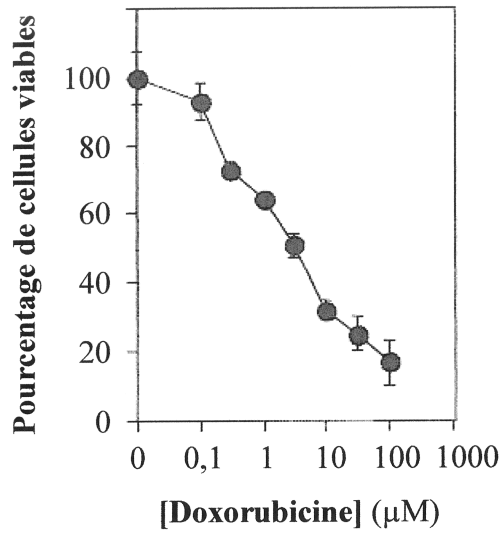


Figure 10. Effet de la doxorubicine sur la viabilité des cellules KBM-5. Le nombre de cellules viables présentes dans chaque lot, exprimé en pourcentage du nombre de cellules viables présentes dans le lot non traité par la doxorubicine, est représenté en fonction de la concentration de doxorubicine en micromoles par litre (μM). Chaque point du graphe correspond à la moyenne des valeurs obtenues dans trois expériences indépendantes. La barre d'erreur représente l'écart-type.

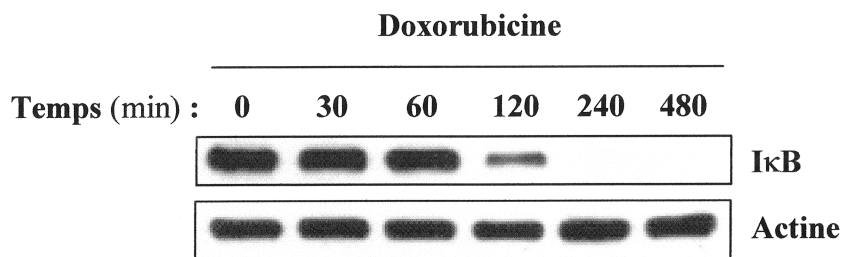


Figure 11. Effet exercé par la doxorubicine sur la protéine I κ B. Les protéines totales extraites des cellules KBM-5, traitées par la doxorubicine ($50 \mu\text{M}$) pendant les durées indiquées en haut de la figure, sont analysées par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps anti-I κ B (en haut) ou à l'aide d'un anticorps anti-actine (en bas). La même quantité de protéines a été déposée dans toutes les pistes.

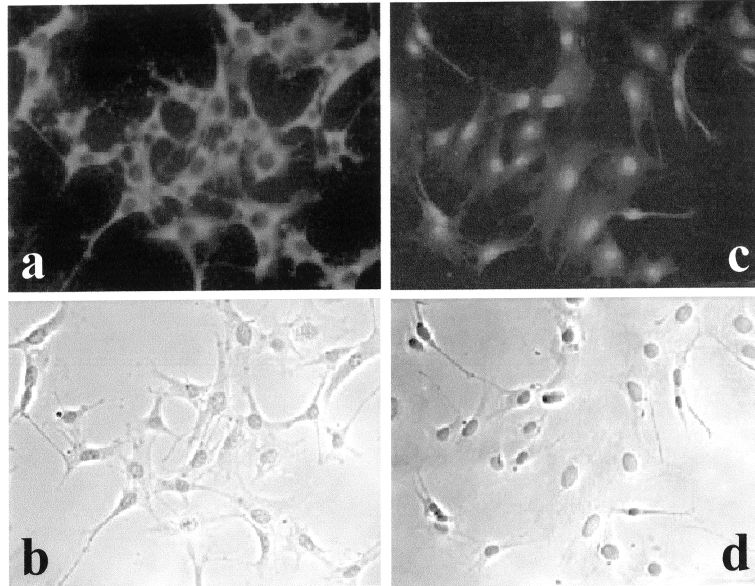


Figure 12. Effet de la doxorubicine sur la localisation subcellulaire de NFκB. Le facteur NFκB est révélé dans des cellules KBM-5, au temps zéro (a, b) et après 4 heures de traitement (c, d) par la doxorubicine (50 μM), à l'aide d'un anticorps fluorescent dirigé contre NFκB. Le signal émis par l'anticorps fluorescent apparaît en clair sur fond noir (a, c). Les mêmes champs optiques sont observés en lumière blanche (b, d).

Doxorubicine (μM) : 0 0,1 1 10 50

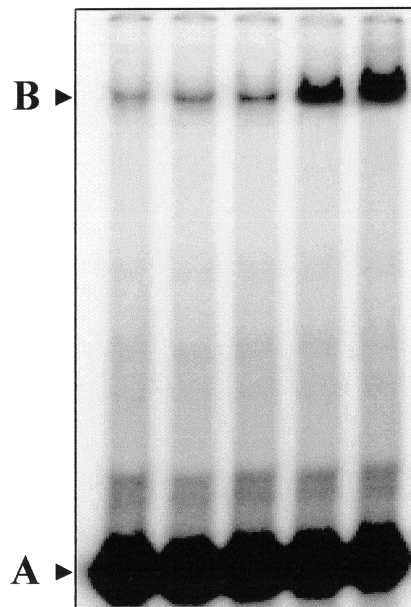


Figure 13. Effet de la doxorubicine sur les interactions entre les protéines nucléaires des cellules KBM-5 et la sonde nucléotidique κB. Les protéines nucléaires extraites des cellules KBM-5 traitées par différentes concentrations de doxorubicine sont incubées en présence de la sonde nucléotidique κB radioactive puis les mélanges sont analysés par électrophorèse. Les espèces moléculaires A et B identifiées dans l'expérience du paragraphe A-3 (figure 3) sont révélées par autoradiographie.

est ensuite réparti en deux fractions équivalentes. Pour chaque extrait, l'une de ces fractions est analysée par immunodétection sur membrane à l'aide d'un anticorps qui reconnaît NFκB, qu'il soit phosphorylé ou non, l'autre fraction est soumise à une immunodétection sur membrane réalisée avec un anticorps qui reconnaît spécifiquement le facteur NFκB phosphorylé en position 311 (figure 4).

Question 12 : *Décrivez les résultats présentés sur la figure 4a. Quelle est la conséquence du traitement par le TNF sur NFκB sauvage ?*

Question 13 : *Que se passe-t-il si NFκB porte la mutation S311A ? A l'aide de la figure 4b qui présente la structure de la sérine et de l'alanine, justifiez ce résultat. Représentez le mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la phosphorylation de NFκB.*

A-5. Un gène artificiel, constitué de la séquence codante de la luciférase (un enzyme présent exclusivement chez la luciole) placée sous le contrôle d'un promoteur contenant la séquence κB, a été introduit dans des fibroblastes de souris sauvages et dans des fibroblastes de souris mutants homozygotes dont le facteur NFκB porte la mutation S311A. Ce gène artificiel, appelé κB-Luc, est intégré dans le génome des cellules et fonctionne comme un gène cellulaire endogène. Son expression est régulée exclusivement par NFκB.

Des fibroblastes contenant le gène κB-Luc et exprimant le facteur NFκB sauvage ou le facteur NFκB mutant S311A, sont traités ou non par le TNF. Les cellules sont lysées et l'activité luciférase contenue dans le lysat, qui reflète directement le niveau de transcription du gène κB-Luc, est dosée (l'ARN messager synthétisé est traduit avec la même efficacité quelles que soient les conditions appliquées dans l'expérience). Les résultats sont présentés sur la figure 5.

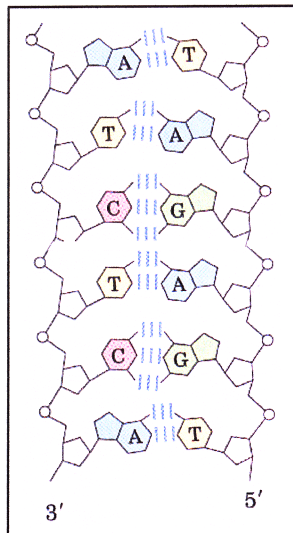
Question 14 : *Quel est l'effet du TNF sur la transcription du gène κB-Luc dans les fibroblastes sauvages et dans les fibroblastes mutants ? Quelle peut-être l'origine de l'activité luciférase mesurée en l'absence de TNF ?*

A-6. Afin de savoir si NFκB interagit *in vivo* avec le promoteur du gène κB-Luc, une expérience d'immunoprécipitation de chromatine est réalisée.

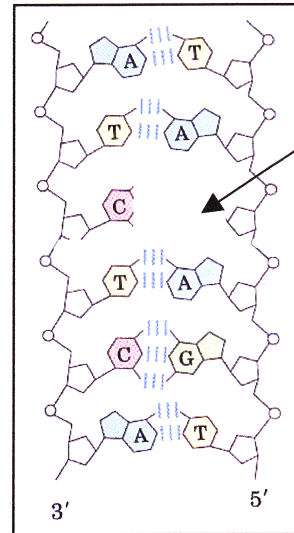
Principe de la technique d'immunoprécipitation de chromatine. Les complexes macromoléculaires présents dans les cellules sont stabilisés par le formaldéhyde. La chromatine est extraite des cellules et l'ADN qu'elle contient est fragmenté en segments ayant une longueur moyenne de 1000 paires de bases. La chromatine fragmentée est répartie en deux fractions égales. La première de ces fractions est conservée telle quelle (chromatine totale). La seconde est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-NFκB fixé sur des billes d'agarose. Les billes sont séparées du reste de l'échantillon, lavées, et les fragments de chromatine retenus par l'anticorps lié aux billes sont recueillis (chromatine immunoprécipitée). L'ADN présent dans les deux échantillons de chromatine (chromatine totale et chromatine immunoprécipitée) est purifié. Les fragments d'ADN contenant le promoteur du gène κB-Luc sont quantifiés par une réaction d'amplification spécifique qui produit des fragments d'ADN de 200 paires de bases révélés par électrophorèse en gel d'agarose.

Figures relatives au sujet B

Figure 14. La formation d'un site abasique. Le panneau de gauche donne une représentation schématique d'un segment non endommagé d'une double hélice d'ADN. Le panneau de droite propose une représentation schématique du même segment d'ADN comportant un site abasique engendré par la rupture de la liaison N-glycosidique entre une guanine et un ribose.



ADN normal



ADN endommagé

Figure 15. Représentation schématique des brins d'ADN M_1 et M_2 . Les nombres indiquent la position des nucléotides par rapport à l'extrémité 3' de la molécule. **Q** indique la présence d'un site abasique. Les segments représentés par un trait plein sont complémentaires de l'ADN monocaténaire A_1^* .

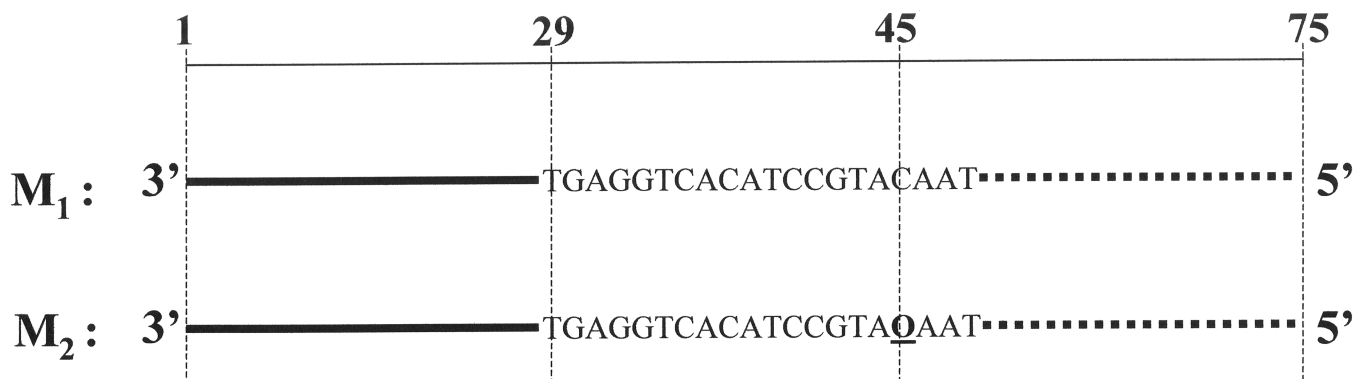


Figure 16. Etude de la réplication *in vitro*, par Pol δ et Pol ζ , d'un ADN comportant un site abasique. a) L'ADN S_1 est incubé en présence des 4 dXTP et en présence ou en l'absence de Pol δ et Pol ζ , comme indiqué en haut. Les molécules d'ADN sont ensuite analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'une autoradiographie. La graduation sur le côté de l'électrophorégramme indique la taille des fragments d'ADN (en nombre de nucléotides). b) L'expérience est réalisée dans les mêmes conditions qu'en a) avec l'ADN S_2 .

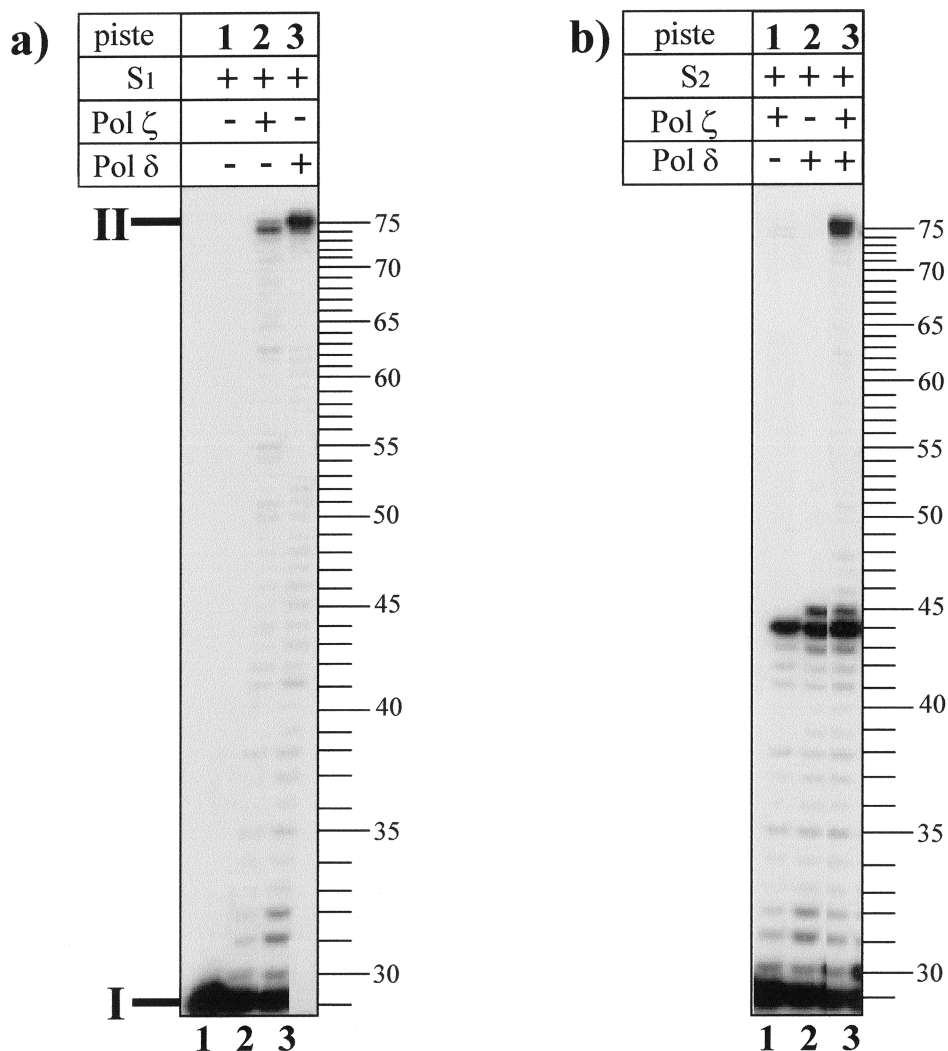


Figure 19. Réparation non mutagène d'un ADN endommagé : schématisation des différentes étapes de la réparation par excision de base. Les losanges symbolisent les désoxyriboses, les traits épais verticaux représentent les bases, les traits fins horizontaux reliant deux losanges correspondent aux liaisons phosphodiesteres. L'orientation des brins est précisée. La base modifiée est repérée par une étoile. Le losange vide symbolise le ribose abasique. Les carrés représentent les riboses du fragment d'ADN néosynthétisé lors de la réparation. Voir le texte pour les explications.

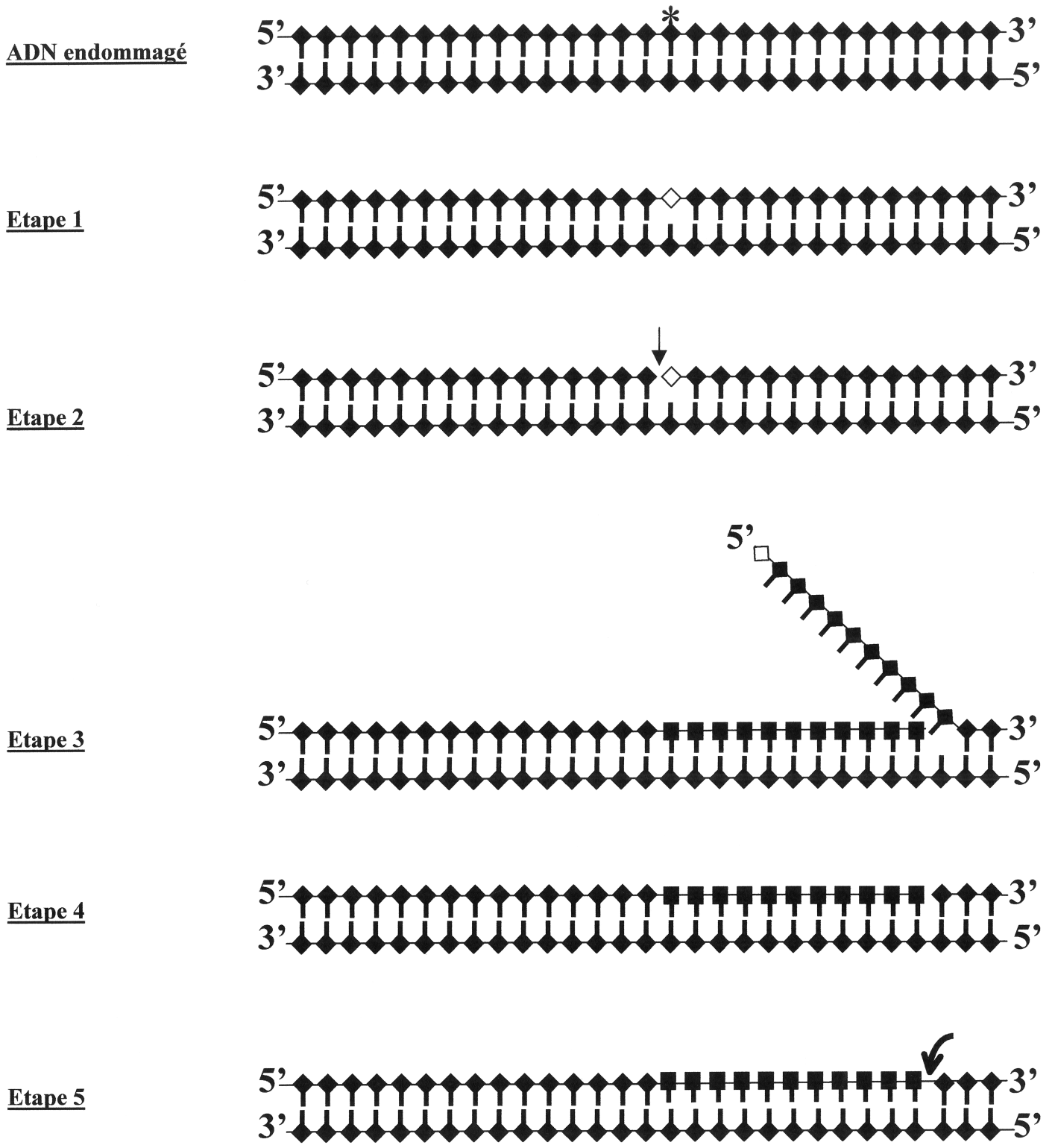


Figure 20 : Séquences des allèles *CAN1* de clones sélectionnés. a) Début de la séquence codante du gène *CAN1* sauvage et séquence polypeptidique de l'extrémité N-terminale de la protéine sauvage. Les résidus sont numérotés à partir de la méthionine N-terminale. Les numéros des nucléotides indiquent la position du troisième nucléotide de chaque codon, à partir du nucléotide +1 de la traduction. b) Début de la séquence codante du gène *CAN1* présent dans quatre clones sélectionnés. c) Tableau présentant le code génétique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

a)

N° de résidu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Résidus	Met	Thr	Asn	Ser	Lys	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	Glu	Glu	Lys	His	Met	Tyr	Asn	Glu	Pro	Val	Thr	Thr	Leu
Codons	ATG	ACA	AAT	TCA	AAA	GAA	GAC	GCC	GAC	ATA	GAG	GAG	AAG	CAT	ATG	TAC	AAT	GAG	CCG	GTC	ACA	ACC	CTC
N° de nucléotide	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	63	66	69

b)

Clone 1 :	ATG	ACA	AAT	TCA	AAA	GAA	GAC	GCC	GAC	ATA	GAG	GAG	AAG	CAT	ATG	TAA	AAT	GAG	CCG	GTC	ACA	ACC	CTC
Clone 2 :	ATG	ACA	AAT	TTA	AAA	GAA	GAC	GCC	GAC	ATA	GAG	GAG	AAG	CAT	ATG	TAC	AAT	GAG	CCG	GTC	ACA	ACC	CTC
Clone 3 :	ATG	ACA	AAT	TCA	AAA	GAA	GAC	CCG	ACA	TAG	AGG	AGA	AGC	ATA	TGT	ACA	ATG	AGC	CGG	TCA	CAA	CCC	TCT
Clone 4 :	ATG	ACA	AAT	TCA	AAA	GAA	GAC	GCC	GAC	ATA	GAG	GAG	AAG	CAT	ATG	TAC	AAC	TGA	GCC	GGT	CAC	AAC	CCT

c)

Second nucléotide du codon

Premier nucléotide du codon		U		C		A		G	
	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG		Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	

Figures relatives au sujet C

Figure 21. Analyse du processus de réparation de l'ADN dans des cellules humaines *in vivo*. L'incorporation de la radioactivité au niveau des sites de réparation est évaluée par autoradiographie. **a)** Cellules irradiées par les UV. **b)** Cellules non irradiées.

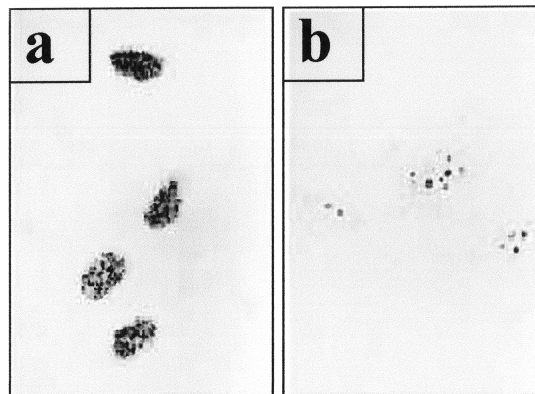


Figure 22. Analyse par microscopie électronique d'échantillons obtenus après incubation de molécules d'ADN bicaténaire linéaire (a et c) ou circulaire (b) en présence (a et b) ou en l'absence (c) de protéine ATR purifiée. Les trois images sont à la même échelle (la barre blanche correspond à une distance de 250 nm).

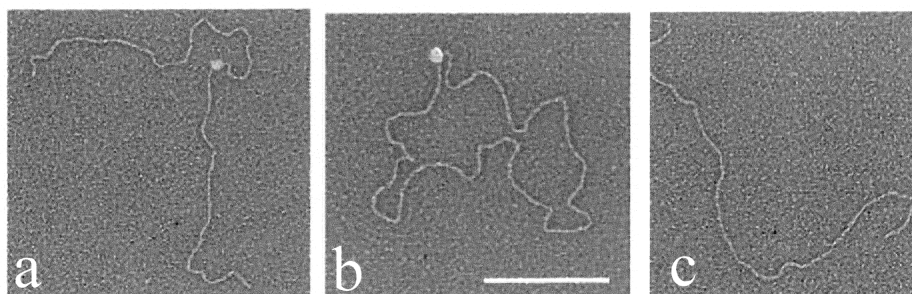


Figure 23. Structure des molécules d'ADN bicaténaire ADN₁ et ADN₂. La séquence des deux brins de chaque ADN bicaténaire est donnée. Le symbole **II** indique la présence d'un dimère de thymine.

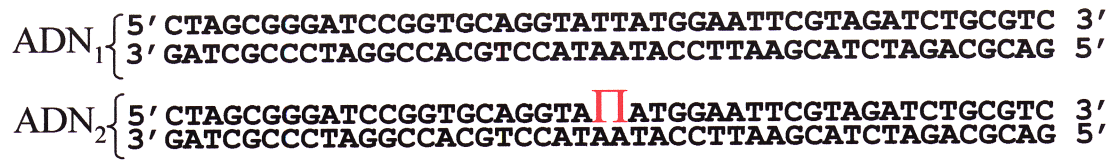


Figure 24. Analyse de la phosphorylation de la protéine p53 par la protéine ATR *in vitro*. Autoradiographie de la portion du gel d'électrophorèse contenant la protéine p53. Des quantités identiques de protéines totales sont analysées dans toutes les pistes.

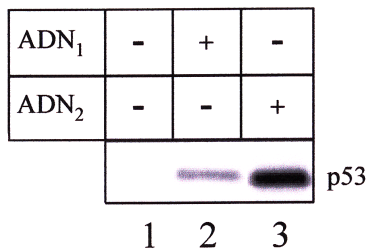


Figure 25. Effet des UV sur la concentration intracellulaire de protéine p21. Analyse par immunodétection sur membrane avec un anticorps dirigé contre p21 (panneau supérieur) ou un anticorps dirigé contre l'actine (panneau inférieur). Des quantités identiques de protéines totales sont analysées dans toutes les pistes.

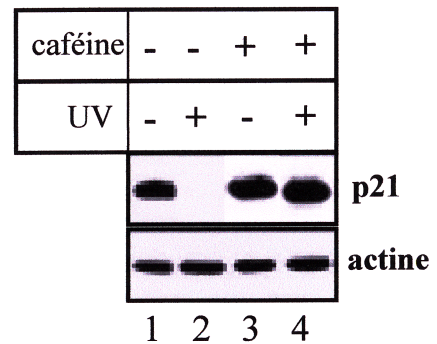


Figure 26. Effet des UV sur la dégradation de p21. a) Analyse de la concentration cellulaire de la protéine p21 par immunodétection sur membrane. Des quantités identiques de protéines totales sont analysées dans toutes les pistes. b) Quantification de l'intensité des bandes.

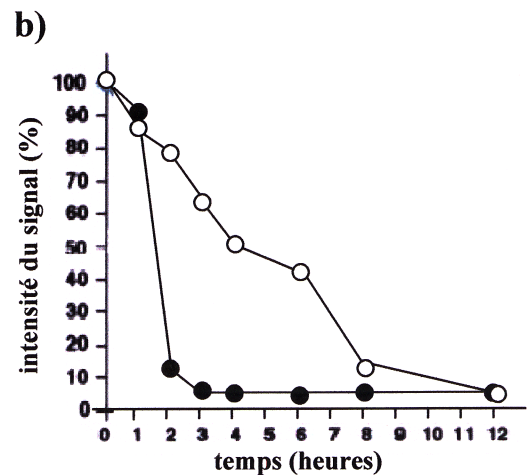
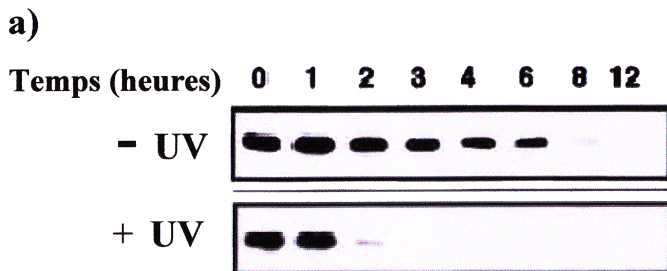


Figure 27. Etude de la localisation subcellulaire de p21. Analyse par immunofluorescence de la protéine p21 dans des cellules humaines irradiées par les UV (a) ou non (b). L'anticorps dirigé contre p21 est couplé à une molécule émettant par fluorescence une lumière verte. L'ADN est marqué par l'iodure de propidium qui émet par fluorescence une lumière rouge. Une coloration jaune indique une émission simultanée de lumière verte et de lumière rouge.

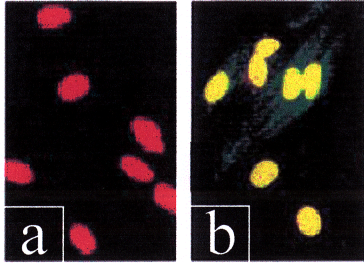


Figure 28. Effet des UV sur la concentration intracellulaire de différentes formes de la protéine p21. Analyse par immunodétection sur membrane avec un anticorps qui reconnaît les différentes formes de p21 (panneau supérieur) ou avec un anticorps dirigé contre l'actine (panneau inférieur). Des quantités identiques de protéines sont analysées dans toutes les pistes. p1 et p2 (repérées par les flèches à gauche de la figure) correspondent aux deux bandes présentes dans les pistes 3 et 5.

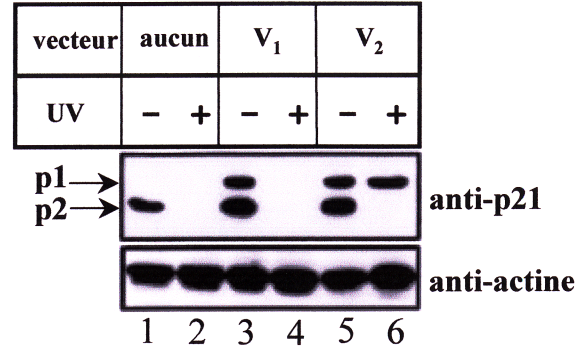


Figure 29. Influence de p21 sur le recrutement du facteur PCNA au niveau des sites d'ADN endommagés. Analyse par immunofluorescence du facteur PCNA non éliminé par le Triton X100. Les cellules sont transfectées par le vecteur V₁ (a et b) ou le vecteur V₂ (c et d), puis irradiées (b et d) ou non (a et c) par les UV. L'anticorps dirigé contre PCNA est couplé à une molécule émettant par fluorescence une lumière verte. L'ADN est marqué par l'iodure de propidium qui émet par fluorescence une lumière rouge. Une coloration jaune indique une émission simultanée de lumière verte et de lumière rouge.

