SESSION 2012

CONCOURS G2E

BIOLOGIE

Durée : 3 heures

Les calculatrices sont interdites.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas.

Il n'est pas nécessaire de rédiger une introduction et une conclusion.

Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés ou exploités.

Attention : le sujet de biologie est composé de 2 parties indépendantes dont la numérotation est continue afin d'éviter toute confusion lors de vos réponses. Le jury vous conseille de les composer en 1h30 chacune afin de répondre à toutes les questions.

BIOLOGIE 1 (durée conseillée 1h30)

Remarque importante : les questions suivent une problématique progressive, le jury vous conseille donc de les aborder dans l'ordre du sujet. L'annexe page 21 est à rendre.

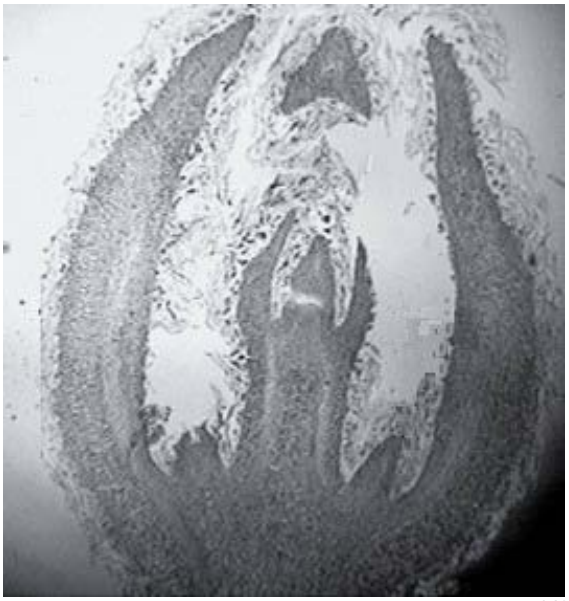
QUELQUES MODALITÉS DU DÉVELOPPEMENT DES ANGIOSPERMES

1. LA LOCALISATION DE LA CROISSANCE (3 points)

1.1. La localisation de la croissance des tiges feuillées

Le document 1 ci-dessous est une microphotographie de la coupe longitudinale de l'extrémité d'un rameau d'olivier (*Olea europaea)*, observée à la fin du mois de février.

1.1.1. Identifier et légender précisément le document 1 (reproduit en annexe page 21)



Ce document est à coller sur votre copie

Document 1 : Observation au microscope optique d'une coupe longitudinale de l'extrémité d'un rameau d'olivier.

Grossissement : x 32.

(Modifié d'après M.A. Mezghani, S. Ben El Hadj, F. Labidi, A. Jebari. 2008. Biotechnology Agronomy Society and Environment, 12:(3)259-266)

Chez les plantes en rosette, l'extrémité étudiée par le document 1 de la page 1 existe bien, pourtant la croissance en longueur semble ne pas exister.

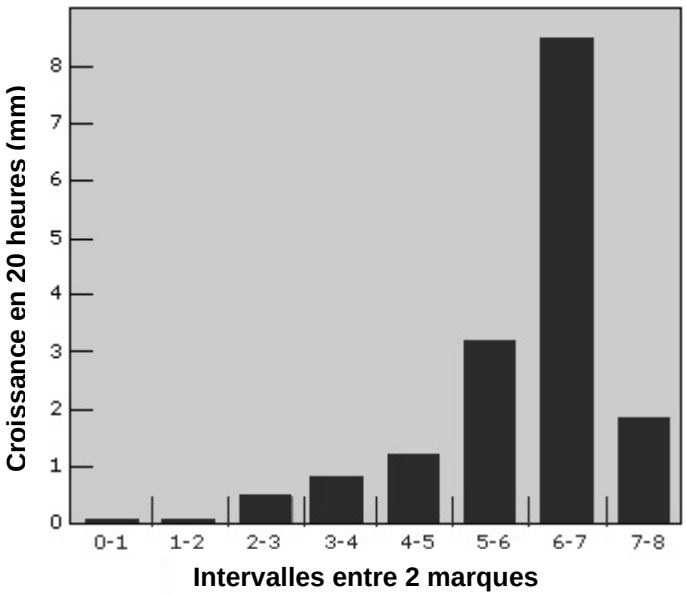
1.1.2. Expliquer l'origine du port en rosette de certaines plantes. Donner un exemple de plante en rosette.

1.2. La localisation de la croissance des racines

On suit la croissance de la racine d'une jeune plantule de potimarron (*Cucurbita maxima Duch*) en reprenant le principe de l'expérience historique de Sachs. On marque la racine à l'aide de traits équidistants de 1 mm (**document 2-A**). Puis on observe au bout de 20 heures (24 heures dans l'expérience historique), comment se sont déplacées les marques. La croissance des différents intervalles marqués par les repères au temps 0 est reportée sur un graphique (**document 2-B**).

Document 2-A

Document 2-B



Document 2 : Suivi de la croissance de la racine d'une jeune plantule de potimarron.
2A - A t = 0 : marquage de la racine.
2B - A t = 20 heures : graphique donnant la croissance de chaque intervalle entre deux marques
(Modifié d'après R. Prat J.P.Rubinstein. 2005. Biologie et Multimédia - Université P et M Curie - UFR Biologie*)*

1.2.1 Analyser le document 2. Conclure sur la localisation la croissance racinaire. Afin de préciser ces conclusions, proposer une amélioration du protocole expérimental.

2. ÉTUDE CYTOLOGIQUE DE LA CROISSANCE (7,5 points)

2.1. Étude cytologique de la croissance des tiges feuillées

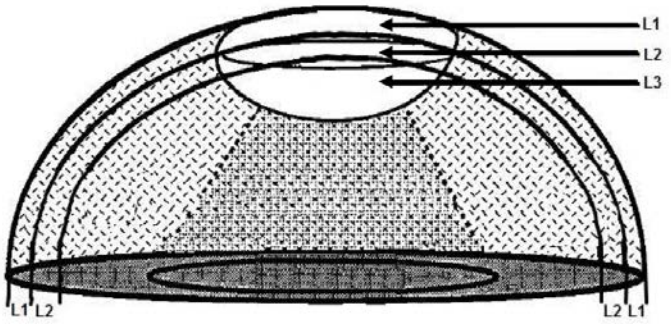
On étudie plus particulièrement une zone précise de l'extrémité observée dans le document 1 : le méristème apical caulinaire (abrégé par MAC dans la suite du sujet). Cette étude porte sur le MAC de très jeunes plantules d'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*).

Pour cela, les cellules du MAC ont été modifiées génétiquement et expriment, dans leur membrane plasmique, une protéine fluorescente spécifique (appelée YFP). Ainsi, quand le MAC est illuminé par un laser (à une longueur d'onde λ = 514nm), les limites des cellules apparaissent nettement.
On suit, en temps réel, la croissance du MAC, par microscopie optique confocale. Cette technique permet de balayer le MAC dans plusieurs plans et ainsi d'obtenir une image en « relief » et de

repérer la position des cellules dans les différentes zones du MAC. Parallèlement, un traitement informatique permet de pointer les cellules du MAC par un point de couleur.
La même couleur est utilisée pour une cellule mère (à t=0) et toutes ses cellules filles (à t=114 heures puis à t=120 heures). L'ensemble des résultats est regroupé sur le document 3 page 10.

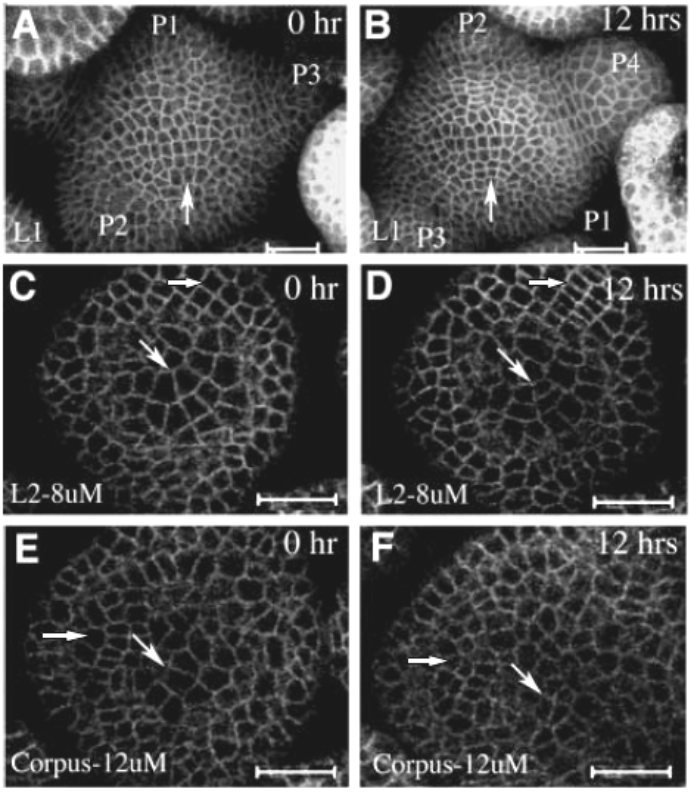
2.1.1. Analyser et interpréter le document 3.
A l'aide de ce document 3 et de vos connaissances personnelles, réaliser un schéma selon la coupe X-Y du document 3C précisant les différentes zones cellulaires (ou régions fonctionnelles) du MAC. Justifier le nom donné à chacune de ces zones.

Comme le montre le document 4 ci-dessous, le MAC présente aussi une organisation en couches cellulaires. On définit ainsi la *tunica*, qui regroupe les deux couches cellulaires superficielles (L1 et L2) et le *corpus* plus profond qui nait à partir de la couche cellulaire L3.



Document 4 : Organisation du MAC d'Arabidopsis thaliana en trois couches cellulaires.
(Modifié d'après J.I. Medford. 1992. Plant Cell 4 : 1029–1039)

Comme pour le document 3, on suit, à intervalles de temps réguliers, la croissance du MAC d'*Arabidopsis thaliana*, par microscopie optique confocale. Cette technique de microscopie permet également d'observer en profondeur le MAC et ainsi d'obtenir une image des différentes couches cellulaires du MAC. Comme pour le document 3, la membrane plasmique des cellules apparait nettement grâce à la protéine fluorescente YFP. L'ensemble des résultats est regroupé sur le ***document 5 ci-dessous.***



Document 5 : Observation en microscopie optique confocale des divisions cellulaires du MAC *d'Arabidopsis thaliana.*

Les flèches indiquent les mêmes cellules avant et après la division.
(A, B) dans les cellules de la couche L1 (en surface).
(C, D) dans les cellules de la couche L2 (8 μm de profondeur).
(E, F) dans les cellules de la couche L3 (12 μm de profondeur).

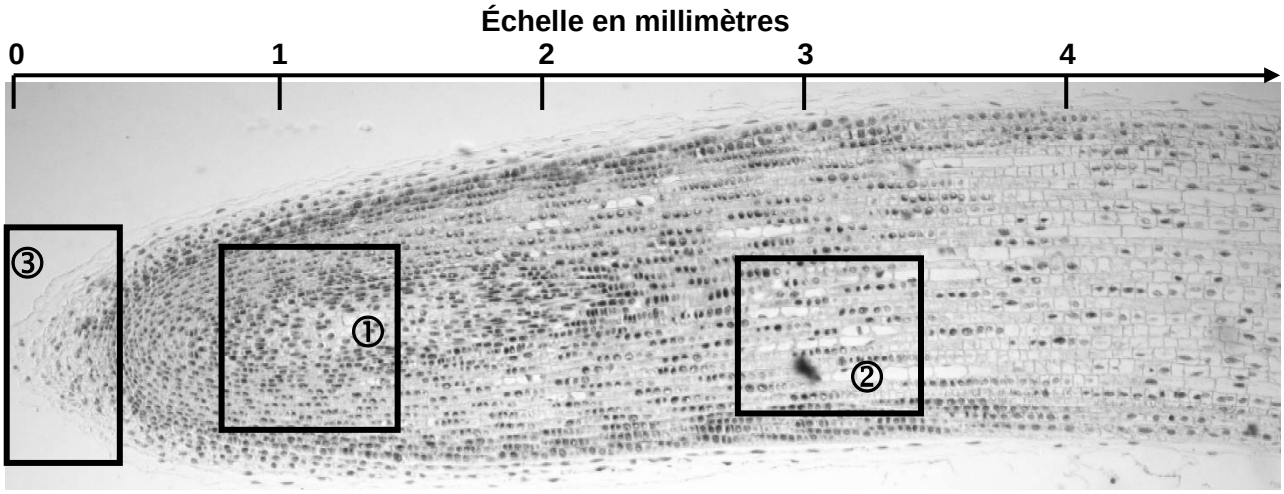
Échelle : barre blanche = 20 μm.

(D'après GV. Reddy and al. 2004. Development 131: 4225–4237)

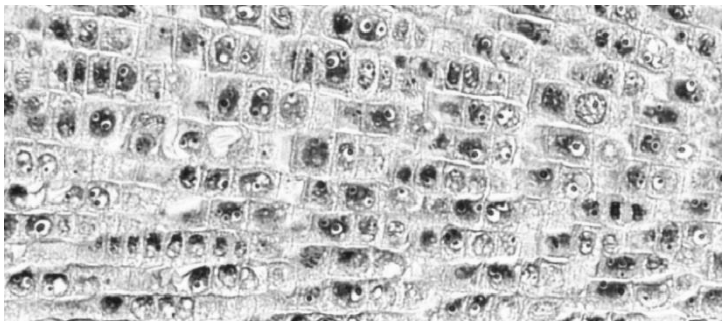
2.1.2. Analyser et interpréter le document 5.
A l'aide de ce document 5 et de vos connaissances personnelles, préciser comment l'orientation du cloisonnement cellulaire permet de séparer la *tunica* du *corpus*.

2.2. Étude cytologique de la croissance des racines

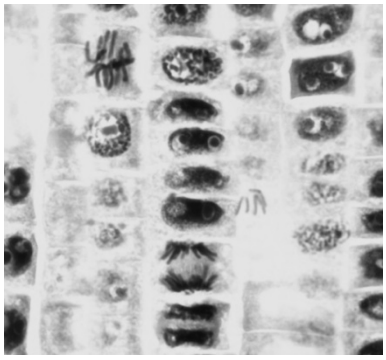
On réalise une coupe longitudinale de racine de jacinthe (*Hyacinthus orientalis*). Cette coupe est ensuite traitée à l'hématoxyline, qui permet une coloration assez générale des structures cellulaires, puis observée au microscope optique. L'observation est réalisée à plusieurs grossissements, et l'ensemble de ces observations est donné par **l'ensemble des documents 6 ci-dessous**.



Document 6A

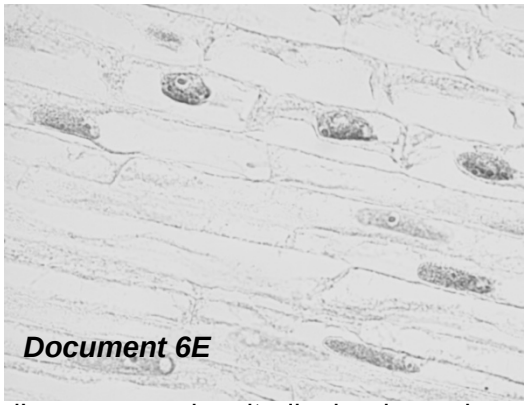


Document 6B



Document 6C

Document 6D



Document 6E

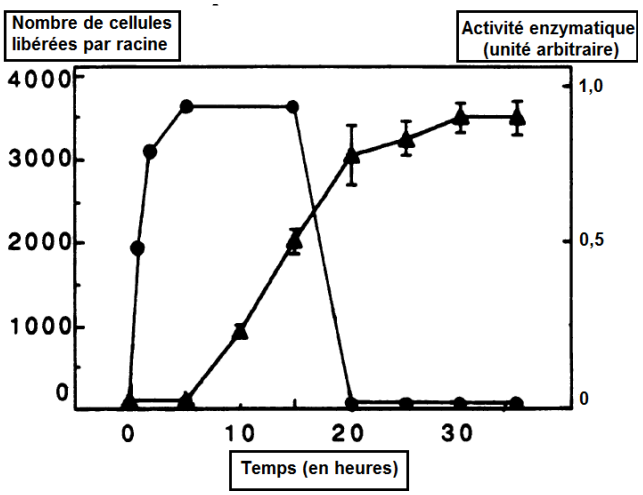
Document 6 : Observations au microscope optique d'une coupe longitudinale de racine de jacinthe colorée à l'hématoxyline. *(Clichés du concepteur)*

6A : Observation de la pointe de la racine. Échelle en millimètres.
6B : Observation de la région ① Grossissement : x 100
6C : Observation de la région ① Grossissement : x 400
6D : Observation de la région ② Grossissement : x 400
6E : Observation de la région ② Grossissement : x 600

2.2.1. Analyser et préciser les particularités cytologiques des documents 6-B et 6-C. En déduire le nom de la région ① encadrée sur le document 6-A.

2.2.2. Analyser les documents 6-D et 6-E. A l'aide de cette analyse et de vos connaissances personnelles, conclure sur les événements cytologiques présents dans la région ② encadrée sur le document 6-A.

La région 3 du document 6-A est plus particulièrement étudiée, mais cette fois sur des racines de pois (*Pisum sativum*). On isole les régions 3 de 15 jeunes racines de pois et on suit, au cours du temps, leur activité enzymatique pectolytique. Dans le même temps, on suit également le nombre de cellules libérées à la périphérie de chaque région 3. L'ensemble des résultats est regroupé sur le document 7 ci-dessous.



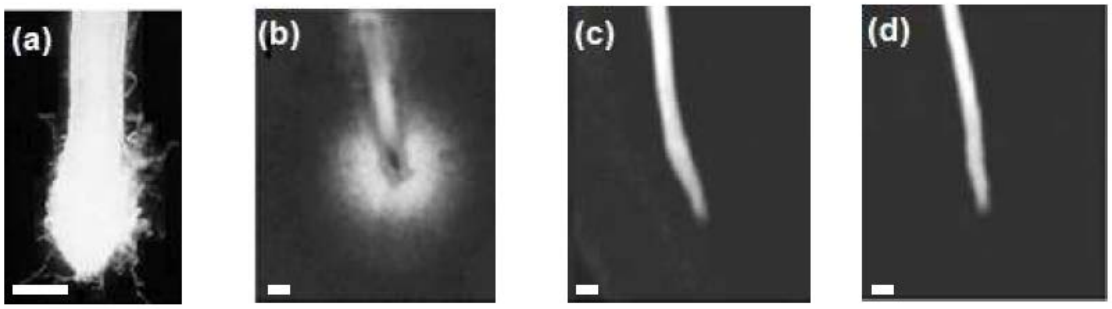
Document 7 : Relation entre l'activité enzymatique pectolytique (cercles) avec le nombre cumulé de cellules libérées par les pointes des racines (triangles).

L'activité enzymatique est exprimée en unité arbitraire. Cette activité n'a été détectée qu'à l'intérieur des régions 3 isolées, alors qu'elle ne l'a pas été dans les suspensions de cellules libérées.

(Modifié d'après MC. Hawes and HJ. Lin. 1990. Plant Physiology 94:1855-1859)

2.2.3. Analyser et interpréter le document 7.
A l'aide de ce document 7 et de vos connaissances personnelles, identifier la région ③ et préciser ses rôles dans les racines.

De jeunes racines de pois (*Pisum sativum*) sont inoculées uniformément avec des spores d'un champignon pathogène *Nectria haematococca*. Au bout de 24 heures, plus de 90% des racines restent blanches, et à l'œil nu l'œil, semblent être indemnes de l'infection. Cependant, l'observation microscopique révèle que la pointe de ces racines est couverte d'hyphes fongiques. Par simple excision, on prélève la pointe de ces racines et on observe le développement des hyphes sur un milieu de culture approprié. Certaines de ces pointes racinaires subissent auparavant un traitement particulier : avant excision, elles sont placées dans l'eau et agitées doucement. On observe alors qu'un manteau de champignon se détache de l'extrémité de la pointe de la racine. Les pointes racinaires ainsi obtenues sont ensuite placées sur le même milieu de culture approprié. L'ensemble des résultats est regroupé sur le document 8 ci-dessous.



Document 8 : Microphotographies de l'extrémité de pointes de racines de pois inoculées avec un champignon pathogène : Nectria haematococca. Échelle : barre blanche = 2 mm

8a : Pointe d'une racine inoculée.
8b : Pointe d'une racine inoculée.
8c : Pointe d'une racine inoculée ayant été préalablement placée dans l'eau et agitée doucement.
8d : Pointe d'une racine non inoculée.

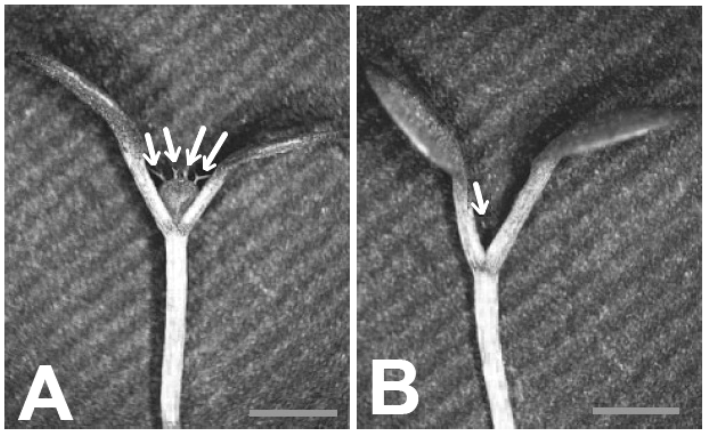
(Modifié d'après MC. Hawes and U. Gunawardena and al.. 2000. Trends in plant science 5:128-133)

2.2.4. Analyser et interpréter le document 8.
En déduire un autre rôle de la région ③ des racines.

3. LE CONTRÔLE DE LA CROISSANCE (9,5 points)

3.1. Le contrôle de la croissance des tiges feuillées

On étudie le contrôle du fonctionnement du méristème apical caulinaire. L'obtention et l'analyse de nombreux mutants *d'Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression contrôle le MAC. Le document 9 ci-dessous s'intéresse à l'un d'entre eux : le gène *WUSCHEL (WUS)*.



Document 9 : Microphotographies de plantules d'Arabidopsis thaliana, âgées de 7 jours.
A- Type sauvage.
B- Mutant wus.
Les flèches blanches indiquent de très jeunes feuilles
Échelle : barre grise =1 mm.
(Modifié d'après T. Laux, KFX. Mayer and al.. 1996. Development 122: 87-96)

3.1.1. Décrire et comparer le phénotype de chaque plantule présentée par le document 9. En déduire la fonction du gène *WUS*.

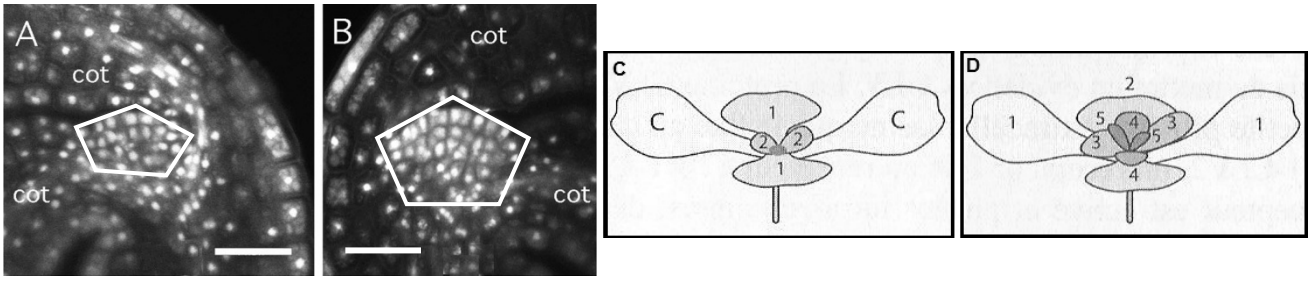
La protéine fonctionnelle WUS comporte 291 acides aminés. Le document 10 ci-dessous compare la région comprise entre l'acide aminé n°33 et n°98, avec des régions séquencées dans quatre protéines de régulation chez les animaux : la protéine *à doigt de zinc, ZFH1,* chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ; la protéine *à doigt de zinc, LIM3,* chez *le xénope (Xenopus* laevis) ; la protéine *à doigt de zinc, ATBF1,* chez l'homme ; et la protéine à hélice coude hélice, HOXA 13, chez l'homme.

```
WUS      QTSTRWTPTTEQIKILKELYYNNAIRSPTADQIQKITARLRQFGKIEGKNVFYWFQNHKARERQKK
HOXA13,H GRKKRVPYTKVQLKELEREYATN--KFITKDKRRRISATT----NLSERQVTIWFQNRRVKEKKVI
ATBF1,H  DKRLRTTITPEQLEILYQKYLLD--SNPTRKMLDHIAHEV----GLKKRVVQVWFQNTRARERKGQ
LIM3,X   AKRPRTTITAKQLETLKNAYNNS--PKPARHVREQLSSET----GLDMRVVQVWFQNRRAKEKRLK
ZFH1,D   KVRVRTAINEEQQQQLKQHYSLN--ARPSRDEFRMIAARL----QLDPRVVQVWFQNNRSRERKMQ
```

Document 10 : Comparaison de la région comprise entre l'acide aminé 33 et 98 de la protéine WUS avec des régions de protéines régulatrices.
ZFH1, D chez la Drosophile. **LIM3, X** chez le Xénope. **ATBF1, H** et **HOXA13, H** chez l'Homme
Chaque lettre correspond à un acide aminé dans le code international à une lettre.
(Modifié d'après F. Klaus, X. Mayer and al.. 1998. Cell Press 95: 805-815)

3.1.2. Analyser le document 10. A quel type de protéine, la protéine WUS appartient-elle ? Quel est son mode d'action sur les cellules du MAC ?

On s'intéresse à un autre gène dont l'expression contrôle le MAC : le gène *CLAVATA3 (CLV3)*. Pour cela, on obtient de nombreuses plantules d'*Arabidopsis thaliana* mutantes *clavata3* (*clv3*) et on analyse leur phénotype. Cette analyse est morphologique et anatomique. Pour l'analyse anatomique, des coupes de très jeunes MAC sont réalisées en présence d'un colorant nucléaire (l'iodure de propidium) et observées en microscopie optique confocale (technique déjà utilisée pour les documents 3 et 5). L'ensemble des caractéristiques du phénotype des plantules mutantes *clv3* est donné par le document 11 page 7.



Document 11 : Le phénotype de plantules mutantes clavata3.

11A : Microphotographie du MAC d'une plantule de Type sauvage, âgée de 4 jours.

11B : Microphotographie du MAC d'une plantule mutante clv3, âgée de 4 jours.

Chaque pentagone noir précise les limites du MAC

Cot = cotylédons Échelle : barre blanche = 25 μm.

11C : Schéma d'une jeune plantule de Type sauvage, âgée de 10 jours.

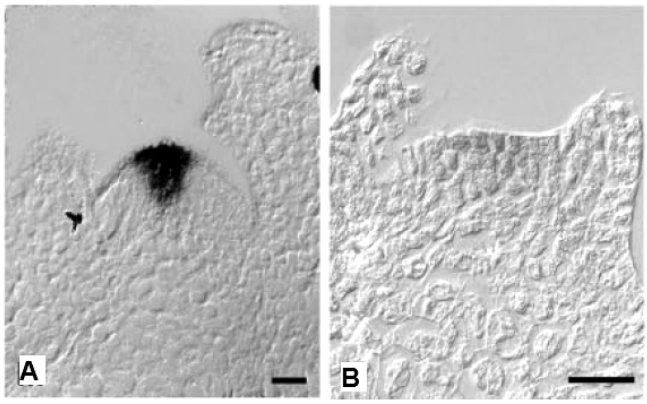
11D : Schéma d'une jeune plantule mutante clv3, âgée de 10 jours.

C = cotylédons **N 1 à 5** : ordre d'apparition des paires de feuilles.

(Modifié d'après SE. Clark and al.. 1995. Development 121: 2057-2067. Et Biologie végétale R. Prat. Dunod 2009)

3.1.3. Analyser l'ensemble du document 11. En déduire la fonction du gène *CLV3*.

On recherche, dans le MAC *d'Arabidopsis thaliana*, les zones d'expression du gène *CLV3,* par insertion d'un gène rapporteur : le gène *GUS,* codant pour la β-glucuronidase, en aval du promoteur du gène *CLV3*. Cette enzyme, produite naturellement par *Escherichia coli,* permet le clivage du X-Gluc soluble et incolore (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β−D-glucuronide) en un produit insoluble et bleu. Cette insertion est réalisée chez *Arabidopsis thaliana* sauvages ou mutantes *wus*. Les résultats sont donnés par les documents 12-A et 12-B ci-dessous.



Document 12 : Expression du gène GUS dans des coupes longitudinales de jeunes MAC d'Arabidopsis thaliana. Le gène GUS est détecté par la couleur noire (bleue dans le document original en couleur).

A- Type sauvage.

B- Mutant wus.

Échelle : La barre noire = 20 μm.

Remarque : La couleur grise des cellules est indépendante de la réaction catalysée par la β-glucuronidase.

(Modifié d'après U. Brand and al.. 2002. Plant Physiology, 129: 565-575)

3.1.4. Expliquer le principe de la technique du gène rapporteur. Donner un autre exemple de gène rapporteur.

3.1.5. Analyser l'ensemble du document 12. En déduire le rôle de la protéine WUS sur le gène *CLV3*.

Afin de préciser les relations entre les gènes *WUS* et *CLV3*, on réalise des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana.* Dans ces plantes transgéniques, la région régulatrice du gène *CLV3* est remplacée par la région régulatrice des gènes du virus de la mosaïque du chou-fleur (ou VMC). Ainsi, dans ces plantes transgéniques (nommées plantes *pVMC::CLV3*), le gène CLV3 est surexprimé. On observe ces plantes transgéniques au bout de 20 jours de développement, et on les compare à des plantes sauvages et à des plantes mutantes *wus*. L'ensemble des observations est donné par le document 13 page 8.

Document 13 : Microphotographies de plantules d'Arabidopsis thaliana, âgées de 20 jours.
13A : Type sauvage. **13B** : Mutant pVMC::CLV3. **13C :** Mutant wus.
La flèche blanche indique que l'on observe la disparition du MAC après la formation des premières feuilles
Échelle : barre blanche = 2 mm.
(Modifié d'après U. Brand and al.. 2000. Science 289 : 617-619)

3.1.6. Analyser l'ensemble du document 13. En déduire le rôle du gène *CLV3* sur le gène *WUS*.

3.1.7. A l'aide des résultats obtenus dans l'ensemble des questions 3.1 et de vos connaissances personnelles, réaliser un schéma montrant le contrôle génétique de la croissance du MAC d'*Arabidopsis thaliana*.

3.2. Le contrôle de la croissance des tiges florales

On s'intéresse à la croissance et au développement du méristème floral (abrégé par MF dans la suite du sujet). Durant la première partie de la vie d'une plante, ou phase végétative, le MAC produit essentiellement des feuilles et des tiges. A la floraison, le MAC se transforme en MF, qui donne progressivement les pièces florales : sépales, pétales, étamines et carpelles. On cherche à mettre en évidence si les gènes *WUS* et *CLV3* qui contrôlent, comme nous venons de le voir auparavant, la croissance du MAC, interviennent également dans le contrôle du MF.

Dans un premier temps, on s'intéresse au gène *WUS*. Comme pour l'étude du MAC, on obtient des mutants *wus d'Arabidopsis thaliana*, et on observe le développement du MF des plantes de type sauvage et des plantes mutantes *wus.* Cette observation est donnée par le document 14 page 10.

3.2.1. Décrire et comparer les deux phénotypes présentés par le document 14. En déduire la fonction du gène *WUS* sur le MF.

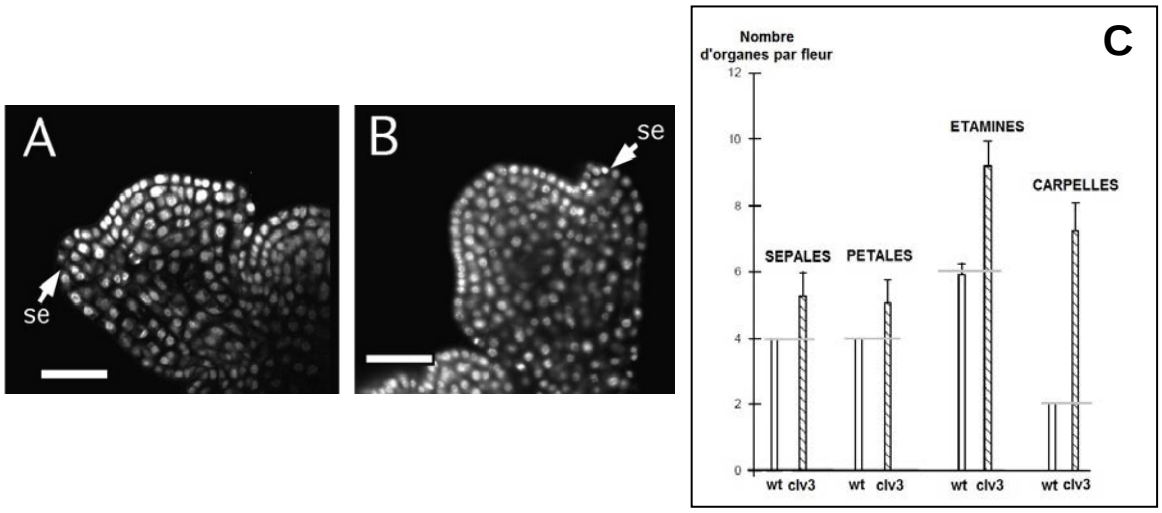
On recherche les transcrits (ARNm) du gène *WUS* par hybridation *in situ* dans le MF *d'Arabidopsis thaliana* à différents stades du développement du MF. Le résultat est donné par le document 15 page 10.

3.2.2. Expliquer le principe de l'hybridation *in situ*.

3.2.3. Analyser l'ensemble du document 15. En quoi ce document permet-il de confirmer et de préciser la fonction du gène *WUS* sur le MF ?

Dans un second temps, on s'intéresse au gène *CLV3*. Pour cela, on obtient de nombreuses plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutantes *clavata3* (*clv3*) et on analyse le phénotype de leur MF. Cette analyse est morphologique et anatomique. L'analyse anatomique des MF est réalisée avec la même technique que celle du document 11. L'ensemble des caractéristiques du phénotype des MF des plantules mutantes *clv3* est donné par le document 16 page 9.

3.2.4. Décrire et comparer les deux phénotypes présentés par le document 16. En déduire la fonction du gène *CLV3* sur le MF.



Document 16 : Le phénotype du MF de plantes mutantes clv3.

16A : Microphotographie du MF d'une plante de Type sauvage.

16B : Microphotographie du MF d'une plante mutante clv3.

se = sépale Échelle : barre blanche = 25 μm.

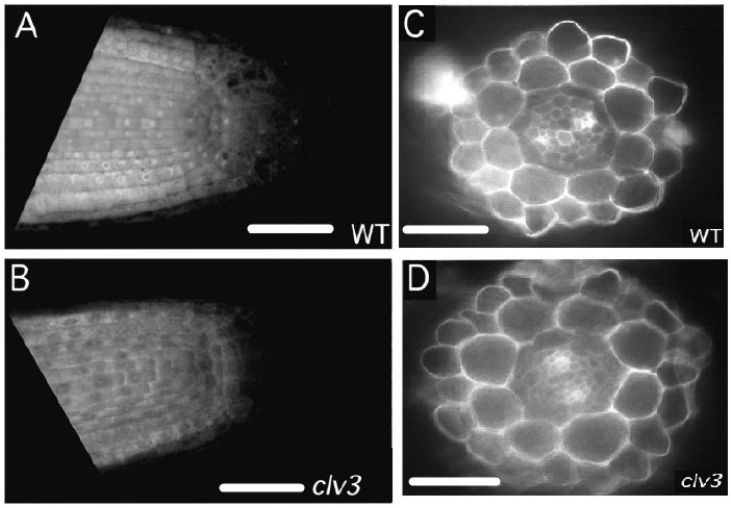
16C : Nombre d'organes floraux chez une plante de type sauvage (notée wt) et chez une plante mutante clv3. Plus de 100 plantes ont été analysées.

(Modifié d'après SE. Clark and al.. 1995. Development 121: 2057-2067)

3.3. Le contrôle de la croissance des racines

On s'intéresse à la croissance et au développement du méristème racinaire (abrégé par MR dans la suite du sujet). On cherche à mettre en évidence si le gène *CLV3* intervient également dans le contrôle de la croissance et le développement du MR.

Comme pour les études du MAC et MF, on obtient de nombreuses plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutantes *clavata3* (*clv3*) et on analyse le phénotype de leur MR. Cette analyse est uniquement anatomique et elle est réalisée avec la même technique que celle du document 11. L'ensemble de cette étude anatomique des MR est donné par le document 17 ci-dessous.



Document 17 : Microphotographies de MR de plantes Type sauvage (wt) et mutantes clv3 âgées de 21 jours.

17A+B : Coupes longitudinales du MR. Échelle : barre blanche = 25 μm.

17C+D : Coupes transversales du MR. Échelle : barre blanche = 5 μm.

Remarque : Les variations de fluorescence et de contraste sont dues uniquement à la technique utilisée : elles ne sont donc pas significatives.

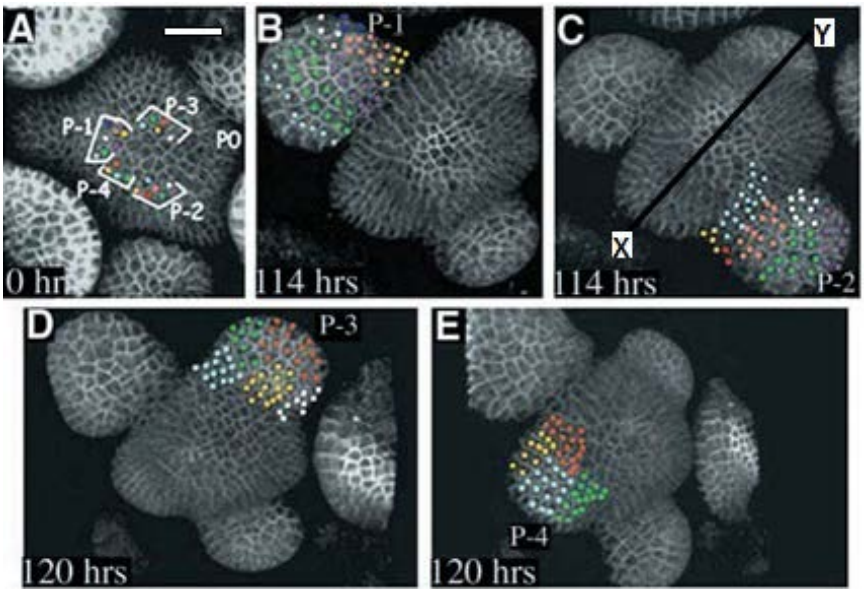
(Modifié d'après SE. Clark and al.. 1995. Development 121: 2057-2067)

3.3.1. Comparer la taille, la forme et la disposition des cellules sur les deux phénotypes présentés par le document 17. En déduire la fonction du gène *CLV3* sur le MR.

3.3.2. A partir des résultats obtenus dans l'ensemble des questions 3.1, 3.2 et 3.3, conclure sur le caractère tissu spécifique de l'expression des gènes *CLV3* et WUS. Justifier votre réponse.

Document 3 : Observation en microscopie optique confocale de la croissance en temps réel du MAC d'Arabidopsis thaliana, avec lignage des divisions cellulaires. Le MAC est vu de dessus. *(D'après GV. Reddy and al. 2004. Development 131: 4225–4237)*

Échelle : La barre blanche sur le document 3A = 20 µm.
Le grossissement est identique pour l'ensemble du document 3.



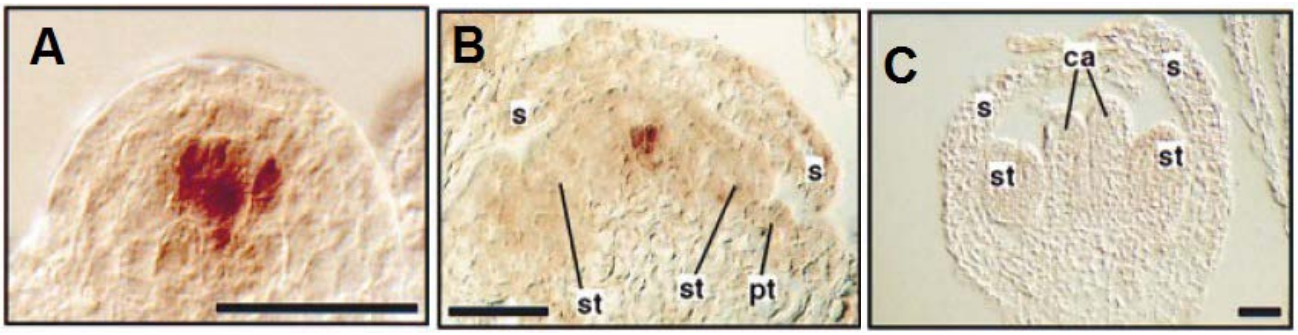
Document 14 : Microphotographies de plantules d'Arabidopsis thaliana, âgées de 7 jours.

A- Type sauvage.
B- Mutant wus

Remarque : Dans les deux cas les 4 sépales étaient présents mais ont été retirés pour les besoins de la photographie.

Échelle : barre grise =1 mm.

(Modifié d'après T. Laux, KFX. Mayer and al.. 1996. Development 122: 87-96.)



Document 15 : Détection par hybridation in situ des ARNm du gène wus, dans des coupes longitudinales de MF d'Arabidopsis thaliana à trois stades de développement. Les ARNm sont détectés par la couleur brun foncé.

A- MF au stade de développement 2.
B- MF au stade de développement 6
C- MF au stade de développement 10

Avec : **s** = sépale **pt** = pétale **st** = étamine **ca** = carpelle

Échelle : La barre noire = 30 µm.

Remarque : la couleur beige des cellules est indépendante de la réaction d'hybridation.

(Modifié d'après Klauss F.X. Mayer and al.. 1998. Development 95: 805-815.)

BIOLOGIE 2 (durée conseillée 1h30)

Remarque importante : Le candidat veillera à répartir le temps de l'épreuve sur l'ensemble des parties 4 (9 points), 5 (8 points) et 6 (3 points) qui sont indépendantes. Le jury attend des réponses précises, courtes et synthétiques.

QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DES PRIONS

Le terme de prion fut introduit pour la première fois en 1982 par Stanley Prusiner et correspond à l'acronyme de *PRoteinaceous Infectious ONly particle* (particule protéique infectieuse), abrégés PrP. Les prions se distinguent très nettement des agents infectieux conventionnels comme les bactéries, les virus. Pour l'ensemble de ses travaux, Prusiner a obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1997.

Les prions de mammifères sont les agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prion. Parmi les EST les plus connues, on peut citer chez l'homme les différentes formes de la maladie de Creutzfeld-Jakob, l'insomnie fatale familiale (IFF), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), le Kuru et chez l'animal, la tremblante du mouton et de la chèvre (*scrapie* en anglais), l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).

L'ensemble de ces maladies se caractérise par une dégénérescence du système nerveux central liée à la propagation et la multiplication des prions chez l'hôte infecté. D'un point de vue anatomo-pathologique, on observe ainsi au niveau de l'encéphale la formation de vacuoles (donnant un aspect spongieux au cerveau, d'où le nom de spongiforme dans EST), une mort des neurones, une gliose (multiplication des astrocytes et de la microglie) et l'accumulation d'une protéine de l'hôte, une forme anormale de la protéine prion.

On se propose ici de définir la nature et les propriétés des prions (partie 4), de leur organisation moléculaire (partie 5) pour enfin étudier quelques uns de leurs effets sur le système nerveux (partie 6).

4. Nature et propriétés des prions (9 points)

Les premiers travaux de Stanley B. Prusiner ont consisté à déterminer la nature de l'agent infectieux de la tremblante. Sur le modèle du hamster, les travaux ont consisté à mesurer le pouvoir infectieux de l'agent en déclenchant la maladie par inoculation de l'agent purifié et traité. Le tableau du document 18 ci-dessous récapitule certains de ces traitements et leurs résultats.

Traitement	Résistance	Sensibilité
Digestion par des protéinases		Protéinase K, trypsine
Détergents		SDS (Sodium dodécyl sulfate)
Ions	Forte concentration de Na^+, K^+	
Dénaturants		Urée
Solvants organiques	Méthanol, éthanol	Phénol

Document 18 : Propriétés moléculaires de l'agent de la tremblante
(D'après Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, SB Prusiner, Science, 1982)

S.B. Prusiner a par la suite recherché si un acide nucléique était impliqué dans le mécanisme infectieux de la tremblante. Pour cela et selon le même protocole que précédemment, l'agent infectieux a été traité par différentes procédures récapitulées dans le document 19.

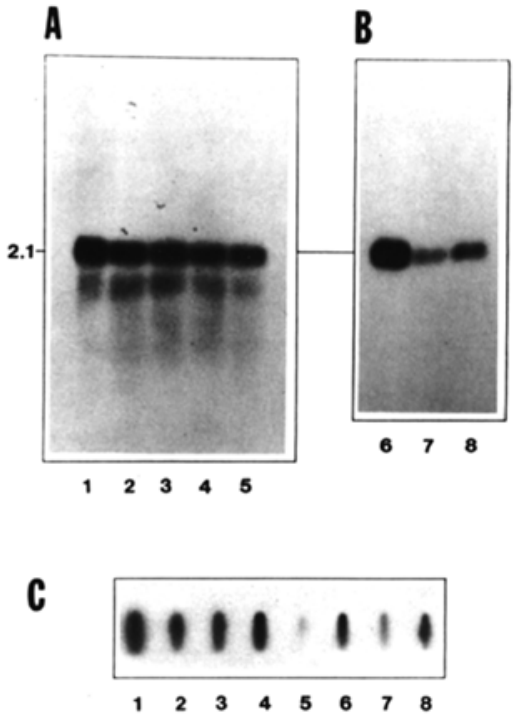
Procédure	Résistance	Sensibilité	Complément sur les effets des traitements
Digestion aux nucléases	Ribonucléases Désoxyribonucléases		
Irradiation aux ultraviolets	254 nm		Les bases azotées des acides nucléiques absorbent à 254 nm

Document 19 : Résistance de l'agent de la tremblante à différentes procédures
(D'après Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, SB Prusiner, Science, 1982)

4.1 A l'aide du document 18 et en précisant l'effet des différentes substances utilisées, émettre une hypothèse sur la nature et les propriétés de l'agent de la tremblante.

4.2 A l'aide du document 19 et en décrivant l'effet des procédures utilisées, préciser votre réponse.

On cherche à détecter la transcription du gène PrP. On purifie les ARN poly A totaux de cerveaux sains et de cerveaux infectés par la tremblante à différents moments après l'inoculation. Une électrophorèse suivie d'un Northern blot avec l'ADNc PrP marqué au ^{32}P et d'une autoradiographie est réalisée. Les résultats sont présentés sur le document 20.



A. Analyse par Northern blot des ARN de cerveau. Puits 1 : ARNm extraits de hamster non inoculés âgés de 40 jours. Puits 2 à 5 : ARNm extraits d'hamster infectés par la tremblante après 24 heures, 20 jours, 40 jours et 60 jours d'inoculation.
Les ARN situés sous la bande à 2.1 kb ne sont pas reproductibles et sont attribués à une dégradation de l'échantillon.

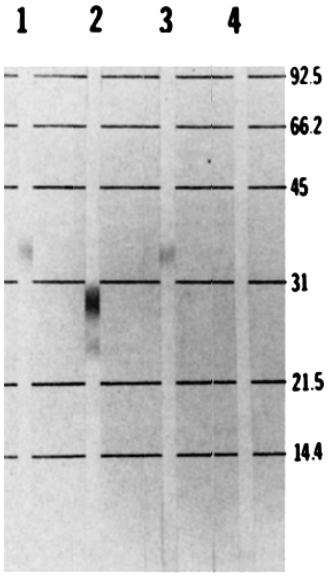
B. Analyse par Northern blot des ARNm de différents organes d'animaux non infectés : cerveau (puits 6), cœur (puits 7) et poumons (puits 8).

C. Analyse par Northern blot des ARNm de différents organes d'animaux infectés : du cerveau (puits 1), du cœur (puits 2), des poumons (puits 3), du pancréas (puits 4), du foie (puits 5), de la rate (puits 6), des testicules (puits 7) et des reins (puits 8).

Document 20 : Détection des transcrits ARNm de hamster sains et infectés par la tremblante
(D'après A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein, Oesch et al., Cell, 1985)

4.3 Analyser les résultats d'expression du gène PrP. Conclure.

La purification de l'agent de la tremblante dans des cerveaux de hamster infectés met en évidence une protéine dont le PM (poids moléculaire) apparent est de 27 à 30 kD. Cette protéine notée PrP 27-30 est en quantité très importante dans les cerveaux infectés mais elle existe également avec un PM de 33 à 35 kD dans les cerveaux sains.
L'analyse de la quantité de PrP 27–30 a été faite par immunoblot avec ou sans digestion à la protéinase K dans des cerveaux de hamsters infectés et sains. Le western blot est visualisé par un antisérum ou des anticorps anti- PrP 27 -30. Le sarkosyl (Sodium lauroyl sarcosinate) est un puissant détergent.
Les résultats sont présentés dans le document 21.



Colonnes 1 et 2 : extraits de cerveaux infectés.
Colonnes 3 et 4 : extraits de cerveaux sains.
La digestion par la protéinase K est montrée sur les puits 2 et 4.
Les Western blots sont conduits avec un anticorps anti PrP 27–30.
La quantité de protéines déposée est la même dans tous les puits.

Document 21 : Immunoblots d'extraits traités au sarkosyl de cerveaux contrôle et de cerveaux d'hamster infectés par la tremblante
(D'après A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein, Oesch et al., Cell, 1985)

4.4 Analyser et interpréter les résultats du document 21. Quelle différence fondamentale apparaît dans le comportement de PrP 33-35 de cerveaux sains et infectés ?

On montre que des cerveaux de hamster infectés par la scrapie contiennent des protéines prions PrP 33 -35^{Sc}. Or une protéine similaire notée PrP 33 – 35^{C} est trouvée dans des cerveaux sains. On cherche ici à montrer la localisation subcellulaire de la PrP 33-35^{C} et de la PrP 33-35^{Sc}.

Les travaux suivants sont réalisés chez des hamsters inoculés ou non avec l'agent de la tremblante. L'inoculation est intracérébrale et les cerveaux de hamster sont collectés à partir de hamsters sacrifiés après 60 jours d'infection ou à partir de cerveaux de hamsters non infectés de même âge.

Les cerveaux sont broyés puis homogénéisés et l'homogénat est fractionné par centrifugation différentielle à 4°C pendant 60 minutes. La présence de PrP est testée dans les fractions par un anticorps anti PrP 27–30 sur des aliquotes des différents culots et surnageants. La présence (+) ou l'absence (-) de PrP est notée. La concentration de PrP 33-35 est la somme de PrP 33 – 35^{C} et de PrP 33 – 35 ^{Sc} qui est déduite de PrP 27-30. Les résultats sont présentés dans le document 5.

	PrP 33-35	PrP 27-30
Homogénat	+	+
Culot (1000 × *g*)	+	+
Surnageant (1000 × *g*)	+	+
Culot (10,000 × *g*)	+	+
Culot (100,000 × *g*)	+	+
Surnageant (100,000 × *g*)	–	–

Document 22 : Présence de PrP 33-35 et PrP 27-30 dans le fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle de cerveaux de hamsters infectés par la scrapie
(D'après Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins, Meyer et al. PNAS, 1986)

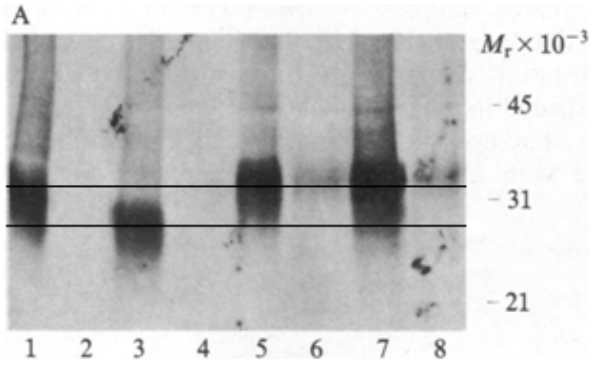
Informations supplémentaires importantes :

- PrP 33-35 a été mise en évidence dans tous les culots de centrifugation obtenus à partir de cerveau de hamsters infectés par l'agent de la tremblante et de hamsters non infectés mais elle est absente du surnageant obtenu à haute vitesse.
- la concentration de PrP 33-35 dans les cerveaux infectés par l'agent de la tremblante est augmentée de 5 à 10 fois 60 jours après l'inoculation intracérébrale, en comparaison avec les cerveaux non infectés.

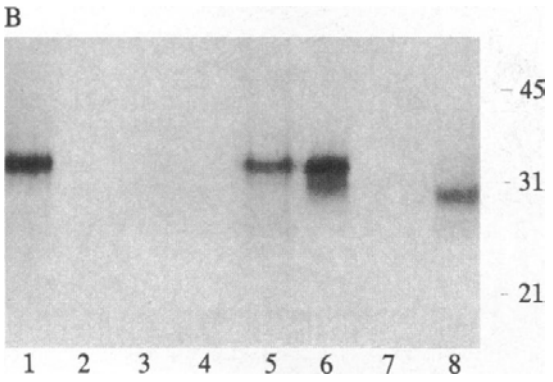
4.5 Qu'est ce qu'une centrifugation différentielle ? Qu'obtient-on aux différentes étapes et à la fin du protocole ?

4.6 Analyser les données du document 22. Préciser notamment la localisation sub-cellulaire de la PrP.

On cherche à savoir dans quelles proportions PrP 33-35^{Sc} et PrP 33-35^{C} sont présentes grâce à l'action de la protéinase K.



A : Immunoblot de la PrP. Les échantillons des puits 1 à 4 ont été digérés 30 minutes avec la protéinase K à 100 µg / mL. Les échantillons 5 à 8 n'ont pas été traités à la protéinase. Puits impairs : échantillons obtenus à partir de hamster infectés de scrapie. Puits pairs : échantillons obtenus à partir d'hamster non infectés. Le sarkosyl a été ajouté aux aliquotes des fractions microsomales 1, 2, 5 et 6.



B : Les microsomes sont extraits au détergent sarkosyl puis les échantillons sont analysés par immunoblot. Le surnageant et les culots obtenus par centrifugation prolongée sont testés. Puits 1 à 4 : échantillons obtenus à partir d'animaux non infectés. Puits 5 à 8 : échantillons obtenus à partir d'animaux infectés. Puits 1 et 5 : surnageant, sans protéinase K. Puits 2 et 6 : culot, sans protéinase K ajoutée. Puits 3 et 7 : surnageant digéré par la protéinase K. Puits 4 et 8 : culot digéré par la protéinase K.

Document 23 : Analyse de la PrP^{C} ou PrP^{Sc} des microsomes de cerveaux de hamsters infectés ou non infectés
Les poids moléculaires sont indiqués en kD.
(D'après Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins, Meyer et al. PNAS, 1986)

4.7 Analyser les résultats du document 23.

4.8 Proposer un schéma bilan précisant la localisation et le rapport entre les différentes protéines PrP.

5. Organisation moléculaire et conversion PrP^{C} en PrP^{Sc} (8 points)

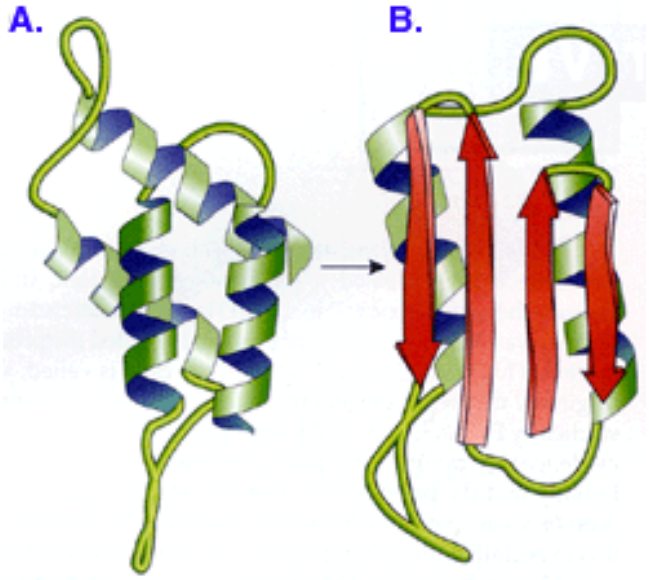
On montre que le gène PrP est entièrement codant et que sa taille est de 720 nucléotides. On montre par ailleurs que PrP 27- 30 possède 142 acides aminés.

5.1 Que pouvez-vous dire de la protéine codée par le gène PrP ? Qu'en déduisez-vous sur la protéine PrP 27-30 ? On rappelle que le PM moyen d'un acide aminé est de 110 Daltons.

PrP^{C} et PrP^{Sc} présentent la même structure primaire. Des études de spectroscopie ont permis de déterminer la structure secondaire des protéines prions PrP^{C} et PrP^{Sc} et PrP 27-30. Le contenu en structures secondaires est donné dans le document 24. La conformation est donnée dans le document 25.

Structure	PrP^{C}	PrP^{Sc}	PrP 27-30
Hélice	42	30	21
Feuillet	3	43	54
Turn (coude)	32	11	9
Coil (boucle)	23	16	16

Document 24 : Proportions en structures secondaires mesurées par spectroscopie (en pourcentage)
(D'après Conversion of a-helices into ,f-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, Pan et al., PNAS, 1993)



Document 25 : Structures tertiaires de la PrP^{C} (en A) et de la PrP^{Sc} (en B)
La structure tertiaire de la PrP 27-30 n'est pas encore bien connue, elle est particulièrement difficile à établir.

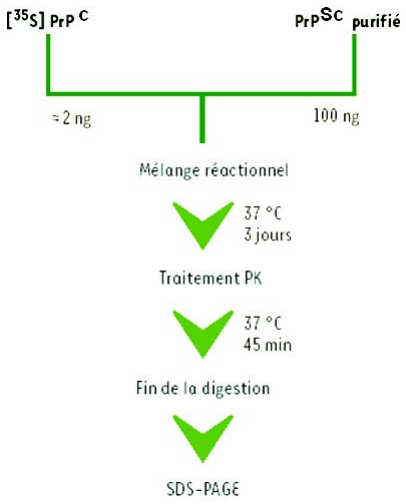
5.2 Qu'est ce qu'une structure secondaire ? Schématiser en détail deux structures secondaires de votre choix.

5.3 Qu'est ce qu'une structure tertiaire ? Comment est-elle établie ?

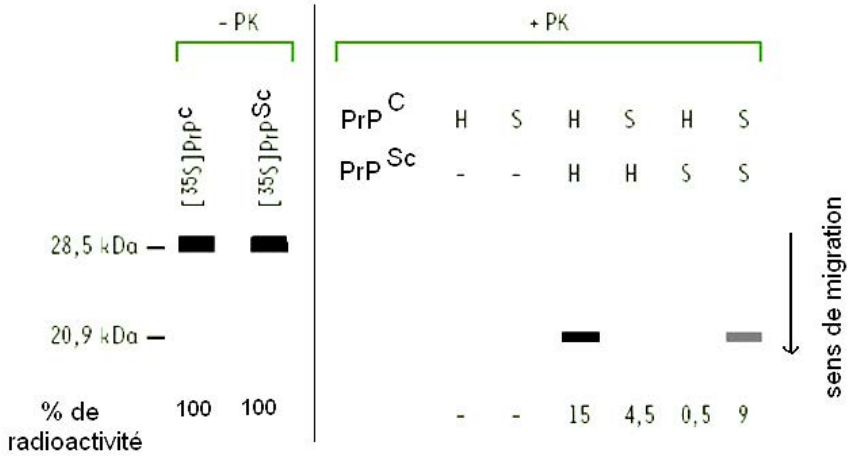
5.4 A l'aide des documents 24 et 25, préciser comment sont organisées PrP^{C} et PrP^{Sc} et PrP 27-30.

5.5 Relier les conclusions issues de la quatrième partie aux conformations de PrP^{C} , PrP^{Sc} et PrP 27-30.

En 1996, le groupe de B. Caughey a pu mettre en évidence la relation entre PrP^{C} en PrP^{Sc} in vitro dans un système acellulaire. La réaction utilise de la PrP^{Sc} résistante à la protéinase K, extraite et purifiée de cerveaux d'animaux infectés, et de la PrP^{C} marquée au ^{35}S radioactif. Après incubation de plusieurs heures, le mélange réactionnel est soumis à une digestion par la protéinase K puis à une électrophorèse. Le principe de l'expérience et les résultats sont présentés dans le document 26.



A. Principe de l'expérimentation



B. Schéma des résultats de l'électrophorèse

Document 26 : Principe (en A) et schéma des résultats de l'électrophorèse après autoradiographie (en B)
Dans ces conditions expérimentales, PrP^C et PrP^{Sc} ont un poids moléculaire de 28.5 kD. La digestion par la protéinase K (notée PK) produit une protéine de 20.9 kD.
En B :
A gauche, résultats de l'électrophorèse de PrP^C et PrP^{Sc} marquées au ^{35}S.
A droite, résultats de l'électrophorèse de différents mélanges de PrP.
- différents mélanges de PrP^C et de PrP^{Sc} ont été réalisés : en présence de PrP de hamster (H) ou de souris (S) ou en l'absence de PrP (-).
- le pourcentage de radioactivité indique le pourcentage de radioactivité dans la bande marquée par rapport à la quantité de PrP^C radioactive au départ.
(Résultats simplifiés, d'après La protéine prion : structure, dynamique et conversion in vitro, J. Torrent, M/S 2002)

5.6 Que montrent les résultats du document 26 ? Conclure sur la multiplication de l'agent infectieux de la tremblante.

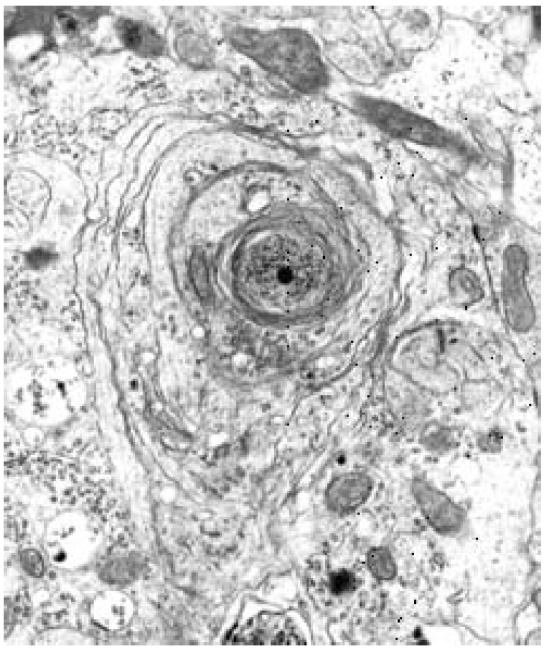
5.7 En quelques phrases, résumer les conclusions de la partie 5.

6. Quelques caractéristiques tissulaires et cellulaires de la dégénérescence du système nerveux central causées par les prions (3 points)

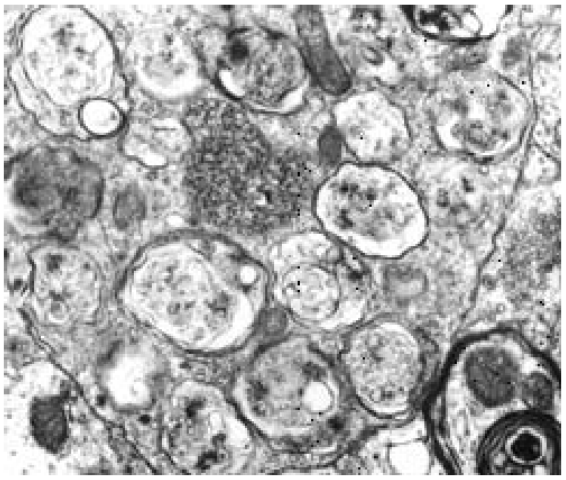
La technique de *In situ end labelling (*ISEL) utilise une ADN polymérase pour incorporer des nucléotides marqués aux extrémités des brins d'ADN fragmentés, elle permet donc de montrer la fragmentation de l'ADN nucléaire. Cette technique a été utilisée sur un modèle murin de la tremblante, conjointement à une immunolocalisation de la protéine PrP et des macrophages dans l'hippocampe. Les résultats sont présentés dans le document 27 (pages 19 et 20).

6.1 Analyser le document 27 et conclure sur chacune des données.
On attachera une attention particulière à l'intensité des marquages et aux indications fléchées, la connaissance de la structure de l'hippocampe n'est pas nécessaire pour répondre à cette question.

Il apparaît que les effets sur le système nerveux central de la souris sont plus tardifs que chez le hamster chez qui la maladie se déclare à 60 jours. Des études à l'échelle subcellulaire ont été conduites. Le document 28 présente des électronographies du cytoplasme de cellules de l'hippocampe de hamster.



A



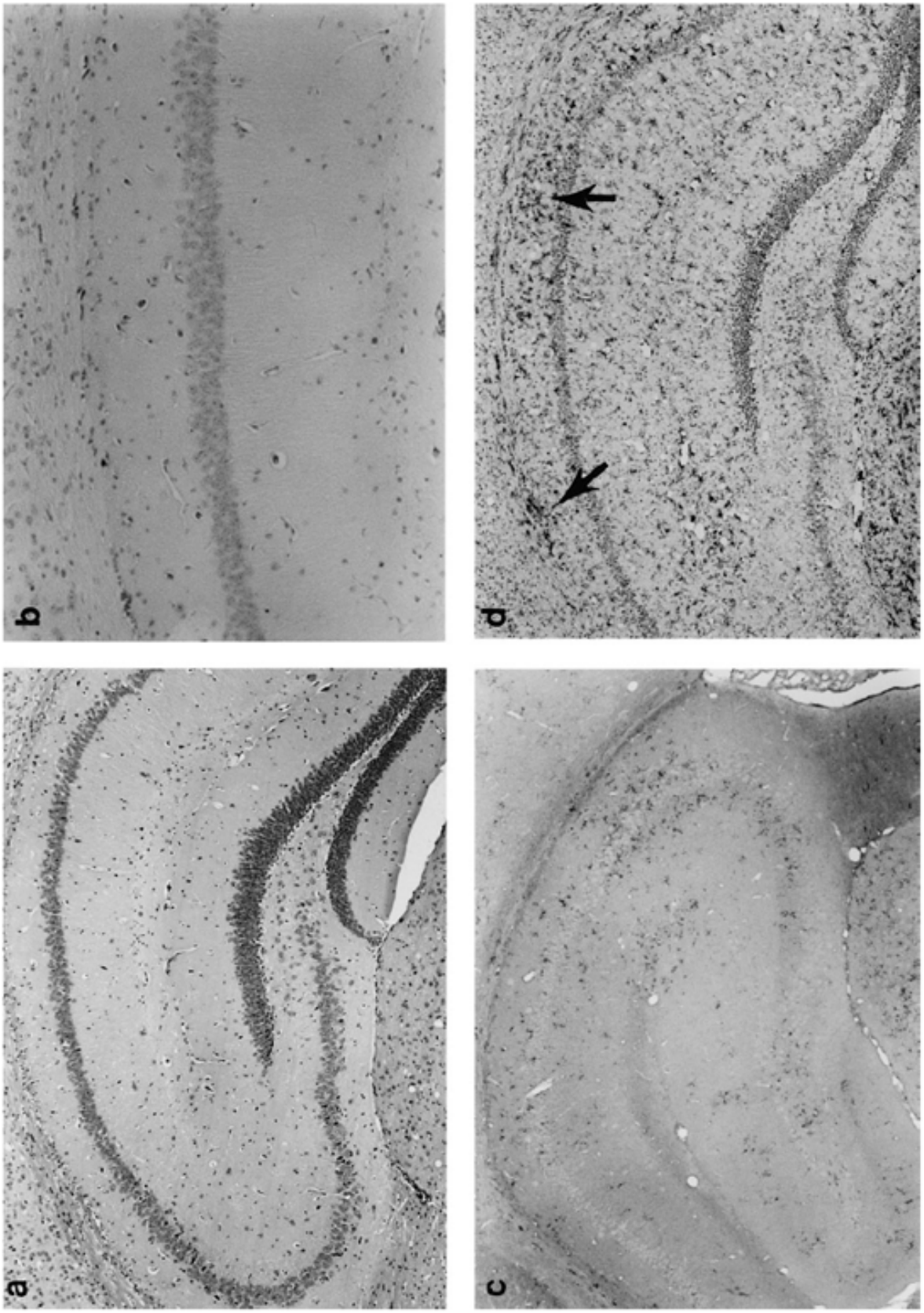
B

Document 28 : Electronographies du cytoplasme neuronal de cellules de l'hippocampe de hamster 60 jours après l'inoculation de l'agent de la tremblante. Marquage au tétroxyde d'osmium. En A : G = x 12 000, en B : G = x 30 000.
(D'après PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie, Williams, Expérimental Neurology 1997)

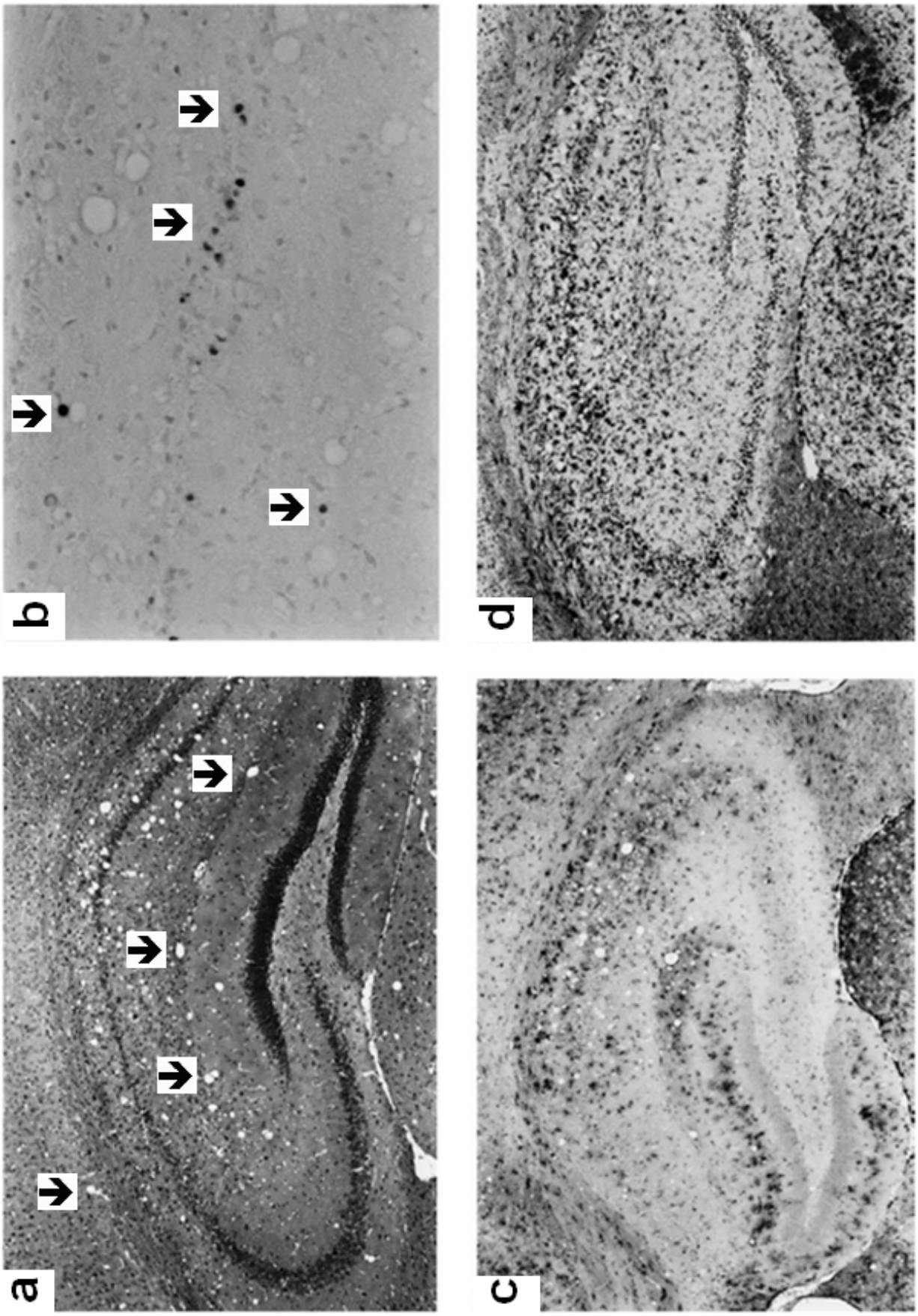
6.2 Quelles informations supplémentaires apportent ces électronographies ?

6.3 Résumer en quelques phrases les conclusions de la partie 6.

Document 27 : Mise en évidence de quelques caractéristiques de la tremblante dans l'hippocampe de souris
En A : 60 jours après l'inoculation
En B : 105 jours après l'inoculation.
(a) Coloration à l'hématoxyline et l'éosine (G = x36). Les flèches désignent des cavités ;
(b) ISEL (G = x 180). Les flèches désignent le marquage ;
(c) Immunohistochimie PrP (G = x 36) ;
(d) Immunohistochimie macrophages et microglie (G = x 36). Les flèches montrent les zones de dépôt de PrP.
(D'après PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie, Williams, Expérimental Neurology 1997)



A. 60 jours après l’inoculation

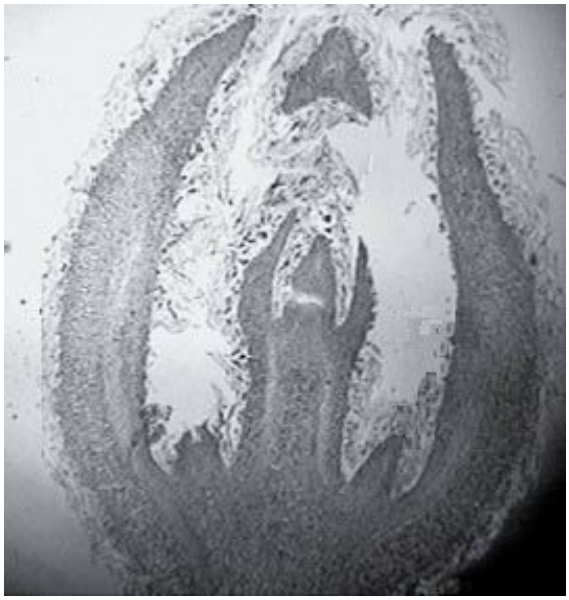


B : 105 jours après l'inoculation

ANNEXE DE LA BIOLOGIE 1

A DECOUPER ET A COLLER SUR VOTRE COPIE

✂----------



✂----------

Document 1 : Observation au microscope optique d'une coupe longitudinale de l'extrémité d'un rameau d'olivier.

Grossissement : x 32.

(Modifié d'après M.A. Mezghani, S. Ben El Hadj, F. Labidi, A. Jebari. 2008. Biotechnology Agronomy Society and Environment, 12:(3)259-266)