

SESSION 2003

---

**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.**

### **Thème** de l'épreuve : les **PHOSPHORYLATIONS**

Le sujet qui vous est proposé est divisé en deux parties totalement indépendantes identifiées par les lettres A et B. Vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Les documents se rapportant à chacune des questions sont repérés par la même lettre que la partie du sujet à laquelle ils correspondent.

Il sera particulièrement tenu compte de la clarté et de la concision des réponses, de la qualité et de la précision des schémas.

Il est fortement recommandé aux candidats de bien gérer leur temps de composition afin de pouvoir aborder les deux parties du sujet. A titre tout à fait indicatif, des temps sont proposés pour chacun des chapitres à traiter.

**Partie A : 1er sujet avec documents (Durée conseillée 3 h)**

***Ce sujet comporte une partie A.1 de type « Sujet de Synthèse » faisant appel aux connaissances et aux qualités rédactionnelles du candidat.***

Au cours du développement du système nerveux, le réseau de neurones est mis en place et modelé sous l'action de facteurs de l'environnement : facteurs diffusibles comme les hormones, les cytokines et les facteurs de croissance.

Les cellules précurseurs des neurones prolifèrent au niveau de zones germinatives. Sous l'action de signaux extracellulaires, certains précurseurs cessent de se multiplier, et s'engagent vers un processus de *différenciation*. Ce phénomène consiste en l'acquisition des propriétés biochimiques (comme l'expression de certains enzymes et récepteurs spécifiques), morphologiques (comme l'extension d'axones et de dendrites, ou neurites) et électrophysiologiques (comme la capacité à générer un potentiel d'action) qui permettront à la cellule de remplir sa fonction neuronale. Progressivement, les cellules précurseurs qui commencent à se différencier, étendent en direction de leur cible de fins prolongements qui sont guidés sous l'effet attracteur ou répulsif de divers facteurs extracellulaires. Une fois leur cible atteinte, les neurones soit se différencient au niveau biochimique, s'intègrent dans le réseau neuronal en stabilisant leurs connexions avec les autres cellules, soit sont éliminés, le cas échéant, par mort cellulaire.

Le *nombre* de cellules qui composent le réseau neuronal est contrôlé par des facteurs solubles qui modulent la prolifération des cellules précurseurs des neurones et la survie des neurones plus matures. Le *devenir* des cellules, c'est-à-dire l'engagement vers la différenciation ou vers la mort cellulaire, est aussi contrôlé par des facteurs solubles, provenant de leur cible ou de leur environnement.

**A-1. Signalisation inter- et intracellulaire (Durée conseillée 45 min)**

De la reconnaissance d'un signal extracellulaire à la réponse biologique de la cellule.

*A partir d'un exemple de votre choix, vous vous attacherez notamment à caractériser les mécanismes moléculaires et événements intracellulaires qui mènent de la reconnaissance du signal à la réponse de la cellule.*

**A-2. Caractérisation d'un facteur de croissance *in vivo*.**

**A-2.1.** Des ganglions nerveux de poulet ont été isolés et incubés en présence d'extraits de glande salivaire de souris adultes. La formation d'un halo dense autour du ganglion correspond à la stimulation de la croissance des neurites des cellules nerveuses formant le ganglion (Document A.1)

Afin d'identifier les facteurs, contenus dans l'extrait de glande salivaire de souris adulte, responsables de la stimulation de l'extension neuritique (effet neurotrophique), on effectue trois étapes successives de purification de cet extrait et on obtient trois fractions : CM-1, CM-2 et CM-3.

*Comment procéderiez-vous pour tester l'activité neurotrophique de ces fractions ?*

**A-2.2.** On injecte quotidiennement pendant 12 jours la fraction purifiée CM-3 à des souriceaux nouveau-nés et à des souris adultes. Des animaux contrôles sont injectés avec du liquide physiologique dans les mêmes conditions (Tableau A1).

		Ganglions nerveux		Fibres nerveuses	
		Volume cellulaire (% du contrôle)	Nombre de neurones (% du contrôle)	Epaisseur des neurites	Densité de neurites
Souriceaux	Contrôles	100	100	n.d.	n.d.
	+ CM-3	410	250	n.d.	n.d.
Souris adultes	Contrôles	100	100	-	-
	+ CM-3	200	100	+++	+++

**Tableau A1 :** Effets de l'injection quotidienne de la fraction CM-3 sur le développement des ganglions nerveux et des fibres nerveuses chez le souriceau et chez la souris adulte. n.d. : non déterminé.

*Quels effets induit la fraction CM-3 sur le développement des cellules nerveuses chez le souriceau ? Chez l'adulte ? Selon vous, quels événements cellulaires pourraient rendre compte de l'effet observé sur le nombre de cellules nerveuses ganglionnaires chez le souriceau ?*

**A-2.3.** L'activité mitotique des cellules ganglionnaires de souriceaux nouveau-nés injectés quotidiennement avec du CM-3 pendant 9 jours est mesurée en comptant le nombre de cellules mitotiques sur des coupes de ganglion nerveux (Tableau A2).

Age	1 jour	3 jours	5 jours	7 jours	9 jours
Contrôles	140	170	180	180	50
Injection CM-3	140	250	400	250	50

**Tableau A2 :** Nombre de cellules présentant des figures mitotiques dans les ganglions nerveux de souriceaux nouveau-nés injectés ou non par du CM-3.

*Commentez l'effet de l'injection de la fraction CM-3 sur l'activité mitotique des cellules des ganglions nerveux de souriceaux.*

**A-2.4.** Le principe actif contenu dans la fraction CM-3 responsable de l'effet neurotrophique est appelé Nerve Growth Factor ou NGF. Les auteurs ont injecté la fraction CM-3 à des lapins et ont obtenu un sérum contenant des anticorps dirigés contre le NGF.

- a.** *Par quelle expérience démontreriez-vous que ces anticorps sont dirigés contre le NGF ?*

Ce sérum anti-NGF est injecté quotidiennement pendant 20 jours à des souriceaux nouveau-nés. Des souriceaux contrôles sont injectés dans les mêmes conditions avec du sérum de lapin normal. Les ganglions nerveux d'animaux traités et contrôles sont disséqués et étudiés. Le document A.2 présente les résultats obtenus lorsque la dissection est réalisée plusieurs semaines après le traitement. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la dissection est réalisée juste après le traitement.

- b.** *Caractérisez l'effet des sera utilisés.*

- c. *Que signifie l'observation, chez les animaux traités, d'une morphologie ganglionnaire similaire juste après le traitement ou plusieurs semaines après la fin du traitement ?*

### A-3. Caractérisation du récepteur du Nerve Growth Factor.

**A-3.1.** Des études préliminaires visant à caractériser la signalisation intracellulaire initiée par le NGF ont conduit au clonage d'un ADN complémentaire (ADNc) codant une protéine tyrosine kinase de 140 kDa, appelée Trk. Cette protéine appartient à la même famille que le récepteur de l'insuline. Afin de préciser le rôle de cette protéine, l'ADNc codant Trk a été introduit par transfection dans une lignée cellulaire appelée L. On obtient alors la lignée cellulaire L-Trk. Les cellules L et L-Trk, cultivées en présence ou en l'absence de NGF, sont lysées et les ARN totaux sont extraits. Les ARN sont séparés selon leur taille par électrophorèse et transférés sur une membrane, où ils sont hybridés avec l'ADNc radiomarqué de Trk (Document A.3).

*Interprétez ces résultats. Pourquoi a-t-on choisi les cellules L pour la transfection ?*

**A-3.2.** Les cellules L et L-Trk sont incubées pendant 2 heures à 4°C avec du NGF radiomarqué à l'iode 125 ( $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$ ), en présence ou en l'absence d'un excès de NGF non radiomarqué. Le NGF radioactif non lié est ensuite éliminé par plusieurs lavages. Les cellules sont lysées et la radioactivité associée aux cellules est mesurée (Tableau A3).

	$[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$	$[^{125}\text{I}]\text{-NGF} + \text{NGF}$
Cellules L	0,1	0,1
Cellules L-Trk	4,5	0,1

**Tableau A3 :** Liaison du NGF radiomarqué aux cellules L et L-Trk en culture, exprimée en coups.min<sup>-1</sup> ( $\times 10^{-4}$ ) et pour  $10^5$  cellules.

- a. *A quoi correspond la radioactivité liée aux cellules L et L-Trk ?*
- b. *Comment expliquez-vous la diminution de radioactivité liée aux cellules L-Trk en présence d'un excès de NGF ?*
- c. *A partir des informations obtenues jusqu'ici, dégagez le rôle de la protéine Trk dans les cellules des ganglions nerveux.*

Dans une seconde expérience, on incube les cellules L-Trk avec du  $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$  pendant 2 heures à 4°C en présence de concentrations croissantes en facteur de croissance NGF, EGF (Epidermal Growth Factor) ou NT3 (Neurotrophine-3). Après plusieurs lavages, la radioactivité associée aux cellules est mesurée. Pour chaque facteur de croissance, on obtient une courbe de déplacement de la liaison du NGF radiomarqué en fonction de la concentration du facteur de croissance (Document A.4).

- d. *Déterminez pour chaque facteur de croissance, la concentration de ligand qui donne lieu à 50% de déplacement de la liaison du  $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). Que pouvez-*

*vous conclure quant à l'affinité des facteurs de croissance NGF, EGF et NT3 pour la protéine Trk ?*

- e. *Comment démontreriez-vous qu'un facteur de croissance est un inhibiteur compétitif de la liaison du [<sup>125</sup>I]-NGF ?*

**A-3.3.** Les cellules des lignées L et L-Trk sont incubées en présence de [<sup>125</sup>I]-NGF pendant 2 heures à 4°C, en présence d'un agent chimique qui assure l'établissement d'une liaison covalente entre le ligand radiomarqué et son récepteur membranaire (technique de *cross-linking*). Une fois les cellules lysées, une fraction du lysat cellulaire est soumise à une séparation des protéines par électrophorèse.

L'autre fraction est immunoprécipitée (la technique d'immunoprécipitation est décrite sur le document A.5A). L'immunoprécipitation (IP) est réalisée :

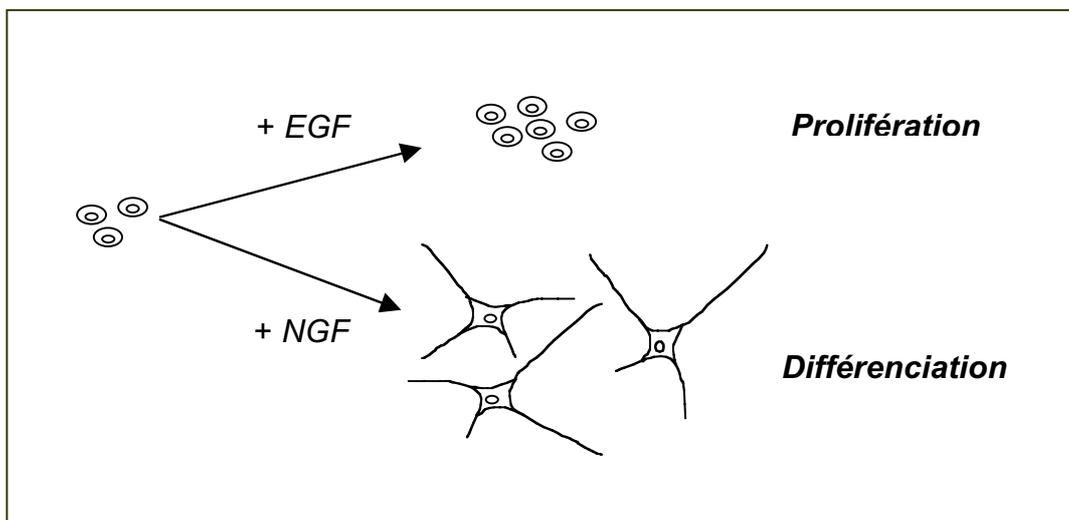
- soit avec un anticorps dirigé contre la protéine Trk (Anti-Trk)
- soit avec un anticorps dirigé contre le NGF (Anti-NGF).

Chaque éluat d'immunoprécipitation est soumis à une séparation des protéines par électrophorèse. Une fois la migration terminée, la radioactivité est directement révélée sur le gel par autoradiographie (Document A.5B).

- a. *Que vous apporte l'ensemble des résultats de cette expérience ?*
- b. *Qu'obtiendrait-on si on immunoprécipitait la protéine Trk en présence du peptide immunogène NGF, ou si on immunoprécipitait le facteur NGF en présence du peptide immunogène Trk ?*

#### **A-4. Effets intracellulaires induits par le NGF.**

La lignée PC12 constitue un modèle cellulaire qui permet d'étudier l'action de facteurs de croissance sur l'induction de la différenciation neuronale. En effet, en présence d'EGF, les cellules PC12 prolifèrent de manière importante. En revanche, si on incube ces mêmes cellules avec du NGF, elles acquièrent les propriétés caractéristiques de cellules neuronales. En particulier on observe l'extension de fins prolongements cellulaires semblables à des neurites, caractéristique de cellules nerveuses en différenciation.



**A-4.1.** Des travaux préliminaires ont montré que l'incubation des cellules PC12 avec du NGF en présence d'un inhibiteur de la phosphorylation des protéines bloque la différenciation des cellules PC12 induite par le NGF. Les auteurs ont donc cherché à identifier les protéines phosphorylées en réponse au NGF. Les cellules PC12 en culture sont incubées 3 minutes en présence de NGF. Après lyse des cellules, les protéines totales sont séparées par électrophorèse puis transférées sur un filtre de nitrocellulose; les protéines phosphorylées sont révélées par un anticorps (immunodétection par la technique de Western Blot) qui ne reconnaît que l'acide aminé tyrosine sous sa forme phosphorylée (anti-P-Tyr) (Document A.6).

*Quel est l'effet d'un traitement au NGF sur l'état de phosphorylation des protéines dans les cellules PC12 ?*

**A-4.2.** Les cellules PC12 sont incubées pendant 3 minutes à 37°C en présence de NGF. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines sont immunoprécipitées (IP) :

- soit par un anticorps dirigé contre la protéine Trk (Anti-Trk)
- soit par un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées (Anti-P-Tyr)

Chaque immunoprécipité (Document A.5A) est élué et soumis à une électrophorèse. Les protéines sont transférées sur un filtre de nitrocellulose et soumises à une immunodétection :

- soit par un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées (Anti-P-Tyr)
- soit par un anticorps dirigé contre la protéine Trk (Anti-Trk) (Document A.7).

**a.** *Interprétez ces résultats.*

Si on effectue la même expérience après avoir réalisé le « cross-linking » du [<sup>125</sup>I]-NGF avec les cellules PC12 selon les conditions expérimentales décrites en A-3.3, on observe le même profil électrophorétique que celui obtenu après immunoprécipitation par l'anticorps anti-Trk dans les cellules L-Trk (Document A.5B).

**b.** *La masse moléculaire apparente des protéines immunoprécipitées dans cette expérience vous paraît-elle compatible avec les résultats trouvés précédemment ?*

**A-4.3.** Les cellules PC12 sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées par l'anticorps anti-Trk en présence ou en l'absence d'un excès du peptide Trk immunogène. L'éluat est ensuite incubé avec de l'ATP marqué au <sup>32</sup>P sur le phosphate γ (γ-[<sup>32</sup>P]-ATP) pendant 20 min à 25°C (test de phosphorylation *in vitro*) puis soumis à une électrophorèse. La migration achevée, le gel est autoradiographié (Document A.8).

**a.** *Proposez deux interprétations pour expliquer l'augmentation de phosphorylation de Trk par le NGF ?*

**b.** *Comment vérifier que l'augmentation de marquage n'est pas liée à des quantités différentes de Trk déposées sur le gel ?*

**A-4.4.** Les MAP kinases (MAPK) sont des enzymes qui phosphorylent spécifiquement certaines protéines sur les acides aminés sérine et thréonine. Ces kinases constituent une étape de phosphorylation commune à de nombreuses voies de transduction du signal. Les MAPK ont pour cible des protéines cytoplasmiques mais aussi des protéines nucléaires. Une fois phosphorylées, certaines MAP kinases entrent dans le noyau où elles phosphorylent divers facteurs de transcription, régulant ainsi la transcription de « gènes précoces immédiats »

comme *c-fos*, mais aussi de gènes « tardifs » impliqués dans certaines étapes du développement. Pour étudier les MAP kinases, on dispose d'un anticorps dirigé contre l'une d'entre elles.

Un lysat de cellules PC12, cultivées préalablement en présence ou en l'absence de NGF pendant 3 minutes, est immunoprécipité avec l'anticorps anti-MAPK. Le surnageant (Document A.5A) est déposé sur gel d'électrophorèse (immunodéplétion). Après migration, les protéines sont transférées sur membrane et immunodétectées avec l'anticorps anti-P-Tyr (Document A.9).

*En justifiant votre démarche, déduisez de cette expérience la masse moléculaire de la MAP kinase étudiée.*

#### **A-5. Effets sélectifs du NGF et de l'EGF sur la différenciation des cellules PC12.**

**A-5.1.** Les auteurs se sont intéressés à l'état de phosphorylation des protéines totales des cellules PC12 cultivées en présence d'un facteur de croissance : le NGF ou l'EGF. Après électrophorèse des protéines extraites des cellules PC12, les protéines phosphorylées sont immunodétectées à l'aide de l'anticorps anti-P-Tyr (Document A.10A).

**a.** *Quelles informations vous apporte cette étude cinétique ?*

Les auteurs se sont plus particulièrement intéressés à l'état de phosphorylation de la MAP kinase étudiée précédemment (Document A.10B) ainsi qu'à son activité enzymatique (Document A.10C) en utilisant les mêmes extraits cellulaires qu'en A-5.1. Le lysat obtenu à chaque stade de traitement par les différents facteurs de croissance est immunoprécipité avec l'anticorps anti-MAPK (Document A.5A). Dans un cas, l'éluat est déposé sur un gel d'électrophorèse et immunodéplété, après migration, avec l'anticorps anti-P-Tyr (Document A.10B). Dans l'autre cas, l'éluat est incubé avec une quantité constante de protéine MBP (Myelin Basic protein). La MBP est un substrat qui permet de tester l'activité des sérine / thréonine kinases (Document A.10C).

**b.** *Interprétez ces résultats.*

**c.** *Proposez un modèle résumant la séquence d'événements qui conduit à la phosphorylation de la protéine MBP par la MAP kinase.*

**d.** *L'activation de la MAP kinase décrite dans cette expérience peut-elle résulter d'une autophosphorylation ? Proposez une expérience permettant de tester cette hypothèse.*

**A-5.2.** Dans cette expérience, on introduit l'ADNc codant le récepteur de l'EGF dans les cellules PC12. Dans la lignée HER-PC12 obtenue, l'expression du récepteur de l'EGF est 50 fois plus élevée que dans la lignée PC12. Les cellules PC12 et HER-PC12 sont cultivées avec ou sans facteur de croissance, NGF ou EGF. Au bout de 24 heures de traitement, on regarde si les cellules des deux lignées prolifèrent ou se différencient (Tableau A4).

Traitement	-	+ NGF	+ EGF
PC12	Etat de base	Extension neuritique	Prolifération
HER-PC12	Etat de base	Extension neuritique	Extension neuritique

**Tableau A4 :** Effets du traitement par l'EGF ou le NGF dans les lignées PC12 et HER-PC12.

- a. *Quelles sont les conséquences de la surexpression du récepteur de l'EGF sur la réponse des cellules HER-PC12 ? Proposez plusieurs hypothèses pour rendre compte de ces effets.*

L'activité MAP kinase est mesurée dans les lignées PC12 et HER-PC12 après stimulation par le NGF ou l'EGF sur une échelle de temps variant de 0 à 90 minutes. Les résultats sont représentés sur le document A.11A. On observe également par immunofluorescence la distribution intracellulaire de la MAP kinase dans les cellules PC12 et HER-PC12 après traitement par le facteur de croissance EGF ou NGF. Après 90 minutes de traitement, les cellules en culture sont fixées et incubées avec un anticorps anti-MAPK lui-même reconnu par un deuxième anticorps couplé à un agent fluorescent. La distribution subcellulaire du marquage fluorescent est observée au microscope (Document A.11B)

- b. *Comparez l'effet du NGF et celui de l'EGF sur l'activité MAP kinase dans les cellules PC12 et HER-PC12.*
- c. *Quelle est la conséquence de la surexpression du récepteur de l'EGF sur la localisation subcellulaire de la MAP kinase ?*
- d. *En vous aidant des résultats obtenus dans les parties A-3, A-4 et A-5, récapitulez dans un schéma synthétique les mécanismes de signalisation du NGF et de l'EGF dans les cellules PC12.*

## **A-6. Conclusions**

*En vous fondant sur les résultats expérimentaux présentés dans cette partie, proposez un modèle décrivant les effets distincts du NGF et de l'EGF sur la différenciation neuronale des cellules PC12.*

**Partie B** : 2ème sujet avec documents (Durée conseillée 3 h)

*Ce sujet comporte une partie B.1 de type « Sujet de Synthèse » faisant appel aux connaissances et aux qualités rédactionnelles du candidat.*

La synthèse des ribo- et désoxyribonucléotides est un processus intracellulaire qui implique deux voies bien distinctes chez l'homme : la voie *de novo* et la voie de récupération des nucléotides ou *salvage pathway*.

Dans la voie *de novo*, plusieurs précurseurs métaboliques sont utilisés comme le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) à l'origine du sucre du nucléotide, des acides aminés et du dioxyde de carbone pour la synthèse de la base du nucléotide.

En parallèle de la voie *de novo*, les désoxyribonucléosides sont phosphorylés par des kinases appartenant à la voie de récupération des nucléotides (Document B.1A). Les désoxyribonucléosides sont soit importés du milieu extracellulaire par diffusion facilitée ou par transport actif, soit dérivent de la déphosphorylation intracellulaire des désoxyribonucléotides. Trois étapes enzymatiques successives assurent la synthèse du désoxyribonucléoside triphosphate. Ces trois étapes sont catalysées par plusieurs désoxyribonucléosides et désoxyribonucléotides kinases, dont la spécificité envers la base du nucléotide est plus ou moins étroite. Cette voie permet de fournir en quantité importante des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), précurseurs importants pour la réplication de l'ADN.

Le virus responsable du syndrome de l'immunodéficience chez l'homme (VIH) est un rétrovirus qui affecte essentiellement les cellules de l'immunité. Les analogues de nucléoside utilisés dans les thérapies antirétrovirales, comme l'AZT (Zidovudine), le d4T (Stavudine), le 3TC (Lamivudine) ou les didésoxyribonucléotides comme le ddC (Zalcitabine) sont des désoxyribonucléosides particuliers dont le sucre a été modifié chimiquement (Document B.1B). Plusieurs analogues de nucléoside sont actuellement utilisés dans les protocoles thérapeutiques seuls ou en association avec d'autres inhibiteurs viraux. Cependant, afin d'être pharmacologiquement actif, l'analogue doit être phosphorylé jusqu'au stade triphosphate. Les phosphorylations successives sont catalysées par les kinases de la voie de récupération des nucléotides.

**B-1. Les virus** (durée conseillée 45 min)

Virus et cycles de multiplication.

*A partir d'un exemple de votre choix, vous décrirez la structure et le cycle de multiplication d'un virus. Vous détaillerez également les particularités des rétrovirus tels que le VIH.*

**B-2. Infection virale et traitements par les analogues de désoxyribonucléoside antirétroviraux.**

**B-2.1.** Des patients infectés par le VIH sont soumis à une thérapie basée sur l'utilisation d'analogues de désoxyribonucléoside. Chez ces patients, on note l'évolution du nombre de copies d'ARN viral dans le plasma ainsi que le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang (Document B.2).

- a. D'après vous, quelle est la cible moléculaire des analogues de désoxyribonucléoside antirétroviraux et leur mécanisme d'action ? Le terme d'inhibiteur est-il adapté à cette classe de molécules ? Si oui, à quel type d'inhibiteur se réfèrent les analogues de désoxyribonucléoside antirétroviraux ?
- b. Que vous suggèrent les données enregistrées chez ces patients quant à l'efficacité du traitement antirétroviral ?
- c. Quelle peut être la conséquence de l'utilisation prolongée d'un analogue de désoxyribonucléoside sur la multiplication du VIH ?

**B-2.2.** Plusieurs souches virales ont été isolées chez des patients atteints par la maladie et chez qui le traitement par les analogues de nucléoside devenait de moindre efficacité. Le génome de chacune des souches a été séquencé et plusieurs mutations ont été détectées dans le gène *pol* qui code la transcriptase inverse. Quelques mutants de l'enzyme ont été clonés, exprimés comme protéines recombinantes et purifiés jusqu'à homogénéité. L'activité enzymatique de la transcriptase inverse sauvage et des formes mutées a été mesurée *in vitro* par incorporation de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) à l'extrémité d'une amorce ADN (18 nucléotides) hybridée sur une matrice ADN (35 nucléotides). Les constantes cinétiques, constante catalytique ( $k_{cat}$ , parfois notée  $k_2$ ) et constante de Michaelis ( $K_M$ ), sont reportées dans le tableau B1.

Transcriptase inverse	dTTP		dCTP	
	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu M$ )
sauvage	0,019	0,11	0,0063	0,14
K65R	0,0085	0,023	0,0058	0,17
M184V	0,0085	0,016	0,012	0,28
Q151M	0,021	0,070	0,0068	0,14

**Tableau B1** : Paramètres cinétiques ( $k_{cat}$ ,  $K_M$ ) de la transcriptase inverse sauvage et de mutants de l'enzyme lors de la réaction d'incorporation de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) à l'extrémité d'une amorce d'ADN. A titre d'exemple, la mutation K65R correspond à la substitution d'une lysine (K) par une arginine (R).

- a. Quelles pourraient être les séquences nucléotidiques de la matrice et de l'amorce ADN qui permettent la mesure des paramètres cinétiques de la transcriptase inverse pour le dTTP ? le dCTP ?
- b. Proposez un protocole expérimental permettant la mesure des paramètres cinétiques de la transcriptase inverse pour un désoxyribonucléotide donné.
- c. En déduire l'effet des mutations sur l'activité enzymatique de la transcriptase inverse en comparant l'efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_M$ ) de la réaction d'incorporation d'un dNTP par la transcriptase inverse sauvage et par les formes mutantes de l'enzyme ?

La constante d'inhibition ( $K_i$ ) de la réaction d'incorporation de dNTP dans l'ADN viral par la transcriptase inverse sauvage et des mutants de l'enzyme a été mesurée pour plusieurs analogues de nucléotide utilisés dans les protocoles thérapeutiques à l'aide d'un test de polymérisation d'une amorce ADN de 18 nucléotides hybridée sur une matrice ADN de 35

nucléotides en présence d'un analogue de désoxyribonucléoside triphosphate (AZT-TP, d4T-TP, 3TC-TP ou ddNTP) (Tableau B2).

	Substrat				
	dTTP			dCTP	
	Inhibiteur			K <sub>i</sub> (μM)	
Transcriptase inverse	ddTTP	AZT-TP	d4T-TP	ddCTP	3TC-TP
sauvage	0,19	0,11	0,28	0,27	1,3
K65R	3,0	2,0	1,0	2,8	30
M184V	0,22	0,076	0,19	1,8	100
Q151M	10	0,34	1,0	1,2	2,3

**Tableau B2** : Constante d'inhibition (K<sub>i</sub>) de la réaction d'incorporation de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) catalysée par la transcriptase inverse sauvage et quelques mutants de l'enzyme.

**d.** *Quelle est la signification biologique de la constante d'inhibition K<sub>i</sub> ?*

**e.** *Commentez les résultats du tableau B2.*

La structure cristallographique de la transcriptase inverse sauvage complexée avec une amorce ADN hybridée à une matrice ADN et un désoxyribonucléoside triphosphate (dTTP) a également été résolue à 3.0 Å (Document B.3).

**f.** *A l'aide du document B.3, formulez plusieurs hypothèses structurales pouvant rendre compte de la moindre efficacité d'incorporation des analogues de désoxyribonucléotide antirétroviraux à l'extrémité de l'amorce ADN par les formes mutantes de la transcriptase inverse.*

**g.** *Selon vous, pourquoi ces mutations n'affectent-elles pas significativement l'incorporation des désoxyribonucléotides naturels (dTTP, dCTP) ?*

**B-2.3.** L'élongation par polymérisation d'une amorce ADN de 21 nucléotides radiomarquée à son extrémité 5' hybridée sur une matrice ADN de 35 nucléotides a été initiée en présence des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP – 50 μM chacun), d'un analogue de désoxyribonucléoside triphosphate (AZT-TP ou d4T-TP - 500 μM) et de la transcriptase inverse sauvage ou mutante. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, 1 mM de pyrophosphate (PPi) a été ajouté. Plusieurs échantillons ont été prélevés au cours du temps, déposés sur gel dénaturant et soumis à une électrophorèse (Document B.4A).

**a.** *Que représente la bande majeure indiquée sur le document B.4A par la lettre T ?*

**b.** *Quelle réaction chimique est mise en jeu après addition de pyrophosphate (PPi) dans cette expérience ?*

**c.** *Que représentent les bandes au dessus de la «bande T» ?*

Dans une série d'expériences visant à mesurer les paramètres cinétiques de la réaction étudiée à la question B-2.3.b catalysée par la transcriptase inverse sauvage ou le mutant K65R de l'enzyme, les auteurs ont quantifié et reporté en fonction du temps la radioactivité contenue dans les produits de réaction de plus de 25 nucléotides (Document B.4B).

- d. Commentez l'effet de la mutation K65R de la transcriptase inverse sur la réaction étudiée.

Les paramètres cinétiques de la réaction d'incorporation d'une molécule unique d'AZT-TP ou de dTTP à l'extrémité d'une amorce ADN (constante de vitesse ou  $k_{pol}$ , constante de dissociation à l'équilibre ou  $K_D^{NTP}$ ), d'une part, et de la réaction évoquée dans les expériences de la question B-2.3.b (constante de vitesse  $k_+$ , constante de dissociation à l'équilibre  $K_D^{PPi}$ ), d'autre part, sont indiqués pour la transcriptase inverse sauvage sur le document B.4C.

- e. Commentez ces résultats en calculant l'efficacité catalytique de chacune des réactions :  $(k_{pol} / K_D^{NTP})$  et  $(k_+ / K_D^{PPi})$ .
- f. La concentration cytoplasmique de pyrophosphate est de 150  $\mu$ M. Est-ce que, d'après vous, la réaction évoquée dans l'ensemble de ces expériences pourrait jouer un rôle important *in vivo* dans les mécanismes de résistance aux analogues de désoxyribonucléoside antirétroviraux ?

### **B-3. Activation intracellulaire des analogues de désoxyribonucléoside par la voie dite de *salvage pathway*.**

**B-3.1.** Des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été cultivés en présence d'un analogue de désoxyribonucléoside (AZT ou 3TC) radiomarqué. Le contenu intracellulaire en analogues de désoxyribonucléoside phosphorylés a été déterminé au cours du temps après extraction des nucléotides et séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), sur une résine échangeuse d'anions, équipée en ligne d'un détecteur de radioactivité et d'un spectrophotomètre (Document B.5). Les formes phosphorylées (mono-, di- et triphosphate) de chaque analogue de désoxyribonucléotide ont été identifiées à l'aide de marqueurs d'élution.

*Interprétez ces résultats.*

**B-3.2.** L'activité enzymatique de plusieurs kinases purifiées à partir d'extraits tissulaires et intervenant dans la phosphorylation des nucléosides jusqu'au stade triphosphate a été mesurée *in vitro* à l'état stationnaire à l'aide d'un test d'échange de phosphate entre un nucléotide donneur de phosphate, l'ATP, et un désoxyribonucléoside ou un désoxyribonucléotide accepteur de phosphate. La localisation subcellulaire de ces enzymes a été déterminée par immunofluorescence. L'ensemble des résultats est indiqué sur le document B.6.

- a. A partir de l'efficacité catalytique de phosphorylation des désoxyribonucléosides, des désoxyribonucléotides naturels et de leurs analogues par les kinases de la voie de récupération des nucléotides, commentez l'effet de la modification de l'analogue en 3' du ribose sur l'activité enzymatique de ces kinases. Pour un analogue donné, quelle étape enzymatique dans la cellule pourrait être limitante dans la phosphorylation de ce composé ?
- b. A partir de l'activité de phosphorylation *in vivo* des analogues antirétroviraux, en déduire quelle(s) étape(s) enzymatique(s) est(sont) limitante(s) *in vivo* dans la voie de phosphorylation de ces analogues particuliers. Ces résultats sont-ils en accord avec vos conclusions de la question B-3.2.a ? Si non, pour quelle raison ?

- c. *A partir de ces mesures d'activité enzymatique, comment interprétez-vous l'accumulation de 3TC sous forme triphosphate dans la cellule ?*
- d. *Quel peut être l'effet de la 5' nucléotidase sur le niveau de phosphorylation de l'AZT ?*
- e. *Quelle(s) hypothèse(s) formuleriez-vous pour expliquer la cytotoxicité de certains analogues de désoxyribonucléoside comme l'AZT ? Comment testeriez-vous cette (ces) hypothèse(s) ?*

**B-3.3.** Certains patients infectés par le virus VIH et soumis à une monothérapie AZT sont devenus de moins en moins sensibles au traitement par l'AZT. Le gène *pol* codant la transcriptase inverse porte la mutation K65R, mais cette mutation ne peut rendre compte à elle seule de l'inefficacité de la monothérapie. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de ces patients ont été extraits et mis en culture en présence d'AZT. Les auteurs ont quantifié l'expression des gènes codant la thymidine kinase (TK), la thymidylate kinase (dTMP kinase) et la nucléoside diphosphate kinase (NDP kinase) par RT-PCR. Cette technique de biologie moléculaire permet de copier l'ARNm correspondant au gène étudié en ADNc et d'amplifier cet ADNc en utilisant des amorces d'ADN spécifiques. Les produits amplifiés ont été déposés sur gel d'agarose et quantifiés (Document B.7A).

- a. *Interprétez ces résultats.*
- b. *Quels événements moléculaires pourraient expliquer ces données ?*

L'ADN génomique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exposés à différentes concentrations d'AZT pendant 48 h a été extrait et le gène codant la thymidine kinase (TK) a été isolé. Les échantillons ont été soumis à l'action de deux enzymes de restriction, EcoRI et HpaII. Les produits de la réaction ont été déposés et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (Document B.7B).

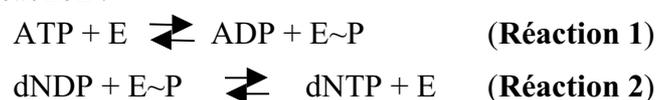
- c. *Interprétez ces résultats.*

Les cellules résistantes à l'AZT ont été traitées pendant trois jours par l'azacytidine (AzaCd), un agent déméthylant de l'ADN. La quantité d'ARNm codant la thymidine kinase a été déterminée par RT-PCR (Document B.7C).

- d. *Interprétez ces résultats.*
- e. *D'après-vous, quelle région du gène est susceptible d'être modifiée ? Comment cette modification peut-elle moduler l'expression d'un gène ?*

#### **B-4. Etude de la phosphorylation des analogues de désoxyribonucléoside antirétroviraux par la nucléoside diphosphate kinase.**

La nucléoside diphosphate kinase (NDP kinase) est une enzyme michaelienne à deux substrats qui catalyse sans spécificité importante l'échange de phosphate entre deux nucléotides selon la réaction :



où dNDP représente un désoxyribonucléoside diphosphate, dNTP la forme triphosphate associée et E~P, un intermédiaire de l'enzyme transitoirement phosphorylé sur une histidine (His 122 – Document B.8). Une des propriétés spectroscopiques de la NDP kinase est que la fluorescence intrinsèque de la protéine est atténuée de 20% lorsque l'enzyme est phosphorylée sur l'His 122.

*Décrivez brièvement le principe physique de la fluorescence. Quels acides aminés sont susceptibles d'émettre de la lumière par fluorescence ?*

**B-4.1.** Afin de comprendre pourquoi les analogues de désoxyribonucléoside diphosphates (AZT-DP, ddNDP, 3TC-DP...) sont très peu efficacement convertis en désoxyribonucléoside triphosphates par la NDP kinase, les auteurs ont réalisé une étude cinétique à l'état préstationnaire (cinétique rapide) en utilisant le signal de fluorescence intrinsèque de l'enzyme. A la différence d'une étude à l'état stationnaire, l'étude à l'état préstationnaire permet de caractériser plusieurs étapes dans une réaction enzymatique : étape de liaison du substrat, changement éventuel de la conformation de la protéine, étape de catalyse, libération du produit de la réaction...

En étudiant sélectivement la réaction 2, les auteurs espèrent ainsi identifier, dans le mécanisme enzymatique de la NDP kinase, l'étape affectée par la modification du désoxyribonucléotide en 3' du ribose. En raison de contraintes expérimentales, les auteurs ont privilégié l'étude de l'interaction de la NDP kinase avec les analogues de désoxyribonucléoside triphosphates, c'est-à-dire dans le sens :



dans le cas où le ddATP est utilisé comme substrat et en l'absence d'ATP. D'après le principe de la réversibilité microscopique, les conclusions issues de ces résultats restent valables dans le sens réactionnel contraire.

Dans un appareil de cinétique rapide équipé d'un fluorimètre, la NDP kinase (1  $\mu$ M) est mélangée automatiquement à l'analogue de désoxyribonucléoside triphosphate (10  $\mu$ M à 3 mM). La fluorescence de l'enzyme est enregistrée en continu, immédiatement après le mélange, pendant quelques secondes (Document B.9).

**a.** *Interprétez ces graphes.*

Les auteurs proposent un modèle cinétique en deux étapes qui répond à la réaction observée tel que :  $E + dNTP \rightleftharpoons E \cdot dNTP \rightarrow E\sim P + dNDP$  où E est la NDP kinase et E~P la NDP kinase phosphorylée.

L'ajustement des données par une équation mathématique est effectué à l'aide d'une monoexponentielle définie par  $F = F_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t}$  où F est la fluorescence de l'enzyme à l'instant t,  $F_0$  la fluorescence initiale de l'enzyme et  $k_{obs}$ , la constante observée de vitesse de phosphorylation de l'enzyme (Document B.9). Cette donnée suggère qu'une seule étape du modèle cinétique proposé est observable, correspondant au transfert de phosphate sur l'enzyme.

**b.** *Pour le ddATP, représentez  $k_{obs}$  en fonction de [S], concentration initiale en didésoxyribonucléotide. Comment varie  $k_{obs}$  ?*

**c.** *Donnez la signification biologique de  $k_{max}$ , valeur de  $k_{obs}$  obtenue pour de fortes concentrations en ddATP.*

- d. En vous inspirant de l'équation cinétique de Michaelis, donnez l'expression de  $k_{obs}$  en fonction de  $[S]$ , en introduisant la constante de dissociation à l'équilibre du complexe enzyme – nucléotide ( $K_D$ ). A l'aide d'une représentation judicieusement choisie, déterminez  $k_{max}$  et  $K_D$  pour le ddATP.

L'efficacité catalytique de phosphorylation ( $k_{max} / K_D$ ) a été déterminée pour plusieurs désoxyribonucléotides et analogues de désoxyribonucléotide (Tableau B3).

Nucléotide substrat	$k_{max} / K_D$ ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Analogue substrat	$k_{max} / K_D$ ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ )
dATP	$4,5 \times 10^6$	ddATP	1800
dGTP	$8,1 \times 10^6$	ddGTP	3200
dTTP	$5,7 \times 10^6$	AZT-TP	270
		d4T-TP	11500
		ddTTP	1000
dCTP	$1 \times 10^5$	ddCTP	100
		3TC-TP	< 5

**Tableau B3** : Activité enzymatique de la NDP kinase mesurée en cinétique rapide. Rapport  $k_{max} / K_D$  ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ) pour plusieurs désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) et analogues de désoxyribonucléoside triphosphates (ddNTP, AZT-TP, d4T-TP et 3TC-TP).

- e. Que pensez-vous de l'efficacité du transfert de phosphate entre les analogues de désoxyribonucléotide et la NDP kinase ?
- f. Quelles raisons pourraient expliquer la très faible efficacité de transfert de phosphate entre la NDP kinase et le 3TC-TP ?

**B-4.2.** Un mutant de la NDP kinase a été construit où l'His 122 a été substituée par une glycine (mutant H122G) et où la Phe 64, en interaction hydrophobe avec la base du désoxyribonucléotide à l'entrée du site actif, a été remplacée par une sonde de fluorescence (Document B.8). Cette sonde ne modifie pas la liaison du désoxyribonucléotide au site actif de l'enzyme. L'interaction hydrophobe entre la base du désoxyribonucléotide et la sonde entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde. Ce signal permet de suivre la liaison du nucléotide au site actif de l'enzyme. La constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) du complexe enzyme-nucléotide a été évaluée pour plusieurs désoxyribonucléosides triphosphates et analogues (Tableau B4).

Nucléotide	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	Analogue de nucléotide	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
dATP	0,20	ddATP	4,6
dGTP	0,15	ddGTP	3,5
dCTP	7,0	ddCTP	150
		3TC-TP	1500
dTTP	1,2	AZT-TP	30
		ddTTP	4,0
		d4T-TP	1,2

**Tableau B4** : Constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ ) du mutant (H122G.F64sonde) de la NDP kinase pour quelques désoxyribonucléosides et analogues de désoxyribonucléoside triphosphates.

- a. *Quel est l'intérêt de la mutation H122G ?*
- b. *Que vous suggèrent ces résultats quant à la liaison des analogues de désoxyribonucléotide au site actif de la NDP kinase ?*
- c. *La valeur de  $K_D$  mesurée pour le ddATP à l'aide du mutant H122G.F64sonde de la NDP kinase est-elle en accord avec la valeur déterminée en cinétique rapide ? Si non, quelles hypothèses pourraient rendre compte des différences observées ?*
- d. *Pouvez-vous en déduire quel paramètre cinétique ( $k_{max}$  ou  $K_D$ ) est particulièrement affecté par la modification du désoxyribonucléotide en 3' du ribose ?*

**B-4.3.** La structure cristallographique de la NDP kinase complexée avec un désoxyribonucléoside diphosphate, la thymidine diphosphate (dTDP), a été résolue à 2.5 Å (Document B.8). Les tracés en pointillés représentent des liaisons de type hydrogène.

- a. *Rappelez brièvement les caractéristiques des liaisons de type hydrogène.*
- b. *D'après vous, quelles hypothèses structurales permettraient d'expliquer la moindre efficacité catalytique de la NDP kinase avec les analogues de désoxyribonucléotide antirétroviraux ? Serait-ce également valable pour le dAT ?*
- c. *En vous aidant du tableau B5, des documents B.8 et B.10 et des informations rassemblées dans la partie B.4, quelle(s) autre(s) mutation(s) proposeriez-vous d'introduire dans le site actif de la NDP kinase pour accroître l'efficacité de phosphorylation des analogues de désoxyribonucléotide antirétroviraux par cette enzyme ? Selon vous, quel paramètre cinétique serait amélioré ?*

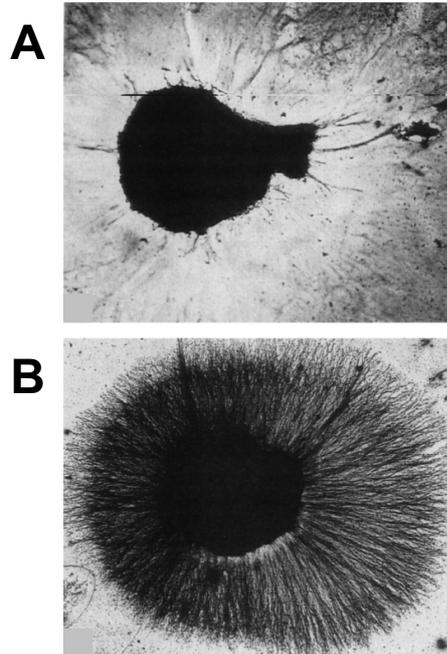
	NDP kinase sauvage	K16A	N119A	Y56A
Activité Spécifique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	2000	30	2040	500
$k_{max}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	1000	10	1110	100
$K_D^{dTTP}$ ( $\mu\text{M}$ )	35	50	33	55

**Tableau B5 :** Paramètres cinétiques de la NDP kinase sauvage et de quelques mutants du site actif mesurés en cinétique rapide.

## B-5. Conclusions

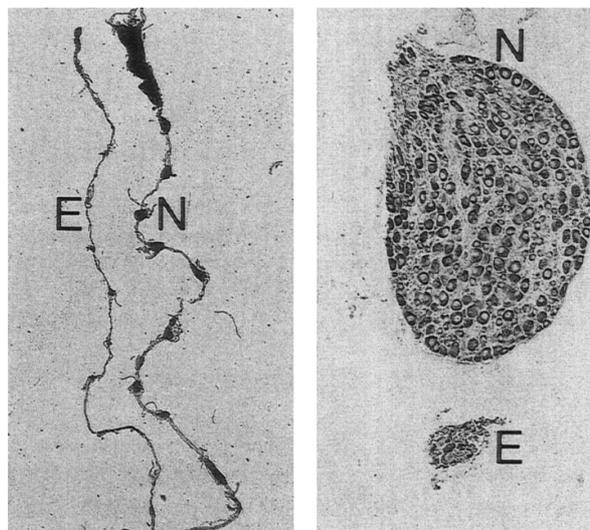
*En utilisant l'ensemble des informations obtenues dans cette partie, comment expliquez-vous l'échec relatif des monothérapies antirétrovirales basées sur l'utilisation exclusive des analogues de désoxyribonucléoside ?*

## Document A.1.



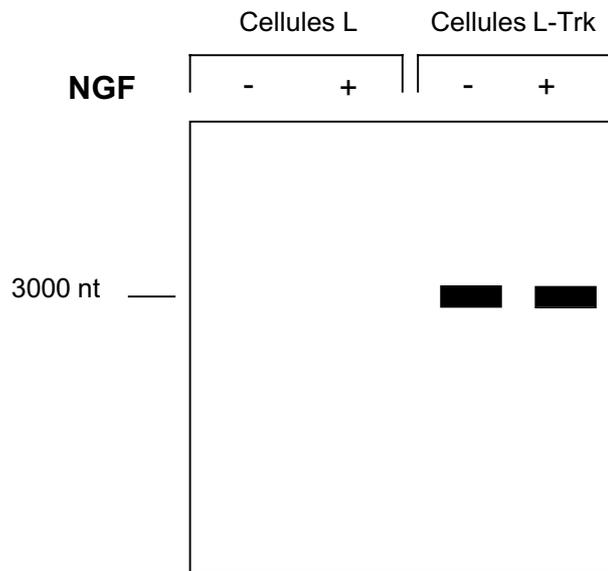
Réponse d'un ganglion nerveux embryonnaire de poulet aux extraits de glande salivaire de souris adulte. **A.** Ganglion nerveux cultivé 24 heures en l'absence d'extraits de glande salivaire. **B.** Ganglion nerveux cultivé pendant 24 heures en présence d'extraits de glande salivaire.

## Document A.2.



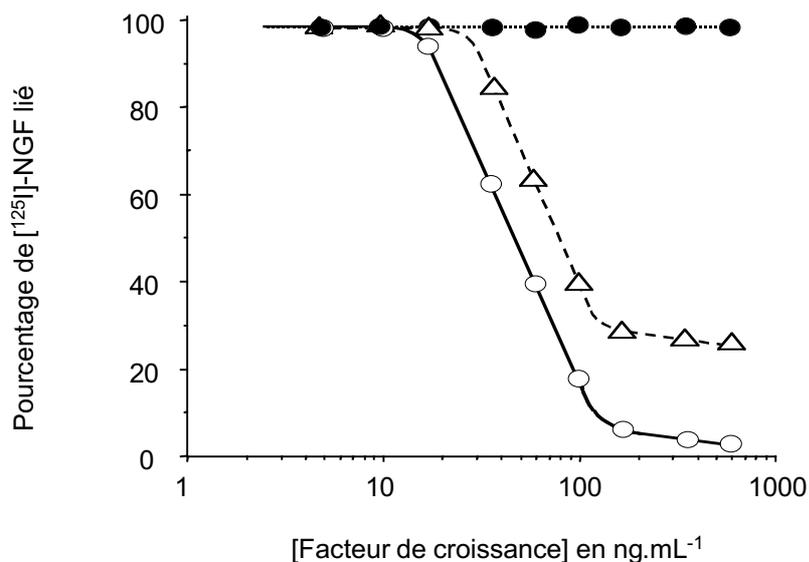
Effet de l'injection d'anticorps anti-NGF sur la chaîne ganglionnaire nerveuse. **Gauche:** chaîne ganglionnaire nerveuse de souriceau nouveau-né injecté avec un sérum contenant des anticorps anti-NGF (E) ou avec un sérum de lapin contrôle (N). **Droite:** Coupe d'un ganglion nerveux de souriceau nouveau-né injecté avec un sérum anti-NGF (E) ou avec un sérum de lapin contrôle (N). Dans les deux cas, ces dissections sont réalisées plusieurs semaines après le traitement.

## Document A.3.



**ARNm de Trk dans les cellules L et L-Trk cultivées en présence (+) et en l'absence (-) de NGF.** Les ARN totaux extraits des cellules en culture sont déposés sur un gel d'électrophorèse, transférés sur membrane et hybridés avec une sonde ADNc radiomarquée codant Trk. Les produits hybridés sont détectés par autoradiographie de la membrane. nt : nucléotides.

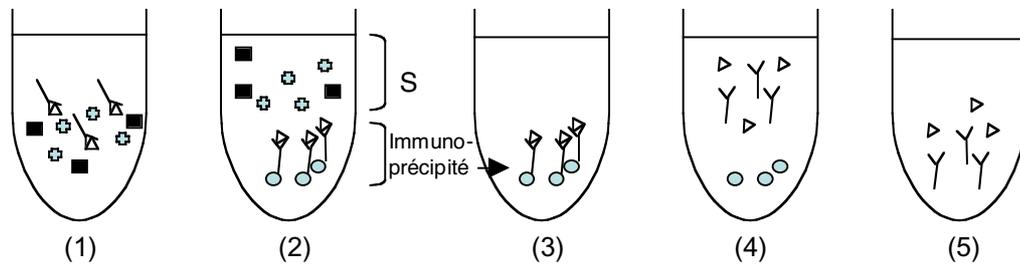
## Document A.4.



**Déplacement de la liaison du NGF radiomarqué ( $[^{125}\text{I}]\text{-NGF}$ ) sur les cellules L-Trk par le NGF (○), l'EGF (●) et le NT-3 (△).** Les concentrations en facteur de croissance sont représentées sur une échelle logarithmique.

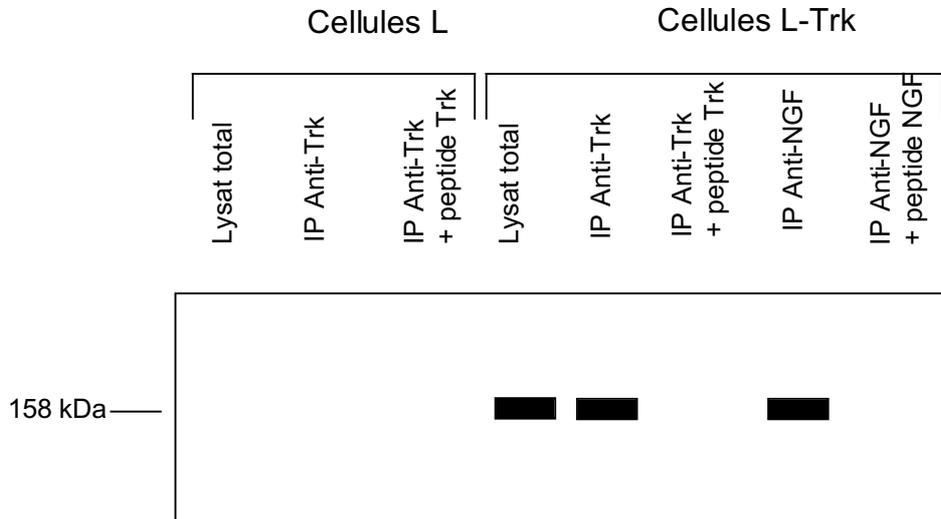
## Document A.5.

**A**



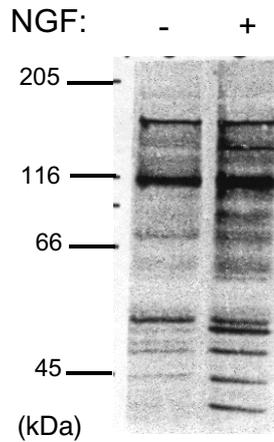
**Principe de l'immunoprécipitation : purifier sélectivement une protéine par *immunoabsorption*, par exemple pour étudier des interactions protéine-protéine, ou pour éliminer cette protéine d'un extrait protéique.** Les anticorps spécifiques de la protéine recherchée (  $\text{Y}$  ) sont incubés avec un lysat cellulaire. Ils retiennent spécifiquement la protéine antigène (triangles blancs) (1). Ils sont ensuite liés de façon covalente sur un support solide (billes grises) (2). Le complexe anticorps-antigène lié au support solide, appelé **l'immunoprécipité**, est ensuite séparé par centrifugation du **surageant (S)** qui contient des protéines non retenues (carrés noirs, croix grises) (3). Après plusieurs lavages de l'immunoprécipité, le complexe anticorps-antigène est décroché du support solide (4), dissocié et élué (5).

**B**



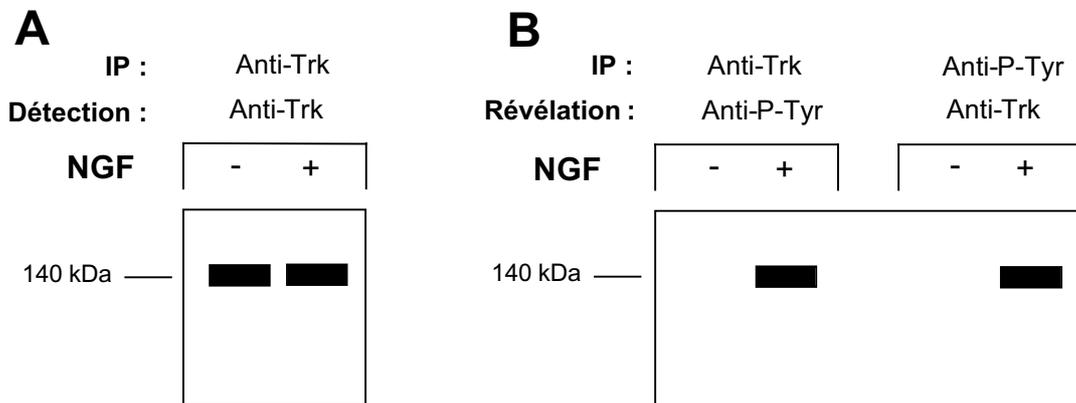
**Fixation covalente (« Cross-linking chimique ») du  $[^{125}\text{I}]$ -NGF sur les cellules L et L-Trk.** Les cellules des lignées L et L-Trk sont incubées avec du  $[^{125}\text{I}]$ -NGF en présence d'un agent chimique pontant. Les cellules sont ensuite lysées et une partie du lysat cellulaire est déposée sur un gel d'électrophorèse (lysat total). Une autre partie du lysat est immunoprécipitée soit avec un anticorps dirigé contre la protéine Trk (IP Anti-Trk), soit avec un anticorps dirigé contre le NGF (IP Anti-NGF) en présence ou en l'absence des peptides respectifs immunogènes ayant permis la production des anticorps correspondants. Les éluats d'IP sont déposés sur le gel d'électrophorèse. Une fois la migration terminée, le gel est autoradiographié.

## Document A.6.



**Effet du NGF sur la phosphorylation des protéines dans des cellules PC12.** Les protéines d'extraits cellulaires totaux de cellules PC12 incubées avec (+) ou sans (-) NGF pendant 3 minutes à 37°C sont séparées sur gel d'électrophorèse puis immunodétectées avec un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées (anti-P-Tyr). Les standards de masse moléculaire sont indiqués par des traits à gauche du gel (en kDa).

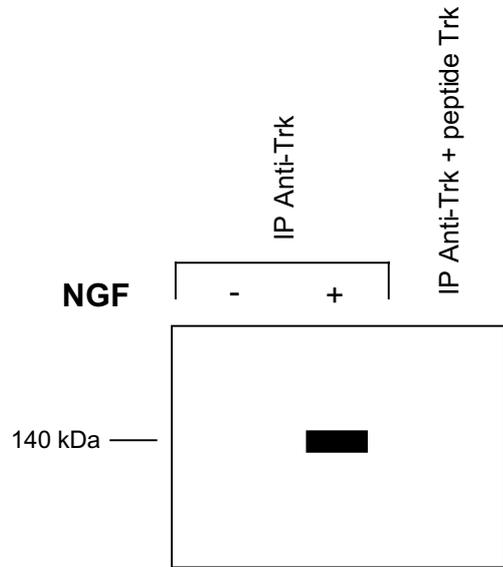
## Document A.7.



**A.** Immunoprécipitation (IP) par un anticorps anti-Trk d'extraits cellulaires totaux de cellules PC12, incubées avec (+) ou sans (-) NGF, et révélées par un anticorps anti-Trk.

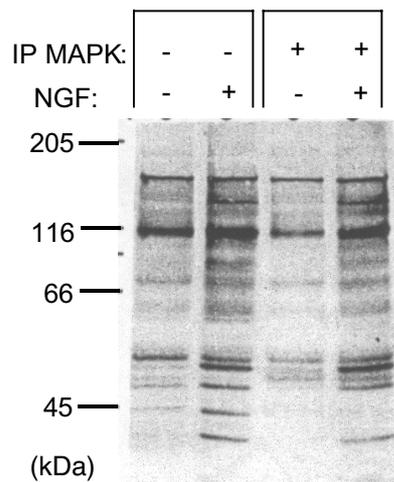
**B.** Extraits cellulaires totaux de cellules PC12, incubées avec (+) ou sans (-) NGF, immunoprécipités (IP) par un anticorps anti-Trk (Gauche) ou par un anticorps anti-P-Tyr (Droite) et révélées respectivement par l'anticorps anti-P-Tyr (Gauche) ou anti-Trk (Droite).

## Document A.8.



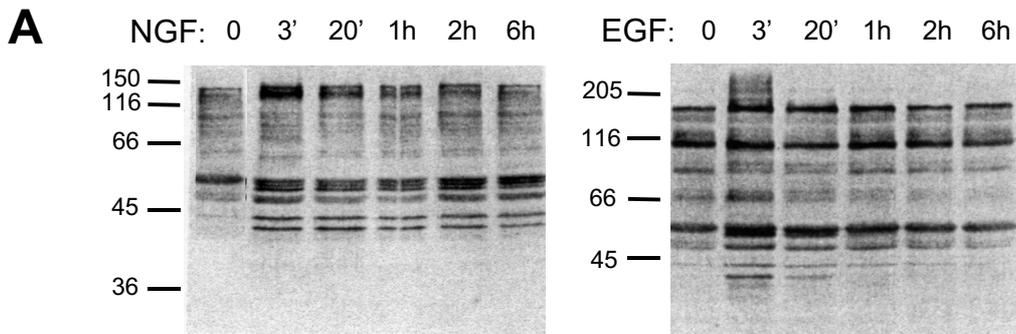
**Phosphorylation *in vitro* de Trk.** Le lysat de cellules PC12 est immunoprécipité (IP) par l'anticorps anti-Trk en présence ou en l'absence du peptide immunogène pour l'anticorps anti-Trk (peptide Trk). L'immunoprécipité est incubé avec du  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP en présence ou en l'absence de NGF puis déposé sur gel d'électrophorèse. Après migration, le gel est autoradiographié.

## Document A.9.

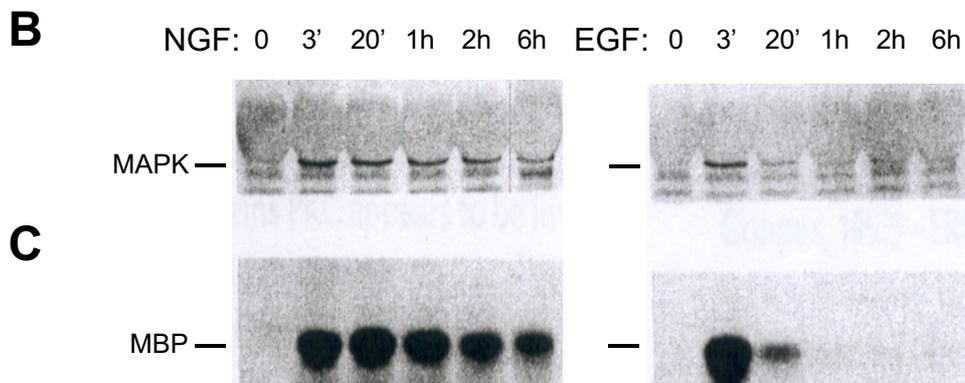


**Immunodéplétion de la protéine MAPK dans les cellules stimulées ou non par le NGF.** Les cellules PC12 traitées ou non par le NGF sont lysées. Une partie de chaque extrait cellulaire est déposée sur le gel. L'autre partie est immunoprécipitée par des anticorps anti-MAPK et le surnageant de l'immunoprécipitation est déposé sur le gel. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane et détectées par l'anticorps anti-P-Tyr. Les standards de masse moléculaire sont indiqués par des traits à gauche du gel (en kDa).

## Document A.10.



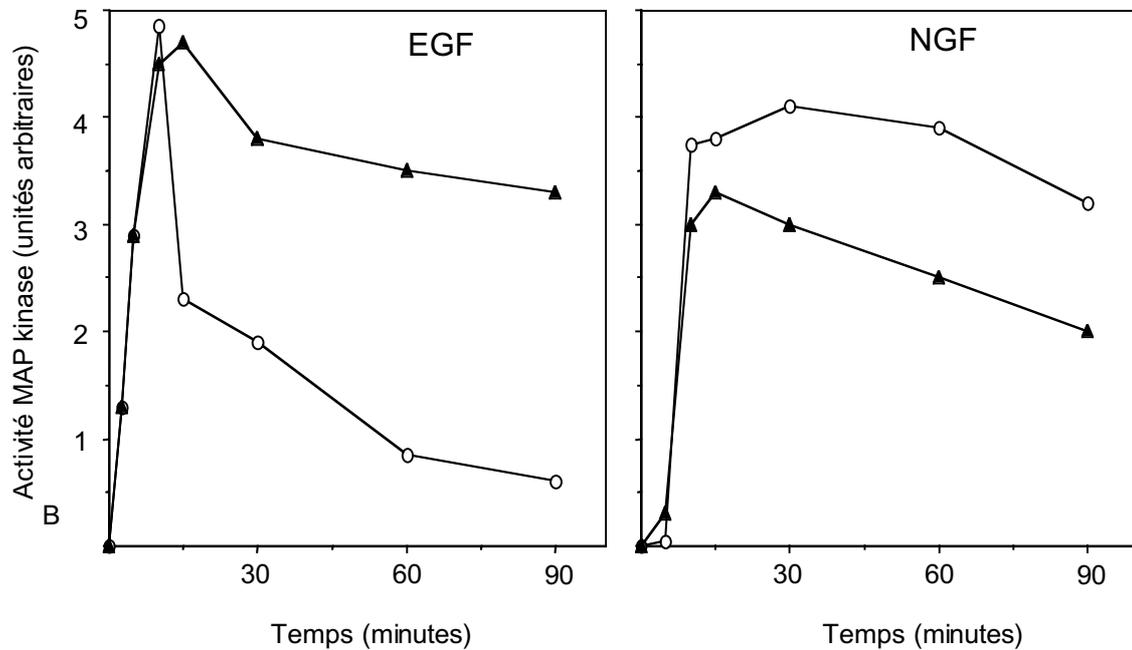
**Etat de phosphorylation des protéines totales en fonction du temps dans des cellules PC12 traitées par le NGF (Gauche) ou l'EGF (Droite).** Les cellules PC12 sont incubées 0, 3 ou 20 minutes, 1, 2 ou 6 heures avec le facteur de croissance indiqué puis sont lysées. Les lysats cellulaires sont soumis à une électrophorèse, transférés sur une membrane et révélés par l'anticorps anti-P-Tyr.



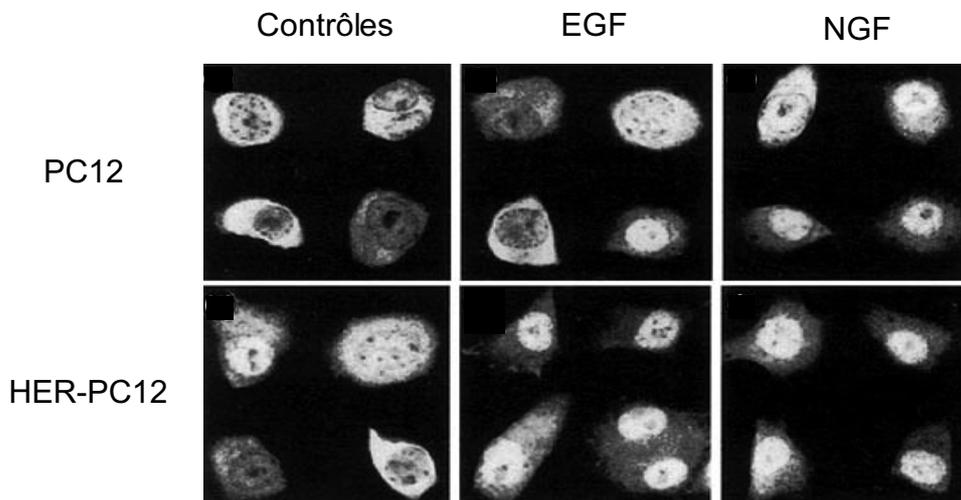
**Etat de phosphorylation de la MAP kinase (B) et mesure de l'activité enzymatique de la MAP kinase (C) en fonction du temps dans des cellules PC12 traitées par le NGF (Gauche) ou l'EGF (Droite).** Les cellules PC12 sont traitées comme dans l'expérience du document A.10.A. Dans l'**expérience B**, la MAP kinase a été préalablement immunoprécipitée avant d'être révélée par l'anticorps anti-P-Tyr. Dans l'**expérience C**, l'activité enzymatique de la MAP kinase immunoprécipitée a été testée en utilisant comme substrat la protéine MBP, substrat spécifique des sérine / thréonine kinases, en présence de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP pendant 20 min à 25°C. L'échantillon est soumis à une électrophorèse et la radioactivité liée à la MBP est estimée par autoradiographie (C).

## Document A.11.

**A**



**B**

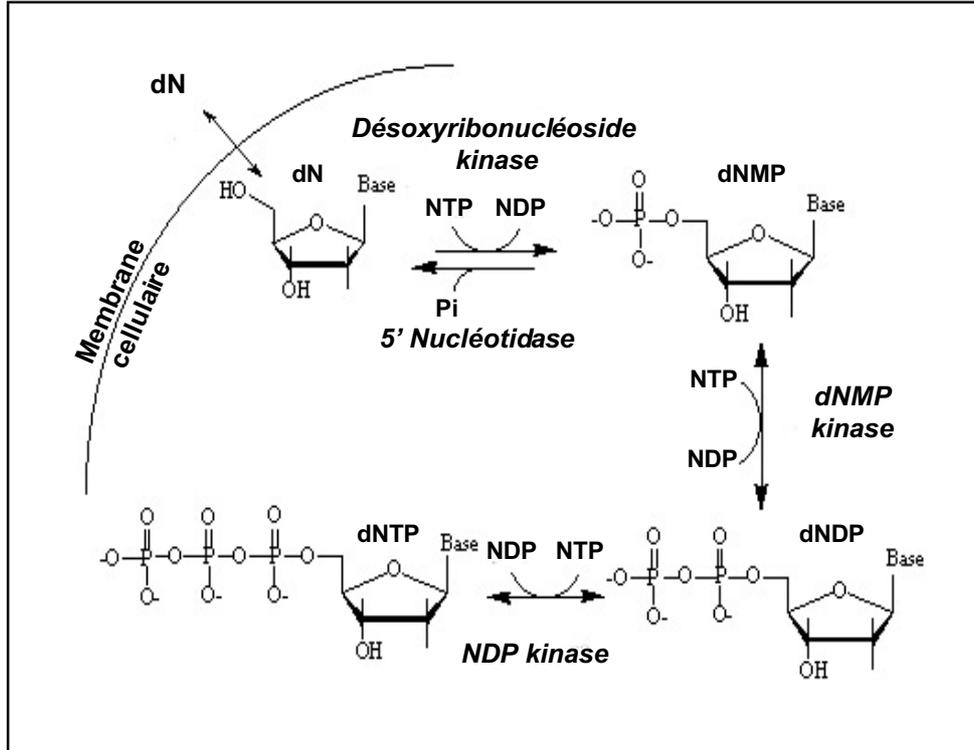


**A. Activité enzymatique de la MAP kinase** dans les cellules PC12 (○) et HER-PC12 (▲) traitées par l'EGF (Gauche) ou le NGF (Droite).

**B. Localisation de la MAP kinase par immunofluorescence** dans les cellules PC12 et HER-PC12 non traitées (Contrôles, Gauche) ou traitées par l'EGF (Milieu) ou le NGF (Droite). Quatre cellules sont représentées pour chaque traitement pour rendre compte de l'estimation statistique de la localisation du marquage (blanc).

# Document B.1.

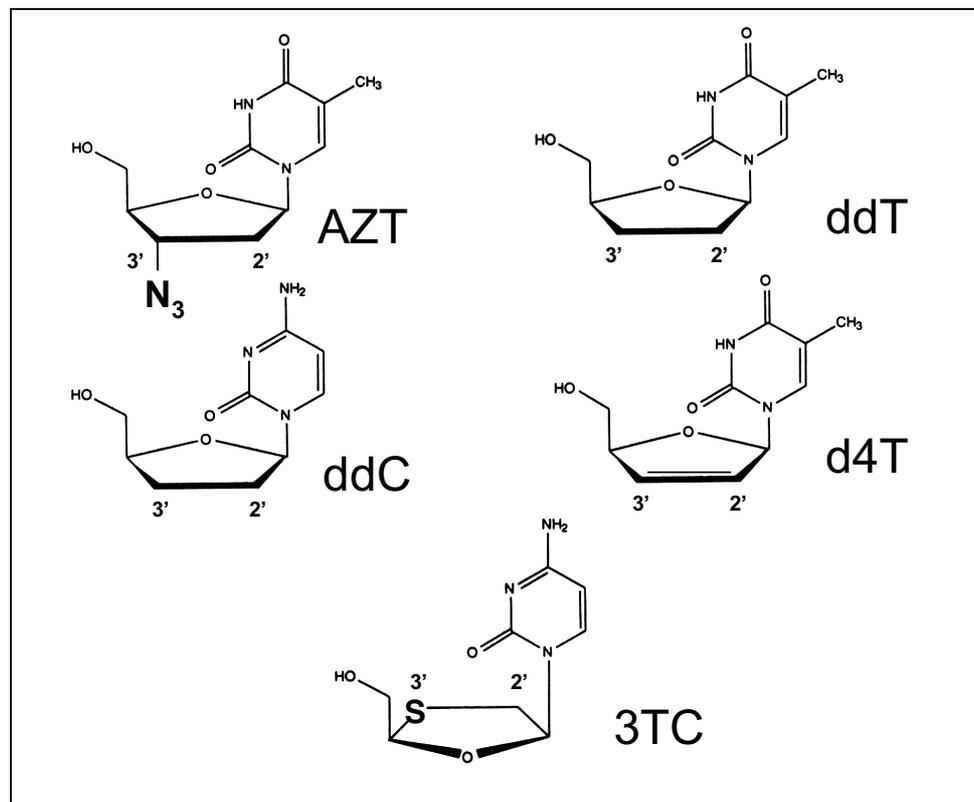
**A**



**Voie de récupération des nucléotides (salvage pathway).**

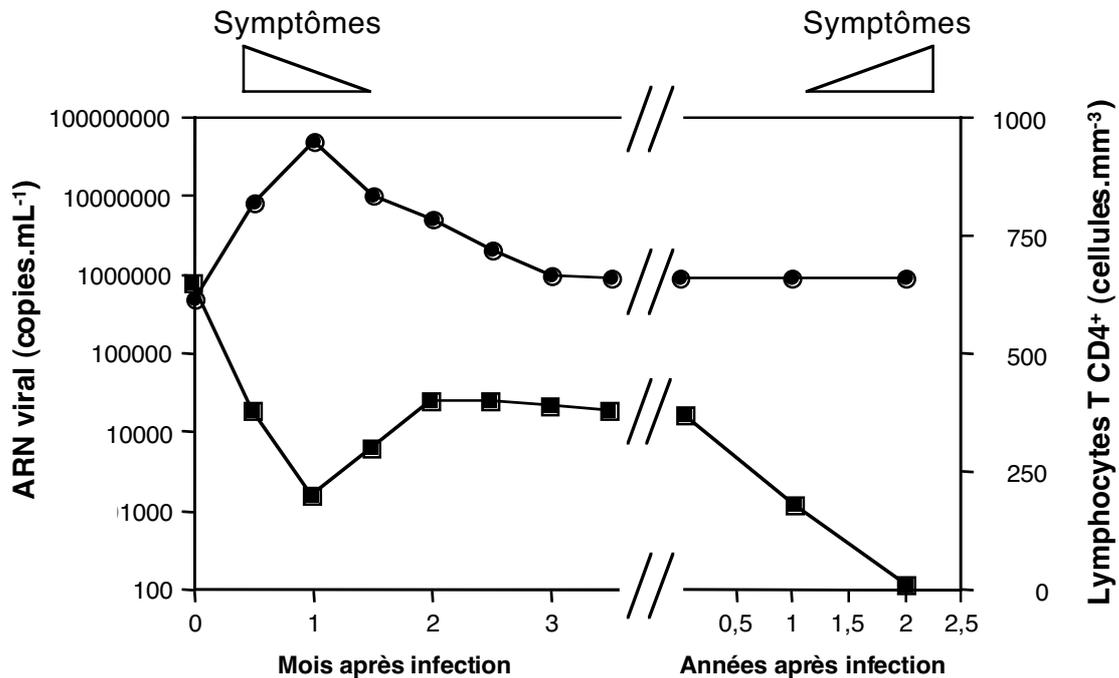
**dN** : déoxyribonucléoside, **dNMP** : déoxyribonucléoside monophosphate, **dNDP** : déoxyribonucléoside diphosphate, **dNTP** : déoxyribonucléoside triphosphate, **Pi** : phosphate inorganique.

**B**

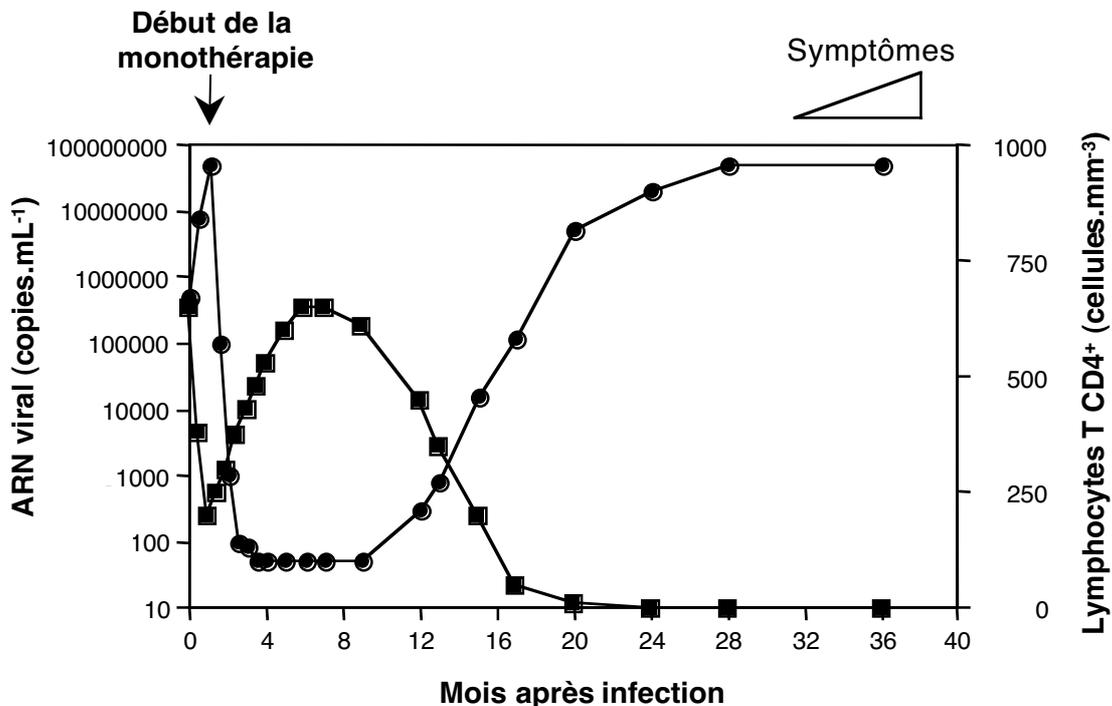


**Principaux analogues de déoxyribonucléoside utilisés dans les protocoles thérapeutiques antirétroviraux.** ddC : 2',3'-didésoxycytidine, ddT : 2',3'-didésoxythymidine, AZT : 3'-azido 3'-désoxythymidine, d4T : 2',3'-didésoxy 2',3'-didéhydrothymidine, 3TC : 3'-thiacytidine. AZT, ddT et d4T sont des dérivés de la thymidine. ddC et 3TC sont des dérivés de la cytosine.

## Document B.2.

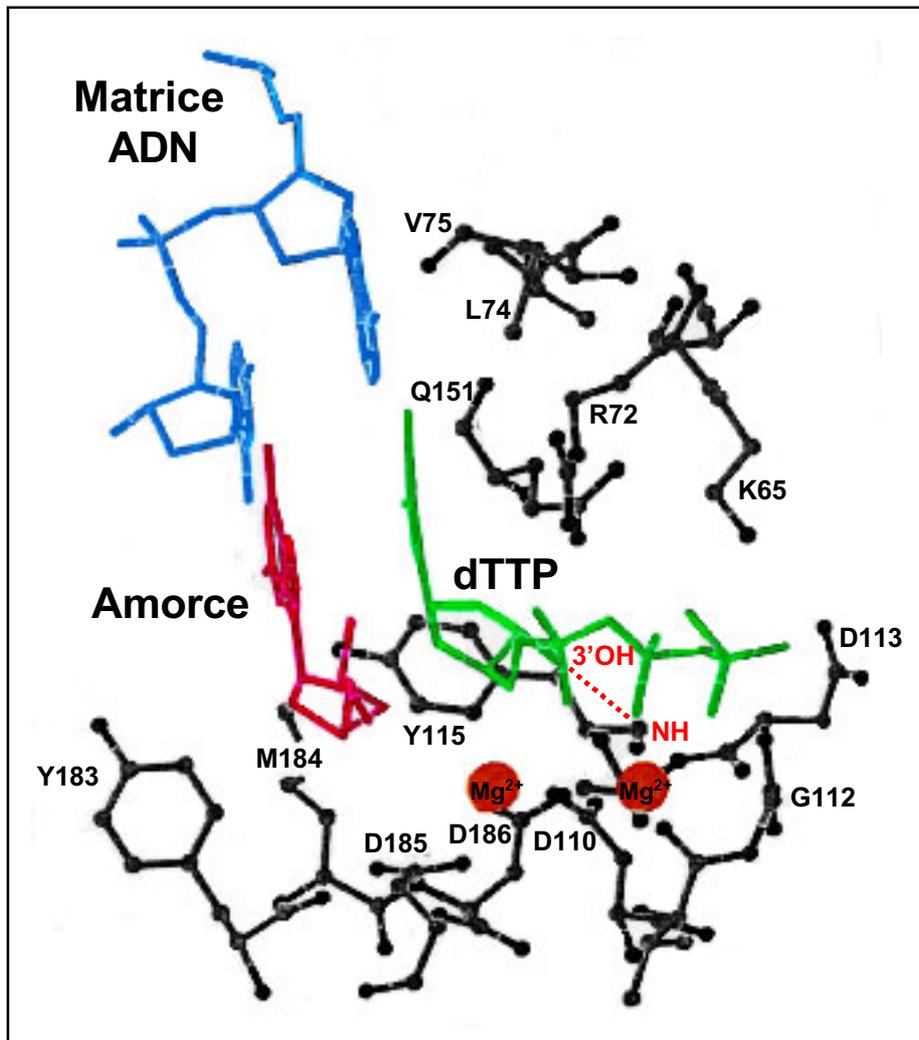


**Evolution de la charge virale** (quantité d'ARN viral par mL de plasma ●) et du **nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>** par mm<sup>3</sup> de sang (■) chez un patient infecté par le virus VIH et n'étant soumis à aucune thérapie. Les triangles reflètent l'ampleur des symptômes cliniques (nombre d'infections opportunistes) constatés chez ce patient.



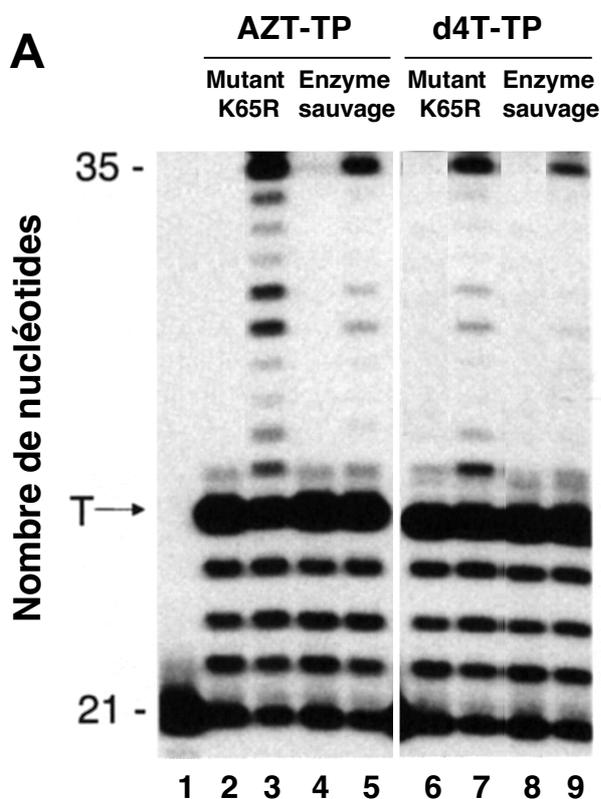
**Evolution de la charge virale** (quantité d'ARN viral par mL de plasma ●) et du **nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>** par mm<sup>3</sup> de sang (■) chez un patient infecté par le virus VIH soumis, 1 mois après constatation de l'infection par le virus VIH, à une **monothérapie AZT, ddC ou 3TC pendant 36 mois**. Les triangles reflètent l'ampleur des symptômes cliniques (nombre d'infections opportunistes) constatés chez ce patient.

## Document B.3.

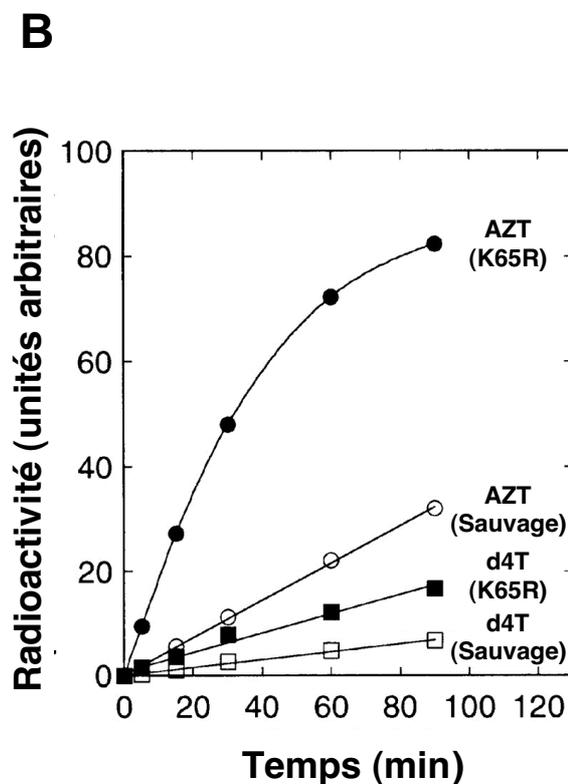


**Structure cristallographique résolue à 3.0 Å de la transcriptase inverse.** Principaux acides aminés du site actif de la transcriptase inverse sauvage complexée avec une matrice ADN (bleu), une amorce ADN (rouge) et un nucléotide (dTTP – vert) prêt à être incorporé à l'extrémité de l'amorce ADN. Deux ions Mg<sup>2+</sup> (orange) participent directement à la catalyse. Une liaison hydrogène (pointillés rouges) relie la fonction OH en 3' du dTTP et la fonction NH de la liaison peptidique impliquant Y115.

## Document B.4.



Electrophorèse des produits de la réaction d'extension d'une amorce ADN de 21 nucléotides radiomarquée à son extrémité 5', par la transcriptase inverse sauvage ou le mutant K65R en présence d'un analogue de désoxyribonucléoside triphosphate (AZT-TP ou d4T-TP) et après addition de 1 mM PPI. 1 : pas d'enzyme ; 2,4,6 et 8 : prélèvement au temps  $t = 0$  après addition de PPI ; 3,5,7 et 9 : prélèvement au temps  $t = 60$  min après addition de PPI.



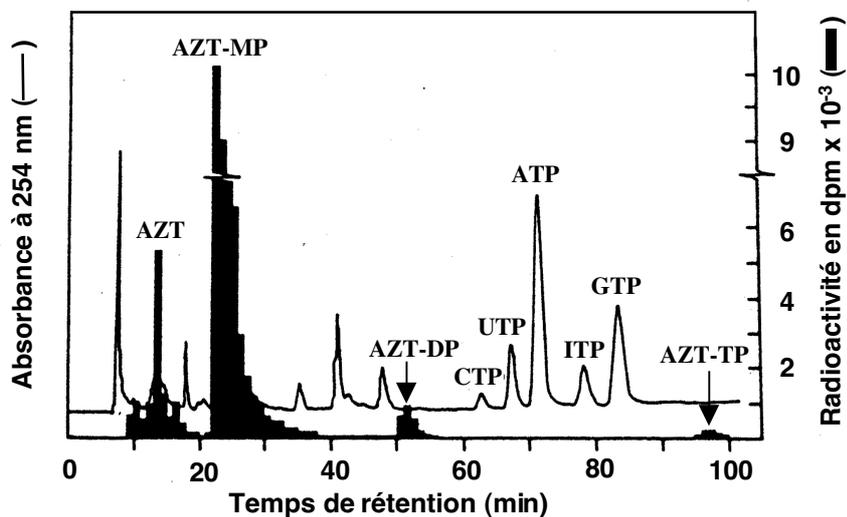
Radioactivité contenue dans les produits de longueur supérieure à 25 nucléotides en fonction du temps.  $[PPi] = 1$  mM.

**C**

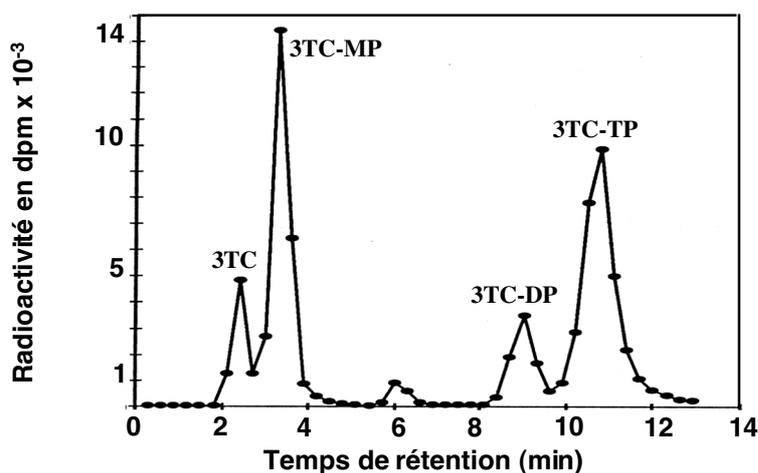
- Pyrophosphate (PPi)			+ Pyrophosphate (PPi)		
Nucléotide	$k_{pol}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D^{dNTP}$ (mM)	Oligonucléotide	$k_+$ ( $s^{-1}$ )	$K_D^{PPi}$ (mM)
dTTP	113	$27 \times 10^{-3}$	Oligo – dT	0,70	12
AZT-TP	80	$28 \times 10^{-3}$	Oligo – AZT	1,3	21

Paramètres cinétiques de la transcriptase inverse sauvage mesurés pour la réaction d'incorporation d'un unique désoxyribonucléoside triphosphate (dTTP ou AZT-TP) à l'extrémité d'une amorce ADN (-PPi) et pour la réaction évoquée à la question B-2.3.b (+PPi). Oligo-dT et Oligo-AZT désignent deux oligonucléotides terminés à leur extrémité 3' respectivement par une thymidine et un AZT.  $k_{pol}$  : constante catalytique de polymérisation.  $K_D^{dNTP}$  : constante de dissociation à l'équilibre du complexe enzyme / dNTP.  $k_+$  : constante de vitesse de la réaction évoquée à la question B-2.3.b.  $K_D^{PPi}$  : constante de dissociation à l'équilibre du complexe enzyme / PPI.

## Document B.5.



Chromatogramme représentant la séparation par HPLC, sur une matrice échangeuse d'anions, de l'AZT, de ses formes phosphorylées et d'autres nucléotides à partir d'un extrait cellulaire de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> préparé après 6 heures d'incubation des cellules avec de l'AZT marqué au tritium. dpm : désintégrations par minute.



Chromatogramme représentant la séparation par HPLC, sur une matrice échangeuse d'anions, du 3TC et de ses formes phosphorylées à partir d'un extrait cellulaire de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> préparé après 10 heures d'incubation des cellules avec du 3TC marqué au tritium. dpm : désintégrations par minute.

## Document B.6.

Réaction catalysée	5' Nucléotidase		Thymidine kinase 1 (TK1)		Thymidine kinase 2 (TK2)		Désoxycytidine kinase (dCK)		Thymidylate kinase (dTMP kinase)		Cytidylate kinase (UMP-CMP kinase)		Nucléoside diphosphate kinase A (NDPK-A)		Nucléoside diphosphate kinase H4 (NDPK-H4)	
	cytosol		cytosol		mitochondrie		cytosol		cytosol		cytosol		cytosol		mitochondrie	
Localisation subcellulaire																
Paramètre cinétique	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Nucléotides																
T	1,1 x 10 <sup>5</sup>	1575	1,0 x 10 <sup>6</sup>	55	95000	1,2	22500	5,5	2,0 x 10 <sup>6</sup>	120	9	0,4	1,2 x 10 <sup>7</sup>	68000	2,1 x 10 <sup>6</sup>	2700
C	18000	750	-	-	65000	1,9	3,0 x 10 <sup>6</sup>	16	-	-	3500	15	8,0 x 10 <sup>5</sup>	32000	-	-
ddT	-	-	83000	50	850	0,1	-	-	1,3 x 10 <sup>5</sup>	30	-	-	3000	60	150	11
AZT	400	60	4,0 x 10 <sup>5</sup>	21	8000	0,5	-	-	2200	0,4	-	-	850	300	5000	500
d4T	< 1	< 0,025	< 500	< 0,01	< 10	< 0,01	-	-	28000	15	-	-	70000	3000	1000	11
3TC	-	-	-	-	-	-	2,9 x 10 <sup>5</sup>	17	-	-	5550	12	0,2	4,2	-	-

**Activité enzymatique de plusieurs kinases impliquées dans la voie de récupération des nucléotides.**

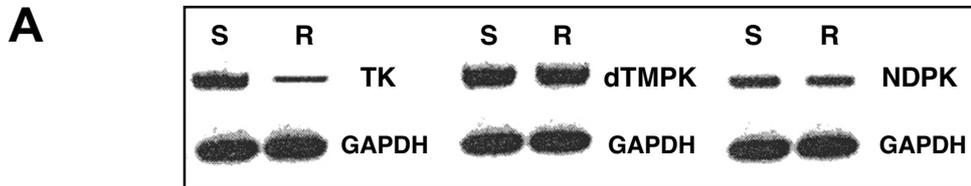
**A : efficacité catalytique de phosphorylation *in vitro* ( $K_{cat} / K_M$  en  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ).**

**B : activité de phosphorylation *in vivo* (en  $\mu\text{mol}$  de substrat converti  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de cellules)**

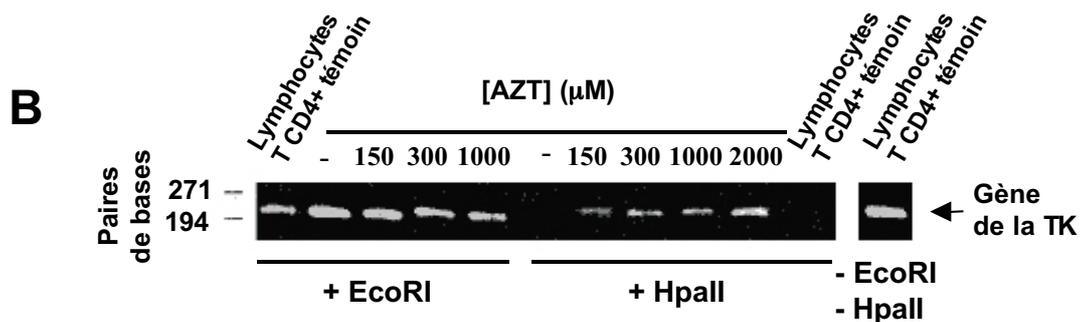
Pour chaque enzyme, la réaction catalysée et la localisation subcellulaire sont indiquées.

- : le nucléotide testé n'est pas substrat de l'enzyme considérée.

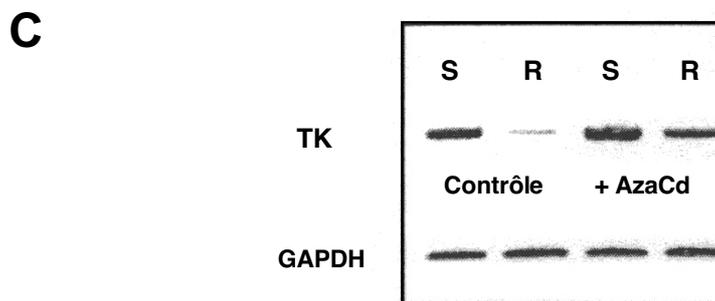
## Document B.7.



**Expression des gènes de la thymidine kinase (TK), de la thymidylate kinase (dTMPK) et de la nucléoside diphosphate kinase (NDPK) dans des lymphocytes extraits de patients soumis à un traitement AZT (R) ou extraits de sujets sains (S) mesurée par RT-PCR.** Il existe une relation de proportionalité entre la quantité d'ARNm initiale et l'amplification réalisée par PCR. L'expression de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisée comme marqueur interne pour calibrer la méthode sachant que la quantité d'ARNm codant cette enzyme ne varie pas entre R et S.

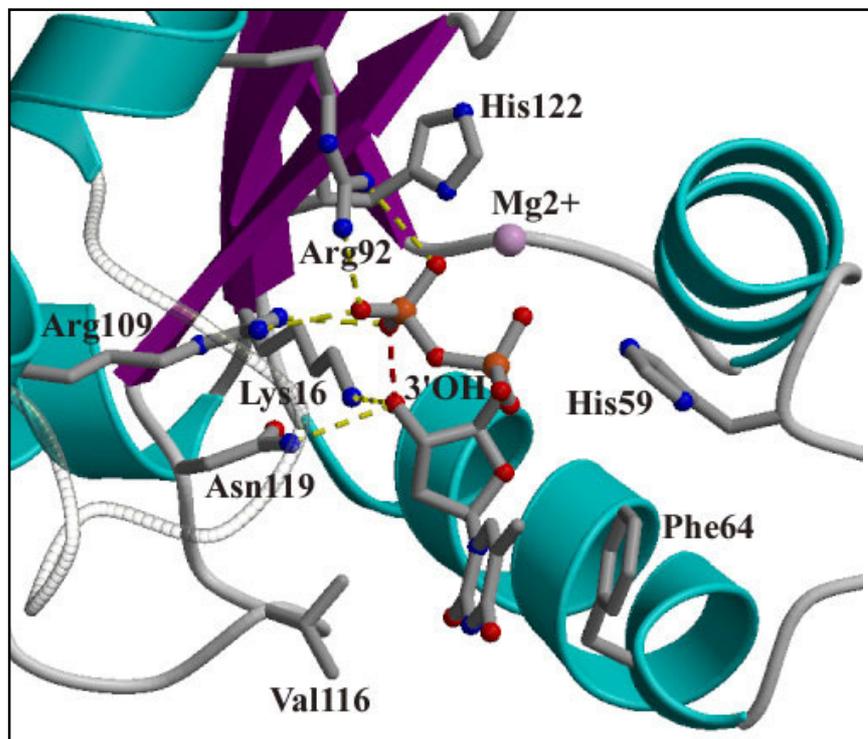


**Digestion par l'enzyme de restriction EcoRI ou HpaII du gène codant la thymidine kinase (TK) cloné à partir de l'ADN génomique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de patients traités par l'AZT ou issus de sujets témoins.** Ces cellules sont maintenues en culture en présence de concentrations variables en AZT.



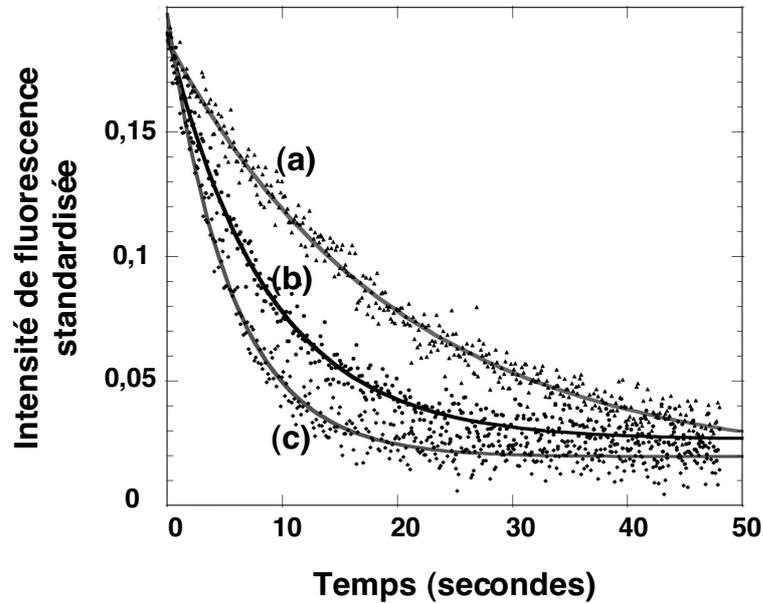
**Expression du gène de la thymidine kinase (TK) dans des lymphocytes extraits de patients soumis à un traitement AZT (R) ou extraits de sujets sains (S).** Les lymphocytes ont été maintenus en culture et traités par l'azacytidine (AzaCd). L'expression de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisée comme marqueur interne pour calibrer la méthode de RT-PCR.

## Document B.8.



**Structure cristallographique résolue à 2,5 Å de la nucléoside diphosphate kinase (NDP kinase).** Site actif de la NDP kinase complexée avec la thymidine diphosphate (dTDP). Les principaux acides aminés constitutifs du site actif ont été représentés. En traits pointillés est indiqué le réseau de liaisons hydrogène entre le nucléotide et l'enzyme.

## Document B.9.



Etude en cinétique rapide de l'interaction de la NDP kinase avec les didésoxyribonucléosides triphosphates (ddNTP). Variation de la fluorescence intrinsèque de la NDP kinase (1µM) pour trois concentrations de ddATP (a) 10 µM, (b) 100 µM et (c) 500 µM. La cinétique est modélisée par une courbe de type monoexponentielle définie par la relation  $F = F_0 \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}$  où  $F$  est la fluorescence de la protéine au temps  $t$ ,  $F_0$  la fluorescence initiale et  $k_{\text{obs}}$ , la constante de vitesse observée de phosphorylation de  $E$  en  $E \sim P$ .

[S] (mM)	0,1	0,2	0,5	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0
$k_{\text{obs}}$ (s <sup>-1</sup> )	0,12	0,22	0,38	0,48	0,54	0,57	0,56	0,60

Valeurs de  $k_{\text{obs}}$  (s<sup>-1</sup>) mesurées en cinétique rapide pour plusieurs concentrations en ddATP.

# Document B.10

Tableau des acides aminés

