SESSION 2012

Filière BCPST

BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage des calculatrices est interdit

Organisation de l'épreuve

	Exercice	Pages	Durée conseillée
Partie A	Synthèse	3	2h30
Partie B	Analyse de documents	4-10	1h45
Partie C	Analyse de documents	11-18	1h45

Le code génétique est fourni en annexe (page 19).

Il est conseillé de traiter chacune des parties de l'épreuve.

Dans chacune des parties du devoir, il sera attaché une très grande importance à la **rigueur** ainsi qu'à la **clarté** des raisonnements et des illustrations.

Partie A : sujet de synthèse

Diversité structurale et convergence fonctionnelle des appareils respiratoires chez les Métazoaires.

L'adaptation des Métazoaires aux contraintes de leur milieu de vie repose sur des modalités spécifiques d'échanges et de transport gazeux. Vous illustrerez et vous discuterez la diversité et la convergence de ces solutions au niveau anatomique, physiologique et biochimique. On ne traitera pas la respiration cellulaire.

Partie B : Identification de la cause génétique d'une rétinite pigmentaire

La rétinite pigmentaire est une maladie dégénérative de la rétine caractérisée par la mort des cellules photoréceptrices. Cette maladie touche environ une personne sur 4000. Nous allons étudier une famille dont trois enfants ont été diagnostiqués pour la rétinite pigmentaire. L'arbre généalogique de cette famille est représenté sur la figure 1. Le but de cette étude est d'identifier la (ou les) mutation(s) responsable(s) de la rétinite pigmentaire dans cette famille.

Nous supposerons tout d'abord (questions 1 à 3) que cette maladie est causée par une seule mutation et que cette mutation est apparue chez les ancêtres de la famille étudiée il y a plusieurs générations.

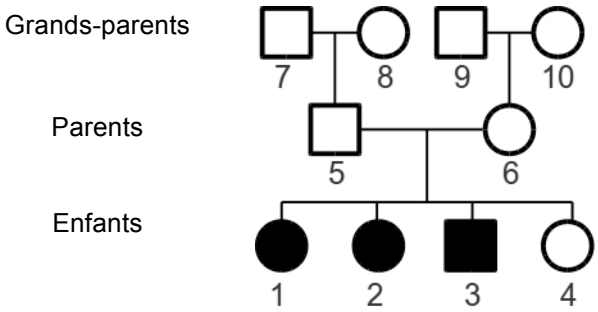

Figure 1 : Arbre généalogique de la famille étudiée dont les membres sont numérotés de 1 à 10. Les hommes sont représentés par des carrés et les femmes par des cercles. Les individus atteints de la rétinite pigmentaire sont en noirs et les individus sains en blanc.

<u>Question 1</u>. La mutation responsable de la rétinite pigmentaire dans la famille étudiée est-elle dominante ou récessive ? Peut-elle être portée par le chromosome X ? Justifiez.

<u>Question 2</u>. On note S l'allèle sauvage et M l'allèle muté. Redessinez rapidement l'arbre généalogique de la figure 1 et indiquez le génotype des individus à côté des carrés et des cercles. Si plusieurs cas sont possibles, indiquez les tous. Les génotypes seront notés S/S, S/M et M/M.

<u>Question 3</u>. A l'aide d'un tableau de croisements, calculez la probabilité qu'un enfant issu des parents 5 et 6 soit malade. Calculez également la probabilité, pour ces parents, que trois de leurs enfants sur quatre soient malades.

Des mutations dans cinquante gènes différents sont connues pour être associées à la rétinite pigmentaire. Toutes ces mutations ont été testées dans la famille étudiée et aucune n'a été retrouvée. Afin d'identifier une cause génétique de cette maladie, les chercheurs ont employé une technique récente qui permet, à partir de l'ADN génomique total d'un individu, d'extraire spécifiquement les ADN correspondant à l'exome et de les séquencer. L'exome est défini ici comme l'ensemble des régions codantes du génome.

Taille du génome (haploïde)	3000 000 000 pb
Nombre total de gènes codant des protéines	25000
Nombre moyen d'acides aminés par protéine	400
Taille moyenne de la région non traduite en 5' des ARN messagers	200 pb
Taille moyenne de la région non traduite en 3' des ARN messagers	1000 pb
Proportion du génome correspondant à des introns	30%
Proportion du génome correspondant à des transposons	45%

Tableau 1 : Quelques caractéristiques du génome humain. Les valeurs ont été arrondies afin de faciliter les calculs. Les tailles sont exprimées en paires de bases (pb).

<u>Question 4</u>. En vous aidant du tableau 1, calculez la taille approximative de l'exome humain haploïde en kilobases et en % du génome.

<u>Question 5</u>. Quels inconvénients y a-t-il à séquencer l'exome uniquement plutôt que le génome entier ?

Pour chacun des quatre enfants de la famille étudiée, l'ADN génomique a été purifié à partir de prélèvements sanguins, puis les ADN correspondant à l'exome ont été extraits et séquencés par la plateforme Illumina. Ces séquences ont été comparées à la séquence de référence du génome humain, qui correspond à un individu sain de sexe masculin. Un total de 19 307 mutations ponctuelles a été détecté entre les enfants et le génome de référence. Leur répartition est indiquée dans le tableau 2.

	Enfant 1	Enfant 2	Enfant 3	Catégorie A: mutations présentes chez les enfants 1 et 2	Catégorie B : mutations présentes chez les enfants 1, 2 et 3	Catégorie C : mutations totalement absentes chez l'enfant 4 et présentes chez les enfants 1, 2 et 3
Ensemble des mutations ponctuelles	8712	8716	8752	5289	4507	Non calculé
Mutations ponctuelles présentes à l'état homozygote	2516	2489	2649	1411	981	127

Tableau 2 : Nombre de mutations ponctuelles identifiées chez les enfants 1 à 4 par rapport à la séquence de référence du génome humain.

<u>Question 6.</u> Dans quel cas la mutation causale pourrait-elle faire partie de la catégorie B mais pas de la catégorie C ? Imaginez-vous des cas où la mutation causale ne ferait pas partie de la catégorie B ? Si oui, lesquels ?

<u>Question 7</u>. Dans la catégorie C, on peut a priori distinguer plusieurs types de mutations suivant leur effet sur les séquences protéiques. Lesquels ? Selon vous, quel type de mutation pourrait être préférentiellement responsable de la maladie ?

Parmi les 127 mutations ponctuelles de la catégorie C, 126 sont présentes dans les bases de données existantes de séquences d'individus sains. Seule une mutation n'a jamais été observée auparavant. Elle touche la région codante du gène de la dehydrodolichol diphosphate synthase (DHDDS). La région en question est indiquée sur la figure 2 pour les enfants 1 à 4. Les séquences protéiques correspondantes dans d'autres espèces sont indiquées sur la figure 3.

Position	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
Enfant 1	ATG	GAC	GGG	AAC	CGT	CGC	CGC	TAT	GCC	AAG	**G**AG	TGC
Enfant 2	ATG	GAC	GGG	AAC	CGT	CGC	CGC	TAT	GCC	AAG	**G**AG	TGC
Enfant 3	ATG	GAC	GGG	AAC	CGT	CGC	CGC	TAT	GCC	AAG	**G**AG	TGC
Enfant 4	ATG	GAC	GGG	AAC	CGT	CGC	CGC	TAT	GCC	AAG	**A**AG	TGC

Figure 2 : Séquence nucléotidique partielle du gène *DHDDS* obtenu par séquençage Illumina. Les quatre individus sont tous homozoygotes pour la région indiquée. Les triplets de nucléotides correspondent à des codons.

Position	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
	ATG	GAC	GGG	AAC	CGT	CGC	CGC	TAT	GCC	AAG	AAG	TGC
Homme (sain)	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Chimpanzé	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Gorille	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Orang-outang	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Souris	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Rat	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Cochon d'Inde	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Lapin	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Dauphin	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Vache	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Cheval	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Chien	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Éléphant	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Opossum	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	K	K	C
Poulet	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	Q	K	C
Xénope	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	Q	K	C
Fugu (poisson)	M	D	G	G	N	R	R	F	A	R	K	K
Épinoche (poisson)	M	D	G	G	N	R	R	F	A	G	K	K
Poisson zèbre	M	D	G	G	N	R	R	Y	A	Q	K	E

Figure 3 : Alignement de la séquence protéique partielle de *DHDDS* de plusieurs espèces. La séquence nucléotidique d'un individu sain est indiquée sur la première ligne. Les acides aminés sont indiqués par leur code à 1 lettre. Les acides aminés différents de la séquence humaine sont grisés.

<u>Question 8.</u> En vous aidant des figures 2 et 3 et du code génétique en annexe, décrivez la mutation observée dans le gène *DHDDS* et ses conséquences sur la protéine DHDDS. D'après l'ensemble des données obtenues jusqu'ici, donnez plusieurs arguments qui suggèrent que cette mutation pourrait être responsable de la rétinite pigmentaire chez la famille étudiée.

La région du gène *DHDDS* identifiée ci-dessus a été séquencée chez les parents et chez les enfants par la technique de séquençage Sanger classique (figure 4) afin de vérifier les résultats obtenus par séquençage Illumina. On séquence simultanément les deux allèles du gène.

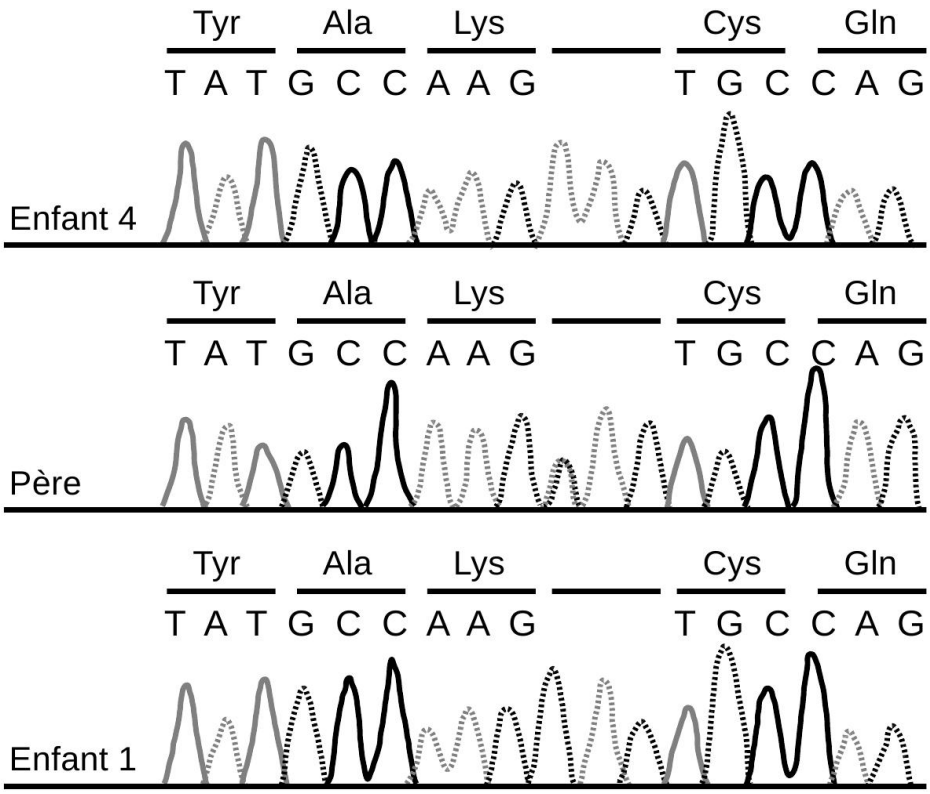

Figure 4 : Résultat du séquençage Sanger de l'enfant 4, du père 5, et de l'enfant 1. Les pics successifs correspondent à des nucléotides successifs le long de l'ADN séquencé. Chaque pic correspond à un nucléotide ; gris continu = T ; pointillé gris = A ; noir continu = C et pointillé noir = G.

<u>Question 9.</u> Analysez et interprétez les résultats présentés dans la figure 4. Vous pourrez vous aider du tableau du code génétique en annexe.

Les patrons d'expression du gène et de la protéine DHDDS correspondante ont été analysés dans divers tissus sains humains par la technique de RT-PCR (figure 5) et par immunomarquage (figure 6). La RT-PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet d'évaluer la quantité d'ARN messager d'un gène. L'ARN messager correspondant au gène étudié est tout d'abord copié en ADN complémentaire, puis amplifié en utilisant des amorces spécifiques. Les produits amplifiés sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés (figure 5).

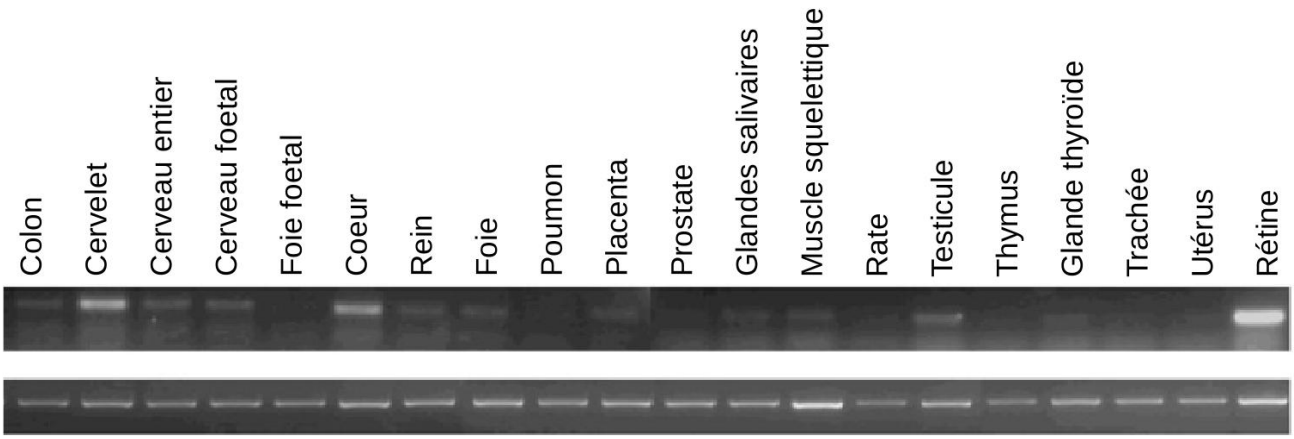

Figure 5 : RT-PCR des ARN purifiés à partir de tissus sains humains en utilisant soit des amorces qui amplifient une partie du gène *DHDDS* (ligne du haut), soit des amorces qui amplifient une partie du gène *PGM1*, qui code l'enzyme phosphoglucomutase-1 (ligne du bas) dont l'expression est uniforme dans tous les tissus.

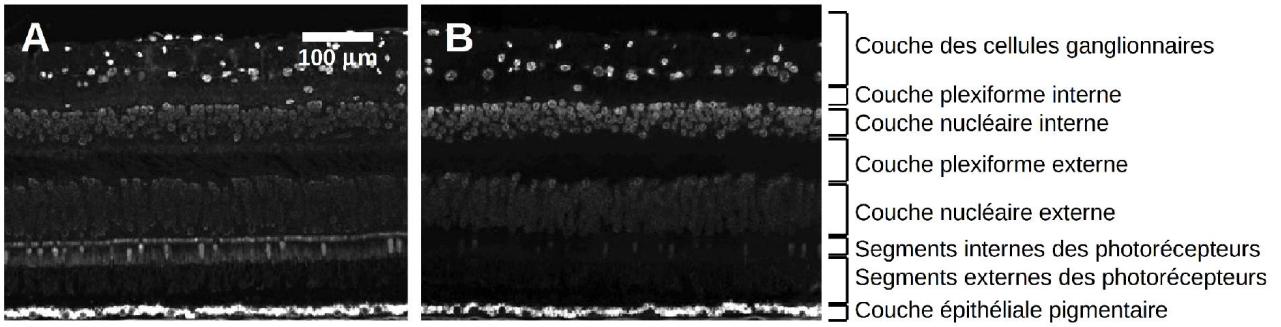

Figure 6 : Immunomarquage de deux coupes de rétine humaine d'un individu sain. (A) Marquage avec des anticorps anti-DHDDS révélés par fluorescence. (B) Témoin négatif de marquage sans anticorps anti-DHDDS mais avec révélation fluorescente. Les différentes couches de la rétine sont indiquées à droite.

<u>Question 10.</u> Analysez et interprétez les résultats présentés dans les figures 5 et 6.

Le gène homologue *dhdds* a été inactivé chez le poisson zèbre en utilisant des morpholinos. Un morpholino est un acide nucléique simple brin d'environ 25 nucléotides dont la séquence est complémentaire d'un ARN messager. En s'hybridant à cet ARN messager, le morpholino bloque sa traduction. L'injection de morpholinos est couramment utilisée chez le poisson zèbre pour inhiber l'expression d'un gène donné pendant plusieurs jours.

Des morpholinos dirigés contre le gène *dhdds* ont été injectés dans des embryons au stade 1 cellule. Comme témoins, des morpholinos qui ciblent une séquence qui n'est pas présente dans le génome du poisson zèbre ont été injectés dans d'autres embryons au stade 1 cellule. Les embryons ont ensuite poursuivi leur développement et ont été analysés après éclosion, au stade larvaire 4 jours après l'injection. Les résultats sont présentés sur les figures 7 et 8.

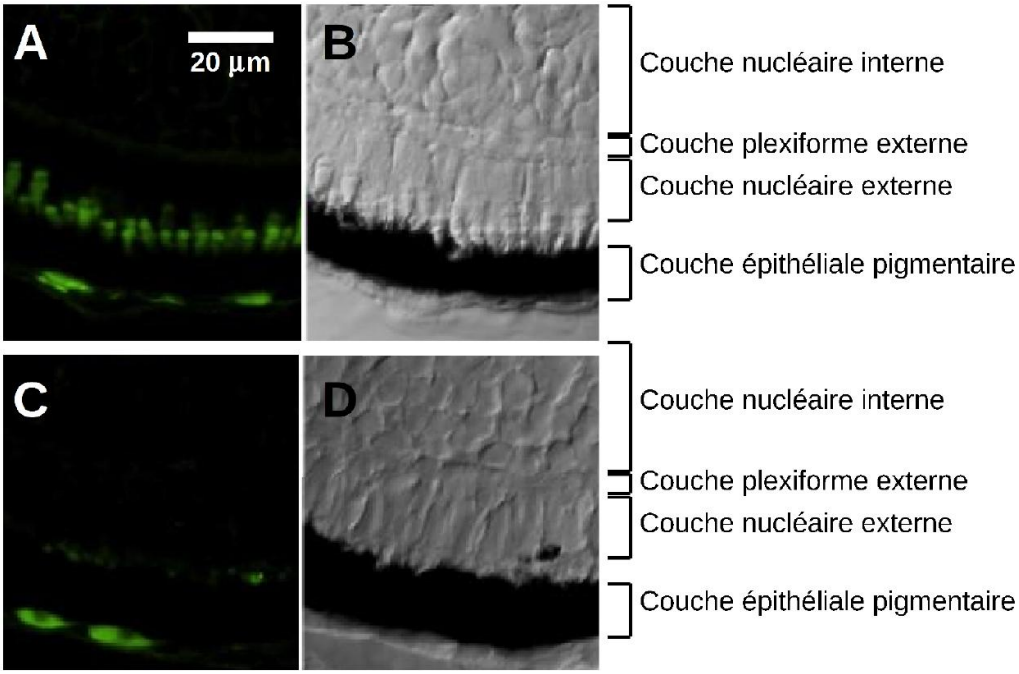

Figure 7 : Sections de rétine de poissons traités avec les morpholinos témoins (A-B) ou avec les morpholinos dirigés contre *dhdds* (C-D). Chaque section a été observée à la fois au microscope à fluorescence (A, C) et au microscope à lumière visible (B, D). Les sections ont été marquées par une molécule révélée en fluorescence verte qui se fixe aux segments externes des photorécepteurs.

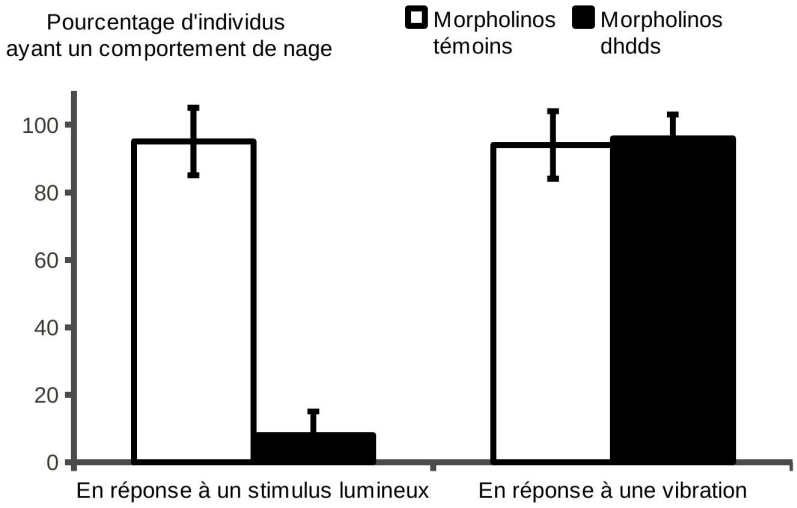

Figure 8 : Effet de l'injection de morpholinos sur la réaction des poissons à un stimulus lumineux ou à une vibration. Trente individus ont été testés pour chaque condition. Les barres indiquent l'écart-type.

<u>Question 11.</u> Analysez et interprétez les résultats présentés dans les figures 7 et 8. Quel est l'intérêt d'observer la réponse des poissons traités à une vibration ?

<u>Question 12.</u> Qu'apportent ces nouveaux résultats par rapport à la question 8 ? Quelles sont les retombées de cette découverte pour les enfants malades et pour l'enfant sain ?

La base de données de patients contient une autre famille atteinte de rétinite pigmentaire chez laquelle aucune des mutations connues pour être associées à cette maladie n'a été détectée. Son arbre généalogique est présenté en figure 9.

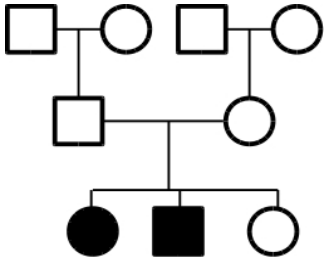

Figure 9 : Arbre généalogique d'une autre famille atteinte de rétinite pigmentaire. Même légende que pour la figure 1.

<u>Question 13.</u> Au regard des résultats du tableau 2 et sur le plan pratique, pourquoi les chercheurs ont-ils préféré rechercher la mutation responsable de la maladie dans la famille de la figure 1 ?

La région contenant la mutation du gène *DHDDS* identifiée dans cette étude a été séquencée chez 15.000 individus, dont 1.000 personnes issues d'une communauté à laquelle appartient la famille de la figure 1. La mutation a été retrouvée uniquement chez 10 individus tous issus de cette communauté, toujours à l'état hétérozygote.

<u>Question 14.</u> Calculez la fréquence de cette mutation dans la communauté. On supposera que les individus échantillonnés sont représentatifs.

Le tableau 3 présente les phénomènes principaux qui tendent à modifier la fréquence des allèles au sein des populations. La probabilité que la même mutation apparaisse deux fois indépendamment chez deux êtres humains est de 10^{-9}.

Question 15. Proposez une histoire évolutive de la mutation dans les populations humaines, depuis son apparition jusqu'à la rétinite pigmentaire observée dans la famille étudiée ici. On considérera que la mutation en question est apparue une seule fois chez une seule personne.

Mutation : modification accidentelle de la séquence d'ADN d'un être vivant
Sélection naturelle : mécanisme proposé par Charles Darwin, selon lequel les individus les mieux adaptés à leur environnement laissent davantage de descendants que les autres.
Dérive génétique : processus par lequel les fréquences des allèles changent à cause de biais d'échantillonnage dans la transmission des allèles d'une génération à l'autre. Ces biais sont causés par des phénomènes aléatoires impossibles à prévoir, comme par exemple une catastrophe climatique ou le hasard des rencontres des spermatozoïdes et des ovules. Ce phénomène permet d'expliquer comment la fréquence d'un allèle neutre peut augmenter au cours du temps. Plus la population est petite, plus la dérive génétique est importante.
Migration : déplacement d'individus d'un endroit à un autre.

Tableau 3 : Phénomènes principaux qui tendent à modifier la fréquence des allèles au sein des populations.

Partie C : Le Syndrome de l'X Fragile

Le Syndrome de l'X Fragile est une des formes les plus communes de retard mental. Il s'associe à un comportement autistique, une mâchoire proéminente, un pavillon de l'oreille de grande taille et des testicules volumineux.

C1. Origine génétique du Syndrome de l'X Fragile et mise au point de modèles murins

La mutation responsable de ce syndrome se trouve dans un gène localisé sur le chromosome X, appelé *Fmr1* (Fragile X mental retardation 1). Le gène *Fmr1* code une protéine appelée FMRP (Fragile X mental retardation protein). La mutation du gène *Fmr1* chez les individus atteints du Syndrome de l'X Fragile consiste exclusivement en l'accumulation de répétitions du triplet CGG dans l'exon 1 (figure 10). Par la suite, nous nous intéresserons uniquement aux individus de sexe masculin, sains ou atteints du Syndrome de l'X Fragile (FraX).

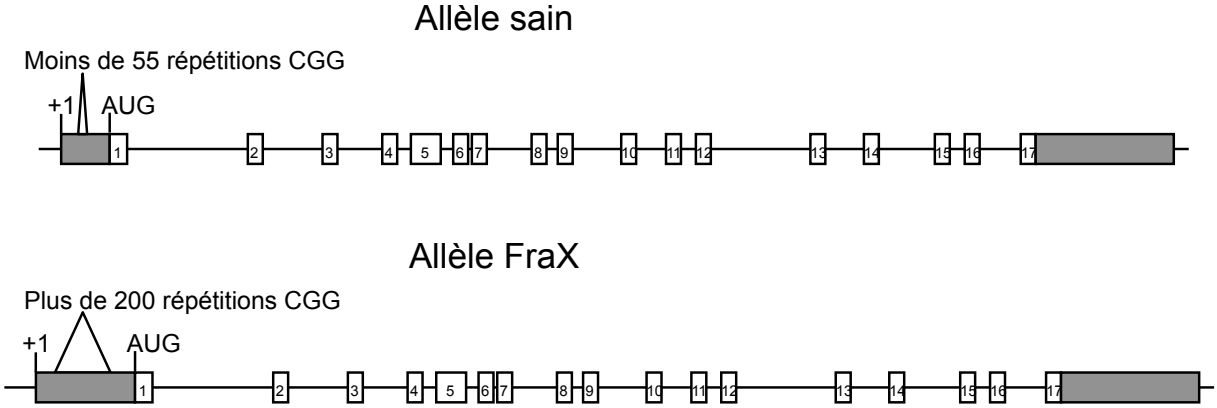

Figure 10 : Organisation du gène *Fmr1* chez les individus sains (en haut) et FraX (en bas). Les rectangles représentent les exons numérotés de 1 à 17 : en grisé les régions non traduites, en blanc les régions traduites. Le site de début de transcription est indiqué par +1. Le site de début de la traduction est indiqué par AUG. Dans la région non traduite entre +1 et AUG, le nombre de répétitions du triplet CGG varie entre l'allèle sain (moins de 55 répétitions) et l'allèle FraX (plus de 200 répétitions). Le nombre de répétitions peut varier chez un même individu.

Question 16. Quelles sont les conséquences attendues de la mutation sur la séquence en acides aminés de la protéine FMRP ?

Chez les individus FraX, la protéine FMRP n'est jamais détectée, ni en immunodétection après électrophorèse, ni en immunocytochimie avec des anticorps dirigés contre cette protéine, quel que soit le tissu analysé, alors que la protéine peut être détectée chez les individus sains.

Question 17. Proposez plusieurs hypothèses pouvant expliquer l'absence de la protéine FMRP chez les individus FraX.

Les ARN sont purifiés à partir de cellules d'individus FraX ou sains. Ces ARN subissent une transcription inverse (RT) donnant naissance à des ADN complémentaires qui sont amplifiés par réaction d'amplification en chaîne (PCR) avec des amorces spécifiques des gènes codant FMRP et HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase). HPRT est une protéine dont l'expression n'est pas affectée par la mutation du gène *Fmr1*. Les amorces spécifiques de *Fmr1* sont choisies dans la séquence codante. L'analyse des rapports des quantités d'ARNm Fmr1/HPRT estimées par cette technique (tableau 4) révèle 2 catégories d'individus FraX, notées FraX-A et FraX-B. Les individus de type FraX-A sont plus fréquents que ceux de type FraX-B.

Catégorie d'individus	Nombre d'individus	Rapport Fmr1/HPRT
FraX-A	16	0,00
FraX-B	4	0,54 ± 0,14
Sains	10	0,65 ± 0,15

Tableau 4 : Analyse de la quantité relative des ARN messagers Fmr1 et HPRT dans les cellules d'individus FraX ou sains. Les résultats présentés correspondent à la moyenne du rapport des quantités d'ARNm Fmr1/HPRT pour les individus de la catégorie ± écart-type.

<u>Question 18</u>. Comment peut-on expliquer l'absence de la protéine FMRP chez les individus FraX à partir des résultats présentés dans le tableau 4 ?

Par la suite, on analyse la méthylation de l'ADN autour du début du gène *Fmr1*. Chez les Eucaryotes, des méthylases peuvent transférer des groupements méthyles sur des cytosines dans des séquences CG, ce qui participe au contrôle local de la transcription. L'enzyme BssHII reconnaît le site de restriction GCGCGC et coupe au niveau de ce site les 2 brins d'ADN, si et seulement si le site n'est pas méthylé. L'enzyme de restriction EcoRI coupe les 2 brins d'ADN au niveau du site de restriction GAATTC et est insensible à la méthylation.

L'ADN génomique d'un individu sain, d'un individu FraX-A et d'un individu FraX-B est digéré par EcoRI seul ou par EcoRI et BssHII en même temps (la carte de restriction de la région autour de l'exon 1 du gène *Fmr1* est présentée en figure 11A). Les fragments de digestion obtenus sont dénaturés et séparés par électrophorèse en fonction de leur taille, puis transférés sur une membrane. La membrane est ensuite incubée avec une sonde radiomarquée (présentée en figure 11A), puis une autoradiographie est réalisée (figure 11B).

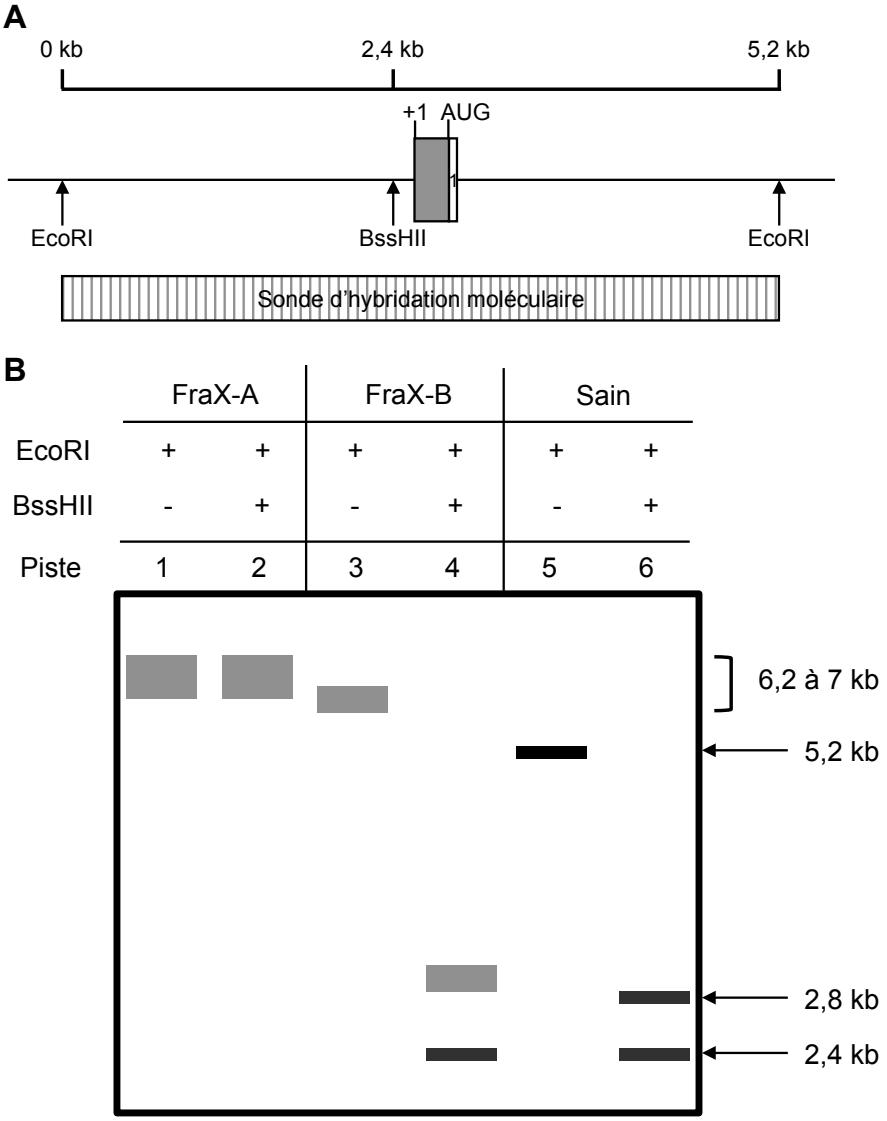

Figure 11 : Analyse de la méthylation dans la région 5' du gène *Fmr1*. (A) Détail de la région 5' chez un individu sain. L'emplacement des sites de restriction des enzymes EcoRI et BssHII est indiqué (flèches). Une échelle de taille en kilobases (kb) est représentée au-dessus du schéma. La sonde utilisée pour l'hybridation moléculaire est indiquée sous le schéma. (B) Schématisation des résultats de l'hybridation moléculaire après électrophorèse, avec la sonde spécifique du gène *Fmr1*, sur l'ADN génomique. Tous les individus FraX-A présentent le profil des lignes 1 et 2 ; tous les individus FraX-B celui des lignes 3 et 4 ; tous les individus sains celui des pistes 5 et 6. La taille (en kb) des fragments d'ADN séparés par électrophorèse est indiquée sur le côté de l'autoradiographie.

<u>Question 19</u>. Analysez les résultats obtenus après digestion par EcoRI, puis ceux obtenus après la double digestion par EcoRI et BssHII. Que peut-on conclure de ces observations ? Quelle(s) hypothèse(s) peut-on faire pour expliquer les résultats du tableau 4 ?

Deux laboratoires ont décidé d'étudier le rôle de FMRP dans des modèles murins. Chez la souris, l'organisation du locus est similaire à celle du locus humain (présenté en figure 10) et l'expression du gène *Fmr1* est comparable en termes de patron et de niveau d'expression à celle du gène humain. Les protéines murine et humaine présentent 97% d'acides aminés identiques. Cependant, le nombre de répétitions du triplet CGG ne varie pas naturellement chez la souris. Les deux laboratoires ont obtenu des souris transgéniques dont le gène *Fmr1* a été invalidé. Leurs deux lignées respectives sont appelées Fmr1-KO1 et Fmr1-KO2 (figure 12). Dans la lignée Fmr1-KO1, le gène de résistance à la néomycine (NEO-R) a été inséré en orientation inverse dans l'exon 5. Dans la lignée Fmr1-KO2, on a supprimé le promoteur, l'exon 1 et une partie de l'intron 1 de *Fmr1* (de 3 kb en amont de l'ATG à 300 pb en aval de la fin de l'exon 1).

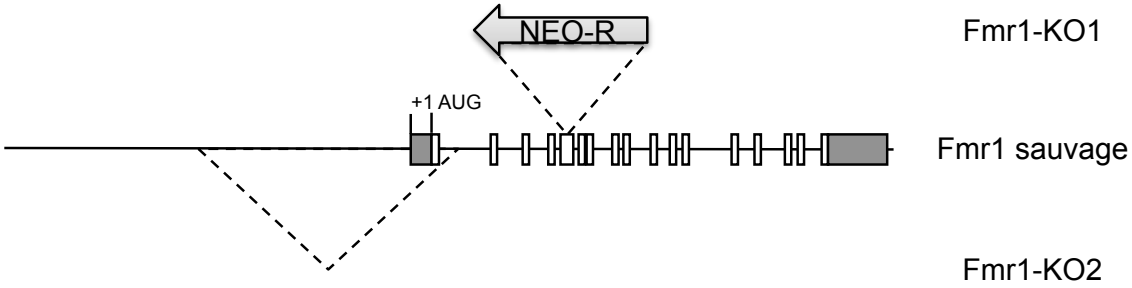

Figure 12 : Représentation schématique des modifications génétiques introduites au locus *Fmr1* (sauvage, au centre) dans les lignées de souris transgéniques Fmr1-KO1 (en haut) et Fmr1-KO2 (en bas).

<u>Question 20</u>. A priori, ce modèle animal vous paraît-il adapté pour étudier le Syndrome de l'X Fragile des individus FraX-A et FraX-B ? Justifiez. Quelle autre modification génétique aurait pu être envisagée pour créer un modèle animal du Syndrome de l'X Fragile ?

Les souris étudiées par la suite sont des souris mâles présentant la modification sur leur chromosome X. Ces souris sont comparées à des souris sauvages de même fonds génétique (tableau 5 et la figure 13).

Génotype	Masse des testicules en mg
Sauvage	244 ± 9
Fmr1-KO1	288 ± 7
Fmr1-KO2	319 ± 5

Tableau 5 : Masse des testicules de mâles adultes sauvages, Fmr1-KO1 ou Fmr1-KO2. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de la masse de 10 paires de testicules par catégorie ± écart-type.

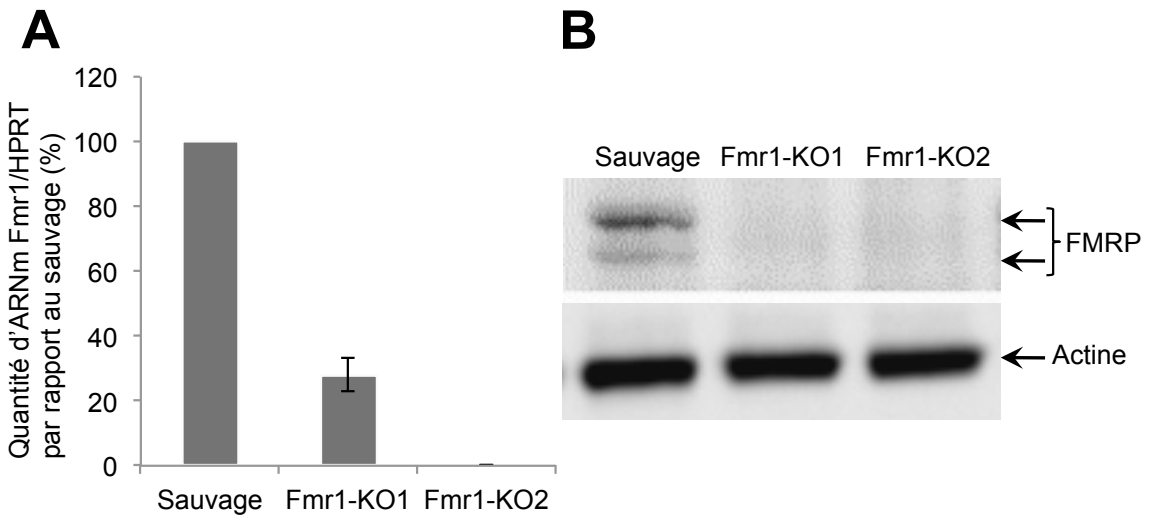

Figure 13 : Analyse de l'expression du gène *Fmr1* dans deux lignées transgéniques invalidées. **A.** Analyse de la quantité relative des ARN messagers Fmr1 dans le cerveau de souris sauvages ou transgéniques (Fmr1-KO1 et Fmr1-KO2). On réalise une RT-PCR sur des ARN purifiés de cerveaux, avec des amorces spécifiques des gènes *Fmr1* et *HPRT* comme décrit pour le tableau 4. Les résultats présentés correspondent à la moyenne du rapport des quantités d'ARNm Fmr1/HPRT pour 3 souris de chaque lignée, exprimée en pourcentage de la moyenne obtenue pour 3 souris sauvages ± écart-type. **B.** Immunodétection de la protéine FMRP. Les protéines purifiées à partir de cerveaux de souris sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes puis transférées sur une membrane. La membrane est incubée avec un anticorps dirigé contre l'actine (panneau du bas) ou avec un anticorps dirigé contre FMRP (panneau du haut). La présence des protéines est détectée grâce au couplage de l'anticorps à une enzyme donnant des produits colorés en présence d'un substrat chromogène.

<u>Question 21</u>. En exploitant les résultats du tableau 5 et de la figure 13, laquelle des 2 lignées transgéniques utiliseriez-vous pour étudier le rôle de FMRP ? Justifiez.

<u>Question 22</u>. Citez au moins 2 autres phénotypes qui pourraient être examinés chez ces souris pour confirmer le choix du modèle transgénique animal.

C2. Rôles moléculaires de la protéine FMRP

Pour comprendre le rôle de FMRP, on analyse les motifs protéiques présents dans cette protéine (figure 14A). On a ainsi pu mettre à jour 2 motifs KH (noté KH1 et KH2) et un motif RGG, qui sont des motifs de liaison aux ARN.

Pour vérifier l'interaction de la protéine FMRP avec différents ARN, dont son propre ARNm, on utilise un protocole de liaison mettant en présence :

1. la protéine FMRP immobilisée sur des billes,
2. l'un des ARN suivants, radiomarqué : la partie non codante d'un ARNm de Drosophile (NTR), un ARN ribosomal d'*Escherichia coli* (ARNr), la partie codante de l'ARNm Fmr1 (Fmr1-exons1-17) ou la partie non codante de cet ARNm (Fmr1-NTR).

Les ARN (en quantité et radioactivité totale constantes entre les différentes expériences) et les protéines FMRP immobilisées sur des billes sont incubés pendant 15 minutes. Après centrifugation, les billes sont séparées du surnageant. Pour chaque ARN testé, on mesure la quantité de radioactivité retenue par les billes recouvertes de FMRP et la quantité de radioactivité non retenue par les billes.

ARN testé	Radioactivité liée aux billes (%)
NTR	70
ARNr	30
FMR1-exons1-17	60
Fmr1-NTR	56

Tableau 6 : Liaison d'ARN radiomarqués à la protéine FMRP. Pour chaque ARN, on mesure la radioactivité associée ou non aux billes pour calculer le pourcentage de radioactivité liée aux billes.

<u>Question 23</u>. Que suggère cette expérience concernant la capacité de FMRP à se lier à des ARN ? Proposez 2 expériences témoins qui permettraient de valider cette expérience.

Par la suite, on utilise le même protocole mais en utilisant une quantité fixe de la partie codante de l'ARNm Fmr1 (Fmr1-exons1-17) radiomarquée et mise en compétition avec un ARN non marqué en quantité croissante. Les résultats obtenus sont présentés en figure 14B.

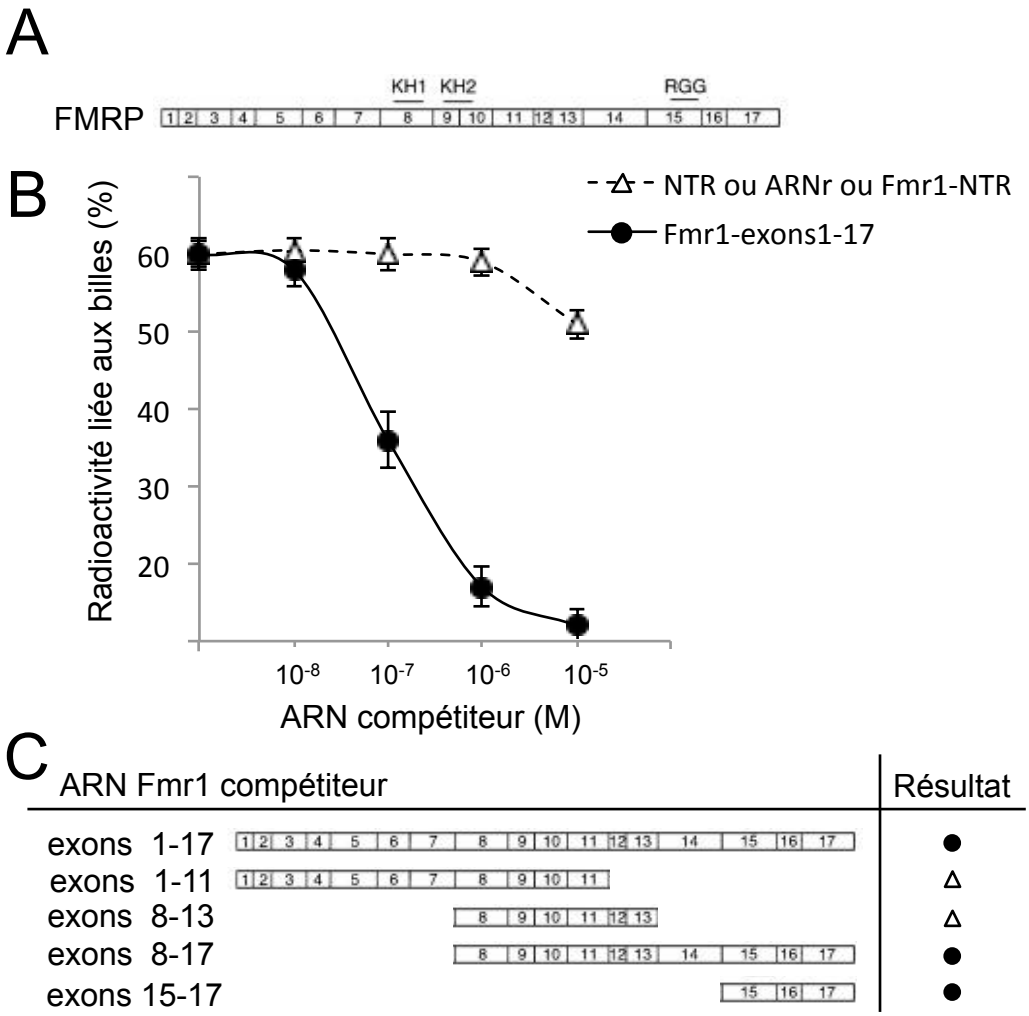

Figure 14 : Test compétitif de liaison de la protéine FMRP à des ARN. A. Domaines de la protéine FMRP avec indication des exons codant de l'ARN Fmr1. KH1, KH2 et RGG sont des domaines de liaison aux ARN. **B et C.** Pourcentage d'ARN Fmr1 lié à la protéine FMRP en présence de concentrations variables d'un ARN compétiteur. La partie codante de l'ARNm Fmr1 (Fmr1-exons1-17) est radiomarquée. Sa liaison à la protéine FMRP est exprimée en pourcentage de la radioactivité retenue par les billes par rapport à la radioactivité totale. Cette liaison est représentée en fonction de la concentration de l'ARN compétiteur non marqué. Chaque point correspond à la moyenne de 4 expériences indépendantes ± écart-type. **B.** Compétition avec la partie non codante d'un ARNm de Drosophile (NTR), d'un ARNr d'*Escherichia coli* (ARNr), de la partie non codante de l'ARNm Fmr1 (Fmr1-NTR) ou de la partie codante de cet ARNm (Fmr1-exons1-17). Les courbes obtenues pour ARNr ou Fmr1-NTR sont comparables à celle obtenue pour NTR. **C**. Compétition avec différents fragments de la partie codante de l'ARNm Fmr1. Les résultats sont exprimés à l'aide des mêmes figurés qu'en B (courbe comparable à celle obtenue pour Fmr1-exons1-17 : ● ; courbe comparable à celles obtenues pour NTR, ARNr ou Fmr1-NTR : ∆).

<u>Question 24</u>. Quelle information complémentaire est apportée par l'expérience présentée en figure 14B concernant la spécificité des interactions entre FMRP et les ARN testés ?

La même expérience est menée en utilisant comme ARN compétiteur non marqué des fragments de la partie codante de l'ARNm Fmr1 (figure 14C).

<u>Question 25</u>. Quelle est la région de l'ARN Fmr1 impliquée dans la liaison à la protéine FMRP ?

<u>Question 26</u>. Proposez au moins 3 rôles possibles pour une protéine se liant aux ARN.

Dans cette région de l'ARNm Fmr1, on a isolé ainsi un motif FBS (FMRP binding site) de 101 nucléotides qui correspond à la séquence minimale de liaison de FMRP. On fusionne cette séquence FBS en 5' de la séquence codante de la luciférase (FBS-*luc*). Une construction contrôle est réalisée sans la séquence FBS (*luc*). On incube *in vitro* pendant 1h à 30°C des quantités équivalentes d'ARNm *luc* ou FBS-*luc* dans un milieu réactionnel contenant la machinerie de traduction en absence ou en présence de FMRP ou de GST (une protéine ne se liant pas aux ARN), puis on mesure l'activité luciférase (figure 15). La luciférase permet une émission de lumière en présence de luciférine et d'ATP, et son activité enzymatique est mesurée grâce à un luminomètre.

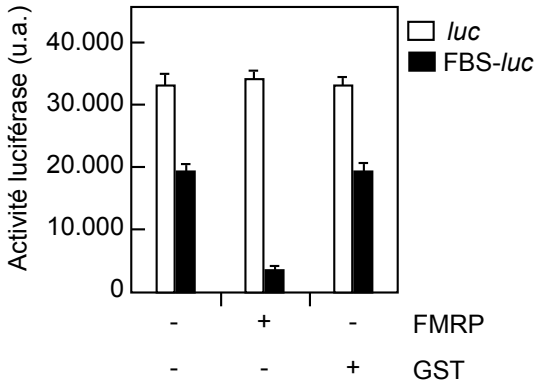

Figure 15 : Activité luciférase exprimée en unités arbitraires après traduction *in vitro* des ARNm *luc* ou FBS-*luc* en présence de FMRP ou GST.

Question 27. D'après le principe de l'expérience, que quantifie-t-on au travers de l'activité luciférase ? D'après les résultats présentés en figure 15, que peut-on dire sur le rôle de la séquence FBS et de FMRP dans le métabolisme de l'ARN rapporteur *in vitro* ?

C3. Implication de la protéine FMRP dans le système nerveux

Le Syndrome de l'X Fragile étant essentiellement caractérisé par un phénotype de retard mental et d'autisme, on s'intéresse aux rôles de la protéine FMRP dans le développement et le fonctionnement du système nerveux. En particulier, les chercheurs ont mené de nombreux travaux sur les neurones du cortex et leurs dendrites. Les épines sont de petites protrusions au niveau des dendrites qui forment une synapse avec un axone d'un autre neurone. Leur morphologie (due aux protéines de structure) et leur équipement en récepteurs aux neurotransmetteurs sont variables en fonction de l'activité de la synapse. Il s'agit d'une des formes de plasticité du système nerveux, phénomène impliqué notamment dans l'apprentissage, la mémorisation et la cognition. La morphologie et le nombre des épines sont aussi régulés au cours du développement du système nerveux. Les épines sont longues et nombreuses au début du développement du système nerveux, puis leur nombre se réduit et leur longueur diminue, de manière dépendante de l'activité de la synapse.

FMRP est présente dans les dendrites des neurones et particulièrement dans les épines (figure 16A). On étudie la morphologie des dendrites dans le cortex de souris sauvages ou de souris mutantes Fmr1-KO (chez lesquelles le gène *Fmr1* a été invalidé - voir partie C1). On note que chez les souris Fmr1-KO, le diamètre des corps cellulaires ou des dendrites, ainsi que la longueur des dendrites ne sont pas différents des sauvages.

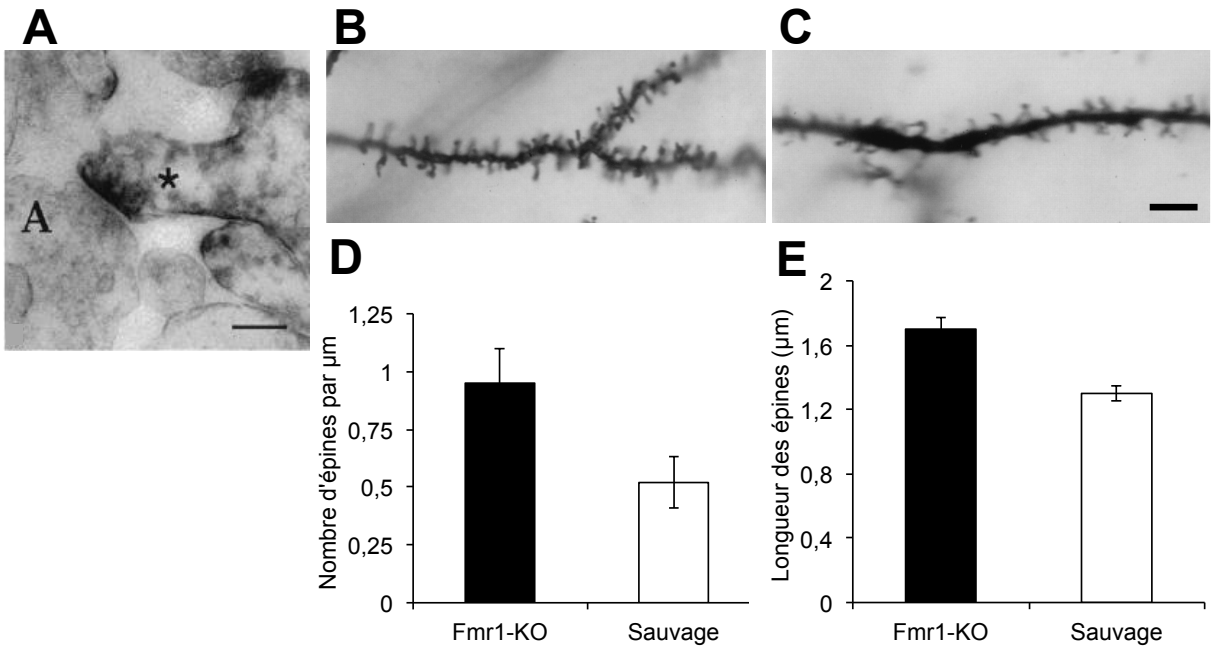

Figure 16 : Morphologie et nombre des épines dans les neurones du cortex de souris Fmr1-KO ou sauvages. (A). Immunolocalisation de la protéine FMRP dans une épine dendritique de neurone du cortex de souris sauvage. ★ Indique un précipité sombre révélateur de l'immunomarquage dans une épine. Le A marque l'emplacement d'une terminaison axonale formant une synapse avec l'épine. Barre d'échelle = 500 nm. (B et C). Morphologie d'une portion de dendrite d'un neurone cortical d'une souris Fmr1-KO (B) ou sauvage (C). Des neurones individuels sont marqués par un colorant. Barre d'échelle = 10 µm. (D). Moyenne ± écart-type du nombre d'épines par µm de dendrite (chez 4 animaux pour chaque lignée, sur 5 neurones par animal, on compte le nombre d'épines sur une longueur de 25 µm à une distance de 50 µm du corps cellulaire). (E). Moyenne ± écart-type de la longueur des épines des neurones corticaux des souris Fmr1-KO ou sauvages (chez 4 animaux pour chaque lignée, sur 5 neurones par animal, on mesure la longueur de 30 épines par neurone).

<u>Question 28</u>. En vous aidant des résultats présentés dans la figure 16, quel rôle la protéine FMRP joue-t-elle sur la morphologie des dendrites des neurones corticaux ?

On s'intéresse à deux ARNm dont la liaison par FMRP a été démontrée : GluR1 (codant un récepteur du glutamate, neurotransmetteur excitateur) et PSD95 (codant une protéine structurale post-synaptique). Ces ARNm sont présents dans les dendrites de neurones en culture. Par ailleurs, des observations en microscopie électronique à transmission montrent la présence de ribosomes et d'ARNm dans ou à proximité des épines, ce qui suggère que des protéines peuvent y être synthétisées.

On réalise un fractionnement à partir de cortex de souris sauvages ou Fmr1-KO pour purifier les épines dendritiques associées aux terminaisons axonales. Les complexes épine dendritique/terminaison axonale, appelés synaptosomes, sont lysés et on réalise un nouveau fractionnement pour séparer les polyribosomes (association de plusieurs ribosomes et d'un ARNm) du reste du lysat. On admettra qu'un ARNm présent dans les polyribosomes est un ARNm en cours de traduction.

Les ARN sont purifiés dans les 2 fractions et sont analysés par RT-PCR quantitative avec des amorces spécifiques des ARNm PSD95 ou GluR1. On calcule alors le pourcentage d'ARNm présents dans la fraction des polyribosomes par rapport aux ARN présents dans la totalité des synaptosomes. Pour évaluer l'effet de l'activité de la synapse sur ces phénomènes, les synaptosomes sont traités ou non pendant 15 minutes par du glutamate.

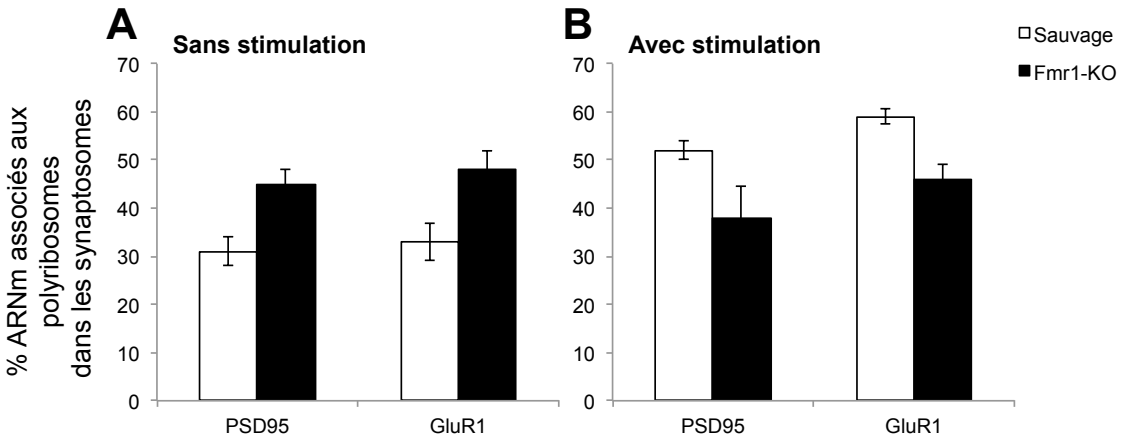

Figure 17 : Comparaison des pourcentages d'ARNm associés aux polyribosomes dans les synaptosomes de cortex de souris sauvages (blanc) ou Fmr1-KO (noir), en absence de stimulation (A) ou après stimulation par du glutamate (B). Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes ± écart-type.

<u>Question 29</u>. D'après le principe de l'expérience, que cherche-t-on à mesurer grâce au pourcentage d'ARNm associés aux polyribosomes dans les synaptosomes ? Proposez un protocole expérimental qui permettrait de mettre en évidence la synthèse de protéines dans les synaptosomes.

<u>Question 30</u>. Analysez et interprétez les résultats de la figure 17 pour les synaptosomes sauvages. Quelles conséquences les modifications induites par le glutamate pourraient-elles entraîner en matière de mémorisation, d'apprentissage et de cognition ?

<u>Question 31</u>. Quel est l'effet de l'absence de FMRP sur le métabolisme de ses ARNm cibles ? Est-ce cohérent avec les rôles proposés *in vitro* pour FMRP en question 27 ?

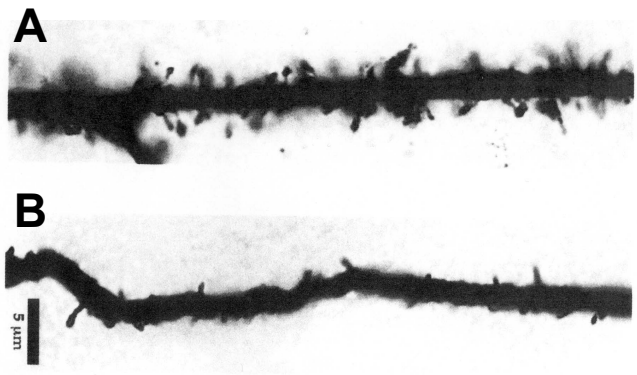

Figure 18 : Morphologie de portions de dendrites de neurones corticaux chez l'homme adulte. Les tissus prélevés post-mortem chez un individu FraX (A) ou un individu sain (B) sont fixés et des neurones individuels sont marqués par un colorant. Barre d'échelle = 5 µm.

<u>Question 32</u>. Comparez les résultats obtenus dans les figures 16 et 18.

<u>Question 33</u>. En regroupant les observations faites chez l'homme et la souris, proposez une explication au retard mental dans le Syndrome de l'X Fragile chez le mâle.

Annexe

		Deuxième lettre									
		U		C		A		G			
Première lettre	U	UUU	Phenylalanine Phe F	UCU	Sérine Ser S	UAU	Tyrosine Tyr Y	UGU	Cystéine Cys C	U	Troisième lettre
		UUC	"	UCC	"	UAC	"	UGC	"	C	
		UUA	Leucine Leu L	UCA	"	UAA	STOP	UGA	STOP	A	
		UUG	"	UCG	"	UAG	STOP	UGG	Tryptophane Trp W	G	
	C	CUU	Leucine Leu L	CCU	Proline Pro P	CAU	Histidine His H	CGU	Arginine Arg R	U	
		CUC	"	CCC	"	CAC	"	CGC	"	C	
		CUA	"	CCA	"	CAA	Glutamine Gln Q	CGA	"	A	
		CUG	"	CCG	"	CAG	"	CGG	"	G	
	A	AUU	Isoleucine Ile I	ACU	Thréonine Thr T	AAU	Asparagine Asn N	AGU	Sérine Ser S	U	
		AUC	"	ACC	"	AAC	"	AGC	"	C	
		AUA	"	ACA	"	AAA	Lysine Lys K	AGA	Arginine Arg R	A	
		AUG	Méthionine Met M	ACG	"	AAG	"	AGG	"	G	
	G	GUU	Valine Val V	GCU	Alanine Ala A	GAU	Acide aspartique Asp D	GGU	Glycine Gly G	U	
		GUC	"	GCC	"	GAC	"	GGC	"	C	
		GUA	"	GCA	"	GAA	Acide glutamique Glu E	GGA	"	A	
		GUG	"	GCG	"	GAG	"	GGG	"	G	