

5. Les épreuves pratiques

Les sujets présents dans ce rapport peuvent présenter une mise en page un peu différente de celle utilisée lors des épreuves car ils contiennent des éléments de réponse aux questions.

5.1 Épreuve de travaux pratiques de spécialité du secteur A : Sujet et commentaires

Le sujet d'option proposé pour le secteur A de la session 2025 comportait deux parties indépendantes, portant sur l'étude des fonctions embryonnaires des enzymes du métabolisme des purines et sur la caractérisation de la SDH mitochondriale.

Ce sujet faisait appel à la mise en œuvre de compétences théoriques et pratiques en embryologie, en biologie cellulaire, en biologie moléculaire et en biochimie. Les capacités d'analyse et de réflexion des candidats ont également été évaluées grâce à l'analyse de données expérimentales issues d'articles de recherche. Certaines parties du sujet nécessitant une bonne maîtrise de Libmol, de tableurs et de Mesurim ont permis d'évaluer les aptitudes des candidats à utiliser les outils informatiques, indispensables pour le métier d'enseignant de SV-STU.

Dans la première partie, les questions de biologie moléculaire ont été généralement bien réussies par la majorité des candidats, à l'exception de la mesure d'absorbance permettant de déterminer la concentration et la pureté de la solution d'ADN. Le jury déplore que certaines notions d'embryologie et de biologie animale, comme les notions relatives au plan d'organisation d'un vertébré et à la capacité des candidats à observer et décrire précisément des embryons ne soient pas davantage maîtrisées. L'utilisation de la cellule de comptage de Malassez, dont le principe était rappelé, et les conversions d'unité ont étonnement posé problème à la plupart des candidats.

La deuxième partie du sujet s'est révélée être particulièrement discriminante pour les candidats ayant réussi à effectuer les manipulations et à les analyser, contrairement à ceux qui n'ont traité que de façon superficielle les documents. Le jury tient à rappeler que les manipulations sont valorisées lors de l'épreuve de travaux pratiques.

Le jury déplore que les concepts d'énergétique et de biochimie de base ne soient pas maîtrisés par la plupart des candidats d'option A tout comme les calculs de dilution et de concentration qui sont trop souvent erronés et sans esprit critique lors de l'analyse de résultats incohérents. Par exemple, certains candidats ne trouvent pas anormal d'obtenir des valeurs d'absorbance supérieures à 2.

De façon globale, la majorité des candidats a montré de bonnes qualités manipulatoires et l'utilisation du matériel de laboratoire de base est plutôt bien maîtrisée (micropipettes, frottis, colorimètre, ...). Le jury tient cependant à souligner quelques points importants :

- L'observation microscopique d'éléments de l'ordre du micromètre nécessite un objectif recourant à de l'huile à immersion et un réglage précis du contraste et de la luminosité. Trop de candidats ignorent l'existence d'un diaphragme. Une observation réalisée avec un objectif X40 n'était pas pertinente pour distinguer des mitochondries.
- Une bonne manipulation implique une bonne organisation de la paillasse. De nombreux candidats laissent des cônes sales et du matériel usagé sur la paillasse. Rappelons que l'organisation de l'espace

de travail et le respect des règles élémentaires de bonnes pratiques sont également évalués en salle par les examinateurs.

- Les enzymes et les fractions cellulaires doivent être conservées sur glace. Une absence de conservation sur glace impacte le résultat des expériences mais aussi la notation en salle : la capacité à intégrer toutes les précisions indiquées dans les protocoles fait partie de l'évaluation. Par exemple, certains candidats n'ont pu observer dans le frottis de la question QII.A.4 qu'un bouillon de culture bactérien après l'avoir conservé à température ambiante plusieurs heures.
- Les règles d'hygiène et sécurité associées aux expérimentations sont parfois négligées par les candidats. Trop de candidats conservent leurs gants après manipulation et se touchent le visage, tapent à l'ordinateur ou boivent à leur gourde avec leurs gants.

AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE - SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – Session 2025

TRAVAUX PRATIQUES DE SPECIALITÉ DU SECTEUR A **Durée totale : 6 heures**

CARACTÉRISATION DE VOIES MÉTABOLIQUES

Le sujet est composé de 2 parties indépendantes :

- **Partie I : Étude des fonctions embryonnaires des enzymes du métabolisme des purines**
Durée conseillée : 3h - barème indicatif : 50 points sur 100
- **Partie II : Caractérisation de la SDH mitochondriale**
Durée conseillée : 3h - barème indicatif : 50 points sur 100

L'utilisation d'une calculatrice non programmable est autorisée. Celle-ci est fournie au candidat.

Les réponses aux questions figureront uniquement dans les cadres réservés à cet effet.

N'oubliez pas d'appeler les examinateurs lorsque cela est demandé.

N'oubliez pas de sauvegarder vos fichiers informatiques sur la clef USB à votre disposition.

Une lecture du sujet dans son intégralité est fortement conseillée afin de répartir au mieux son temps de travail entre les différentes parties et les manipulations qui nécessitent parfois des temps d'attente.

PRÉAMBULE :

Indications sur l'organisation de l'épreuve et rappels utiles aux manipulations :

- L'épreuve comprend plusieurs temps d'attente incompressibles qui sont rappelés ci-après :
 - La partie I.B comporte une restriction enzymatique (1h) suivie d'une électrophorèse (1h) ;
 - La partie I.C comporte une coloration β -galactosidase (1h à 2h) ;
 - La partie II comporte une étude enzymatique nécessitant 10 min d'incubation.
- Pour l'électrophorèse, un seul gel vous sera fourni. Les dépôts devront se faire au minimum 1h avant la fin de l'épreuve sous la supervision du jury qui photographiera le gel après migration.
- Partie I.C : Les embryons vont seront donnés 2h après le début de l'épreuve ; la coloration devra alors être effectuée immédiatement.
- Tout le matériel nécessaire aux manipulations est disposé sur la paillasse de chaque candidat. Il ne sera pas délivré de matériel ou d'échantillon supplémentaire.
- Toutes les solutions de biologie moléculaire utilisant des enzymes doivent être conservées dans la glace.
- La propreté de la paillasse et le respect des règles d'hygiène et de sécurité seront contrôlées et évaluées tout au long de l'épreuve.

Certaines manipulations nécessitent de porter des gants ; c'est au candidat de décider quand en porter. Le port des gants sera contrôlé par les membres du jury.
- Au cours de l'épreuve, certains résultats nécessitent d'être contrôlés par les membres du jury en salle. L'énoncé mentionnant cette obligation, vous appellerez un membre du jury qui examinera votre résultat.

Partie I : Étude des fonctions embryonnaires des enzymes du métabolisme des purines

Dans cette partie, on s'intéresse aux fonctions embryonnaires des enzymes impliquées dans le métabolisme des purines. Pour ce faire, des expériences fonctionnelles sont réalisées afin de moduler l'expression des gènes codant pour ces enzymes par micro-injection dans l'embryon de xénope. L'ARNm *LacZ* est également injecté afin de confirmer la qualité des injections et identifier le côté de l'embryon qui a subi l'injection.

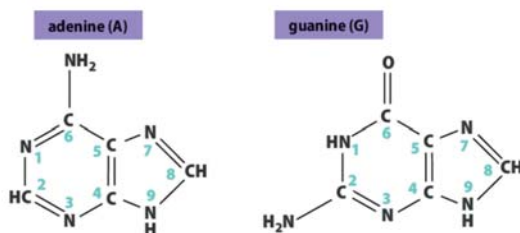
Partie A : Caractérisation des enzymes du métabolisme des purines

On cherche à démontrer la conservation des enzymes impliquées dans la voie de synthèse *de novo* ou de recyclage des purines au cours de l'évolution. Une représentation schématique de ces voies est donnée dans l'Annexe 1.

QI.A.1 : Définir une purine.

Réponse à la question QI.A.1

Une purine est une molécule azotée hétérocyclique constituée d'un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole.



QI.A.2 : Citer deux rôles cellulaires des purines, autres que l'énergétique cellulaire, en précisant la purine impliquée dans ces fonctions.

Réponse à la question QI.A.2

Plusieurs réponses étaient possibles

- Synthèse dans acides nucléiques des ADN et ARN : adénine et guanine
- Signalisation cellulaire : AMPc ou GMPc en tant que second messenger ; Le GTP essentiel pour la signalisation par les protéines G, en étant converti en GDP
- Neuromodulateur : ATP /Adénosine
- acide urique : produit final du métabolisme des purines et est majoritairement éliminé par les reins et excrété dans les urines.

La protéine ADSL (pour adénylosuccinate lyase ou adénylosuccinase) est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des purines, à la fois dans la voie de synthèse *de novo* et celle de recyclage des purines.

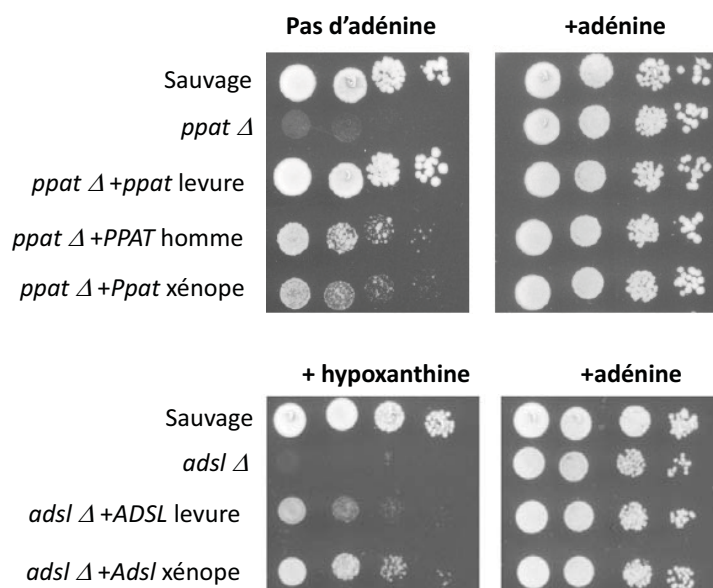
QI.A.3 : Une lyase est une enzyme qui catalyse une réaction de décomposition dans laquelle une liaison C-C, C-O, C-N est rompue sans hydrolyse ni oxydation. Parmi les réactions enzymatiques suivantes du métabolisme des purines, identifier celle qui est réalisée par une lyase et indiquer le numéro de cette réaction dans le cadre ci-dessous. Vous pouvez vous aider de l'Annexe 2 pour répondre à cette question.

1. Xanthine + H₂O + O₂ \longrightarrow acide urique + H₂O₂
2. Adénosine + H₂O \longrightarrow Inosine + NH₃
3. ATP \longrightarrow AMP_c + PPi
4. GMP + 2H⁺ + NADPH \longrightarrow IMP + NADP + NH₄⁺
5. Adénosine + ATP \longrightarrow AMP + ADP

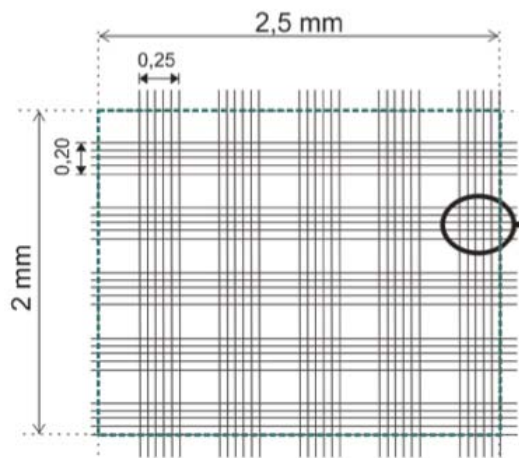
Réponse à la question QI.A.2

La réaction catalysée par la lyase est la réaction 3

Des levures mutantes pour les différentes enzymes de ce métabolisme purique sont disponibles dans les laboratoires. Il est possible de transformer ces souches mutantes afin de sur-exprimer des gènes d'intérêt. Les capacités des différentes souches à se développer sur différents milieux peuvent être testées par le test appelé « test de goutte ». Des dilutions en série des solutions-mères des différentes souches de levures (même concentration cellulaire pour toutes les souches) sont réalisées et 1 goutte de 5 µL de chaque dilution est déposée sur des boîtes de milieu de culture supplémenté, ou non, en adénine ou hypoxanthine comme seule source de purine. Après plusieurs jours de culture, les boîtes sont prises en photographie et analysées. La figure ci-dessous représente les photographies obtenues avec des levures mutantes pour le gène *ppat* (*ppat* Δ) ou *adsl* (*adsl* Δ) transformées pour sur-exprimer les gènes *ppat* ou *adsl* de levure, de l'homme ou de l'amphibien xénope.



Afin de réaliser ce test de goutte, la concentration cellulaire de la solution-mère des souches de levures est déterminée avec l'hématimètre de Malassez. Les levures de chaque souche ont été comptées dans 5 rectangles de comptage.



L'hématimètre contient 100 rectangles de comptage au total, dont 25 quadrillés qui sont subdivisés en 20 petits carrés.

1 des 25 rectangles de comptage est entouré.

Profondeur hématimètre : 0,2 mm

Les résultats de comptage des 5 rectangles de la souche mutante *ppat* Δ sont les suivants : 24, 17, 22, 15, et 20 cellules.

QI.A.4 : Sachant que la solution-mère a été diluée 1000 fois, calculer la concentration cellulaire en cellules/mL. Expliquer votre calcul.

Réponse à la question QI.A.4

La formule à appliquer est la suivante $N = (n / (a \cdot v)) \times Fd$

Avec n = nombre de levures comptées

a : nombre de rectangles comptés

v = volume d'un rectangle

Fd : facteur de dilution

Volume rectangle : $v = 0,2 \times 0,25 \times 0,2 = 0,01 \text{ mm}^3 = 0,01 \mu\text{L}$

Nombre de levures comptées $n = 24 + 17 + 22 + 15 + 20 = 98$ levures

$N = (98 / (5 \times 0,01 \cdot 10^{-3})) \times 1000 = 1,96 \cdot 10^9$ cellules/mL

Trop de candidats ont fait des erreurs de conversion

Q1.A.5 : D'après cette expérience, comment peut-on qualifier la souche *ppat* Δ ? Quel est l'intérêt d'avoir sur-exprimé les gènes *ppat* de levure, *PPAT* de l'Homme et *Ppat* du xénope dans cette souche mutante ? Justifier votre réponse en vous servant de l'Annexe 1.

Réponse à la question Q1.A.5

-Toutes les levures se développent sur le milieu avec de l'adénine : ces levures peuvent synthétiser l'AMP à partir du PRPP.

-Par contre la souche mutante *ppat* Δ (*qui ne possède plus le gène ppat*) ne se développe pas sur le milieu ne contenant pas d'adénine. Cette souche est dite **auxotrophe** pour l'adénine.

- La surexpression du gène *PPAT* de levure, Homme et xénope permet à la souche de levure de se développer sur le milieu qui ne contient pas d'adénine. Cette surexpression permet donc **de restaurer le phénotype** de la souche non mutée, sauvage.

Q1.A.6 : Analyser les résultats présentés pour la souche mutante *ads1* Δ . Justifier votre réponse en utilisant l'Annexe 1. Conclure quant à la conservation de ce gène chez les organismes étudiés.

Réponse à la question Q1.A.6

Toutes les levures se développent sur le milieu avec de l'adénine. Ces levures peuvent synthétiser l'AMP à partir du PRPP ; cette enzyme est impliquée dans les voies de synthèse et recyclage des purines.

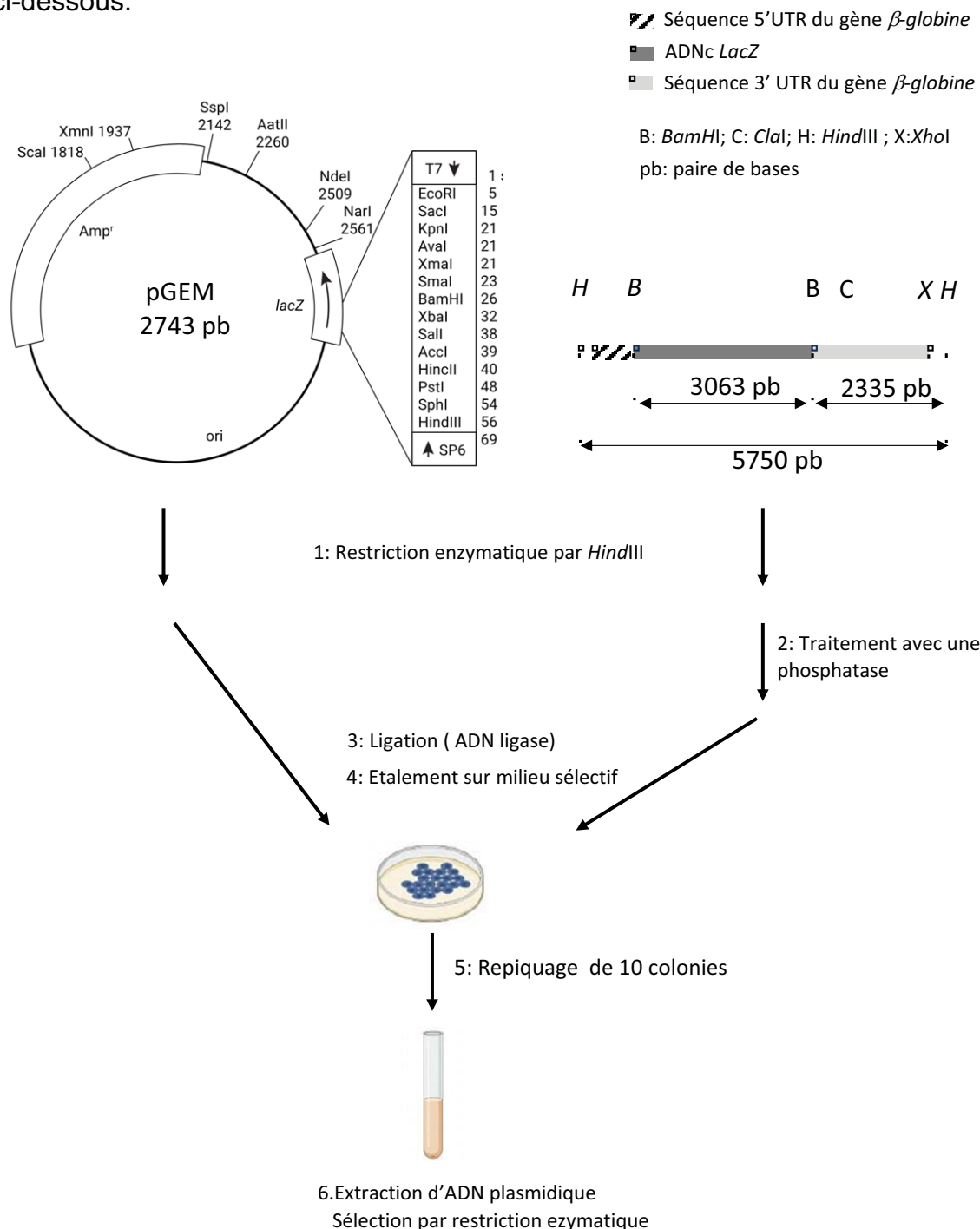
- La souche mutante *ads1* Δ ne peut se développer sur le milieu+hypoxanthine. Par contre les souches transformées avec les gènes ADSL de levure ou de Xénope peuvent se développer sur ce milieu+hypoxanthine, même si cette capacité de pousse est moindre que celle de la souche sauvage.

- Ceci montre que la fonction de ces enzymes a été conservée au cours de l'évolution et que les enzymes ADSL de levure, de l'homme et du Xénope ont la même activité enzymatique.

- Il est à noter que la surexpression du gène de levure dans la souche mutée aurait dû sauver le phénotype mais ce sauvetage n'est que partiel.

Partie B : Obtention et vérification du vecteur pGEM-LacZ en vue des études fonctionnelles

En vue des expériences fonctionnelles, un fragment d'ADN contenant l'ADNc *LacZ* (nommé insert dans la suite du sujet), codant la β -galactosidase, a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote, appelé pGEM-LacZ dans la suite du sujet, afin de produire l'ARNm *LacZ* *in vitro*. La stratégie expérimentale de ce clonage est indiquée ci-dessous.



Le site de restriction de l'enzyme *Hind*III est le suivant .



QI.B.1 : Quelle est la particularité de ce site de restriction ? Écrire la séquence des extrémités obtenues après coupure avec cette enzyme. Comment appelle-t-on ce type d'extrémités ?

Réponse à la question I.B.1

C'est une séquence palindromique composée de 6 bases.

Ce sont des extrémités cohésives

5'A	AGCTT 3'
3'TTCGA	A 5'

QI.B.2 : Concernant l'étape 3 de ce clonage : Expliquer cette réaction enzymatique en précisant ce que doit contenir le milieu réactionnel.

Réponse à la question I.B.2

La ligase permet de réunir les extrémités complémentaires de 2 fragments d'ADN afin de former un plasmide intact circulaire. En utilisant l'**ATP** comme source d'énergie, la ligase catalyse une réaction dans laquelle le groupe phosphate qui se détache de l'extrémité 5' d'un brin d'ADN est lié au groupe hydroxyle qui se détache de l'extrémité 3' de l'autre brin. Cette réaction génère un squelette sucre-phosphate intact.

Le milieu réactionnel doit contenir le vecteur, l'insert, l'enzyme, le tampon de l'enzyme et de l'ATP.

Trop de candidats ont oublié l'ATP dans le mix réactionnel.

QI.B.3 : Indiquer sur quel milieu sélectif les bactéries transformées avec les produits de ligation ont été étalées. Justifier votre réponse.

Réponse à la question I.B.3

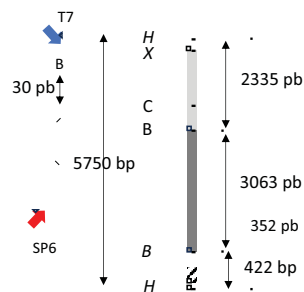
Le vecteur de clonage possède le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R). Les bactéries seront étalées sur un milieu LB+Ampicilline.

Q1.B.4. Représenter les deux plasmides pouvant être générés à la suite de ce clonage moléculaire après coupure du vecteur et de l'insert contenant l'ADNc *LacZ* par *Hind*III et insertion de cet insert. Positionner les sites des enzymes *Hind*III, *Bam*HI et *Xho*I sur les 2 plasmides. Indiquer le nombre de fragments d'ADN plasmidiques obtenus après restriction enzymatique avec chacune de ces 3 enzymes et calculer leur taille attendue.

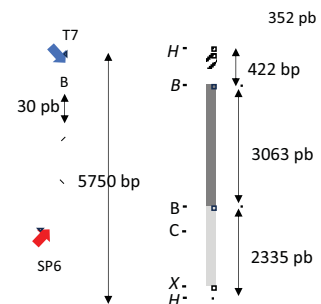
Réponse à la question I.B.4

Les plasmides générées possèdent 1 site *Xho*I, 2 sites *Hind*III et 3 sites *Bam*HI. Les restrictions par *Xho*I et *Hind*III conduisent dans les 2 cas à l'obtention des mêmes fragments d'ADN.

Plasmide 1



Plasmide 2



Taille fragments de restriction: *Xho*I : 8493 pb ; *Hind*III : 2743pb + 5750 pb

*Bam*HI : 3063pb+ 3065pb+ 236pb

*Bam*HI : 3063pb+382pb+5048pb

Q.I.B.5 : Sachant que l'ARNm *LacZ* est produit par transcription *in vitro* en utilisant l'ARN polymérase SP6, préciser quel plasmide doit être sélectionné à la suite de ce clonage. Justifier votre réponse.

Réponse à la question I.B.5

Il faut produire le brin sens qui est le brin correspondant à l'ARNm afin de produire la protéine β -Gal.

Le plasmide à sélectionner est le plasmide 1.

Pour cette réaction, il est nécessaire de ne garder que les séquences nucléotidiques nécessaires à cette transcription *in vitro* et éliminer toute séquence plasmidique non essentielle. Ceci est effectué par restriction enzymatique du plasmide.

Q.I.B.6 : En vous reportant à la figure de stratégie de clonage, expliquer pourquoi l'enzyme *XhoI* et non l'enzyme *ClaI* est choisie pour cette restriction enzymatique.

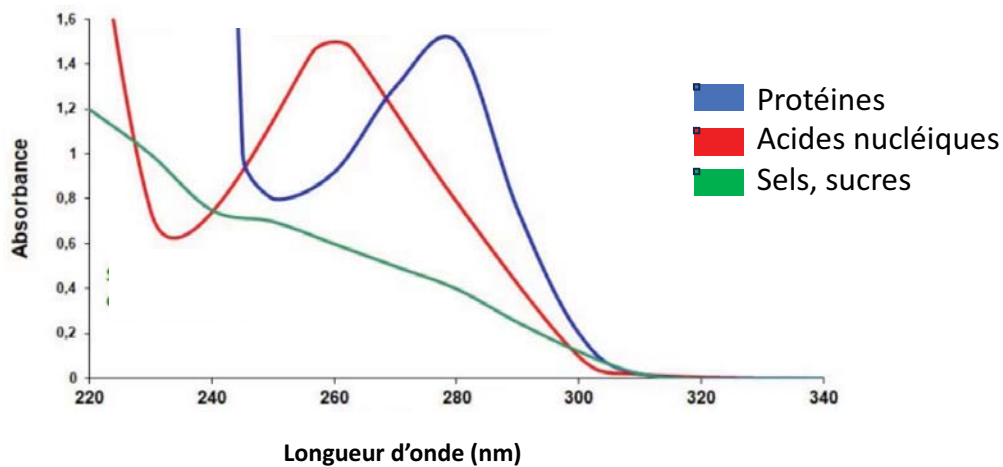
Réponse à la question QI.B.6

Il est nécessaire d'avoir l'intégralité des séquences 3' UTR de la β -globine. En effet ces séquences sont nécessaires à la traduction et la stabilité des ARNm. En particulier cette séquence 3'UTR va contenir la séquence de polyadénylation AAUAAA nécessaire à la synthèse de la queue polyA.

Le plasmide pGEM-LacZ sélectionné a été transformé dans des bactéries *E.coli* chimiocompétentes. Après une culture liquide de 100mL, l'ADN plasmidique a été extrait.

Vous disposez d'un aliquote de cette solution plasmidique pGEM-LacZ.

Vous voulez déterminer la concentration en ADN et vérifier la pureté de l'extraction du plasmide. Vous avez à votre disposition un spectrophotomètre. La figure ci-dessous indique les spectres d'absorbance de différentes molécules.



Q.I.B.7 : Indiquer à quelle(s) longueur(s) d'onde vous devez faire ces mesures. Justifier votre réponse.

Réponse à la question I.B.7

Mesure du blanc à 260 nm en utilisant de l'eau sans ADN.

Mesure de l'absorbance de l'échantillon d'ADN à 260 nm (A_{260}).

Mesure de l'absorbance de l'échantillon d'ADN 280 nm (A_{280}) pour mesurer les protéines

Mesure de l'absorbance de l'échantillon d'ADN 230 nm (A_{230}) pour mesurer des contaminants

Effectuer les mesures

- **Prélever 1 μ L d'ADN auquel vous ajoutez 99 μ L d'eau.**
- **Placer cette solution dans la cuve de spectrophotométrie et procéder aux mesures d'absorbance.**

A la longueur d'onde optimale, la concentration des acides nucléiques peut être déterminée avec les valeurs suivantes.

$$\begin{aligned}
 1 \text{ unité Absorbance} &= \sim 50 \mu\text{g/mL d'ADN double brin} \\
 &= \sim 33 \mu\text{g/mL d'ADN simple brin} \\
 &= \sim 40 \mu\text{g/mL d'ARN simple brin}
 \end{aligned}$$

Q.I.B.8 : Quel est le degré de pureté et la concentration de l'ADN plasmidique ?
Interpréter et conclure sur ces résultats.

Réponse à la question I.B.8

Pureté :

Contamination protéique : Elle est déterminée par le rapport A260/A280, la valeur idéale de pureté est environ 1,8-2,0

Contamination par des composés organiques et salins chaotropiques : elle est déterminée par le ration A260/A230, valeur idéale >1,5.

Concentration : Elle est déterminée par le calcul suivant :

$$A260 \times 100 \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} \times \text{facteur de dilution (ici 100)}$$

La solution avait été préparée par le jury à 1 $\mu\text{g/mL}$.

Trop de candidats ont fait des erreurs de manipulation et/ou de calcul.

La conformité de ce plasmide pGEM-LacZ est vérifiée par une carte de restriction enzymatique avec les enzymes *Bam*HI, *Hind*III et *Xho*I.

Pour effectuer les 3 réactions enzymatiques vous disposez des réactifs suivants :

	Concentration dans la solution stock	Concentration finale dans le tube (1 enzyme par tube)
Tampon de réaction	10X	1X
ADN plasmidique	A déterminer	1 μg
Enzyme de restriction <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III ou <i>Xho</i> I (sur demande)	10 U/ μL	10U
H ₂ O		Compléter pour 20 μL

Q.I.B.9 : Indiquer les volumes de chacun des réactifs pour réaliser chacune de ces 3 restrictions enzymatiques.

Réponse à la question I.B.9

ADN : 1 µL

Tampon : 2 µL

Enzyme : 1 µL

H₂O : 16 µL

Q.I.B.10 : Quel tube contrôle faut-il effectuer pour cette expérience ? Justifier votre réponse.

Réponse à la question I.B.10

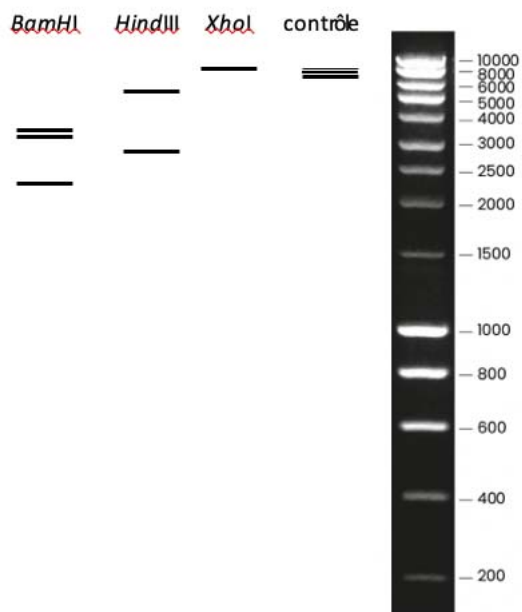
La restriction avec l'enzyme *Xho*I linéarise le plasmide.

il est nécessaire d'effectuer un tube sans enzyme de restriction. Ceci conduira à un plasmide non digéré permettant de vérifier la linéarisation par *Xho*I

- Réaliser vos mélanges réactionnels (**demander les enzymes de restriction au jury**). Le tampon de digestion de couleur verte contient le tampon de charge pour les dépôts sur gel.
- Placer les tubes à 37°C pendant 1heure.
- Appeler un membre du jury pour déposer les échantillons (15 µL) dans un gel d'agarose imprégné de SYBR Safe ainsi que 10µL du marqueur de taille.
- **Vous devez déposer les échantillons selon l'ordre suivant : Marqueur de taille ; Tube *Bam*HI ; Tube *Hind*III ; Tube *Xho*I ; Contrôle**

Q.I.B.11 : Coller et analyser le schéma du gel qui vous a été donné après la mise en route de votre gel.

Réponse à la question I.B.11



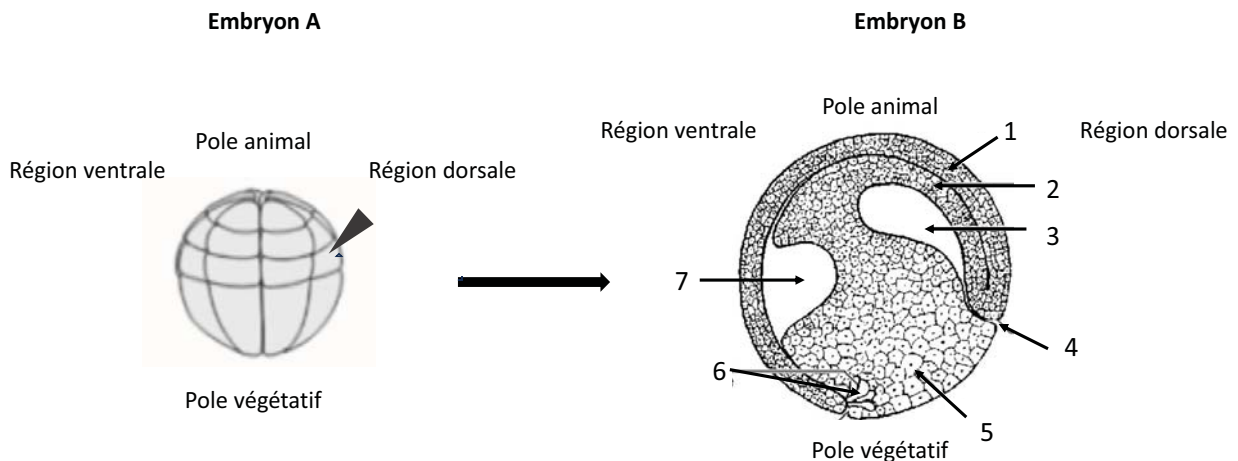
Cette restriction permet d'obtenir les fragments dont la taille correspond aux tailles calculées dans la question I.B.4. La piste contrôle montre les 3 conformations de l'ADN, circulaire, super-enroulée et linéaire.

Partie C : Étude fonctionnelle de la protéine ADSL au cours du développement embryonnaire d'un vertébré, le xénope

Les observations des embryons doivent s'effectuer en utilisant la loupe binoculaire.

L'ARNm *LacZ* est couramment utilisé comme traceur cellulaire. Il peut être micro-injecté dans les cellules d'embryon de xénope au stade 2, 4 ou 8 cellules. Sa traduction est mise en évidence par la révélation de l'activité enzymatique de la protéine, la β -galactosidase.

Q.1.C.I : Légender les structures/feuillet embryonnaires indiqués par les 7 flèches de l'embryon B et indiquer dans quelle phase du développement se trouvent les 2 embryons. Indiquer, sur le schéma de l'embryon B (dans le cadre ci-dessous), dans quelle région se trouveront les ARNm *LacZ* à la suite de leur micro-injection effectuée dans l'embryon A (illustrée par le triangle).



Réponse à la question Q1.C.1

1 : ectoderme

2 : mésoderme

3 : blastocœle

4 : lèvre dorsale du blastopore

5 : On se propose de tester l'ARNm *LacZ* dans la partie I.B. par coloration de l'embryon

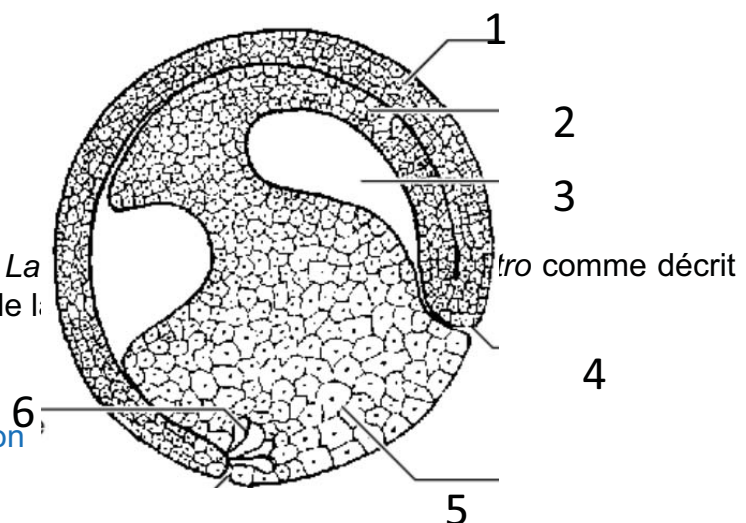
6 : cellules en bouteille

7 : archentéron

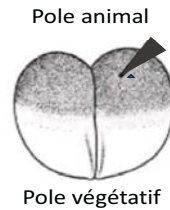
Embryon 1 : phase de segmentation

Embryon 2 : phase de gastrulation

Les ARNm *LacZ* vont se retrouver dans le mésoderme dorsal (numéroté en 2), qui est entré dans l'embryon par le mouvement d'involution.



L'ARNm *LacZ* a été injecté dans une cellule au niveau du pôle animal d'un embryon au stade 2 cellules, comme indiqué par le triangle sur le schéma.



Après quelques jours de culture ces embryons ont été placés dans une solution contenant un fixateur, le formaldéhyde, pendant 30 minutes avant d'être rincés dans une solution de PBS1X-MgCl₂ 2mM.

Sur l'étiquette de la bouteille de ce fixateur figurent 3 pictogrammes.



Q.I.C.2 : Donner la signification des 3 pictogrammes figurant sur cette étiquette. Expliquer les précautions d'utilisation de ce fixateur.

Réponse à la question I.C 2

Symbole 1 Toxique/Mortel

Symbole 2 Toxique/nuisible pour la santé

Symbole 3 Corrosif

Précautions à prendre

Maintenir le récipient fermé de manière étanche

Ne pas respirer les fumées : Travail sous sorbonne / hotte

Éviter tout contact avec yeux et peau : Porter des gants de protection, des lunettes, et une blouse fermée

Q.I.C.3 : La β -galactosidase hydrolyse le lactose en galactose et glucose. En vous aidant de l'Annexe 3, indiquer le substrat chromogène permettant de détecter l'activité de cette enzyme dans les embryons injectés.

Réponse à la question I.C 3

Le X-Gal

Pour préparer la solution de coloration vous disposez des réactifs suivants :

	Concentration dans la solution stock	Concentration finale dans le tube réactionnel
Solution $K_4Fe(CN)_3$	50mM	20mM
Solution $K_3Fe(CN)_6$	50mM	20mM
$MgCl_2$	0,1M	2mM
PBS	1X	0,155X
Substrat de la β -galactosidase (à demander au jury)	40mg/mL	1mg/mL

Q.I.C.4: Indiquer les volumes de chacun des réactifs nécessaires pour réaliser 250 μ L de la solution de coloration.

Réponse à la question I.C 4

Solution $K_4Fe(CN)_3$	100 μ L
Solution $K_3Fe(CN)_6$	100 μ L
$MgCl_2$	5 μ L
PBS	38,75 μ L
Substrat de la β -galactosidase	6,25 μ L

Effectuer la coloration :

Il n'est pas nécessaire d'avoir répondu aux questions de la partie B pour réaliser cette coloration.

Le substrat de l'enzyme doit être ajouté en dernier.

La solution de coloration, à laquelle le substrat a été ajouté, doit être préchauffée à 37°C pendant 15 minutes avant son utilisation.

- A l'aide de la pipette en plastique, enlever la solution PBS1X-MgCl₂ du tube contenant les embryons (attention à ne pas éliminer les embryons).
- Ajouter 1mL de solution PBS1X-MgCl₂ et placer le tube sous agitation pendant 5 minutes.
- Renouveler 2 fois le lavage.
- Enlever la solution PBS1X-MgCl₂.
- Recouvrir les embryons de la solution de coloration.
- Placer le tube à l'obscurité en l'entourant d'aluminium à 37°C pendant 1heure.
- Vérifier que la coloration bleue est suffisante pour une bonne qualité d'observation. Remettre le tube à 37°C si la coloration ne l'est pas. Il ne faut pas laisser le tube à 37°C au-delà de 2 heures.
- A l'aide de la pipette en plastique, enlever la solution de coloration et la placer dans un tube Eppendorf.
- Ajouter 1 mL de PBS1X et placer le tube sous agitation pendant 5 minutes.
- Effectuer 2 fois ce lavage avec du PBS1X.
- Placer les embryons dans une boîte de pétri contenant du PBS 1X dont le fonds est recouvert d'agarose 1%.
- Observer les embryons colorés.

Q.1.C.5 : A l'aide du document fourni en Annexe 4, identifier le stade embryonnaire des embryons. Justifier votre réponse.

Réponse à la question Q1.C.5

Pour identifier le stade, il est nécessaire d'observer

la morphologie de l'embryon et celle de la nageoire caudale

la pigmentation de l'œil en formation et de l'embryon (présence de mélanocytes)

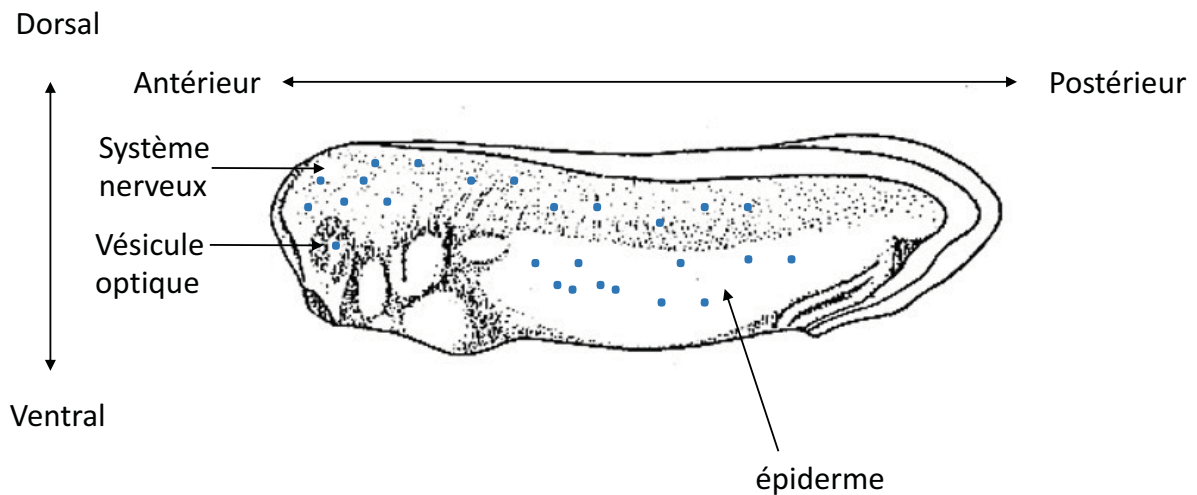
la morphologie de l'endoderme au niveau caudal de l'embryon

Appeler un examinateur afin qu'il évalue votre datation. Présenter au jury un embryon, placé sous la loupe binoculaire, le plus représentatif du stade déterminé

Q.1.C.6 : Décrire vos observations en précisant dans quelle région /quel tissu/ quel organe se trouve la coloration en réalisant une représentation schématique légendée indiquant les axes des embryons. Conclure sur ces résultats en discutant le devenir cellulaire du pôle animal de l'embryon au stade 2 cellules.

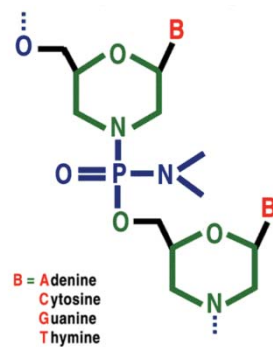
Réponse à la question Q1.C.6

Les embryons ont été injectés au pôle animal, qui va être à l'origine de l'ectoderme. La coloration se trouve au niveau de l'épiderme ainsi qu'au niveau du système nerveux. La localisation au sein de ces tissus était embryon-dépendante.



Trop de candidats n'ont pas suivi les consignes données (schéma sans axes, légendes) et n'ont pas donné le devenir de la région de l'embryon injectée.

Le knock-down d'un gène (= expression génique diminuée) s'effectue par une technologie anti-sens en micro-injectant dans l'embryon de xénope des molécules appelées morpholino-oligonucléotides (MO dans la suite du sujet). Les MO se fixent aux séquences complémentaires d'ARN par appariement de bases. Ce sont des molécules simple brin synthétiques d'une longueur de 25 bases. La structure chimique d'une molécule de MO est donnée ci-dessous.



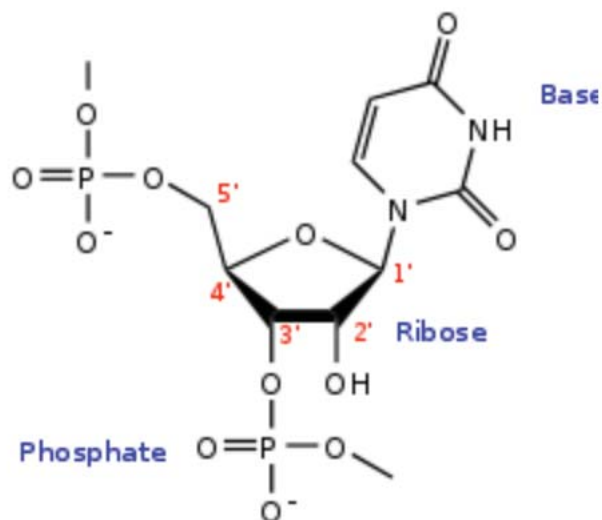
En vert : Cycle morpholine

En bleu : groupements phosphorodiamidate

Les bases retrouvées dans un MO sont indiquées sur la figure.

QI.C.7 : Représenter et annoter la structure chimique d'une molécule d'ARN. Comparer cette structure à la structure d'un MO.

Réponse à la question QI.C.7



Les MOs diffèrent de l'ARN par le fait qu'ils possèdent des bases azotées fixées sur des cycles morpholines (et non ribose) qui sont reliés entre eux par des groupements phosphorodiamidate (et non des groupes phosphate). Ce groupement dérive d'un phosphate par substitution de groupes $-OR$ par des groupes $-NR_2$.

Un MO a été généré pour le gène *Adsl* du xénope. La figure ci-dessous indique le positionnement de ce MO sur cet alignement de séquence des ARNm *Adsl* du xénope et *ADSL* humain. En rouge sont indiquées les bases qui diffèrent entre ces deux séquences d'ARNm.



QI.C. 8 : En vous servant du code génétique fourni dans l'Annexe 5, écrire la séquence protéique correspondant à la séquence de l'ARNm *Adsl* de xénope donnée dans la figure ci-dessus.

Réponse à la question QI.C.8

5' -CUUGAAGC **AUG** GAG GGG AGC AGU GGG CUA AGC AUG GAC-3'

Met Glu Gly Ser Ser Gly Leu Ser Met Asp

Trop de candidats ont commencé la séquence protéique en amont de l'ATG

QI.C. 9 : Écrire, dans le sens 5'-3', la séquence du MO *Adsl*.

Réponse à la question QI.C.9

Adsl MO 5'- TGCTTAGCCCACTGCTCCCCCTCCAT -3'

Certains candidats ont donné la séquence de ce MO dans l'orientation 3'-5'.

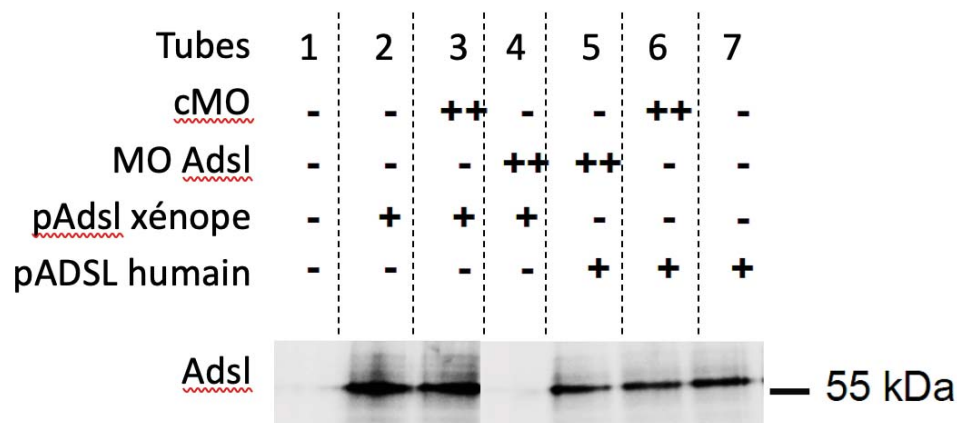
QI.C.10 : Sachant que la fixation du MO sur le brin d'ARNm n'entraîne pas la dégradation de l'ARNm *Adsl*, quelle hypothèse peut-on faire pour expliquer que cette technologie peut conduire au knock-down du gène *Adsl* ?

Réponse à la question QI.C.10

La fixation du MO au niveau de la séquence du code initiateur de la traduction va interférer avec la progression du complexe ribosomique et empêcher la traduction de l'ARNm.

On dispose des plasmides d'expression eucaryote pAdsl xénope et pADSL humain qui permettent de générer par traduction *in vitro* les protéines Adsl de xénope et ADSL humaine. La séquence de la partie 5' de l'ARNm ADSL humain est donnée dans la figure précédente.

Des micro-injections de plasmides ou de MO ont été réalisées dans des ovocytes prélevés dans les ovaires : les plasmides ont été micro-injectés dans le noyau et les MO dans le cytoplasme de chaque ovocyte. Après deux jours de culture, les protéines ont été extraites et un western-blot a été réalisé à partir de ces extraits protéiques avec un anticorps qui reconnaît la protéine Adsl. Le cMO est un MO qui ne reconnaît aucune séquence nucléotidique amphibienne.



QI.C.11 : Expliquer pourquoi il est nécessaire d'injecter les plasmides dans le noyau.

Réponse Question I.C.11

Les ADNc présents dans les plasmides doivent être transcrits en ARNm.

La transcription s'effectue dans le noyau.

QI.C.12 : Que peut-on conclure des résultats de la condition 1 ?

Réponse Question I.C.12

Cette condition correspond à des ovocytes n'ayant pas été injectés.

Ceci montre que le gène *Adsl* n'est pas exprimé dans les ovocytes non injectés.

QI.C.13 : Quelle est l'utilité de la micro-injection du cMO ?

Réponse Question I.C.13

Le cMO ne reconnaît aucune séquence nucléotidique d'amphibien. De ce fait il ne se fixe sur aucun ARNm, dont l'ARNm *Adsl*.

On observe une bande dans les tubes 3 et 6, ce qui est le résultat attendu. L'injection de ce cMO n'inhibe pas la traduction de l'ARN

Cette micro-injection sert de contrôle d'injection.

QI.C.14 : Conclure sur les résultats des conditions 2 et 4.

Réponse Question I.C.14

On observe une bande dans la condition 2 et aucune bande dans la condition 4.

La protéine *Adsl* de xénope a bien été produite à partir du plasmide p*Adsl* dans les ovocytes et l'injection du MO *adsl* inhibe cette traduction.

Le MO est efficace pour inhiber la traduction d'*Adsl* in vivo et peut être utilisé pour les expériences de perte de fonction.

QI.C.15 : Expliquer sur les résultats des conditions 5 et 7. Quel est l'intérêt d'avoir réalisé ces conditions ?

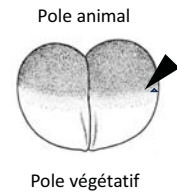
Réponse Question I.C.15

On observe une bande dans le tube 5 et 7.

La protéine ADSL Humaine a bien été produite à partir du plasmide pADSL dans les ovocytes mais le MO *Adsl* n'inhibe pas la traduction de cet ARNm puisque la séquence humaine est différente de celle d'*Adsl* de xénope (11 bases différentes). Ces changements de bases ne permettent pas la fixation du MOs sur l'ARNm ADSL.

Ces conditions sont un contrôle. Elles permettent de tester la spécificité de fixation du MO *Adsl*.

Des injections du MO Adsl ou cMO ont été effectuées dans l'embryon de xénope au stade 2 cellules au niveau de la zone marginale comme indiqué par le triangle sur le schéma. Les MO ont été co-injectés avec l'ARNm *LacZ* dans chaque embryon.



Les potentiels phénotypes ont été analysés par immunohistochimie indirecte avec un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement une protéine, appelée X dans la suite du sujet, exprimée dans les cellules musculaires différenciées.

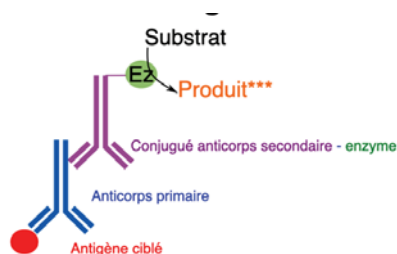
Les embryons obtenus à la suite de cette expérience se trouvent dans les boîtes de Pétri notées A et B. Ces embryons sont dans du PBS1X.

Voici une liste d'anticorps pouvant être utilisés pour réaliser cette immunohistochimie indirecte.

1	Anticorps monoclonal de souris anti-X couplé à la phosphatase alcaline (avec son substrat)
2	Anticorps monoclonal de souris anti-X de xénope couplé à l'Alexia 405
3	Anticorps polyclonal de chèvre anti-X de xénope
4	Anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris
5	Anticorps monoclonal de souris anti-X de xénope
6	Anticorps monoclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 405
7	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de xénope couplé à la phosphatase alcaline (avec son substrat)
8	Anticorps monoclonal de chèvre anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (avec son substrat)
9	Anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (avec son substrat)

QI.C.16 : Faire une représentation schématique de l'échafaudage moléculaire nécessaire à la réalisation de cette immunohistochimie en indiquant le numéro des anticorps de la liste qui doivent être utilisés.

Réponse Question I.C.16



Antigène : protéine du tissu musculaire

Ac primaire : n5

Ac secondaire : n9

Observer les embryons des boîtes de Pétri notées A et B, en comparant les côtés injectés et non injecté.

QI.C.17 : Décrire les phénotypes observés et calculer le pourcentage de ces phénotypes observés dans chaque condition. Identifier quel tube correspond à l'injection du MO Adsl.

Réponse Question I.C.17

* L'embryon présent dans le tube A possède une morphologie normale, aucune courbure selon l'axe antéro-postérieur, images du haut. Le marquage se trouve au niveau des somites. Ce marquage est identique sur les 2 côtés de l'embryon, sur le côté non injecté (contrôle) et injecté (identifié avec la révélation de l'activité β -gal). Ce tube correspond à l'injection du cMO.

* L'embryon présent dans le tube B a une morphologie altérée, associée à une courbure selon l'axe antéro-postérieur, images du bas. Le marquage sur le côté non injecté est normal, montrant des somites en forme de chevrons. Par contre, ce marquage est altéré, les somites ne présentent pas cette morphologie en chevrons, ceux-ci sont droits, fins parfois absent, traduisant une malformation des somites et plus généralement du tissu musculaire. Ce tube correspond à l'injection du MO Adsl.

QI.C.20 : Réaliser un dessin d'observation titré et légendé d'un embryon dans chacune condition qui illustre au mieux vos observations en indiquant les axes de ces embryons.

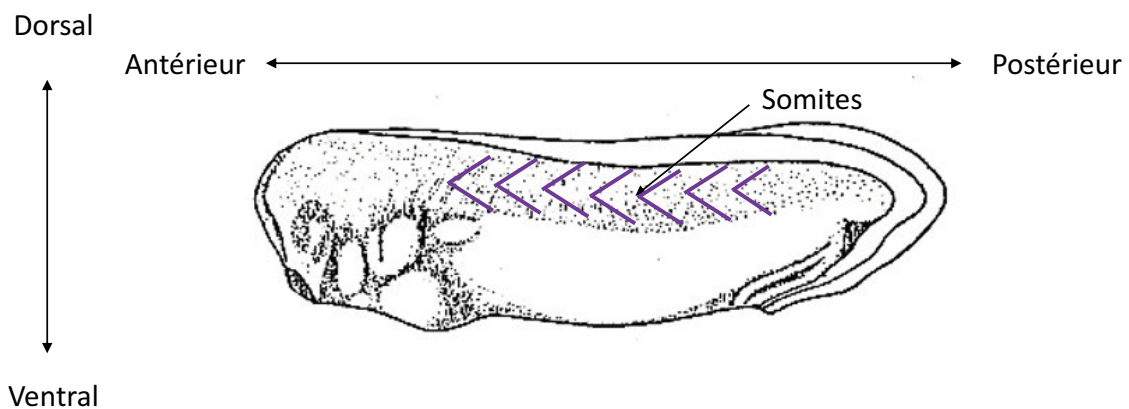
Dans la majorité des copies, la description de ces phénotypes était sommaire et peu détaillée.

QI.C.18 : Représenter vos observations par un schéma titré et légendé d'un embryon dans chacune des conditions en indiquant les axes de ces embryons.

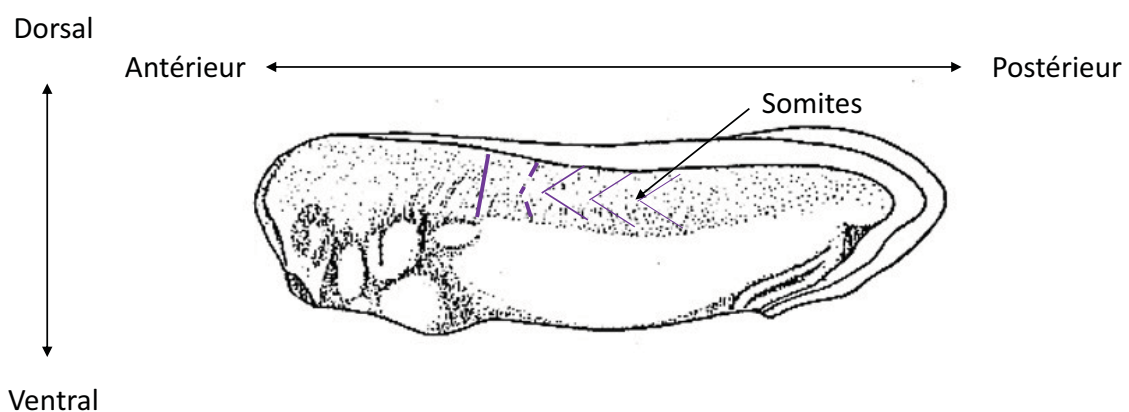
Appeler un examinateur afin qu'il évalue vos dessins des 2 embryons. Il est nécessaire de présenter dans une boîte de Pétri recouvert de fonds d'agarose les 2 embryons que vous avez dessinés.

Réponse Question I.C.18

Embryon tube A



Embryon tube B

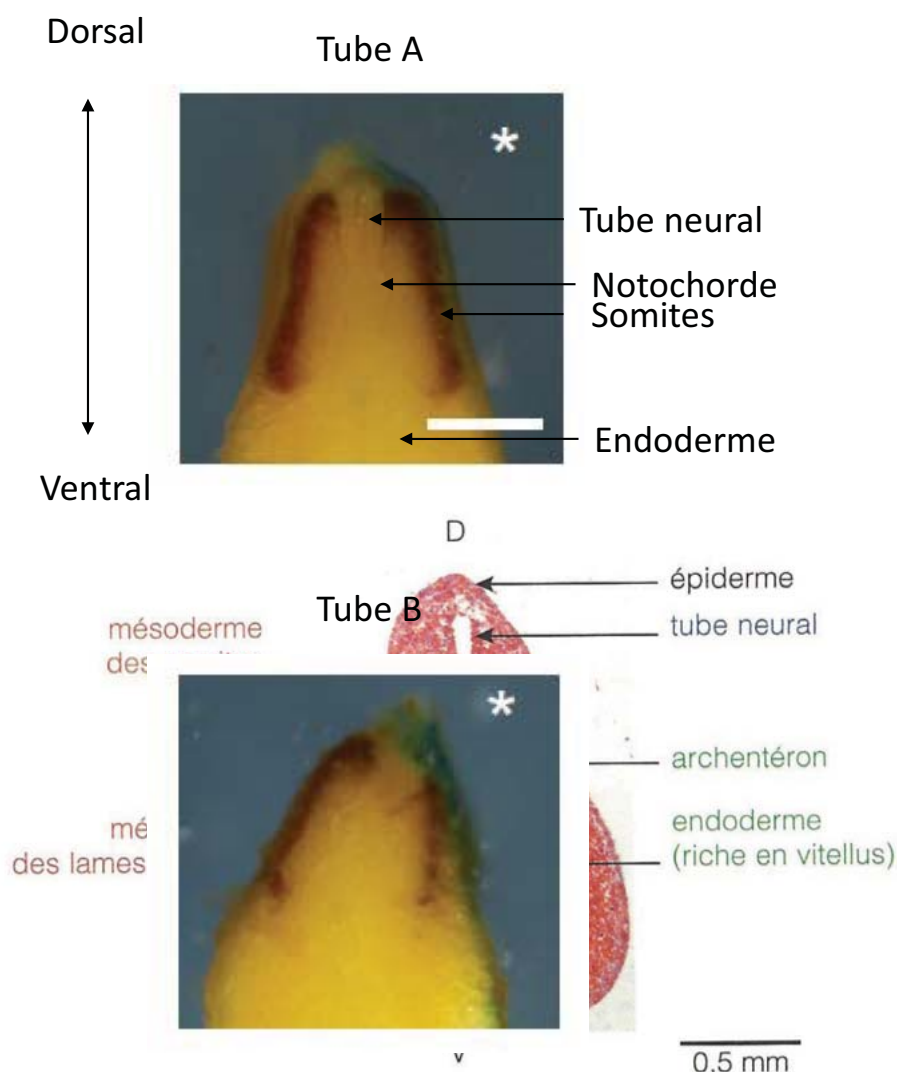


- Placer les embryons dessinés sur le couvercle de chacune des boîtes de Pétri. Enlever le maximum de PBS à l'aide de la pipette et papier absorbant.
- Effectuer une série de deux à trois coupes transversales au niveau du tronc de ces embryons.
- Placer ces coupes dans la boîte de Pétri recouvert de fonds d'agarose correspondant à la condition d'injection A ou B de l'embryon.

Question I.C.19 : Réaliser un dessin d'observation titré d'une coupe de ces embryons en légendant les différents organes/tissus présents sur ces coupes et en indiquant les axes des embryons.

Appeler un examinateur afin qu'il évalue vos dessins des coupes.

Réponse Question I.C.19



Il est à noter que les altérations étaient embryon-dépendantes.

Ces photographies donnent une indication des phénotypes observés (dans ce cas la révélation de l'immunohistochimie est visible par la coloration marron)

Question I.C.20 : Conclure sur ces résultats.

Réponse Question I.C.20

L'injection du MO Adsl conduit à une altération des somites, désorganisation des chevrons, marquage moins prononcé suggérant un nombre réduit de cellules musculaires différenciées.

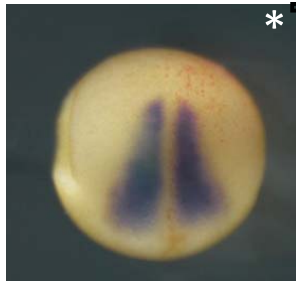
L'inhibition de l'expression de Adsl induit ces altérations. Ceci démontre que la protéine Adsl est impliquée dans la formation des somites chez le xénope.

Des injections supplémentaires ont été réalisées afin d'étudier les fonctions du gène Adsl à des stades plus précoces. Les embryons ont toujours été micro-injectés au stade 2 cellules au niveau de la zone marginale. Différentes combinaisons de MO et d'ARNm ont été co-injectées avec l'ARNm *LacZ* dans chaque embryon.

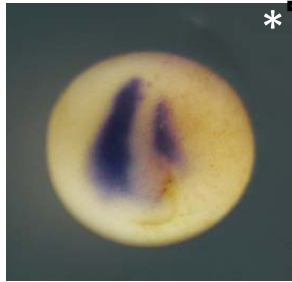
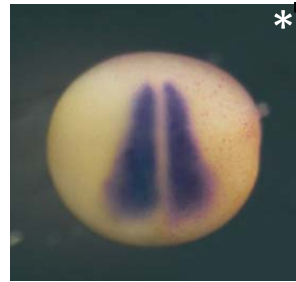
Les phénotypes des embryons ont été analysés par hybridation *in situ* avec une sonde spécifique du gène *Myod*, qui est un gène exprimé dans le mésoderme et impliqué dans la différenciation musculaire.

La figure ci-dessous regroupe des photographies d'embryons représentatifs des phénotypes observés. Le côté injecté est indiqué par l'astérisque. Les embryons sont orientés face postérieure et région dorsale vers le haut. Les résultats d'analyse des embryons est donné dans le tableau ci-dessous. Trois phénotypes ont été observés : Domaine d'expression normal (N) ou Domaine d'expression réduit (Red) ou aucun marquage (Abs) sur le côté injecté. Le tableau recense le phénotype de chaque embryon analysé.

cMO



MO Adsl

MOAdsl +
Adsl Humain mRNA

embryon	cMO
1	N
2	N
3	N
4	Red
5	N
6	Red
7	N
8	Red
9	N
10	N
11	N
12	N
13	N
14	N
15	Red
16	N
17	N
18	N
19	N
20	N
21	N
22	N
23	N
24	N
25	N
26	N
27	N
28	Red
29	Red
30	N
31	N
32	N
33	N
34	N
35	N
36	N
37	N
38	N
39	N

embryon	MO Adsl
1	N
2	Abs
3	Red
4	Red
5	Red
6	Red
7	Red
8	N
9	N
10	N
11	N
12	N
13	Red
14	Abs
15	Red
16	N
17	N
18	N
19	Red
20	N
21	N
22	Red
23	N
24	Abs
25	Red
26	Abs
27	Abs
28	Red
29	Red
30	Red
31	Abs
32	Red
33	Red
34	Red
35	Red
36	Red
37	Red
38	Red
39	Red
40	Abs
41	Abs

embryon	MO Adsl+ARN ADSL
1	N
2	Red
3	N
4	Red
5	N
6	N
7	Red
8	N
9	N
10	N
11	N
12	N
13	N
14	N
15	N
16	Red
17	N
18	N
19	N
20	Red
21	N
22	N
23	N
24	N
25	Red
26	N
27	N
28	N
29	N
30	Red
31	N
32	N
33	Red
34	Red
35	N
36	N
37	N
38	N
39	N
40	Red

Il s'agit ici de déterminer si

1. L'injection du MO Adsl induit une perturbation du domaine d'expression de MyoD
2. La co-injection du MO Adsl et ARN *ADSL* humain induit les mêmes altérations phénotypiques que l'injection du MO Adsl.

L'analyse de ces données nécessite un test statistique. Les valeurs étant des valeurs nominales, il faut faire un test de Chi-2. Ce test permet de déterminer s'il existe des différences significatives entre les conditions d'injection au seuil choisi de 5% en émettant l'hypothèse suivante :

H0 : Les variables conditions d'injection et phénotypes sont indépendants.

Il est nécessaire de représenter les résultats par un tableau de contingence : Les effectifs réels (observés) sont rassemblés dans un tableau à double entrée, par ligne pour le premier caractère (ici conditions d'injection), et par colonne en fonction du second caractère (phénotype normal ou altéré).

La dernière case du tableau (grisée) correspond au nombre total d'embryons analysés= NZ.

Si l'hypothèse H0 est vraie, un deuxième tableau rassemblant les effectifs prévus est généré avec la formule suivante : $(NX \cdot NY) / NZ$

Question I.C.22 : Compléter les tableaux de contingence ci-dessous pour les 2 interrogations. En vous servant d'Excel, générer les tableaux des effectifs prévus si l'hypothèse H0 est vraie et reporter vos résultats dans les tableaux ci-dessous.
Effectuer les tests Chi2 :

Pour effectuer cette analyse, vous disposez du logiciel Excel.

- A partir de l'interface des onglets, choisir SIGMA

Avec le menu déroulant : Autres fonctions-STATISTIQUES

Choisir catégories

Avec le menu déroulant : sélectionnez la fonction : TEST.KHIDEUX

- Sélectionnez les plages de données réelles et prévues.

Renseignez la p-value obtenue.

Enregistrer votre réponse sur la clé USB fournie.

Réponse Question I.C.22

Interrogation 1				
effectifs réels				
	X :injection /Y :phénotype	Normal	Altéré	NX : total général d'embryons par injection
	cMO	33	6	39
	MO P2X5	12	29	41
	NY : total général d'embryons par phénoty	45	35	80
Effectifs prévus				
	X :injection /Y :phénotype	Normal	Altéré	
	cMO	21,9375	17,0625	
	MO P2X5	23,0625	17,9375	
				6,10173E-07
Interrogation 2				
effectifs réels				
	X :injection /Y :phénotype	Normal	Altéré	NX : total général d'embryons par injection
	MO P2X5	12	29	41
	MO P2X5+Homme	30	10	40
	NY : total général d'embryons par phénoty	42	39	81
Effectifs prévus				
	X :injection /Y :phénotype	Normal	Altéré	
	cMO	21,25925926	19,74074074	
	MO P2X5	20,74074074	19,25925926	
				3,81569E-05

Question I.C.23 : Analyser les résultats et conclure sur ces résultats.

Réponse Question I.C.23

L'injection du CMO n'induit aucun phénotype (marquage MyoD normal) sur le côté injecté chez plus de 85% des embryons.

L'injection du MO Adsl entraine une altération du domaine d'expression de MyoD : le domaine d'expression est réduit ou absent chez 75% des embryons. Les différences phénotypiques entre le cMO et MO adsl sont statistiquement significatives.

Plus de 75% des embryons co-injectés avec le MO Adsl et l'ARNm ADSL présentent un domaine d'expression normal sur le côté injecté. Ceci montre que l'injection de l'ARNm sur lequel le MO ne peut se fixer sauve le phénotype du MO Adsl, le domaine d'expression de MyoD est normal.

La protéine Adsl régule l'expression du gène MyoD. Ces phénotypes observés lors de la différenciation musculaire à un stade précoce de développement expliquent les phénotypes tardifs (QI.C.11-13)

Partie II : Caractérisation de la succinate déshydrogénase (SDH) mitochondriale

Partie A : Étude de l'enrichissement d'une fraction cellulaire en mitochondries

La partie B vise à caractériser l'enzyme SDH que l'on trouve dans les mitochondries. Pour cela, on a réalisé un enrichissement de fractions cellulaires en mitochondries en recourant à plusieurs centrifugations à partir d'un foie de veau.

QII.A.1 : En quoi le foie de veau est-il un modèle d'étude pertinent pour réaliser cette étude préliminaire ?

Réponse à la question QII.A.1

Les hépatocytes sont particulièrement riches en mitochondries, environ 20% de leur volume cellulaire ; cet organe présente peu de tissu conjonctif par rapport au muscle par exemple donc l'extraction des mitochondries est assez aisée. De plus c'est un matériel biologique peu onéreux et facile à se procurer.

Un foie de veau a été sectionné en fins morceaux et broyé dans du tampon TEA. Le broyat noté B a été centrifugé dans des tubes de 10 mL à 500 g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 2 mL de tampon TEA, formant ainsi la fraction C1 tandis que le surnageant a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. Le nouveau culot obtenu a été resuspendu dans 2 mL de tampon TEA, formant ainsi la fraction C2 tandis que le surnageant constitue la fraction S. Vous disposez d'un aliquote du broyat (B), des fractions C1 et C2, ainsi que du surnageant (S).

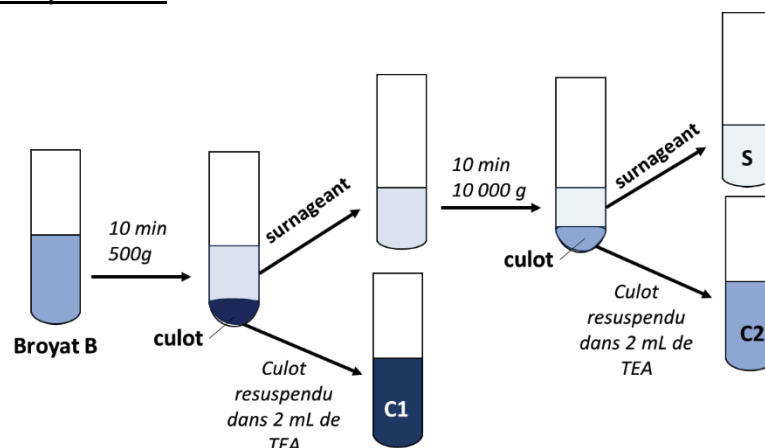
QII.A.2 : Rappeler le principe et l'intérêt de la centrifugation différentielle.

Réponse à la question QII.A.2

Cette méthode permet de séparer les composants cellulaires en suspension en fonction de leur densité en soumettant l'échantillon à une succession de cycles de centrifugation avec une valeur croissante de g.

QII.A.3 : Schématiser le protocole expérimental afin d'identifier les différentes fractions.

Réponse à la question QII.A.3



- Réaliser un frottis pour chacune des fractions B, C1 et C2 sur une lame de verre.

- Après avoir laissé sécher quelques minutes, recouvrir chaque lame avec quelques gouttes d'éthanol 100% et laisser agir 2 minutes.
- Éliminer le surplus d'éthanol et laisser sécher à l'air libre.
- Lorsque le frottis est sec, recouvrir de quelques gouttes du mélange suivant pendant 5 minutes : 100 µL de colorant de Giemsa, colorant basique qui colore en particulier les acides nucléiques en violet, dilué dans 2 mL d'eau neutre.
- Rincer délicatement avec de l'eau neutre.
- Observer au microscope au grossissement approprié.

QII.A.4 : Rendre compte de l'observation microscopique des trois frottis dans un tableau en identifiant le maximum d'éléments de façon raisonnée.

Réponse à la question QII.A.4

B	C1	C2
<ul style="list-style-type: none"> - Groupements de cellules jointives avec noyaux colorés en violet - Quelques cellules isolées avec noyau coloré en violet - Éléments fibreux enchevêtrés, plus ou moins opaques, légèrement colorés en rose : matrice extracellulaire et débris tissulaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Quelques cellules isolées avec noyau coloré en violet - Éléments sphériques d'environ isolés avec coloration violette : noyaux - Éléments fibreux isolés, peu opaques, légèrement colorés en rose : débris cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs dizaines de structures ovoïdes d'environ 1µm avec coloration violet clair : mitochondries - Petites structures sphériques parfois agglomérées, de petite taille (<1µm) faiblement colorées : peroxysomes, lysosome

QII.A.5 : Rendre compte de l'observation microscopique du frottis de votre choix permettant l'observation de mitochondries, par un dessin d'observation légendé.

Appeler un examinateur pour vérification de l'adéquation entre le champ d'observation microscopique et le dessin sur lequel sera précisé la fraction observée.

Réponse à la question QII.A.5

Qualité de la coloration, du frottis et de l'observation microscopique				Qualité du dessin d'observation	
Grossissement adéquat avec huile à immersion	Contraste et luminosité	Épaisseur du frottis permettant l'observation d'éléments dissociés	Coloration réussie avec des éléments rose clair et d'autres violets	Adéquation avec le champ d'observation	Légende cohérente avec l'observation

Le jury a apprécié et valorisé l'honnêteté et la rigueur des candidats qui ont décrit l'observation de bactéries ou ont indiqué ne pas observer de mitochondrie lorsque elles n'étaient effectivement pas visibles.

QII.A.6 : Préciser en le justifiant si les résultats des frottis permettent de déterminer quelle fraction est enrichie en mitochondries.

Réponse à la question QII.A.6

L'observation microscopique seule ne permet pas de conclure : bien que la fraction C2 contienne des structures d'environ 1µm colorées au Giemsa étant vraisemblablement des mitochondries, il pourrait également s'agir de bactéries initialement présentes dans l'échantillon ou encore de fragments nucléaires.

QII.A.7 : Rappeler l'origine évolutive des mitochondries en citant trois arguments moléculaires.

Réponse à la question QII.A.7

D'après la théorie endosymbiotique, les mitochondries proviennent de l'endosymbiose d'une protéobactérie au métabolisme aérobie. Arguments :

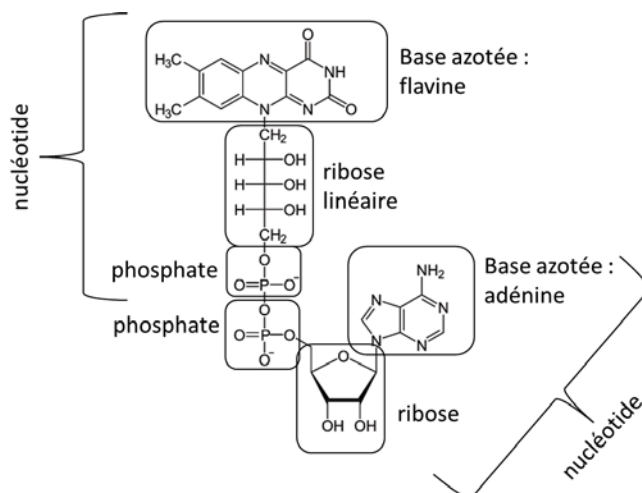
- génome mitochondrial a une structure proche d'un génome bactérien (peu d'introns, circulaire etc.)
- double membrane dont une membrane interne à composition proche d'une membrane bactérienne.
- composition en ARNr des ribosomes (16s)
- modalités de division etc.

Afin de confirmer l'enrichissement d'une des fractions précédentes en mitochondries, on cherche à réaliser un dosage de l'activité enzymatique de la SDH, la succinate déshydrogénase, appelée aussi succinate-coenzyme Q réductase. La SDH est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale. Elle catalyse dans le cycle de Krebs une réaction mettant en jeu les molécules du couple (FAD/FADH₂) et du couple (fumarate/succinate). La SDH permet également la formation d'ubiquinone QH₂ dans la chaîne respiratoire.

QII.A.8 : Après avoir rappelé la signification de l'acronyme FAD, légender sa formule ci-dessous pour déterminer les groupes d'atomes caractéristiques de cette molécule.

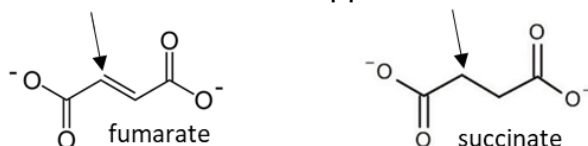
Réponse à la question QII.A.8

Flavine adénine dinucléotide



Le jury déplore que cette question n'ait pas été traitée par la majorité des candidats ou alors de façon très superficielle alors que la reconnaissance des nucléotides, des riboses et des groupements phosphates semblent être une base fondamentale et indispensable à l'étude de mécanismes biochimiques.

Les formules du fumarate et du succinate sont rappelées ci-dessous.



QII.A.9 : Déterminer le nombre d'oxydation du carbone 2 indiqué par une flèche pour chacune de ces molécules. Préciser la formule brute de ces deux molécules et la demi-équation d'oxydoréduction qui permet le passage de l'une à l'autre.

Réponse à la question QII.A.9

Pour le fumarate ; n.o. = -1 (carbone plus oxydé) ; $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4$

Pour le succinate ; n.o. = -2 (carbone plus réduit) ; $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$

$\text{Succinate} = \text{Fumarate} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$

$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-} \quad \text{C}_4\text{H}_2\text{O}_4^{2-}$

Seules quelques rares candidats ont été capables de déterminer le nombre d'oxydation. Trop de candidats n'ont pas été capable de fournir une formule brute et d'équilibrer la demi-équation pourtant simple.

QII.A.10 : Rappeler la relation permettant de déterminer la variation d'enthalpie libre en conditions standards au cours d'une réaction d'oxydoréduction à partir des potentiels standards de transfert d'électrons.

Réponse à la question QII.A.10

$\Delta_r G^{0'} = - n.F.(E^{0'} \text{ accepteur d'électrons} - E^{0'} \text{ donneur d'électrons}) = - n.F.\Delta E^{0'}$
avec n le nombre d'électrons échangés et F le nombre de Faraday.

Vous disposez des potentiels standards de transfert d'électrons de quelques couples d'oxydoréduction.

Couple d'oxydoréduction	$E^{0'} \text{ (V)}$
(Cétoglutarate / Citrate)	-0,38
($\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$)	-0,32
($\text{NADP}^+/\text{NADPH}, \text{H}^+$)	-0,32
(FAD/FADH_2)	-0,22
(Pyruvate / Lactate)	-0,18
(Oxaloacétate / Malate)	-0,16
(Fumarate / Succinate)	0,031
(Q/QH_2)	0,045
($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$)	0,42
($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$)	0,81

QII.A.11 : Déterminer la variation d'enthalpie libre associée à la réaction catalysée par la SDH dans le cycle de Krebs permettant la production de fumarate et de FADH₂ dans des conditions standards. Cette réaction est-elle endergonique ou exergonique ? Est-ce attendu ?

Données complémentaires : nombre de Faraday $F \approx 96485 \text{ C.mol}^{-1}$; R constante des gaz parfait $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}$; température standard $T = 298 \text{ K}$

Réponse à la question QII.A.11

Les deux demi-équations d'oxydoréduction sont :

Succinate = fumarate + 2H⁺ + 2e⁻

FAD + 2H⁺ + 2e⁻ = FADH₂

Succinate + FAD = fumarate + FADH₂

$$\begin{aligned}\Delta rG^{0'} &= -n.F.(E^{0'} \text{ accepteur d'électrons} - E^{0'} \text{ donneur d'électrons}) \\ &= -2 \times 96485 \times (-0,22 - 0,031) \\ &= +48,4 \text{ KJ/mol} > 0\end{aligned}$$

La réaction est endergonique ; cela est surprenant car cette réaction s'effectue dans le cycle de Krebs.

Le FADH₂ produit à l'issue de cette réaction n'est pas libre dans le cytosol mais se trouve lié à la SDH sous la forme d'un groupement prosthétique. Il est oxydé par des centres Fer-Soufre ce qui aboutit à la formation de QH₂ dans la chaîne respiratoire. On rappelle que la formule permettant de déterminer la variation d'enthalpie libre, dans des conditions non standards, associée à une réaction d'oxydoréduction est la suivante :

$$\Delta rG = \Delta rG^{0'} + RT.ln \frac{[\text{Produit1}].[\text{Produit2}]}{[\text{Réactif1}].[\text{Réactif2}]}$$

QII.A.12 : En considérant les concentrations apparentes à proximité de la SDH suivantes :

[Succinate] = 158 mM ; [Fumarate] = 0.048 mM ; [FAD] = 280 mM ; [FADH₂] = 0,0022 mM ; déterminer la variation d'enthalpie libre associée à la réaction catalysée par la SDH dans le cycle de Krebs permettant la production de fumarate et de FADH₂ dans des conditions cellulaires à T = 298 K. Confronter ces résultats avec ceux de la question QII.A.11.

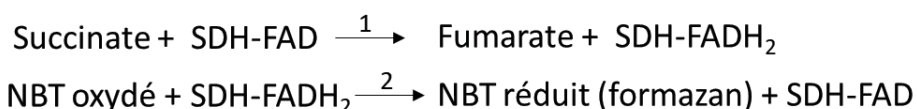
Réponse à la question QII.A.12

$$\Delta rG = 48400 + RT \cdot \ln \frac{[\text{fumarate}] \cdot [\text{FADH}_2]}{[\text{Succinate}] \cdot [\text{FAD}]}$$

$$\begin{aligned}\Delta rG &= 48400 + 8,314 \times 298 \ln [(0,048 \times 0,0022) / (158 \times 280)] \\ &= 48400 - 49200 \\ &= -0,8 \text{ KJ/mol} < 0\end{aligned}$$

En conditions cellulaires, la variation d'enthalpie est négative, la réaction est exergonique et peut se dérouler de façon spontanée ; ce qui n'est pas le cas en conditions standards lorsque réactifs et produits sont à une concentration de 1M.

On cherche à estimer l'activité enzymatique de la SDH dans les échantillons C1, C2, S et B (réaction 1 ci-dessous). Pour cela, on recourt au nitro bleu de tétrazolium (NBT) dont la couleur dépend de son état d'oxydation. La forme oxydée du NBT réagit avec le FADH₂ lié à la SDH comme groupement prosthétique noté SDH-FADH₂ (réaction 2 ci-dessous).

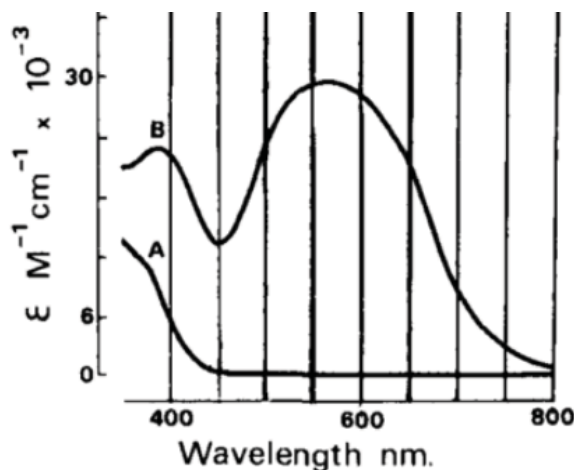


QII.A.13 : Quelles conditions doit remplir la réaction 2 pour que l'activité enzymatique de la SDH puisse être estimée par dosage colorimétrique ?

Réponse à la question QII.A.13

La réaction 2 doit être rapide, totale et sans interférence avec la réaction 1.

QII.A.14 : À partir du graphique ci-dessous présentant l'évolution de coefficient d'absorption molaire du NBT oxydé (A) et du formazan (B) en fonction de la longueur d'onde, est-il plus pertinent d'étudier la disparition de NBT oxydé ou l'apparition de formazan ?



Réponse à la question QII.A.14

Il est plus pertinent d'étudier la formation du formazan pour lequel le coefficient d'absorption molaire est maximal aux alentours de 550nm tandis que celui du NBT à cette longueur d'onde est nul. Ainsi la valeur d'absorbance déterminée à 550nm ne sera due qu'à la participation du formazan ; une valeur d'absorbance déterminée à 400nm ne permettrait pas de discriminer les participations relatives des deux espèces et donc leurs concentrations.

QII.A.15 : En déduire parmi la liste ci-dessous, la longueur d'onde à sélectionner sur le spectrophotomètre pour étudier la réaction 2 dans les différentes fractions.

Longueurs d'onde disponibles sur le spectrophotomètre :

405 nm 450 nm 490 nm 550 nm 650 nm 720 nm

Réponse à la question QII.A.15

550nm

QII.A.16 : Quelles hypothèses doit-on faire pour qu'un lien puisse être établi entre quantité de formazan formée, ou quantité de NBT oxydé consommé, et quantité de mitochondries dans les fractions ?

Réponse à la question QII.A.16

Il faut faire l'hypothèse que les réactions 1 et 2 ne peuvent être effectuées que par la SDH et par aucune autre enzyme ; il faut également faire l'hypothèse que la SDH n'est présente que dans les mitochondries et dans des proportions équivalentes dans toutes les mitochondries.

- Préparer les 10 tubes à hémolyse sur glace en suivant les indications du tableau de la question QII.A.17.
- Une fois les mélanges constitués, homogénéiser les tubes par retournement et les incuber 10 minutes au bain marie à 37°C.
- Après les 10 minutes, placer les tubes à nouveau dans la glace.
- Transférer le contenu des tubes dans les cuves de spectrophotométrie et mesurer l'absorbance à la longueur d'onde précédemment déterminée.

QII.A.17 : Compléter le tableau ci-dessous avec les valeurs d'absorbance mesurées.

Réponse à la question QII.A.17

TUBE	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tampon TEA (μL)	800	900	700	900	700	900	700	900	700	600
Solution de malonate 1M (μL)										100
Solution de succinate 100 mM (μL)	100		100		100		100		100	100
Solution de NBT 0,5% (μL)	100		100		100		100		100	100
Fraction C1 diluée 5 fois dans du TEA		100	100							
Fraction C2 diluée 5 fois dans du TEA				100	100					
Fraction S diluée 5 fois dans du TEA						100	100			
Fraction B diluée 5 fois dans du TEA								100	100	100
Absorbance	0,09	0,18	0,35	0,17	0,52	0,11	0,16	0,1	0,49	0,33

Certains candidats ont obtenu des valeurs d'absorbance supérieures à 1,8 ce qui rendait compte d'une erreur de dilution et ne permettait pas d'établir une relation linéaire entre la concentration de NBT et l'absorbance.

Appeler un examinateur pour vérification de l'adéquation entre les mesures d'absorbance et l'aspect des cuves.

QII.A.18 : Une solution de NBT à 0,5 % correspond à une solution de 100 mL contenant 0,5 g de NBT. Le NBT a une masse molaire de 817 g.mol⁻¹. Quelle masse de NBT a-t-on dû peser pour préparer 900 μl de solution de NBT à 0,5 % ? Quelle est la concentration molaire de cette solution ?

Réponse à la question QII.A.18

Pour préparer 900 μl de solution de NBT à 0,5 %, on a pesé $m = 0,9 \times 0,5 / 100$
mL = $4,5 \cdot 10^{-3}$ g = 4,5 mg

$C = n/V = m/M \times (1/V) = 0,5 / 817 \times (1/0,1) = 6,12 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹

QII.A.19 : Sachant que la masse molaire du succinate est de 118,09 g.mol⁻¹, quelle masse de succinate a-t-on dû peser pour préparer 900 μl de solution de succinate à 100 mM ?

Réponse à la question QII.A.19

900 μl de solution de succinate à 100 mM contient

$N = C \times V = 100 \cdot 10^{-3} \times 900 \cdot 10^{-6} = 9 \times 10^{-5}$ mol.

Pour obtenir cette quantité de matière il faut peser

$m = n \times M = 9 \times 10^{-5} \times 118,09 = 10,6$ mg

QII.A.20 : Quelle est l'utilité du tube 0 ?

Réponse à la question QII.A.20

Il permet de faire le blanc en attribuant une absorbance nulle pour le mélange tampon TEA + réactifs (succinate + NBT) sans réaction enzymatique.

QII.A.21 : Quelle est l'utilité des tubes 1, 3, 5 et 7 ?

Réponse à la question QII.A.21

Ils permettent déterminer l'absorbance des fractions B, C1, C2 et S en absence de réactifs et de réaction enzymatique.

QII.A.22 : Pourquoi les étapes 1 et 3 du protocole se déroulent sur la glace ?

Réponse à la question QII.A.22

À l'étape 1, la glace permet de maintenir une température suffisamment basse pour inhiber la réaction enzymatique. On s'assure ainsi que la réaction ne débute pas immédiatement dans chaque tube lors de la préparation des mélanges réactionnels. À l'étape 5, la glace permet de stopper la réaction enzymatique en vue de la détermination de l'absorbance.

QII.A.23 : Le malonate est un inhibiteur compétitif spécifique de la SDH. En comparant les valeurs d'absorbance pour les tubes 8 et 9, conclure quant à la spécificité du dosage enzymatique réalisé.

Réponse à la question QII.A.23

En présence de malonate, l'absorbance est diminuée d'environ 30%. Cela signifie que la réaction de dosage n'est pas totalement spécifique à la SDH ou que l'inhibition par le malonate n'est que partielle.

QII.A.24 : Calculer la variation d'absorbance par minute et par mL de fraction pour les échantillons C1, C2, B et S en utilisant judicieusement les valeurs d'absorbances mesurées pour les tube 1, 3, 5 et 7.

Réponse à la question QII.A.24

Il faut soustraire à toute valeur d'absorbance mesurée, la valeur du tube 0 faisant office de blanc ainsi que la valeur du tube ne contenant que la fraction à tester (1, 3, 5 et 7). Il faut ensuite diviser cette valeur par 10, l'expérience durant 10 minutes, puis la multiplier par 50 pour rendre compte de la dilution de la fraction (100µL dilué 5 fois placé dans 1mL)

FRACTION		C1		C2		S		B	
TUBE	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Absorbance	0,09	0,18	0,35	0,17	0,52	0,11	0,16	0,1	0,49
Absorbance corrigée du blanc	0	0,09	0,26	0,08	0,43	0,02	0,07	0,01	0,40
Variation d'absorbance tube			0,17		0,35		0,05		0,39
Variation d'absorbance fraction (min ⁻¹ .mL ⁻¹ de fraction)			0,85		1,75		0,25		1,95

QII.A.25 : En admettant que le dosage réalisé ne rende compte que de l'activité de la SDH, calculer l'activité enzymatique de chaque échantillon en $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ par mL de fraction. Donnée : longueur du trajet optique du colorimètre = 1 cm et $\epsilon = 65 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Réponse à la question QII.A.25

D'après la loi de Beer-Lambert, $A = \epsilon \times l \times [\text{formazan}]$. Les valeurs s'obtiennent facilement en divisant les résultats de la question précédente par $\epsilon.l$.

FRACTION	C1	C2	S	B
TUBE	2	4	6	8
activité enzymatique ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ par mL de fraction)	$1,3 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-2}$	$0,38 \times 10^{-2}$	3×10^{-2}

QII.A.26 : Conclure quant à l'efficacité de l'enrichissement des fractions en mitochondries par la centrifugation différentielle. Quelles autres techniques permettraient d'améliorer cet enrichissement ?

Réponse à la question QII.A.26

Toutes les fractions présentent une activité de la SDH, la séparation des constituants et l'enrichissement en mitochondrie peuvent encore être améliorés en recourant par exemple à une centrifugation différentielle avec gradient de densité ou à une immunoprécipitation utilisant des anticorps reconnaissant des protéines spécifiques de la mitochondrie comme TOM.

La fraction S présente une activité enzymatique dix fois plus faible que la fraction C2, la majorité des mitochondries ont été extraites dans les fractions précédentes.

L'activité enzymatique de la fraction C2 est légèrement plus faible que la fraction initiale B. En prenant en compte la suspension du culot de 100 μL dans un volume de 2mL, cette fraction est bien enrichie en mitochondries par rapport à B.

L'activité enzymatique de la fraction C1 est comparable à celle des fractions B et C2. Cela peut s'expliquer par la présence de cellules intactes et donc contenant des mitochondries, observées lors du frottis.

Toute analyse argumentée et cohérente avec les résultats expérimentaux a été valorisée.

Partie B : Étude moléculaire de la SDH et de maladies associées à son dysfonctionnement

La SDH est un complexe enzymatique formé de plusieurs chaînes peptidiques. On se propose d'étudier les conséquences de mutations de gènes codant la SDH. Elles sont notamment à l'origine de prédispositions à certains cancers caractérisés par des tumeurs particulières comme des paragangliomes et des phéochromocytomes.

Vous disposez du fichier SDH.pdb qui permet de visualiser la structure 3D de la SDH à partir du logiciel Libmol. N.B. Les premiers acides aminés des chaînes peptidiques n'ont pas pu être déterminés avec certitude lors de la cristallographie. Ils sont donc absents du fichier de visualisation 3D de la protéine.

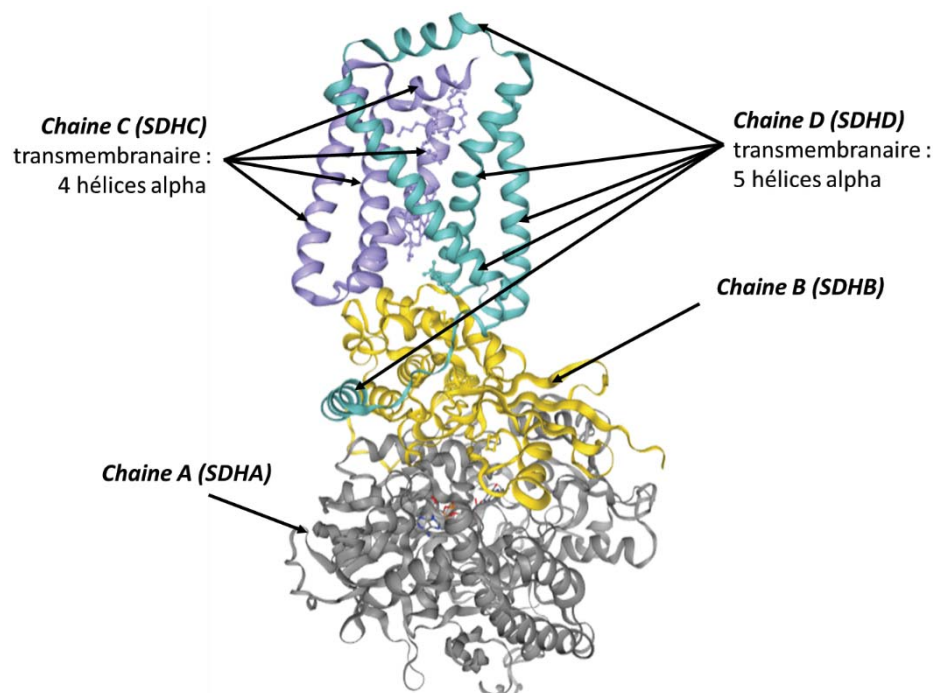
QII.B.1 : Après observation de la structure 3D de la SDH avec le logiciel Libmol, déterminer le nombre total de chaînes peptidiques qui la constituent ainsi que le nombre et le nom des chaînes peptidiques transmembranaires de la membrane interne qui sont celles constituées de 4 ou 5 hélices alpha mais d'aucun feuillet bêta.

Réponse à la question QII. B.1

La SDH est constituée de 4 chaînes peptidiques distinctes : SDHA ; SDHB ; SDHC ; SDHD. Les chaînes transmembranaires sont :

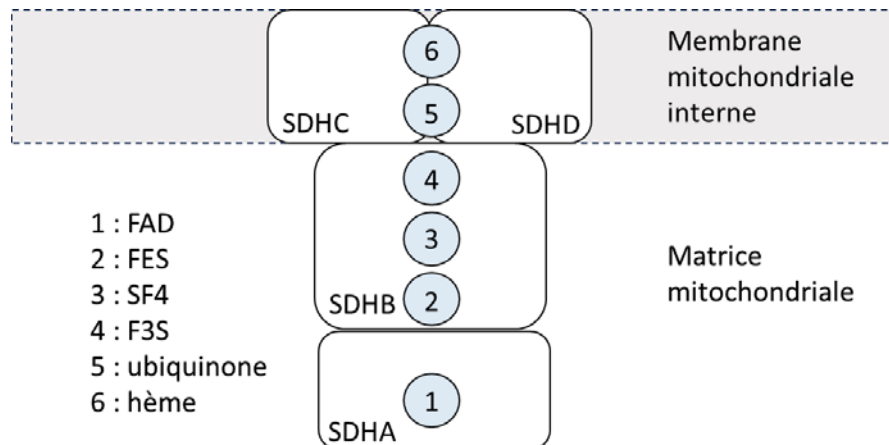
- SDHC constituée de 4 hélices alpha
- SDHD constituée de 5 hélices alpha

QII.B.2 : Rendre compte de l'organisation spatiale de ces chaînes peptidiques en effectuant **une capture d'écran de la structure 3D la plus pertinente et en la légendant**. Le document ainsi produit sera enregistré dans le document « power point » présent sur le bureau dans le dossier « TP A ». **Enregistrer votre réponse.**



QII.B.3 : Après observation de la structure 3D de la SDH avec le logiciel Libmol, en considérant les liaisons entre les chaînes peptidiques et le FAD, les 3 centres Fer-Soufre (FES, SF4 et F3S), l'ubiquinone et l'hème, réaliser un schéma rendant compte de la structure 3D de la SDH en utilisant la base ci-dessous.

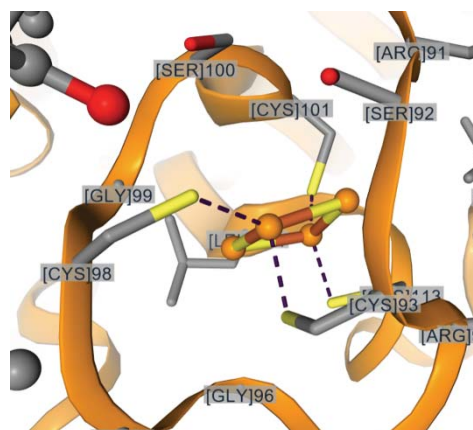
Réponse à la question QII. B.3



QII.B.4 : Après observation de la structure 3D de la SDH avec le logiciel Libmol, identifier la nature des acides aminés 93 et 98 de la chaîne B. En quoi peuvent-ils être importants pour la fonction de la SDH ?

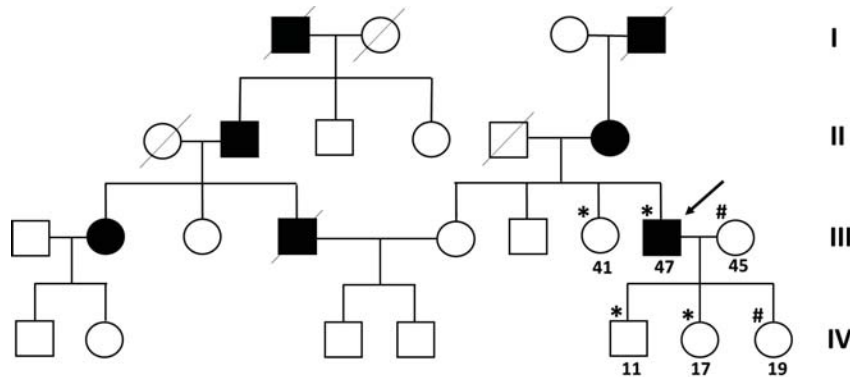
Réponse à la question QII. B.4

Il s'agit de 2 cystéines qui établissent une liaison de coordinence avec le centre Fer-Soufre FES. Leur substitution diminuerait vraisemblablement l'activité enzymatique, la SDH ne pouvant plus fixer le centre Fer-Soufre impliqué dans le transfert d'électrons.



Trop de candidats ayant identifié la présence de cystéines, expliquent sans argument que l'interaction avec le centre Fer-Soufre s'effectue par des ponts disulfures.

La figure ci-dessous présente un pedigree d'une famille développant des phéochromocytomes causés par une mutation du gène codant la sous unité B de la SDH notamment au niveau de l'exon 3 du gène. Un symbole barré indique que la personne est décédée.



QII.B.5 : Rappeler la signification des cercles, des carrés, de la couleur blanche et de la couleur noire.

Réponse à la question QII. B.5

Les cercles correspondent à des femmes, les carrés à des hommes ; la couleur noir indique la présence de la pathologie étudiée chez l'individu, la couleur blanche son absence. Trop de candidats associent la couleur noire à la présence d'un allèle muté. Dans ce cas, l'étude de l'arbre ne présenterait que peu d'intérêt.

QII.B.6 : En ne considérant que les générations I, II et III, analyser l'arbre pour identifier de façon argumentée la ou les modalités de transmission de cette maladie génétique.

Réponse à la question QII. B.6

Les hommes et femmes sont touchés par la maladie : le gène n'est pas porté par le chromosome Y.

On trouve des personnes malades à chaque génération : 2 personnes malades sur 5 à la génération II et 3 personnes malades sur 7 à la génération III ; Toutes les personnes malades ont au moins un enfant malade. Cela indiquerait un mode de transmission dominant.

À la génération II, un homme malade a une fille qui n'est pas malade. Si la transmission s'effectue selon un mode dominant, le gène n'est pas porté par le chromosome X.

La maladie se transmet donc selon un mode autosomique dominant.

QII.B.7 : Ce mode de transmission est-il cohérent avec une maladie causée par une mutation touchant une protéine mitochondriale ? Pourquoi ?

Réponse à la question QII. B.7

Oui, car une partie des protéines de la mitochondrie est codée dans le génome nucléaire, ce qui est le cas de la SDH. La transmission n'est donc pas forcément maternelle comme cela peut être le cas dans certaines pathologies ayant pour origine des mutations touchant l'ADN mitochondrial.

Un seul candidat a donné une réponse satisfaisante à cette question.

À la génération III, l'individu pointé par une flèche a participé à une étude génétique visant à caractériser la mutation responsable de phéochromocytomes familiaux. Le symbole * indique que l'individu est porteur de la mutation tandis que le symbole # indique que l'individu n'est pas porteur. Les chiffres à côté des symboles correspondent aux âges des individus lors de l'étude génétique.

QII.B.8 : Quelle information apporte cette étude génétique sur le lien entre mutation et maladie ?

Réponse à la question QII. B.8

Cette mutation a une pénétrance incomplète : certains individus porteurs ne sont pas atteints. La dernière génération est composée d'individus assez jeunes, les phéochromocytomes se développent chez les personnes âgées de plus de 30 ans.

Des études ont été réalisées afin de caractériser les phéochromocytomes, tumeurs des glandes médullosurrénales, provoquées par des mutations du gène codant la sous-unité B de la SDH. 145 de ces tumeurs ont été analysées et classées en 3 groupes M1, M2 et M3 d'après des critères biochimiques et génétiques. La méthylation de 27 000 régions du génome des tumeurs a été comparée à celle de cellules de glandes médullosurrénales sans tumeur dans des puces à ADN. Les résultats sont présentés sur la figure 1 ci-dessous.

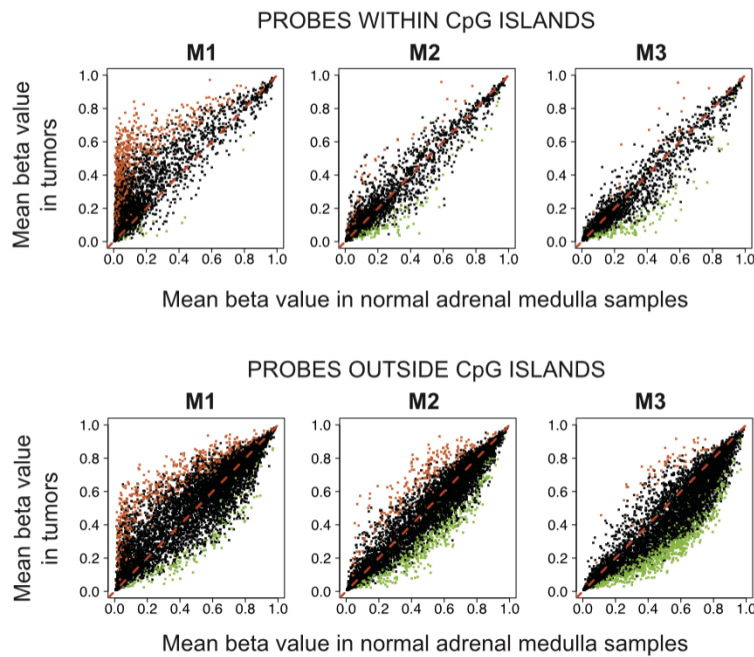


Figure 1. Degré de méthylation (beta value) de 27 000 sites localisés dans des îlots CpG (haut) ou hors des îlots CpG (bas) déterminée chez les tumeurs des groupes M1, M2 et M3 (ordonnées) et chez les cellules de glandes médullosurrénales (abscisses). Pour la clarté de la représentation, les sites ont été ordonnés dans le sens d'une méthylation croissante déterminée chez les cellules de glandes médullosurrénales. Les points colorés indiquent des valeurs significativement différentes entre les tumeurs et les cellules de glandes médullosurrénales.

QII.B.9 : Qu'est-ce qu'un îlot CpG ? En quoi est-il pertinent d'estimer leur degré de méthylation ?

Réponse à la question QII. B.9

Un îlot CpG est une région du génome riche en dinucléotides C-G. Ces îlots sont fréquents dans les promoteurs (environ 70% des promoteurs en possèdent) et sont les lieux préférentiels de la méthylation de l'ADN sur les C des deux brins. Cette méthylation inhibe généralement la transcription à long terme.

Trop de candidats énoncent de façon imprécise que le degré de méthylation est une estimation de la transcription d'un gène. L'absence de méthylation n'est en aucun cas suffisante pour conclure quant au niveau de transcription d'un gène.

QII.B.10 : D'après l'analyse de la figure 1, caractériser le méthylome de chaque groupe de tumeur en précisant ce que sont les points verts et des points oranges.

Réponse à la question QII. B.10

Les points rouges représentent des sites hyperméthylés chez les tumeurs, les points verts à des sites hypométhylés, par rapport aux cellules de glandes médullosurrénales.

Les tumeurs M1 présentent une hyperméthylation des îlots CpG et dans une moindre mesure des sites hors îlots CpG. Les tumeurs M2 et M3 présentent quelques hyperméthylations hors des îlots CpG mais surtout des hypométhylations hors des îlots CpG. Les trois types de tumeurs présentent donc une altération de leur méthylome.

Afin de comprendre le lien entre les mutations des gènes codants la sous-unité SDH-B et la modification de la méthylation du génome, des souris exprimant une forme tronquée de la sous-unité SDH-B ont été générées par génie génétique, les autres

sous-unités n'étant pas altérées. Des cellules de glandes médulosurrénales de 2 mutants (c6 et c8) ont été immortalisées et mises en cultures. La concentration cellulaire en succinate et en fumarate a été déterminée par spectrométrie de masse après chromatographie en phase gazeuse comme présenté sur la **figure 2A** et l'activité enzymatique de la SDH a été mesurée après ajout de succinate et de malonate, inhibiteur compétitif de la SDH comme présenté sur la **figure 2B**.

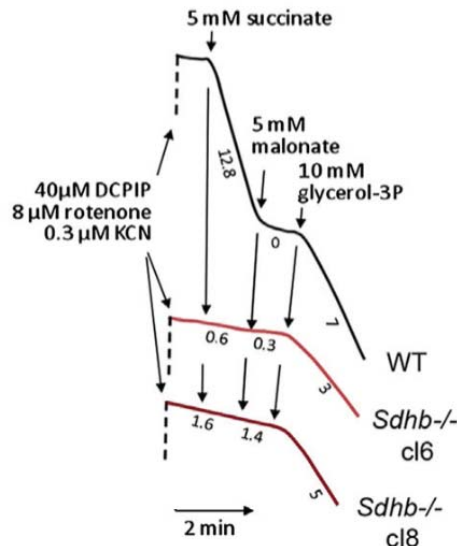


Figure 2A. Suivi de l'activité enzymatique de la SDH dans des cellules de glandes médulosurrénales de souris sauvages (WT) ou de souris présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb -/- c6 et c8), exprimée en mol.min⁻¹ par mg de protéines

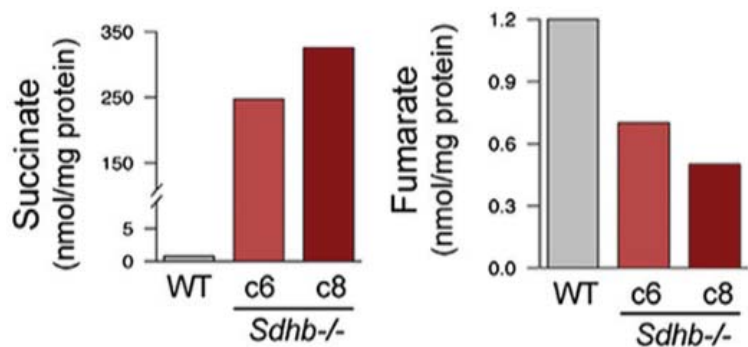


Figure 2B. Concentration intracellulaire de succinate et de fumarate dans des cellules de glandes médulosurrénales de souris sauvages (WT) ou de souris présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb -/- c6 et c8).

QII.B.11 : Analyser les figures 2A et 2B pour caractériser l'activité enzymatique de la SDH des cellules de glandes médulosurrénales des souris Sdhb -/-

Réponse à la question QII. B.11

L'activité enzymatique de la SDH est fortement diminuée dans les deux lignées de cellules Sdhb -/- en présence de succinate (environ divisée par 10). Les enzymes de ces lignées sont moins sensibles à l'inhibition du malonate car elles conservent une activité enzymatique contrairement à la lignée WT. Ces résultats sont cohérents avec la figure 2B qui indique une accumulation de succinate, substrat de l'enzyme, et une diminution de la concentration de fumarate, produit de l'enzyme dans les cellules Sdhb -/-

Le degré de méthylation des 500 sites les plus dissemblables entre deux lignées de cellules WT (WT1 et WT2) et deux lignées de cellules présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb ^{-/-} c6 et c8) localisées dans des îlots CpG sont représentés sur la **figure 3**.

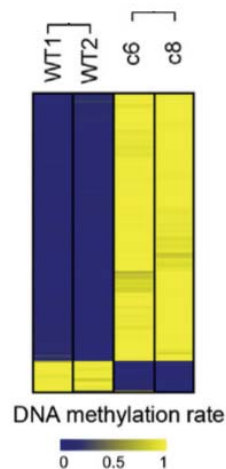


Figure 3. Profil de méthylation de 500 sites les plus dissemblables du génome de 2 lignées de cellules de glandes médullosurrénales de souris WT (WT1 et WT2) ou de souris Sdhb ^{-/-} (c6 et c8).

QII.B.12 : Analyser la figure 3. D'après les résultats de la figure 1, à quelle catégorie de cellule appartiendraient les lignées c6 et c8 ?

Réponse à la question QII. B.12

Sur les 500 sites, environ 90% ont des taux de méthylation proche de 1 chez les lignées Sdhb ^{-/-} qui ne le sont pas chez les WT et inversement, 10% des sites avec un fort taux de méthylation chez les WT ne le sont pas chez les Sdhb ^{-/-}. Ainsi, la mutation de la SDH-B a un effet hyperméthylateur. D'après la figure 1, les lignées c6 et c8 appartiendraient à la catégorie M1.

Le taux de division des cellules des lignées WT ou des deux lignées de cellules présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb ^{-/-} c6 et c8) est déterminé par cytométrie en flux en présence ou en absence de decitabine. La decitabine est un médicament utilisé comme anticancéreux pour lutter contre certaines leucémies. Elle possède notamment une action inhibitrice des méthyltransférases. Les résultats sont présentés sur la **figure 4**.

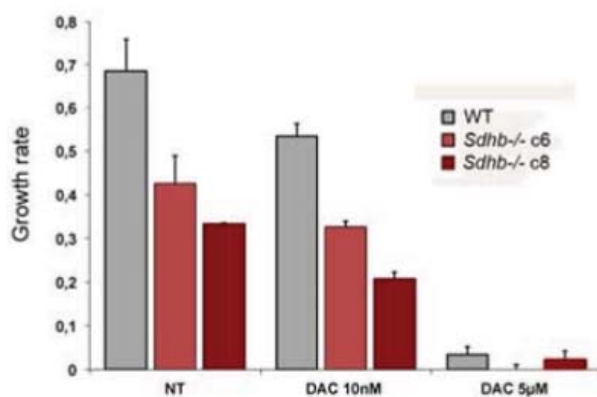


Figure 4. Taux de division des cellules de glandes médullosurrénales de souris sauvages (WT) ou de souris présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb ^{-/-} c6 et c8), en absence (NT) ou en présence de decitabine (DAC). Growth rate = nombre de division par cellule et par jour.

QII.B.13 : Analyser la figures 4 pour caractériser le phénotype cellulaire des lignées mutantes et l'effet de la decitabine.

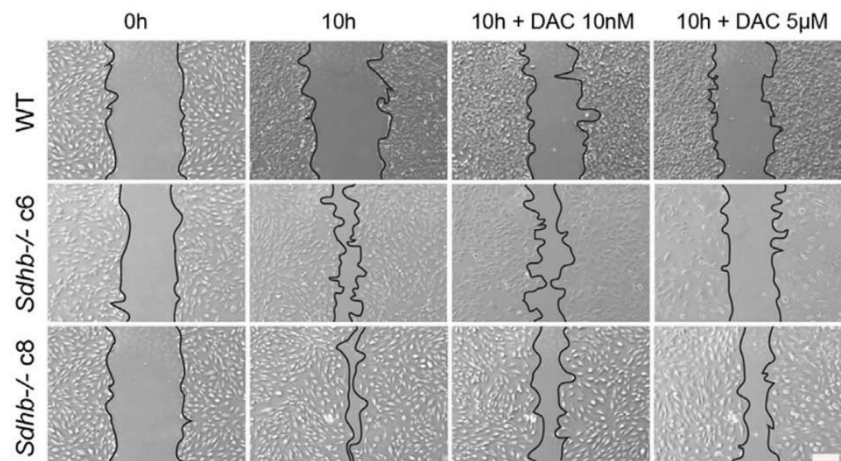
Réponse à la question QII. B.13

En absence de DAC, les cellules des lignées Sdhb ^{-/-} ont un taux de division environ 2 fois plus faible que celles de la lignée WT.

Le DAC à 10nM inhibe les divisions cellulaires chez les 3 lignées, d'environ 10%.

Le DAC à 5µM inhibe presque totalement les divisions cellulaires chez les 3 lignées.

Les cellules de glandes médullosurrénales de souris sauvages (WT) ou de souris présentant une sous-unité SDH-B tronquée (Sdhb ^{-/-} c6 et c8) sont mises en culture pendant 72h jusqu'à ce qu'elles forment un tapis cellulaire homogène. Les cellules sont mécaniquement retirées de la zone centrale de la boîte puis la culture est laissée pendant 10h avec un milieu standard ou avec ajout de decitabine. **Vous disposez de cette photographie représentative des résultats sur le bureau dans le dossier « TP A ». Barre d'échelle 100 µm.**



QII.B.14 : En utilisant le logiciel Mesurim, déterminer dans chaque condition la surface inoccupée par les cellules puis en utilisant un tableur, déterminer l'index de fermeture pour chaque condition en utilisant la formule suivante. **Enregistrer votre réponse dans le tableur.**

$$\text{Indice de fermeture} = 100 \times \frac{(\text{surface sans cellule à } t=0) - (\text{surface sans cellule à } t=10\text{h})}{(\text{surface sans cellule à } t=0)}$$

	surface inoccupée par les cellules (µm ²)			
	0h	10h	10h + DAC 10nM	10h + DAC 5µM
WT	130600	125600	95540	104700
c6	97230	36760	54800	90740
c8	127000	22180	47830	51210

	indice de fermeture (%)		
	non traité	DAC 10nM	DAC 5µM
WT	3,8	26,8	19,8
c6	62,2	43,6	6,7
c8	82,5	62,3	59,7

QII.B.15 : En considérant les valeurs de taux de division présentées à la figure 4, quel processus cellulaire est étudié dans cette expérience ?

Réponse à la question QII. B.15

D'après la figure 4 les lignées Sdhb -/- se divisent en moyenne une fois tous les deux jours et les cellules WT se divisent en moyenne 0,7 fois par jour. En 10h d'expérience, le processus étudié est donc principalement la migration cellulaire.

QII.B.16 : Analyser les résultats de l'index de fermeture pour caractériser le phénotype cellulaire des lignées mutantes et l'effet de la decitabine. On considèrera les écarts de plus de 5% comme statistiquement significatif.

Réponse à la question QII. B.16

En absence de DAC, les cellules des WT n'ont quasiment pas colonisé la zone centrale contrairement aux lignées Sdhb -/- qui ont colonisées plus de deux tiers de la zone vide. La mutation de la SDH confère donc aux cellules un important phénotype migratoire.

La DAC augmente d'environ 20% l'indice de fermeture chez les WT, tandis qu'elle le diminue de façon drastique et dose dépendant chez la lignée c6. La diminution de l'indice de fermeture par la DAC est moins importante pour la lignée c8 et ne montre pas d'effet dose dépendant.

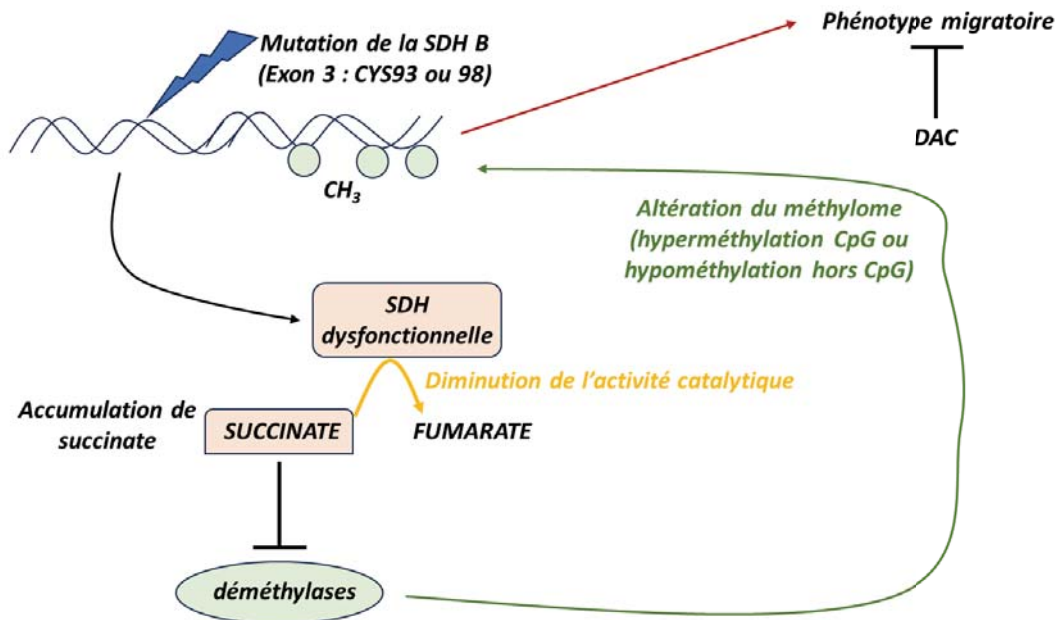
QII.B.17 : En déduire pourquoi les tumeurs des phéochromocytomes sont considérées comme particulièrement invasives, pouvant être à l'origine de nombreuses métastases.

Réponse à la question QII. B.17

Ces tumeurs sont particulièrement invasives car leurs cellules ont une forte capacité de migration, propriété essentielle dans le processus de formation des métastases.

QII.B.18 : En considérant que le succinate est un inhibiteur compétitif des enzymes de la famille des TET, des déméthylases de l'ADN, résumer les informations extraites de l'analyse des documents 1, 2, 3 et 4 dans un schéma bilan rendant compte des caractéristiques des cellules de phéochromocytomes et des liens entre les processus étudiés.

Réponse à la question QII. B.18



5.2 Epreuve de travaux pratiques de spécialité du secteur B : Sujet et commentaires

Les sujets de travaux pratiques étaient présentés sous la forme d'un livret qui était, pour partie à compléter. Des feuilles annexes supplémentaires ayant permis l'examen direct en salle, par les membres du jury, des travaux réalisés étaient à restituer avec la copie.

Le sujet de cette année : « Dégradation de litières forestières », permettait d'aborder différents aspects de la biologie du secteur B de l'agrégation externe SV-STU. La plupart des exercices faisaient appel à des techniques et des notions classiques dans les programmes du premier cycle de l'enseignement supérieur, ou des classes préparatoires.

La mise en pratique comme l'évaluation ont fait appel à différentes compétences :

- La qualité **des gestes techniques** permettant d'extraire, présenter ou colorer des échantillons à différentes échelles. Par exemple : coupes et coloration d'organes végétaux selon un protocole fourni ; extraction d'organes spécifiques chez un cloporte...
- Les qualités d'**initiative** associée au choix pertinent de la **présentation des résultats** lors de questions plus ouvertes comme l'exploitation de la « petite carotte de sol ».

Nous avons maintenu encore cette année la volonté de **valoriser les compétences pratiques intégrées à une démarche scientifique indispensable à l'enseignement en SVT**. Celles-ci peuvent être déclinées en :

- La mobilisation de connaissances naturalistes (reconnaissance et présentation des « fruits » et cônes collectés dans la litière, reconnaissances d'organismes de la microfaune à partir de vidéos)
- L'utilisation de clef de détermination (détermination des organismes de la faune du sol)
- L'application d'un protocole, la mise en forme de données brutes et l'analyse critique des résultats (mesure de résistance des feuilles)
- La capacité à mettre en lien des éléments biologiques avec des paramètres écologiques pouvant expliquer, en partie, leur présence dans un écosystème (Etude cartographique d'une station forestière)
- L'analyse des données expérimentales à l'aide d'un logiciel utilisé en recherche (analyse du comportement de cloporte en enceintes climatiques afin de mettre en évidence l'effet du changement climatique)
- La capacité à mener un raisonnement scientifique en mobilisant des connaissances du programme pour analyser des documents scientifiques (par exemple la construction d'un réseau trophique à partir de données isotopiques)

L'ensemble témoignant de la capacité à rendre compte d'un mécanisme écologique (la dégradation d'une litière forestière) **par une étude intégrant différentes échelles** : de l'échelle moléculaire (activités enzymatiques) à celle d'écosystème (estimation du temps de résidence du C dans une litière forestière).

Le jury regrette le grand nombre de questions non, peu ou mal traitées dans cette épreuve témoignant d'une difficulté à s'organiser et à gérer le temps pour un certain nombre de candidats. Une compréhension globale du sujet et des compétences à mettre en œuvre pour répondre aux différentes questions devrait permettre de mieux répartir le temps passé sur les différentes parties. Heureusement, des préparations, présentations et expérimentations de très bonne qualité ont été observées : elles ont alors fait l'objet d'une forte valorisation par le jury, de même que des raisonnements aboutis sur les documents plus théoriques proposés.

Le jury encourage les candidats à bien préparer cette épreuve souvent discriminante, il rappelle que la somme des coefficients des deux épreuves pratiques (5) est égale au coefficient de la leçon d'option.

Des éléments de corrections non exhaustifs ([en bleu](#)) ainsi que des remarques sur les productions des candidats ([en violet](#)) sont donnés dans le sujet ci-dessous.

Remarque : pour des raisons de pagination le sujet présenté ci-après qui inclue des éléments de correction ou des productions de candidats a été repaginé.