

UE2 – Biochimie

Annales Classées Corrigées

Réplication de l'ADN
Réparation des erreurs de réplication

SUJET

2021

Question 19 - En vous aidant de vos connaissances laquelle (lesquelles) des proposition(s) suivantes est (sont) exacte(s) ?

- A. Les télomères sont des séquences formées d'un motif de bases répété, localisés aux extrémités chromosomiques.
- B. Pour synthétiser les télomères, la télomérase utilise comme matrice un ARN non codant.
- C. Le télomère est régénéré à chaque réplication après activation de la télomérase cellulaire.
- D. Si les télomères sont trop courts, les ADN polymérase répliquatives sont bloquées et la cellule meurt
- E. L'ADN Polymérase δ assure la copie complète des télomères

2017

La protéine TP53 codée par le gène TP53 est décrite comme un gardien du génome qui permet en situation de stress cellulaire, par exemple en cas d'exposition à un toxique, de mettre en place les processus biologiques nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire. La protéine TP53 non mutée favorise la réparation des lésions de l'ADN ou induit la mort des cellules endommagées si la réparation n'est pas efficace, limitant ainsi la prolifération de cellules anormales ou cancéreuses (activité anti-oncogénique).

Le gène TP53 est situé sur le chromosome 17 et comporte 10 exons. La taille de l'ARNm TP53 est de 1,3 kb. Des variations de séquence du gène TP53 (perte totale d'un allèle et/ou mutations le plus souvent localisées dans les exons 5 à 9) sont retrouvées dans plus de 50 % des cancers (tous types confondus). Les anomalies moléculaires de la protéine TP53 peuvent conduire selon le cas à une perte de fonction (perte d'activité anti-oncogénique) ou à un gain de fonction (acquisition d'une activité oncogénique), à l'origine dans les deux cas d'une activation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, il existe des polymorphismes fréquents du gène TP53 qui n'ont pas d'impact fonctionnel.

La nature et l'impact fonctionnel de trois mutations récurrentes de TP53 impliquant le codon 273 (figure B11) ont été analysés.

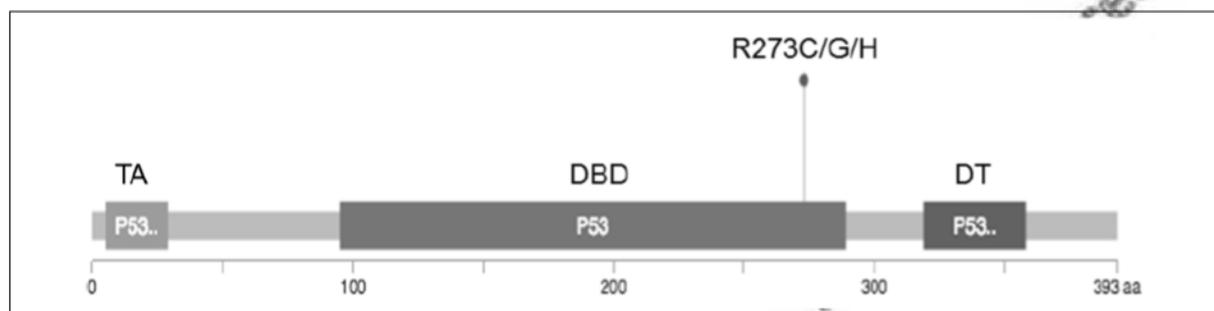


Figure B11 : Représentation schématique de TP53. TA : domaine de transactivation. DBD : domaine de liaison à l'ADN. DT : domaine de tétramérisation. Les mutations impliquant le codon 273 sont indiquées : R273C, R273G et R273H.

Afin d'analyser l'impact fonctionnel de ces mutations, cinq constructions plasmidiques sont transfectées dans deux lignées cellulaires qui n'expriment pas la protéine TP53 : H358 et

HCC1937. Par ailleurs, la lignée H358 exprime la protéine BRCA1 alors que la lignée HCC1937 présente une mutation non-sens homozygote dans le deuxième exon de BRCA1.

Les différents vecteurs utilisés sont décrits ci-dessous :

- V1 : vecteur d'expression de TP53 non mutée : H358-V1 et HCC1937-V1
- V2 : vecteur d'expression de TP53 273H : H358-V2 et HCC1937-V2
- V3 : vecteur d'expression de TP53 273C : H358-V3 et HCC1937-V3
- V4 : vecteur d'expression de TP53 273G : H358-V4 et HCC1937-V4
- V5 : vecteur vide : H358-V5 et HCC1937-V5

Les deux lignées ont été transfectées et les clones ayant intégré les vecteurs (V1, V2, V3, V4 et V5) ont été sélectionnés. Nous disposons donc de dix lignées modifiées qui ont été cultivées de la même façon.

Les résultats d'un test de prolifération cellulaire exprimé en valeur relative comparée à la situation TP53 non mutée sont présentés dans le tableau B1.

Type de vecteur	Lignée H358	Lignée HCC 1937
V1 : TP53 non mutée	1	1
V2 : TP53 273H	6,80 ± 0,50	3,98 ± 0,24
V3 : TP53 273C	6,72 ± 0,41	2,2 ± 0,25
V4 : TP53 273G	3,20 ± 0,27	1,99 ± 0,25
V5 : Vecteur vide	3,28 ± 0,26	2,05 ± 0,26

Tableau B1: Test de prolifération cellulaire. Les résultats sont exprimés en valeur relative comparée à la situation avec TP53 non mutée.

On effectue une extraction des protéines à partir des lysats cellulaires pour réaliser un western blot révélé avec un anticorps monoclonal anti TP53 reconnaissant aussi bien la protéine non mutée que la protéine mutée (pour tous les western blots, la protéine bêta-actine est utilisée comme contrôle). Les résultats sont présentés dans la figure B12.

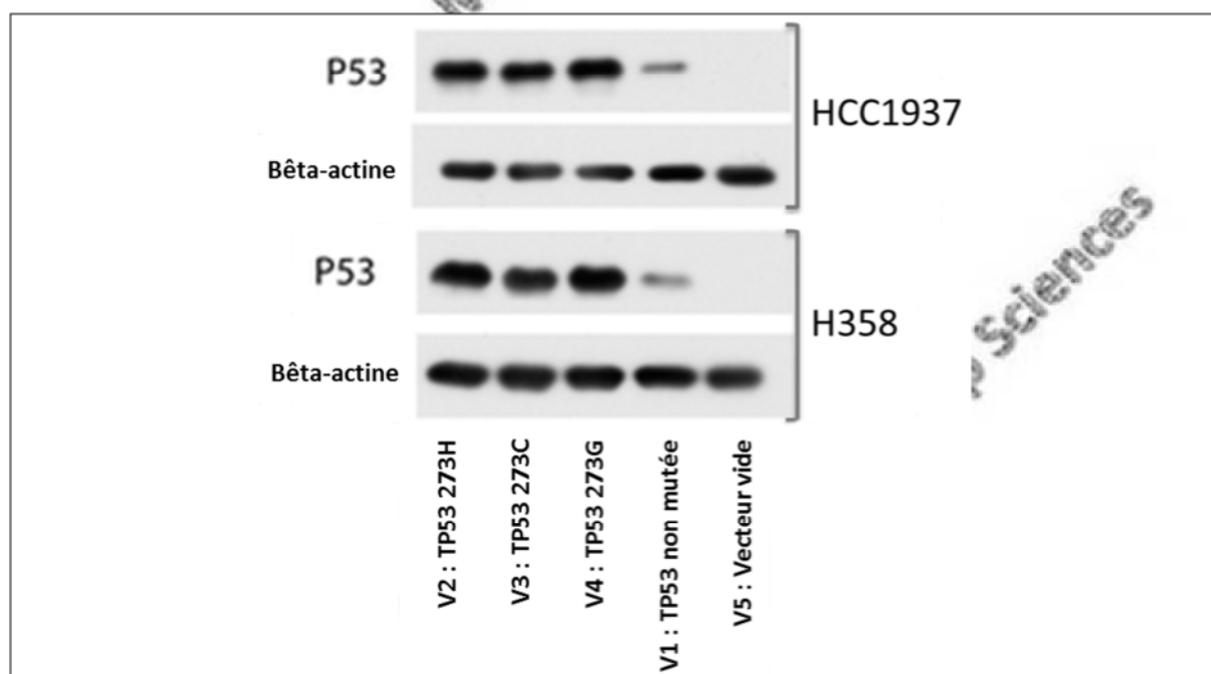


Figure B12 : Western blot analysant l'expression de TP53 en condition de culture standard dans les deux lignées. L'efficacité de transfection est identique pour les cinq vecteurs.

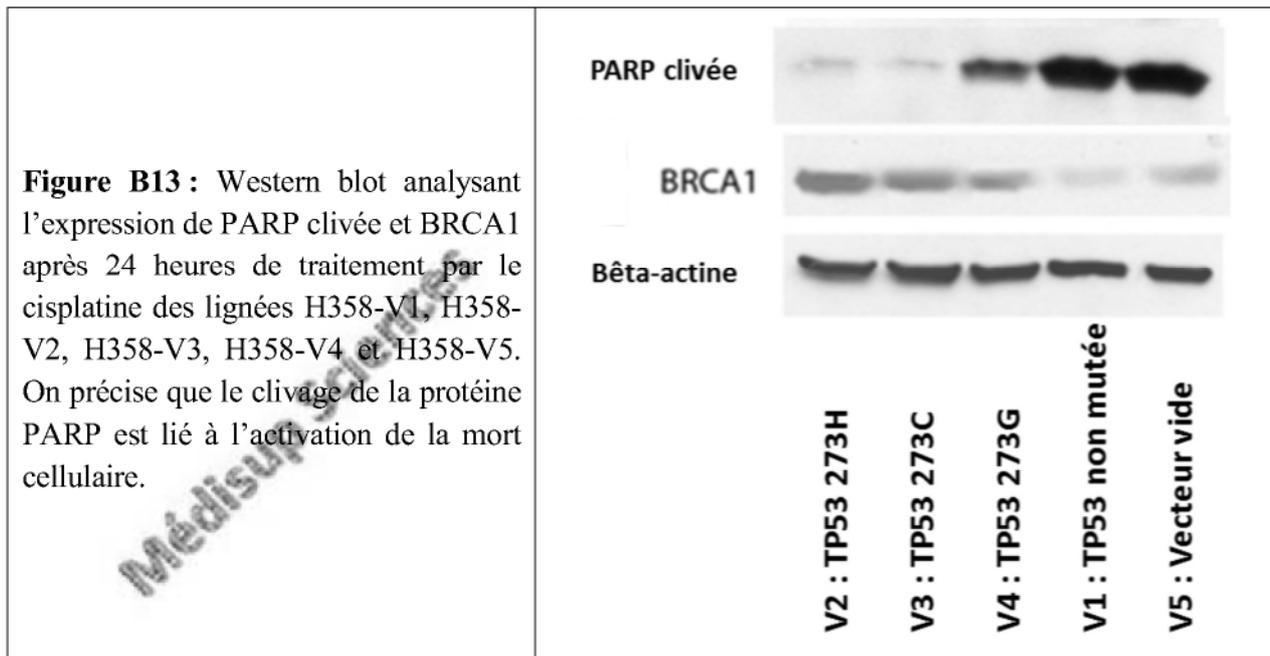
Question 40 : Au vu des résultats présentés dans le tableau B1 et la figure B12, quelle est la ou quelles sont les proposition(s) exacte(s) ?

- A. Le mutant TP53 273H est associé à une augmentation de la prolifération cellulaire par comparaison à la situation TP53 non mutée et à la situation absence d'expression de TP53
- B. Concernant le test de prolifération, les résultats suggèrent que le mutant TP53 273G est une mutation perte de fonction
- C. Certaines mutations ont un effet positif sur la prolifération cellulaire, supérieur à celui observé en cas d'absence de la protéine
- D. Ces expériences montrent que l'absence de TP53 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire
- E. Un défaut de dégradation de TP53 pourrait expliquer les résultats obtenus en présence d'une mutation de TP53

La sensibilité au cisplatine, un agent utilisé en chimiothérapie, a été étudiée en fonction de la présence de TP53 non mutée ou de TP53 mutée ou en l'absence de TP53. Elle est exprimée par la concentration minimale de cisplatine nécessaire pour tuer 50 % des cellules ou IC₅₀. Les résultats sont présentés dans le tableau B2.

Type de vecteur	Lignée H358	Lignée HCC1937
V1 : TP53 non mutée	4,5 ± 0,59	2,75 ± 0,14
V2 : TP53 273H	13,17 ± 0,60	2,58 ± 0,22
V3 : TP53 273C	9,33 ± 0,6	2,67 ± 0,43
V4 : TP53 273G	6,0 ± 0,58	2,83 ± 0,30
V5 : Vecteur vide	6,25 ± 0,52	2,77 ± 0,43
Tableau B2 : Etude de la sensibilité au cisplatine. Les valeurs des IC ₅₀ sont exprimées en micromoles/L (µM).		

Parallèlement, un second western blot a été effectué dans les conditions suivantes. Les lignées H358-V1, H358-V2, H358-V3, H358-V4 et H358-V5 sont traitées pendant 24 heures par une concentration de cisplatine de 4 µM. Les protéines ont été extraites à partir des lysats cellulaires et un western blot est réalisé et révélé avec un anticorps monoclonal anti BRCA1 et un anti PARP clivée. Les résultats sont présentés dans la figure B13.



Question 41 : Au vu de vos connaissances et des résultats présentés dans le tableau B2 et la figure B13, quelle est la ou quelles sont les proposition(s) exacte(s) ?

- A. En présence du mutant TP53 273H, la réparation de l'ADN est activée et la mort cellulaire inhibée
- B. La présence de la protéine TP53 est nécessaire pour activer la mort des cellules H358 traitées par le cisplatine
- C. La présence du mutant TP53 273H est associée à une résistance au cisplatine quel que soit le statut de BRCA1
- D. L'absence de BRCA1 est associée à une résistance des cellules au cisplatine
- E. En l'absence de BRCA1 la sensibilité au cisplatine ne dépend pas de TP53

LAS – 2021

La possibilité de discriminer les couleurs s'explique par la présence de pigments (protéines) dont 2 des gènes (codant le vert et le rouge) sont localisés sur le chromosome X.

Notre objectif est d'identifier les altérations génétiques associées au défaut de vision des couleurs chez l'homme. On s'intéresse uniquement à l'exon 3 du gène V.

Une amplification par PCR est effectuée en utilisant des amorces spécifiques positionnées dans les introns de part et d'autre de l'exon 3. Puis le fragment amplifié est digéré par une enzyme de restriction "ER".

Sont analysés les génomes d'1 homme ayant une vision normale des couleurs (HN) et de 2 hommes ayant une vision déficiente du vert (HD1 et HD2).

Structure du gène « V »

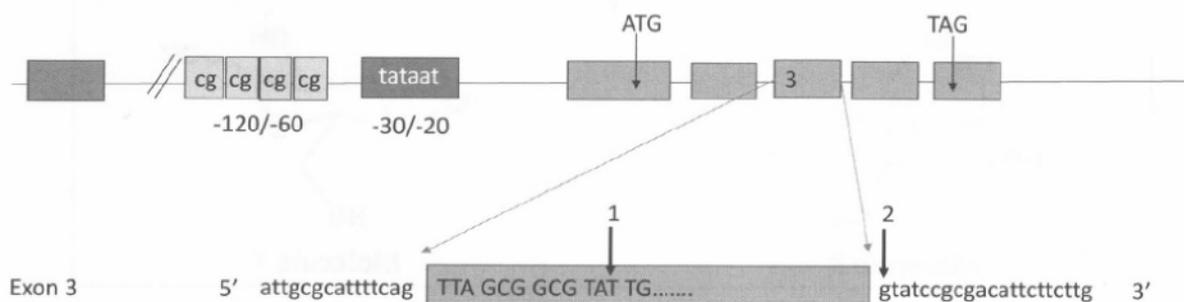


Figure 1 : schéma simplifié du gène « V », zoom sur la région codant l'exon 3, majuscules : séquence codante, minuscules : séquence non codante, le cadre de lecture de l'exon démarre au premier nucléotide.

Question 3- En vous basant sur vos connaissances et sur les informations ci-dessus laquelle (lesquelles) des proposition(s) suivantes est (sont) exacte(s) ?

- Lors de la réplication, l'ADN polymérase alpha assure la synthèse d'une amorce ARN orientée de 5' vers 3' sur le brin continu
- La séquence TATAAT en amont du gène permet le recrutement d'une ARN polymérase qui assure la transcription du gène V en ARN pré-messager
- La méthylation des cytosines localisées au niveau les îlots CpG du promoteur sera associée à une augmentation de la transcription du gène
- Si cette région du génome est sous forme d'hétérochromatine le gène V ne sera pas activement transcrit
- Lors de la réplication, un mésappariement T>G en position +12 par rapport au début de l'exon 3 (**Figure 1, flèche 1**) pourra être réparé par le système de réparation par excision de base (BER)

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des 20 acides aminés constituant des chaînes peptidiques et abréviations

Les 20 acides aminés					
Acide glutamique	Glu	E	Leucine	Leu	L
Acide aspartique	Asp	D	Lysine	Lys	K
Alanine	Ala	A	Méthionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phénylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

ANNEXE 2 : Code génétique

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

ANNEXE 3 : Principales abréviations habituellement utilisées

ADN (Acide DésoxyriboNucléique), ARN (Acide RiboNucléique), A (adénine), G (guanine), T (thymine), C (cytosine), RT-PCR (réaction de transcription inverse et amplification par PCR).