

SESSION 2012

Filière BCPST

BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage des calculatrices est interdit

Partie C : Le Syndrome de l'X Fragile

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

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

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

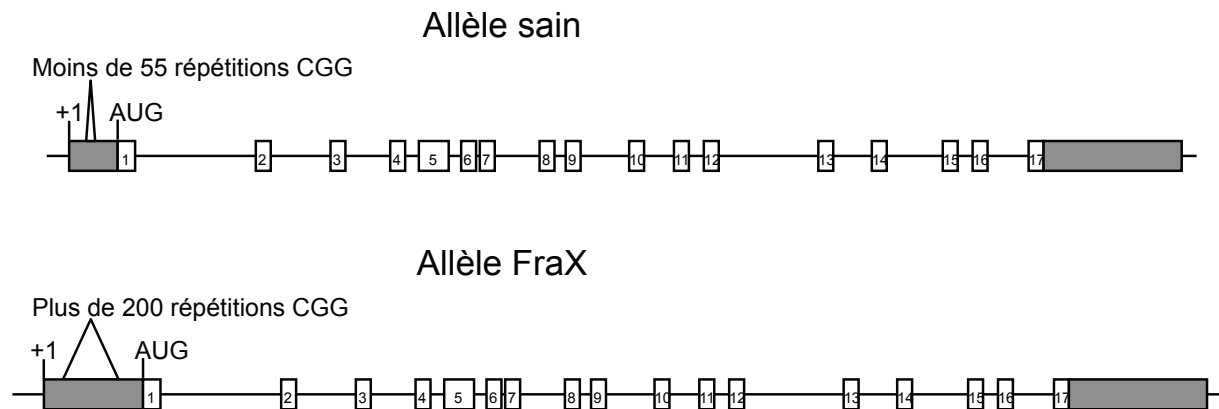


Figure 10 : Organisation du gène *Fmr1* chez les individus sains (en haut) et FraX (en bas). Les rectangles représentent les exons numérotés de 1 à 17 : en grisé les régions non traduites, en blanc les régions traduites. Le site de début de transcription est indiqué par +1. Le site de début de la traduction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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

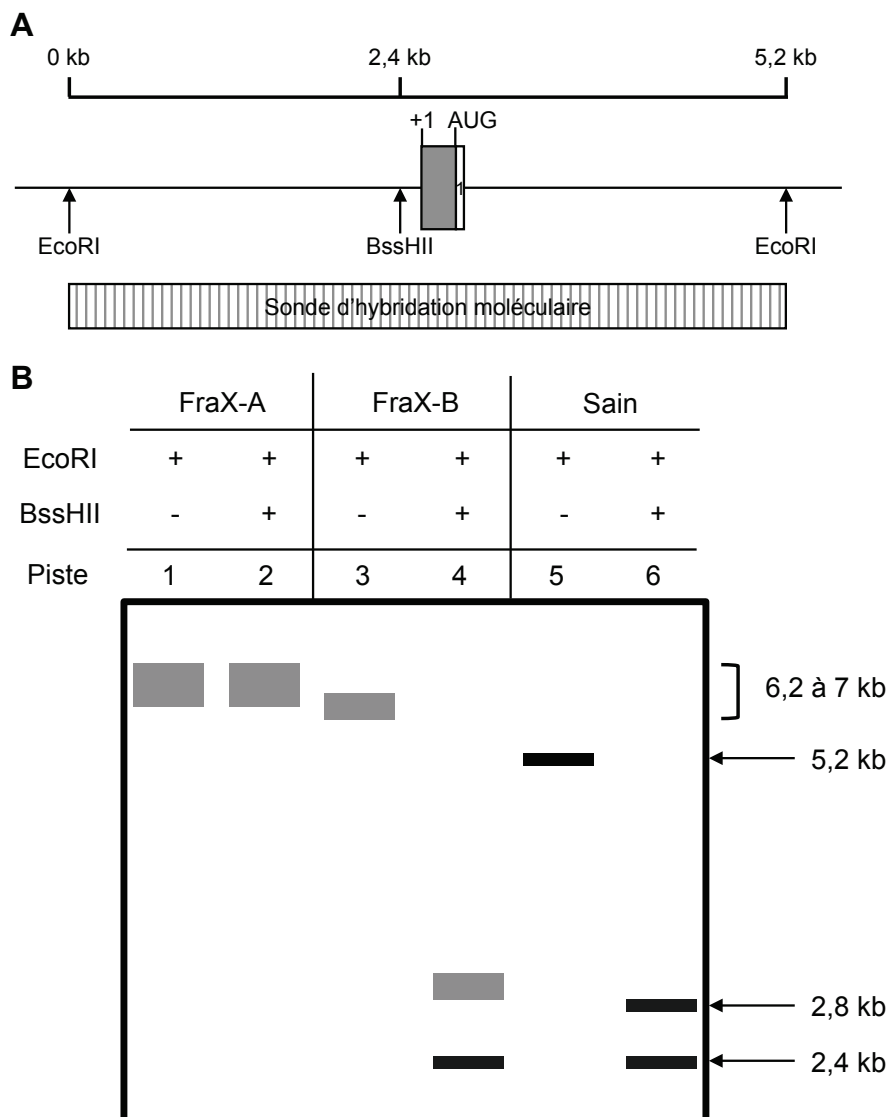


Figure 11 : Analyse de la méthylation dans la région 5' du gène *Fmr1*. (A) Détail de la région 5' chez un individu sain. L'emplacement des sites de restriction des enzymes EcoRI et BssHII est indiqué (flèches). Une échelle de taille en kilobases (kb) est représentée au-dessus du schéma. La sonde utilisée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

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

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

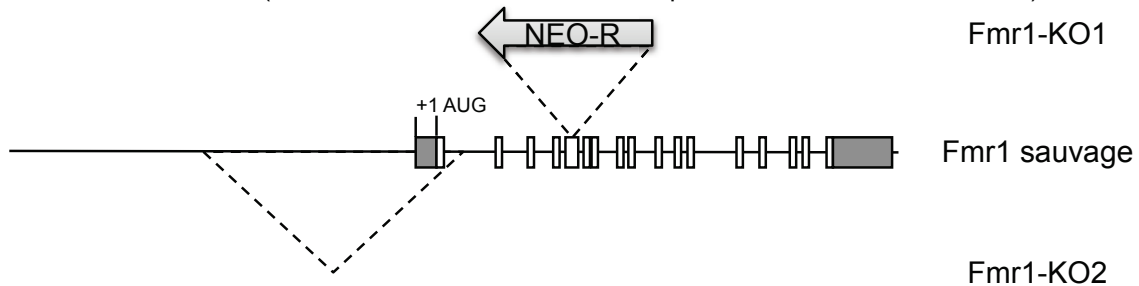


Figure 12 : Représentation schématique des modifications génétiques introduites au locus *Fmr1* (sauvage, au centre) dans les lignées de souris transgéniques Fmr1-KO1 (en haut) et Fmr1-KO2 (en bas).

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

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

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

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

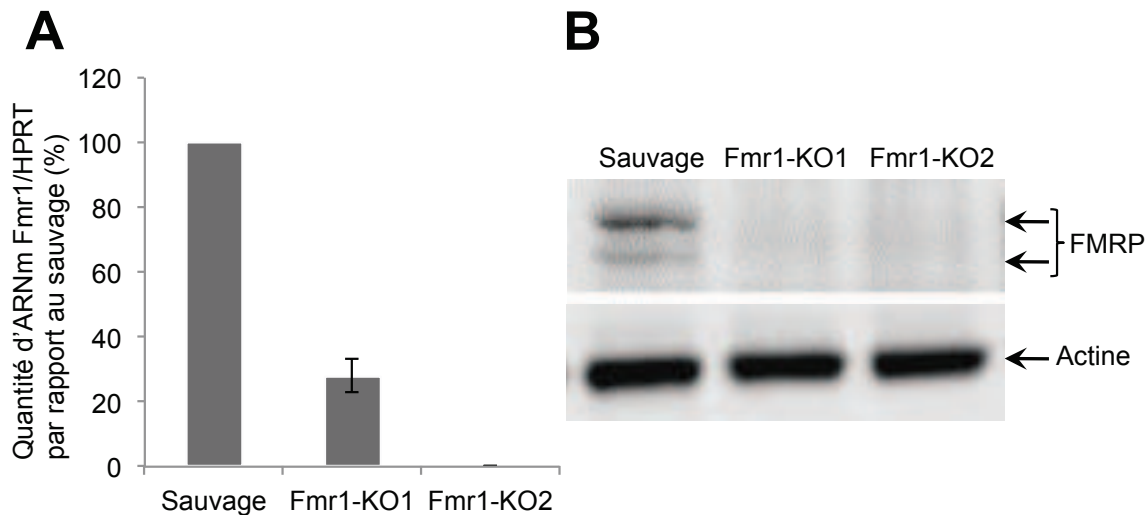


Figure 13 : Analyse de l'expression du gène *Fmr1* dans deux lignées transgéniques invalidées. **A.** Analyse de la quantité relative des ARN messagers *Fmr1* dans le cerveau de souris sauvages ou transgéniques (*Fmr1*-KO1 et *Fmr1*-KO2). On réalise une RT-PCR sur des ARN purifiés de cerveaux, avec des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

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

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

C2. Rôles moléculaires de la protéine FMRP

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

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

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

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

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

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