**Corrigé ENS biologie 2017**

**Partie A.**

|  |
| --- |
| **SUJET DE SYNTHESE : Aspects temporels du développement (fin de spé)**Le développement (embryonnaire et post-embryonnaire) est constitué d’un ensemble de processus dont le caractère séquentiel, la vitesse et la durée sont définis par des mécanismes de contrôle endogènes et, dans certains cas, influencés par des facteurs environnementaux. Vous exposerez ces aspects temporels du développement en vous limitant aux Vertébrés et aux Angiospermes. |

|  |
| --- |
| ***Ce que dit le rapport du jury****Le jury aurait souhaité une prise de recul sur les différents exemples au programme, et que le sujet soit envisagé à une échelle plus large. Ainsi, d’un point de vue écologique et évolutif, il était intéressant de discuter des différents « points de contrôle » du développement des Angiospermes par l’environnement et de leurs avantages en termes de reproduction et de survie au fil des saisons, de la variabilité inter-espèce en ce qui concerne la temporalité du développement ou son contrôle, ou des liens entre ontogenèse et phylogenèse.* |

**Introduction.**

**Définitions, délimitation du sujet.** Le **développement** désigne l’ensemble des mécanismes participant à la croissance et à la production de nouveaux organes chez les organismes pluricellulaires. Il peut être embryonnaire (DE) ou post-embryonnaire (DPE) et présente une **chronologie précise**, propre à l’espère considérée. Nous nous concentrerons surtout sur les **aspects temporels** du DE chez les **Vertébrés**, Métazoaires présentant un crâne et une série de Vertèbres, et du DPE chez les **Angiospermes**, plantes à fleurs.

**Problématique permettant de comprendre votre plan.** Quelles sont les principales étapes du développement chez ces organismes ? Comment leur chronologie est-elle contrôlée à la fois par des facteurs endogènes (souvent génétiques) et par l’environnement ? Nous répondrons successivement à ces questions.

|  |
| --- |
| *Le jury déplore que les problématiques ne soient souvent que peu travaillées : «Nous allons nous demander quels sont les aspects temporels du développement », que l’on retrouve dans beaucoup de copies n’est pas un énoncé de problématique et ne permet pas de définir un fil directeur clair pour l’exposé, ni de justifier l’intérêt du sujet.* |

**I) La mise en place séquentielle du plan d’organisation au cours du développement**

Le plan d’organisation désigne les axes de polarité d’un organisme ainsi que la position des organes par rapport à ces axes. La mise en place de ce plan répond à un schéma temporel précis, relativement peu variable au sein d’une même espèce.

 **1) Chez les Vertébrés**

Le xénope présente un développement indirect : une larve, le têtard, sort rapidement de l’œuf, et doit subir une métamorphose pour donner un individu adulte, le crapaud.

Le DE du xénope dure **entre 2 jours et demi et 4 jours** à 20 degrés. Il se déroule en plusieurs phases : segmentation, gastrulation et organogenèse. Le contenu de l’ovocyte et la fécondation sont déterminants pour la mise en place des axes de l’embryon (*faire un schéma légendé d’un ovocyte puis schématiser rapidement chaque étape du DE*).

Environ **1h30** après la pénétration du spermatozoïde, le premier plan de clivage issu de la première mitose apparaît ; le second plan de division se met en place **45 min plus tard**. La **segmentation** se déroule ensuite rapidement, en deux phases. Elle permet l’acquisition du caractère pluricellulaire et dure environ **35h** au total :

- **morula** jusqu’au 12e cycle de division (**14h** après fécondation, on est au stade **128 cellules**) : les divisions sont synchrones, l’embryon se présente sous forme d’une petite boule de cellules pleine, la transcription n’a pas lieu ;

- **blastula** : les divisions se désynchronisent et une cavité, le blastocèle, apparait dans le pôle animal. Les cycles durent environ **35 minutes** mais sont plus longs au niveau du pôle végétatif. De nombreuses communications paracrines, appelées inductions, se mettent en place à ce stade, et sont déterminantes pour initier la gastrulation. A la fin, l’embryon possède 10.000 cellules environ.

Au cours de la **gastrulation**, des mouvements cellulaires apparaissent, qui contribuent à la mise en place des 3 feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme. Les inductions se poursuivent et sont déterminantes pour initier la régionalisation de ces feuillets. Chez le xénope, les mouvements de la gastrulation **durent environ 7 à 8 heures** à température ambiante (**35 à 42h post-fécondation**).

Puis, les feuillets se régionalisent et se différencient en organes : c’est l’**organogenèse (> 42h après fécondation, éclosion entre 53h et 90h environ)**. Celle-ci débute par la neurulation, au cours de laquelle le tube neural, futur cerveau et moelle épinière, se met en place.

Les **somites**, petits massifs cellulaires métamérisés, se mettent en place **de l’avant vers l’arrière** : les somites côté tête apparaissent en premier, chacun met **1h** à se former. Les somites côté queue apparaissent en dernier et mettent environ **3h** chacun pour se former. Au total, quelques dizaines de somites se mettent en place. C’est à leur niveau que la régionalisation antéro-postérieure de l’embryon sera la plus visible puisque chez les mammifères et oiseaux, les somites donnent :

- les différentes vertèbres : cervicales, thoraciques, lombaires, sacrées et caudales

- les membres antérieurs et postérieurs.

Le « timing » du DE est très différent chez les Mammifères, comme l’Homme, par rapport aux Amphibiens. En effet, les Mammifères présentent un développement direct. La segmentation et la gastrulation se font en quelques jours, les principaux organes se mettent rapidement en place et sont presque tous présents au bout de 2 mois de grossesse, lorsque l’embryon devient fœtus. Les 7 mois suivants consistent en une croissance très importante et des modifications lentes des organes, qui acquièrent leur maturité.

 **2) Chez les Angiospermes**

 **a) le développement embryonnaire**

Chez les Angiospermes, l’embryon se développe au sein d’une **graine**. La graine contient au minimum des téguments protecteurs (plus ou moins sclérifiés), des réserves, et un embryon présentant une radicule, une tigelle et une gemmule. Les réserves sont soit absorbées et stockées dans deux feuilles primitives appelées cotylédons, soit conservées sous forme d’albumen (blé) ou de périsperme (poivre). La formation de la graine est coordonnée avec celle du fruit qui la contient. Lorsqu’elles sont disséminées (souvent en été en zone tempérée), les graines entrent généralement en **dormance** et n’en sortent que lorsque les paramètres environnementaux redeviennent favorables (fin de l’hiver/début du printemps). Cela évite que les graines ne germent en hiver au moindre redoux et que les plantules ne meurent de froid par la suite.

 **b) le développement post-embryonnaire**

Chez les Angiospermes, le DPE de l’appareil végétatif implique une croissance continue des parties aériennes et racinaires. La croissance se fait au niveau de zones privilégiées appelées **méristèmes**:

* les méristèmes primaires apicaux caulinaire et racinaire contribuent à la croissance en longueur ; le premier est histogène et organogène (puisqu’il édifie l’axe feuillé) alors que le second n’est qu’histogène. Les cellules sortant de la zone méristématique s’allongent puis se différencient.
* les méristèmes secondaires comme le cambium ou l’assise subéro-phellodermique, présents chez les végétaux ligneux, contribuent à la croissance en épaisseur ;
* les méristèmes comme les bourgeons axillaires, qui participent à la ramification de l’axe.

Le développement floral implique une conversion de méristèmes apicaux caulinaires en méristèmes inflorescentiels, sous étroit contrôle du cycle saisonnier (souvent au printemps en zone tempérée).

*Le caractère séquentiel du développement est relativement peu variable au sein d’une même espèce, ce qui suggère un fort contrôle endogène (génétique au sens large, c’est-à-dire incluant l’épigénétique). Toutefois, les conditions extérieures peuvent imposer des variations, en particulier chez les végétaux. Nous allons voir comment la génétique et l’environnement s’additionnent pour gouverner et moduler les aspects temporels du développement.*

**II) Le contrôle endogène de la chronologie du développement**

Les individus présentant des **mutations** peuvent présenter de fortes altérations de leur développement : retard de croissance, membres atrophiés, malformations d’organes etc.

 **1) Les communications cellulaires dans le contrôle de la chronologie du développement**

 **a) Les inductions cellulaires (xénope, DE)**

Chez le xénope, les étapes précoces du développement reposent sur des inductions. Pour bien comprendre la notion d’induction, on peut se référer à des expériences historiques comme celles de Nieuwkoop :

* si on clive une blastula au **stade 64 cellules** et qu’on sépare le pôle animal, la zone marginal et le pôle végétatif, les deux premiers donnent des tissus ectodermiques et le dernier, des tissus endodermiques ;
* si on clive une blastula au **stade 128 cellules** et qu’on sépare le pôle animal, la zone marginal et le pôle végétatif, la calotte animale donne des tissus ectodermiques, la zone marginale des tissus mésodermiques et le pôle végétatif, des tissus endodermiques ;
* **entre les stades 64 et 128 cellules**, la zone marginale a été induite à donner du mésoderme.

Une expérience complémentaire montre que si on associe des cellules marquées de la calotte animale avec des cellules non marquées de la zone végétative au stade 64 cellules, on observe que les cellules marquées donnent des tissus mésodermiques.

**Conclusion** : Le pôle animal est donc induit par des molécules émises par le pôle végétatif. Au contact de ces molécules, il donne des tissus mésodermiques. Le sommet de la calotte animale, trop éloigné du pôle végétatif, ne reçoit que peu de molécules inductrices et donne toujours de l’ectoderme.

*[Si vous avez le temps, il est aussi judicieux de décrire l’expérience de greffe surnuméraire de la lèvre dorsale du blastopore en début de gastrulation, entre un embryon blanc et un embryon pigmenté, effectuée par Spemann].*

Une **induction** consiste en une communication cellulaire par des facteurs émis par un petit groupe de cellules (dites inductrices) qui diffusent entre les cellules et qui sont capables de se fixer sur les cellules qui possèdent des récepteurs adaptés. On parle de **communication paracrine**. Les cellules réceptrices sont qualifiées de compétentes. La réception des facteurs paracrines au niveau membranaire entraine une **voie de transduction**, avec une **activation en cascade** de molécules, qui aboutit à un effet biologique précis : les cellules sont dites induites, c’est-à-dire qu’elles s’engagent dans une voie de développement particulière.

La **compétence** d’une population de cellule varie suivant le **stade de développement** : par exemple, les cellules peuvent se mettre à exprimer les récepteurs à un certain facteur à un moment précis du DE, ou au contraire cesser de les exprimer. Les expériences ont montré qu’il faut au moins **2h de contact** avec la cellule compétente pour qu’un effet apparaisse et **5h de contact** pour que le mésoderme commence réellement à se former.

Les gènes qui codent des facteurs diffusibles, comme Nodal (= Xnr) qui a un effet inducteur et dorsalisant, ou les FGF et BMP4 qui ont un effet plutôt ventralisant, ainsi que les gènes qui codent leurs récepteurs ont donc un rôle clé dans le timing du développement.

 **b) La communication via les jonctions GAP (xénope, DE)**

D’autres événements moléculaires jouent un rôle capital dans la chronologie du développement, la mise en place des connexines qui forment les jonctions GAP. En effet, les connexines sont fonctionnelles chez le xénope au stade 8 cellules, mais cessent de l’être au stade 16 cellules. Si les connexines sont bloquées au stade 8 cellules, ou surexprimées au stade 16 cellules, le têtard à l’éclosion présente des malformations.

*Pour plus de détails, voir sujet sur documents agro 2005, thème 3.*

 **c) Les phytohormones (Angiospermes, DPE)**

Chez les Angiospermes, le DE est contrôlé par des facteurs diffusibles qualifiés de **phytohormones**.

Par exemple, l’auxine est produite par les apex caulinaires et inhibe le développement des bourgeons axillaires situés à proximité. Les ramifications de la plante sont ainsi contrôlées, et une phyllotaxie particulière apparaît.

De même, la floraison, donc la transition d’un méristème végétatif en méristème reproducteur, repose sur la stimulation de ce méristème par des phytohormones comme le florigène qui sont produites en réponse à des variations de la photopériode et de la température.

 **2) Les modulations des adhérences cellulaires (xénope, DE)**

Les cellules se lient entre elles grâce aux cadhérines, des protéines transmembranaires pouvant réaliser des interactions homophiles via leurs domaines extracellulaires. Les cadhérines forment une famille de glycoprotéines présentant une forte spécificité : les cadhérines N (= des neurones) se lient surtout aux cadhérines N, les cadhérines E aux cadhérines E etc. Des événements clés du développement embryonnaire sont gérés par la production ou, au contraire, l’arrêt de synthèse de certaines cadhérines.

Par exemple, les cellules des crêtes neurales entament leur migration en neurulation parce qu’elles cessent d’exprimer des cadhérines. Au contraire, la fermeture du tube neural est permise par la synthèse de nombreuses cadhérines qui permettent aux cellules de se lier entre elles.

 **3) Les gènes à homéoboite**

 **a) Chez les animaux**

Des mutations affectant un segment entier de l’organisme ont été découvertes chez la drosophile entre les années 20 et 40. Ces mutations sont qualifiées d’homéotiques (ex : Antennapedia, Ultrabithorax). On a pu montrer que la mutation d’un unique gène était responsable d’un mutant homéotique : les gènes homéotiques sont des gènes maitres du développement. On trouve des **homologues** de ces gènes chez les Vertébrés, présents généralement en 4 exemplaires chacun. Ces gènes, très conservés donc au cours de l’évolution, présentent tous une séquence de 180 nucléotides appelée **homéoboite** codant un domaine de liaison à l’ADN de 60 AA (hélice-boucle-hélice, deux fois) : c’est l’**homéodomaine** de la protéine. Les protéines à homéodomaine sont des facteurs de transcription capables d’activer/réprimer en cascade des centaines de gènes. Les gènes homéotiques présentent une **colinéarité** à la fois spatiale et temporelle entre leur organisation sur le chromosome, leur moment d’expression au cours du DE et la position du segment corporel qu’ils mettent en place.

Il existe des gènes à homéoboite qui ne sont pas des gènes homéotiques (ce sont juste d’autres gènes importants pour le développement). Tous les gènes homéotiques sont des gènes à homéoboite, mais la réciproque n’est pas vraie.

 **b) Chez les végétaux**

Le développement floral et l’identité des organes floraux sont déterminés par des gènes, dont certains, comme chez les animaux, sont des gènes homéotiques, et impliquent des activations en cascade. Par exemple, les **gènes ABCE**, impliqués dans la mise en place des 4 verticilles floraux, sont des gènes homéotiques. L’expression des gènes de classe A seuls donne des sépales, A+B des pétales, B+C des étamines et C des carpelles et des ovules. Les gènes de la classe E s’expriment dans les 4 verticilles et dans les ovules.

Le modèle ABCE semble être retrouvé chez toutes les espèces, les gènes homéotiques étant **homologues** entre eux. Aussi, comprendre la phylogénie des gènes homéotiques régulant l'organisation florale permet une meilleure compréhension de l'origine et de l'**évolution** des angiospermes.

*Le contrôle endogène du développement, essentiellement d’origine génétique, est coordonné avec un contrôle par les paramètres environnementaux – en particulier chez les Angiospermes qui présentent une vie fixée et doivent donc s’adapter aux conditions environnementales qu’ils subissent.*

**III) Le contrôle du développement par des facteurs environnementaux**

 **1) Chez les Vertébrés**

Chez les espèces présentant un développement externe, la **température** du milieu joue sur la vitesse de développement et les espèces aquatiques en particulier y sont très sensibles. Le **taux d’humidité** peut jouer aussi sur les espèces à développement externe.

 **2) Chez les Angiospermes**

Il est courant d’observer des ports particuliers chez les Angiospermes : **nanisme** et réduction de la tige en région montagneuse, port en drapeau de type « **anémomorphose** » en région ventée etc. Les plantes ayant un éclairage anisotrope se tournent vers la source de lumière : on parle de **phototropisme**. Il est relativement aisé d’obtenir des bonsaïs par taille régulière d’une plantule présentant un génotype sauvage… et l’observation des **cernes des arbres** montre qu’ils ne grandissent qu’à la belle saison. L’influence des paramètres extérieurs sur le développement est essentielle chez les Angiospermes. Comme ils présentent une vie fixée, ils ont dû s’adapter aux conditions de vie imposées par leur environnement.

La **température** et la **photopériode** sont les principaux facteurs susceptibles de moduler le développement d’une Angiosperme. En région tempérée, de nombreuses plantes doivent subir un épisode de froid pour pouvoir fleurir : c’est la **vernalisation**. De plus, l’augmentation des températures et l’augmentation de la photopériode au printemps provoquent une **levée de dormance** des graines, et entraine leur germination.

Chez les Angiospermes, la **photopériode** est perçue par des **phytochromes** : la lumière provoque une photoisomérisation de type cis-trans. Les phytochromes sont impliqués dans de nombreux points du développement : floraison (avec des plantes « de jours courts » et d’autres « de jours longs »), la germination, la production de pigments, le débourrement des bourgeons, la reprise d’activité des méristèmes secondaires etc.

En résumé, la perception de stimuli environnementaux entraine la production de phytohormones et/ou l’activation en cascade de nombreuses voies moléculaires, qui modulent les facteurs de transcription, qui eux-mêmes modifient l’expression génétique.

**Conclusion**: le timing du développement **embryonnaire** est essentiellement sous contrôle endogène, même si des variations de température peuvent modifier son décours. L’activation séquentielle de groupes de gènes permet d’orchestrer le développement de la graine des Angiospermes ou de l’embryon des Vertébrés, qui suit toujours un **schéma temporel précis**. Les gènes homéotiques, qui sont les principaux gènes maitres du développement, sont très conservés et se retrouvent à la fois chez les plantes et les animaux, suggérant une origine évolutive très ancienne.

Le développement **post-embryonnaire** est bien plus sensible aux paramètres environnementaux, en particulier chez les Angiospermes. La température, la photopériode, le vent… modifient l’activité métabolique de la plante et permettent l’adaptation au **rythme des saisons**. Ces différents facteurs jouent sur des relais moléculaires, qui agissent à leur tour sur l’expression génétique.

**Ouverture** : Il est à noter que de nombreux polluants qualifiés de « perturbateurs endocriniens » se retrouvent dans les cours d’eau et modifient le schéma développemental des organismes aquatiques, en particulier des Amphibiens (le taux d'extinction de ce taxon est 211 fois plus élevé que celui de tout autre !).

**Partie B. L’horloge centrale des Mammifères**

1a) Du jour 1 au jour 4, on observe que l’activité des rongeurs nocturnes se déroule bien pendant les 12h de nuit, et pas pendant les 12h de jour. En nuit continue, un léger décalage apparaît : en l’absence de stimulus exogène, le rythme propre des rongeurs est légèrement inférieur à 24h (plutôt un peu plus de 23h).

1b) Lorsqu’on effectue une lésion des NSC, l’activité devient très chaotique : on en déduit que les NSC sont indispensables dans le maintien d’un rythme circadien. Lorsqu’on greffe de nouveaux NSC, le rythme endogène de 23h et quelques réapparaît. Les NSC sont donc suffisants pour maintenir un rythme endogène de 23h et quelques. Ce rythme se cale sur 24h lorsque le rongeur peut percevoir la photopériode.

2a) On peut supposer qu’une fréquence de mutation plus élevée provoquerait trop de mutations délétères (potentiellement mortelles) et qu’une fréquence de mutation inférieure demanderait trop de souris pour espérer avoir un mutant du rythme circadien. Ici, on précise qu’on a obtenu un mutant pour 300 souris. Or, le taux de mutation était de 0,0015/locus/gamète, ce qui veut dire qu’on avait initialement 0,0015 x 300 = 0,45 soit 45% de chance d’avoir un mutant sur le lot de 300 souris.

2b) Le mutant 25 présente un rythme endogène de presque 25h, d’où son nom, alors que les souris sauvages présentent un rythme endogène tournant autour de 23h40 environ. Les profils d’activité en cycle jour/nuit de 12h sont similaires chez le mutant et les sauvages, ce qui veut dire que la perception de la photopériode suffit à caler l’individu malgré sa mutation. En revanche, en nuit continue, le décalage se fait dans le sens de cycles plus courts que la normale pour les sauvages, et plus longs que la normale chez le mutant 25. On observe qu’environ 50% des descendants du mutant 25 sont identiques à lui, et 50% sont identiques au sauvage : on peut donc supposer que le mutant 25 est hétérozygote et que l’allèle muté responsable de l’altération du rythme est dominant.

3a) LACZ est ici un gène rapporteur qui s’exprime en même temps que CLOCK. Comme le produit de LACZ est coloré, cela permet de visualiser les zones de production de CLOCK, et son intensité. On observe que pour les rongeurs exprimant beaucoup CLOCK (beaucoup de bleu), le rythme endogène est proche de celui du sauvage (23h40). En revanche, moins il y a de CLOCK, plus le rythme est long et plus les résultats sont variables d’un individu à l’autre.

3b) CLOCK serait donc responsable du maintien du rythme endogène vers 23h40.

4a) L’objectif de l’expérience est de savoir si les molécules X et Y se lient l’une à l’autre. Si elles se lient, alors BD ira se fixer sur la séquence d’ADN, AD activera la transcription et le produit LACZ sera synthétisé (couleur bleue). Si X et Y ne se lient pas, BD ira se fixer sur la séquence mais il n’y aura rien pour activer la transcription et LACZ ne sera pas synthétisé (couleur blanche).

4b) Figure 4A. Le test de p50 et p65 est un témoin positif : on sait que ces molécules doivent se lier et donc que la couleur observée doit être bleue. On observe que CLOCK se lie à BMAL1 et à PER1.

Figure 4B. La présence d’une couleur bleue signifie ici que LACZ a bien été transcrit, donc qu’il y a bien eu activation de la transcription par liaison d’une molécule AD au 21-mer. On observe que le seul cas où il y a transcription de LACZ est l’ajout simultané de CLOCK et BMAL1 avec un 21-mer de type a, mais sans PER1. BMAL-1 AD ne suffit pas à activer seul la transcription. PER1 empêche l’activation de la transcription par le couple BMAL1/CLOCK. Les autres 21-mer ne sont pas efficaces. Or, la seule séquence qui diffère est la séquence 9 à 14, qui est CACGTG chez le 21-mer a. On en déduit que BMAL1-AD se lie à CLOCK, qui se lie à son tour à la partie CACGTG du 21-mer a et active la transcription. PER1 doit bloquer soit la liaison de CLOCK au 21-mer a, soit l’interaction CLOCK/BMAL1.

Figure 4C. On teste ici la boite E, qui correspond justement à la séquence CACGTG du 21-mer a, seule (cas 2) ou avec d’autres séquences autour (cas 1). On observe qu’en présence simultanée de BMAL1 et de CLOCK, le niveau d’expression du gène rapporteur est élevé en présence du promoteur entier (9 UA) et assez élevé en présence de la boite E seule (4 UA). CLOCK ou BMAL1 seuls ne sont pas efficaces. On en déduit que le dimère BMAL1-CLOCK peut se lier à la séquence CACGTG de certains promoteurs et activer la transcription d’autres gènes.

4c) Dans la figure 4B, PER1 semblait avoir un effet inhibiteur sur l’activation de la transcription par le dimère CLOCK/BMAL1. L’effet de PER1 n’est pas retesté dans l’expérience de la figure C : on aurait pu ajouter deux conditions supplémentaires (CLOCK + BMAL1 + PER1 en présence du rapporteur 1 puis du rapporteur 2).

Il est aussi envisageable de tester si PER1 bloque l’interaction CLOCK/BMAL1, en réutilisant l’expérience de la figure 4A : s’il n’y a pas de production de produit bleu en présence de CLOCK-BD + BMAL1 + PER1, cela voudra dire que PER1 bloque bien l’interaction CLOCK/BMAL1.

5) Les petits ARN interférents empêchent la traduction d’un ARN en protéine. On observe ici qu’en présence du siARN REV-ERBα, donc en l’absence de la protéine REV-ERBα, l’expression de CLOCK devient bien plus importante (x3 par rapport au contrôle). On en conclut que la protéine REV-ERBα limite l’expression de CLOCK. Le test avec ROR permet de vérifier la spécificité du gène : la protéine ROR ne limite pas l’expression de CLOCK.

6) En milieu de nuit : CLOCK se lie à BMAL1, le dimère se fixe sur le promoteur de PER1 (et peut-être de REV-ERB) et active la transcription. PER1 et REV-ERB s’accumulent progressivement. Le rongeur est actif.

En fin de nuit : PER1 bloque progressivement l’interaction CLOCK/BMAL1 ou empêche CLOCK de se fixer. REV-ERB limite la production de CLOCK (peut-être via BMAL1 ?). La quantité de CLOCK diminue. Le rongeur cesse progressivement son activité.

7) Figure 6A. La quantité de PER1 augmente en fin de nuit et en début de journée, pour atteindre un pic à la mi-journée. Chez les mutants CLOCK-/-, les fluctuations de PER1 sont très atténuées mais restent synchronisées avec le rythme circadien lorsqu’il existe. Les fluctuations de CLOCK sont opposées à celles de PER1, on a un oscillateur. En nuit continue, pour les individus sauvages, les fluctuations de PER1 et de CLOCK sont normales mais suivent le rythme endogène un peu plus court (23h40). En revanche, les fluctuations de PER1 chez le mutant CLOCK-/- deviennent aléatoires. On en déduit qu’en l’absence de stimulus exogène, la quantité de PER1 est sous contrôle de CLOCK.

Figure 6B. On observe qu’en période nocturne, un flash lumineux provoque une augmentation brutale (un pic) de PER1. La production de PER1 est bien associée à la lumière. La figure 6C montre que le niveau d’expression de PER1 augmente lorsque l’intensité du flash augmente. On peut en déduire que le lever du jour participe à l’augmentation de la quantité de PER1 observée à la figure 6A.

8a) Dans les NSC, in vivo, les fluctuations de PER1 sont identiques à celles observées à la figure 6A chez les individus sauvages. Sur les cultures in vitro, la quantité de PER1 augmente le jour et diminue la nuit (ce qui est presque identique aux fluctuations in vivo, à cela près que l’augmentation ne débute pas en fin de nuit mais bien en début de jour). Dans les hépatocytes, in vivo, les fluctuations de PER1 sont de même amplitude et de même période que pour les NSC, mais décalées dans le temps : l’augmentation se fait plutôt durant la nuit et non durant la journée. En revanche, in vitro, les hépatocytes sont incapables de maintenir des fluctuations de PER1 : la quantité décline et devient nulle.

8b) La stratégie in vivo demande de sacrifier beaucoup d’animaux puisqu’à chaque temps où on veut une valeur, il faut tuer un groupe de souris. En revanche, elle présente l’avantage de maintenir les connexions entre les organes. La stratégie in vitro permet de faire de nombreuses mesures sans avoir à sacrifier des animaux, mais elle ne permet pas de maintenir les connexions entre les organes.

8c) Figure 7C. On observe que la température d’un rongeur suit un rythme circadien : elle augmente en fin de jour/début de nuit (lorsque le rongeur se met en activité) et diminue en fin de nuit/début de jour (lorsqu’il se met au repos).

Figure 7D. Des hépatocytes sont soumis à des profils de température mimant les variations naturelles du corps. On observe que lorsque la température augmente (= mimant une fin de jour/début de nuit), la quantité de PER1 augmente et lorsque la température diminue, la quantité de PER1 diminue (= mimant une fin de nuit/début de jour). Cela est cohérent avec les mesures in vivo des hépatocytes de la figure 7B. Le profil de BMAL1 est plus difficile à interpréter, mais on peut constater que son pic est décalé par rapport à celui de PER1.

Lorsque les fluctuations de température sont abolies (figure 7E), les variations de PER1 sont chaotiques.

8d) On peut faire l’hypothèse que les neurones du NSC contrôlent la température du corps, et que ces fluctuations de température contrôlent à leur tour la production de PER1 (et des autres effecteurs du rythme circadien ?) dans les hépatocytes. Pour valider ce modèle, il faudrait prouver que ce sont les neurones du NSC qui contrôlent la température du corps : on pourrait mesurer le profil de température chez des rongeurs pour lesquels les neurones du NSC ont été retirés ou lésés.

9a) On observe que la teneur en glycogène du corps des rongeurs nocturnes diminue en fin de journée/début de nuit, puis réaugmente au cours de la nuit. Cela est cohérent avec le fait que les rongeurs ont jeuné dans la journée : ils ont besoin de puiser dans leurs réserves de glycogène pour se remettre en activité. Au fur et à mesure qu’ils mangent, la nuit, les réserves de glycogène peuvent être reconstituées. La teneur en glycogène synthase augmente lorsque la teneur en glycogène diminue, puis diminue lorsque la teneur en glycogène augmente (peut-être que les variations de la quantité de cette enzyme sont contrôlées par la teneur en glycogène ? simple hypothèse). La teneur en glycogène phosphorylase augmente vers 16h, alors que la teneur en glycogène des animaux n’a pas encore trop diminué : on peut faire l’hypothèse que la glycogène phosphorylase contribue à hydrolyser les réserves de glycogène en fin de journée, ce qui permet à l’animal de récupérer du glucose plasmatique pour se remettre en activité. Par la suite, la glycogène phosphorylase diminue (on peut imaginer que l’animal n’a plus besoin de piocher dans ses réserves et, au contraire, les reconstitue).

9) Schéma bilan.



**Partie C. Importance des rythmes endocrines**

1a) Courbe étalon :



1b) On mélange un échantillon de plasma de volume connu avec une concentration connue d’anticorps marqués et une concentration connue de GC marqué (les mêmes que pour le tracé de la courbe étalon). On mesure la radioactivité R et on retrouve la concentration GCp en GC non marquée (= la concentration plasmatique en GC).

2a) La concentration plasmatique en GC varie chez les Mammifères étudiés au cours des 24h. On observe que pour l’Homme, diurne, la concentration en GC augmente en fin de nuit/début de jour, alors que pour le rongeur, nocturne, la concentration en GC augmente en fin de journée/début de nuit. Globalement, la concentration en GC est plus élevée au début de la période d’activité de l’animal. En plus de ces variations globales au cours des 24h, on note des oscillations à une échelle de temps beaucoup plus courte.

2b) La concentration en GC fait augmenter les concentrations en substrats du catabolisme oxydatif, ce qui permet à l’organisme de récupérer de l’énergie chimique sous forme d’ATP pour initier sa période d’activité.

3) On observe en figure 3A que la quantité globale de GC libérée est la même dans les deux conditions (contrôle et I), ce sont donc juste les variations journalières de concentration qui diffèrent. Figure 3B : Pour le groupe contrôle, les variations sont analogues à celles observées en figure 1 (concentration en GC maximale en début de nuit, à 21h, et minimale au matin à 7h). Pour le groupe I, la concentration en GC est bien constante, comme souhaité. On observe en figure 3C que le thymus des animaux du groupe I est plus gros que celui des animaux du groupe contrôle (d’environ 15%, différence significative car les barres d’erreur ne se croisent pas). Or, l’énoncé précise que la GC inhibe la prolifération des LT contenus dans le thymus : on peut supposer que cette inhibition est moins efficace lorsque la concentration en GC est maintenue constante. Conclusion : même si la quantité journalière de GC délivrée est identique, le fait que GC soit en concentration constante dans le plasma du rongeur semble diminuer son effet physiologique ; la variation temporelle de la concentration en GC serait donc importante pour son effet sur ses cellules cibles.

4a) La sonde est complémentaire du brin codant de l’ADN, donc elle peut s’hybrider avec les ARNm issus de la transcription du gène étudié. On peut ainsi évaluer le taux de transcription du gène.

4b) On observe que pour le groupe contrôle, 60 minutes après injection de la GC, le taux de transcription des gènes cibles est bien plus important (d’environ 40%). Ce taux de transcription revient à son niveau initial 180 minutes après injection. Pour le groupe I, on n’observe pas d’augmentation de la transcription des gènes cibles même après injection de GC. On en déduit que les variations journalières de concentration en GC sont indispensables pour que celle-ci puisse agir sur le taux de transcription des gènes cibles.

5a) La GC est une hormone stéroïde, hydrophobe, pouvant traverser les membranes cellulaires : elle possède donc des récepteurs intracellulaires (cytoplasmiques ou nucléaires).

5b) Figure 5B : La tubuline α est une protéine dont l’expression ne varie pas au sein des cellules. On voit qu’elle est présente avec la même intensité pour chacune des pistes sur le Western blot : on a donc déposé la même quantité d’extrait cellulaire dans les deux puits (témoin de charge). Toute différence d’intensité visible pour la bande correspondant à GC-R pourra donc s’expliquer par une variation de la concentration de cette dernière dans les cellules. On constate donc qu’il y a beaucoup plus de GC-R chez le groupe contrôle que chez le groupe I.

Figure 5C : On observe la localisation du récepteur à GC après injection de GC. Pour le groupe contrôle, à t=0, le récepteur est cytosolique, alors que 60 min après injection de GC, le récepteur est passé dans le noyau des cellules. Pour le groupe I, le récepteur ne change pas de localisation : il est toujours nucléaire (même avant que GC n’ait pu agir). Cela est confirmé par les mesures de la figure 5D.

6) La sécrétion en GC varie au cours d’une journée. Cette variation de la libération de GC est indispensable pour que cette hormone soit efficace. On peut supposer que cette hormone entre dans les cellules en traversant directement la bicouche lipidique de la membrane plasmique, se fixe sur son récepteur GC-R qui est initialement cytosolique, et que le complexe GC/GC-R passe dans le noyau. Là, il se fixe sur des promoteurs et active la transcription de certains gènes cibles, ce qui conduit à des effets biologiques (comme la réduction de prolifération des LT dans le thymus).

7a) Figure 7B. On observe qu’à t = 0, GC-R est abondamment situé dans le cytosol. Dès le premier pulse, GC-R passe dans le noyau et y reste au fil des pulses et lavages (il ne repart pas dans le cytosol, même après lavage). Toutefois, on observe une petite tache verte plus visible juste après les pulses, sur la droite du noyau : il peut s’agit du locus artificiel. Cette tache ne s’observe pas après lavage : on peut supposer que GC-R se détache de ce locus après lavage, lorsque GC se décroche de lui.

7b) La figure 6C confirme cette dernière hypothèse : la petite tache est visible après pulse et après lavage sur le marquage rouge RFP-NF1, alors qu’elle n’est visible qu’après pulse sur le marquage vert GFP-GC-R.

8) On peut faire l’hypothèse que GC se lie à GC-R dans le cytoplasme, le complexe passe dans le noyau, se lie aux sites GRE, qui font partie des promoteurs des gènes cibles, y favorise le recrutement de l’ARN Pol II et donc augmente la transcription des gènes cibles. Le complexe GC/GC-R est donc un facteur de transcription.

9) Figure 7B. On observe que pour la zone GRE, il faut attendre plus longtemps pour retrouver un même taux de fluorescence : par exemple, pour avoir 80% de l’intensité initiale, il faut attendre 0,5s pour la zone témoin et 2s pour la zone GRE. Cela veut dire que les molécules GC-R sont moins mobiles dans les zones GRE, probablement parce qu’elles sont fixées à l’ADN (alors qu’ailleurs dans le noyau, elles diffusent librement).

10) Figure 8. On observe que pour le groupe « pulsatile », il faut attendre plus longtemps pour retrouver un même taux de fluorescence : par exemple, pour avoir 80% de l’intensité initiale, il faut attendre 0,5s pour le groupe « continu » et 2s pour le groupe « pulsatile ». Cela veut dire que les molécules GC-R sont moins mobiles pour le groupe « pulsatile », probablement parce qu’elles se fixent plus efficacement à l’ADN. Cela est cohérent avec les résultats de la figure 4, où on voyait que GC n’avait plus d’influence sur les gènes cibles lorsque les variations de sécrétion étaient abolies.

11) Les variations de sécrétion de GC sont indispensables à la fois au maintien d’une grande quantité de récepteurs à GC et à la possibilité d’une translocation du cytoplasme au noyau du complexe GC/GC-R. Ce complexe se fixe sur des séquences GRE et active la transcription de certains gènes cibles en favorisant le recrutement du complexe de transcription. Des effets biologiques apparaissent alors, comme la réduction de prolifération des LT dans le thymus.

12) On observe en figure 9A que lorsque le Lapatinib est administré à 7h, le volume de la tumeur et le nombre de métastases sont significativement plus faibles que lorsqu’il est administré à 19h (d’environ 25% dans les deux cas). Chez les rongeurs, animaux nocturnes, il est préférable d’inhiber Le récepteur à l’EGF au début de la période de repos.

13a) On observe qu’en l’absence de GC et EGF, les cellules ne migrent pas. En présence d’EGF seul, elles migrent, ce qui peut favoriser les métastases. En présence d’EGF+GC, elles ne migrent plus : GC aurait un effet inhibiteur sur l’EGF. Il aurait fallu tester aussi GC seul, pour vérifier qu’il y a bien une absence de migration.

13b) La condition contrôle doit consister en une injection d’ARN de même taille que le siARN dirigé contre GC-R, mais de séquence aléatoire (ou dirigé contre un gène complètement différent). Cela permet de vérifier que l’injection d’un petit ARN en soi ne perturbe pas la migration cellulaire.

13c) On observe qu’en l’absence de récepteur à GC, les cellules se remettent à migrer (comme dans la condition EGF seul). C’est donc bien la liaison de GC à GCR qui empêche EGF de favoriser la migration cellulaire. GC et EGF ont un effet antagoniste sur la migration des cellules.

14a et c) On observe que par rapport à l’ajout de l’EGF seul, l’ajout d’EGF en présence de GC conduit à une plus forte transcription des inhibiteurs de la voie EGF (comme ERRFI1, DUSP1 et TRIB2) et une moindre transcription des activateurs (comme HBEGF, EREG et TGFA), ce qui pourrait expliquer la diminution des effets d’EGF sur la migration des cellules.

14b) Extrait du rapport de jury : La question 14)b. incitait ensuite les candidat·e·s à proposer une expérience permettant de démontrer ce lien de causalité : GC inhiberait bien l’augmentation de la migration cellulaire due à la présence d’EGF via un effet sur la transcription des gènes codant des régulateurs de la voie de signalisation de l’EGF. Toute proposition pertinente d’expérience a été valorisée. A titre d’exemple, on pouvait proposer de modifier la séquence de fixation de GC-R dans le promoteur des gènes régulateurs de la voie de signalisation de l’EGF, et de réitérer avec ces cellules, l’expérience de migration soit en présence d’EGF, soit en présence d’EGF et de GC.

15) On observe que les activateurs d’EGF sont plus abondants le jour et que les inhibiteurs sont plus abondants la nuit. Cela est cohérent avec le fait que la GC est plus abondante la nuit et que GC favorise la production des inhibiteurs d’EGF. GC serait donc une hormone « de nuit », libérée lorsque l’animal est actif, et l’EGF une hormone « de jour », libérée lorsque l’animal est inactif.

16a) Le Lapatinib inhibe le récepteur à l’EGF. Or, l’EGF est libéré surtout le jour chez les rongeurs. Il est donc pertinent de l’inhiber en début de journée, à 7h. Cela explique le fait que le Lapatinib soit plus efficace lorsqu’il est injecté à 7h qu’à 19h.

16b) Le rythme de l’Homme est opposé à celui du rongeur : la GC est libérée en journée, et l’EGF probablement la nuit. Il serait donc pertinent d’inhiber le récepteur à l’EGF en début de nuit, à 19h.