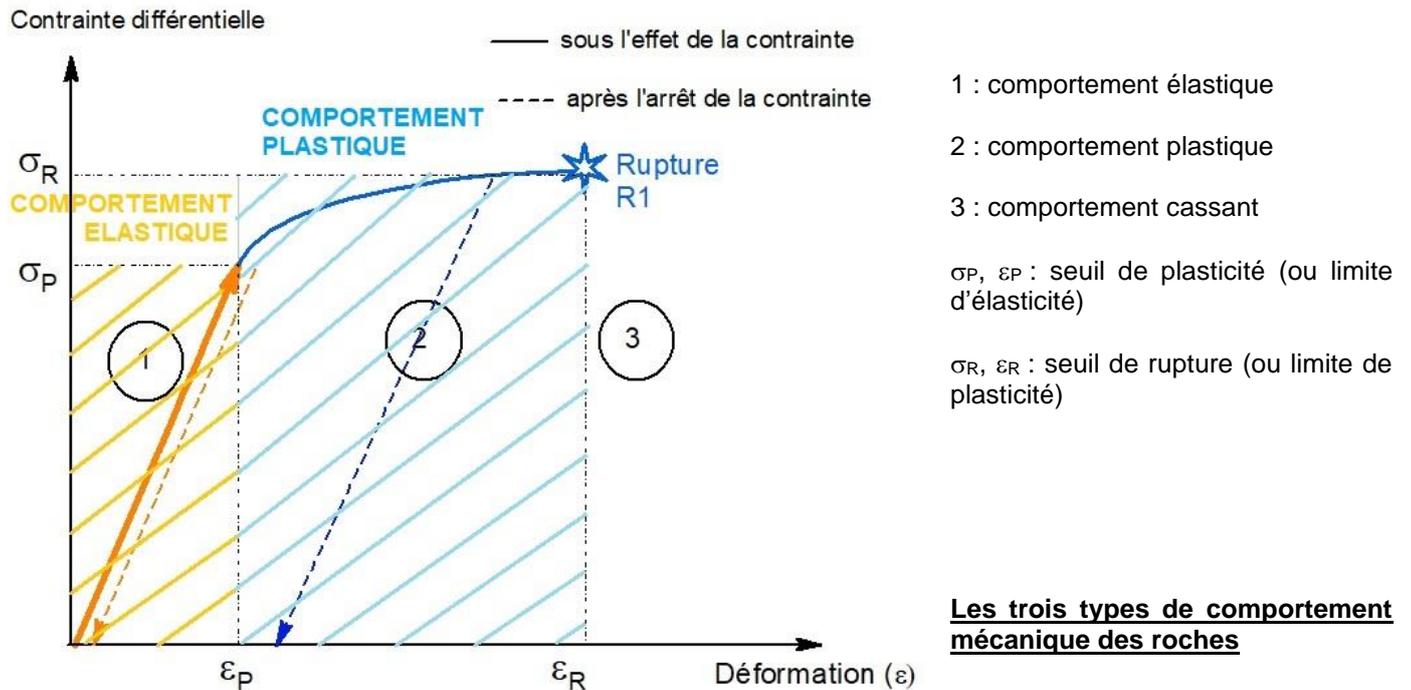


DEVOIR SURVEILLE n°5 – Eléments de correction

PARTIE A : GEOLOGIE

I. Les propriétés de la lithosphère vis-à-vis des contraintes : apport des données expérimentales

1. Identifiez les différents domaines et seuils sur le graphique du document 1 en légendant ce document sur l'annexe (p. 15).



2a. Justifiez les valeurs choisies pour σ_3 et T dans les expériences dont les résultats sont présentés dans le document 2.

$\sigma_3 = 500$ MPa et T = 300 °C correspondent à des conditions rencontrées à une profondeur supérieure à 10 km (gradient de pression lithostatique = 30 MPa / km), soit une grande profondeur pour la croûte.

$\sigma_3 = 110$ MPa et T = 150 °C correspondent à des conditions rencontrées à une profondeur légèrement supérieure à 3 km, soit une faible profondeur.

2b. Analysez le document 2 afin de caractériser l'effet de la pression de fluides sur la déformation du cylindre de roche.

A forte profondeur, pour une contrainte différentielle d'environ 100 Pa, le % de déformation est d'autant plus important que la pression de fluides est importante : 1 % environ pour un échantillon sec, 2 % pour 0,5 % d'eau et un peu moins de 6 % pour 2,5 % d'eau. Le seuil de plasticité, qui correspond au point d'inflexion de chaque courbe, est atteint pour une contrainte différentielle d'autant plus faible, que la teneur en fluide est élevée.

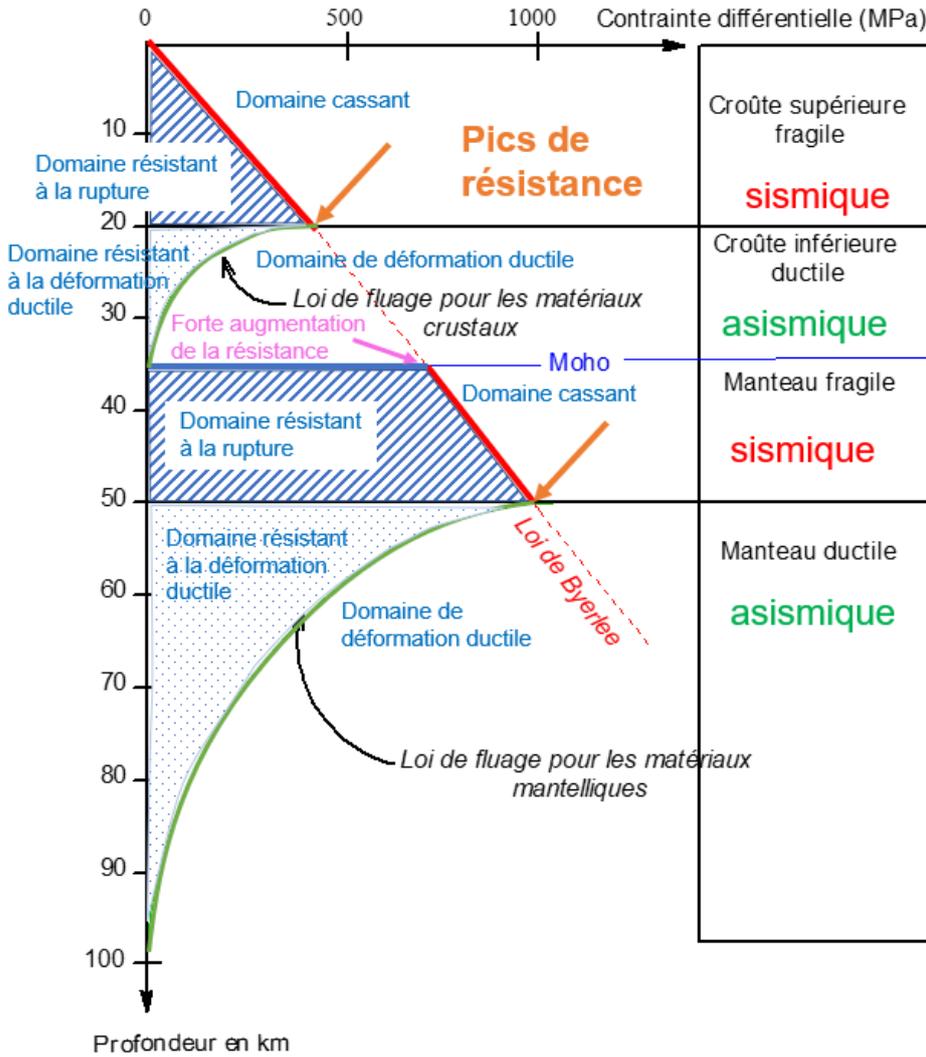
Ces observations indiquent qu'à grande profondeur, la présence de fluides favorise un comportement ductile des roches.

A faible profondeur, le seuil de rupture est atteint pour une déformation de 3 % si la pression de fluides est de 93 MPa, de 8,5 % si la pression de fluides est de 65 MPa et de 10,5 % si la pression de fluides est de 60 MPa. On relève également que plus la pression de fluides est élevée, moins la contrainte différentielle nécessaire pour atteindre le seuil de plasticité est élevée, même si les différences ne sont pas très importantes.

Ainsi, plus la pression de fluides est élevée, plus le domaine de plasticité est réduit et le seuil de rupture facilement atteint.

Par conséquent, à faible profondeur la présence de fluides favorise un comportement cassant des roches.

3. Légendez aussi précisément que possible le graphique concernant la lithosphère continentale (document 3, en annexe p. 15 à rendre avec votre copie). Précisez en particulier quelles lois s'appliquent et dans quels domaines et indiquez quelles enveloppes peuvent être le siège de séismes.



Les enveloppes qui peuvent être le siège de séismes sont celles qui ont un comportement cassant, c'est-à-dire pour lesquelles la loi de Byerlee s'applique : croûte supérieure et manteau lithosphérique supérieur.

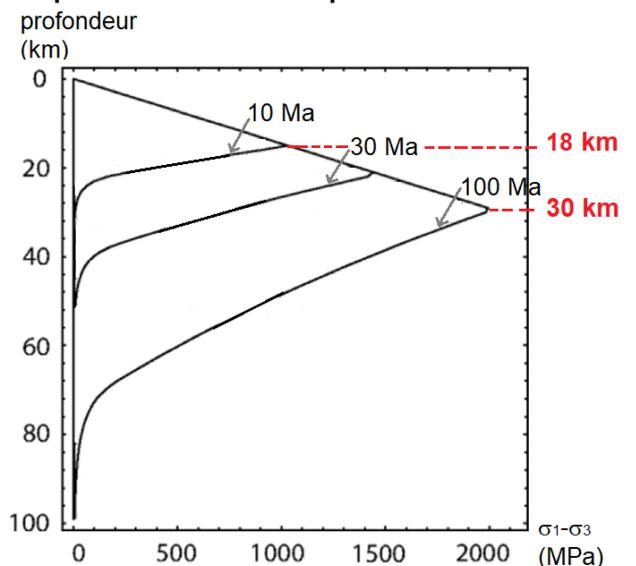
Enveloppe rhéologique de la lithosphère continentale

4a. Comparez l'enveloppe rhéologique de la lithosphère océanique à celle de la lithosphère continentale.

Le profil rhéologique de la lithosphère océanique ne présente qu'un seul domaine où la loi de Byerlee s'applique puis un seul domaine où la loi de fluage s'applique, contrairement à celui de la lithosphère continentale où l'on en distingue deux de chaque (d'abord pour la croûte, puis pour le manteau lithosphérique).

Pour une lithosphère océanique de 10 Ma, le pic de résistance est observé à une profondeur d'environ 18 km, et il n'y en a qu'un seul contrairement au cas de la lithosphère continentale.

Ce pic de résistance, qui marque la limite entre un domaine fragile et un domaine ductile, est d'autant plus profond que la lithosphère océanique est âgée : il se situe à environ 30 km de profondeur pour une lithosphère âgée de 100 Ma.



4b. Comment pouvez-vous expliquer les différences constatées ?

La profondeur du pic de résistance est plus importante que l'épaisseur d'une croûte océanique (7-10 km) donc ce pic de résistance ne se situe pas dans la croûte, mais dans le manteau lithosphérique. Il n'y a pas de découplage entre croûte et manteau lithosphérique dans la lithosphère océanique, contrairement à ce qui est constaté pour la lithosphère continentale. On distingue par conséquent seulement une lithosphère supérieure cassante et une lithosphère inférieure ductile. Cette différence peut s'expliquer par l'épaisseur plus fine de la CO, qui par conséquent

ne présente pas de croûte inférieure dans des conditions de pression et température permettant une déformation ductile.

La variation de la profondeur du pic de résistance avec l'âge peut s'expliquer par l'épaississement de la lithosphère océanique au cours du temps, dont la base coïncide avec l'isotherme 1300 °C quelle que soit l'épaisseur. La limite thermique entre lithosphère cassante et lithosphère ductile est d'autant plus profonde que la lithosphère est âgée.

II. Etude du contexte géodynamique du séisme du 12 janvier 2010 à Haïti

Le 12 janvier 2010, un séisme important a touché l'île d'Hispaniola dans les Caraïbes. Son épicentre se trouvait proche de Port-au-Prince, capitale de Haïti.

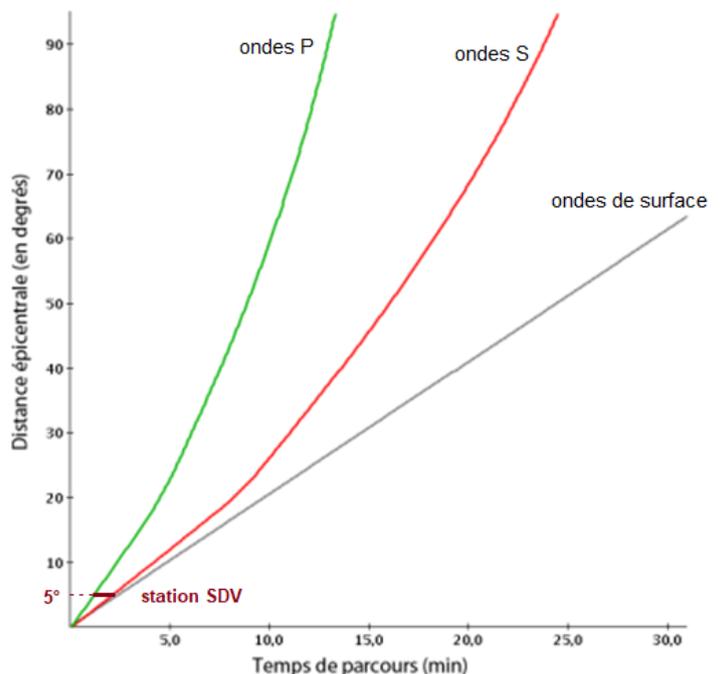
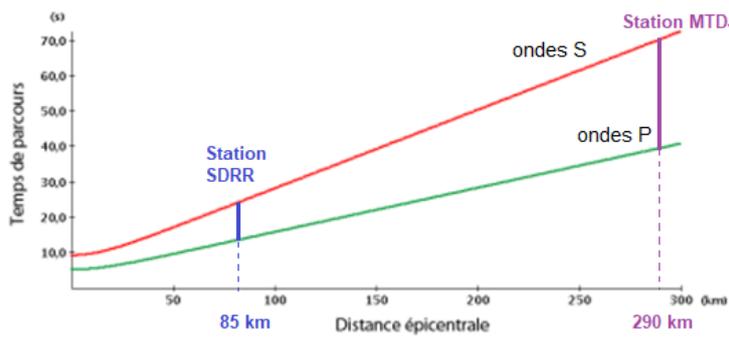
5. Utilisez les données des documents 5 et 6 pour localiser l'épicentre du séisme.

Vous expliquerez votre démarche et vous reporterez les résultats sur le document 4 en annexe p.16, à rendre avec votre copie.

- Le délai d'arrivée des ondes S par rapport aux ondes P permet de déterminer la distance qui sépare la station considérée de l'épicentre du séisme.
- On utilise pour cela les graphiques mettant en relation la distance parcourue et le temps de parcours (graphe 1 pour les deux premières stations, graphe 2 pour la troisième station. Attention, repérer qu'abscisses et ordonnées sont inversées entre ces deux graphiques).
- En utilisant un compas, on trace trois cercles autour des trois stations dont le rayon correspond à la distance établie entre chacune des stations et l'épicentre. L'intersection de ces trois cercles permet de localiser l'épicentre.

Code station	Localisation	Coordonnées	Heure d'arrivée des ondes P hh :mm :ss	Heure d'arrivée des ondes S hh :mm :ss	Délai d'arrivée des ondes S / ondes P	Distance lue sur le graphe
SDRR	Presa de Sabenta, République Dominicaine	19°N 289°W	22 :01 :07	22 :01 :17	10 s	85 km
MTDJ	Mount Denham, Jamaïque	18° N 282°5' W	22 :01 :48	22 :02 :20	32 s	290 km
SDV	Santo Domingo, Venezuela	9°N 290°W	22 :02 :59	22 :03 :59	1 min	5°

Document 5. Données issues de l'enregistrement du séisme dans trois stations sismiques (ces stations sont localisées par des triangles sur le document 4).



Document 6. Relation temps de parcours – distance parcourue pour les différents types d'ondes sismiques. (distance en km et temps en s pour le graphe du haut).

Pour tracer les cercles correspondants sur la carte (document 4) repérer que les graduations en ° évitent de convertir le résultat obtenu pour la station SDV, et que 1° = 11 mm sur la carte d'où 10 mm = 100 km.



Document 4. Carte de la région étudiée et localisation de trois stations sismiques : SDDR, MTDJ et SDV.

Au moins 50 répliques de magnitude supérieure à 4 ont été enregistrées dans les 8 jours qui ont suivi le séisme principal. Leur nombre a ensuite progressivement décru dans les semaines suivantes.

La distribution Est-Ouest des répliques suggère que la rupture a activé un segment long d'environ 60 km de la faille. **La surface totale de faille mise en jeu a été estimée de l'ordre de 1670 km². Le glissement cosismique entre les compartiments est de l'ordre de 2 m.** Le foyer du séisme a été localisé à 10 km de profondeur.

6. Utilisez ces informations pour calculer le moment sismique puis la magnitude de moment de ce séisme.

On calcule d'abord le moment sismique $M_0 = \mu DS$,
 où μ est le module élastique de cisaillement ($\mu = 30 \text{ GPa}$),
 D est la distance de glissement relatif des deux compartiments ; **dans le cas étudié $D \approx 2 \text{ m}$**
 S la surface totale de la faille (m^2) = **1670 km² x 10³ x 10³** (pour conversion en m²)

A.N. : $M_0 = 30 \cdot 10^9 \times 2 \times 1670 \cdot 10^6 = 3 \times 2 \times 167 \cdot 10^{17} \approx 1000 \times 10^{17} = 10^{20} \text{ Joules}$

On calcule alors la magnitude de moment M_w par la relation : $M_w = 2/3 \log_{10}(M_0) - 6$.

A.N. : $M_w = 2/3 \log_{10}(10^{20}) - 6 = 2/3 \times 20 - 6 = 13,3 - 6 = 7,3$

7. Expliquez comment, à partir de données telles que celles présentées sur le document 7, on peut déterminer un mécanisme au foyer.

Sur les sismogrammes enregistrés, on repère si le premier pic est vers le haut ou vers le bas. S'il est vers le haut, la station qui a produit le sismogramme est localisée sur un compartiment en compression (ex : PMSA, PPTF sur le document 7), s'il est vers le bas, la station qui a produit le sismogramme est localisée sur un compartiment en distension (ex : DAG, KEV sur le document 7).

La localisation des stations sur une carte permet ensuite de déterminer les limites des compartiments en distension et en compression, limites qui coïncident avec le plan de faille et le plan accessoire, et par conséquent de représenter la sphère focale qui correspond au mécanisme au foyer.

8. Identifiez la nature des mécanismes au foyer présentés sur le document 8. Compte-tenu de la localisation de l'épicentre du séisme étudié déterminée à la question 5, à quel type de mécanisme au foyer pouvez-vous vous attendre ?

- Les mécanismes au foyer localisés entre -72 et -68° de longitude sur le document 8 présentent tous le même aspect : un compartiment en compression encadré par deux compartiments en dilatation. Cette représentation correspond à un mécanisme au foyer en compression, lié au jeu d'une faille inverse.
- Les mécanismes au foyer localisés plus à l'Ouest présentent deux compartiments en distension et deux compartiments en compression ce qui caractérise les mécanismes de coulissage associés au jeu d'une faille décrochante.

Ils sont d'ailleurs localisés pour deux d'entre eux sur la faille septentrionale, pour les deux autres sur la faille d'Enriquillo-Plantain, qui sont toutes deux orientées Est-Ouest. On peut ainsi orienter le décrochement : il est sénestre pour ces deux failles.

Nous avons localisé l'épicentre du séisme étudié à un peu plus de -72° (soit un peu moins de 288°W) de longitude et 18° de latitude : il est donc situé sur la faille d'Enriquillo-Plantain : son mécanisme est probablement sénestre.

9. En exploitant les données des documents 8 et 9, déterminez le contexte géologique qui explique la sismicité de la région.

Les mécanismes au foyer en compression repérés sur le document 8 sont approximativement alignés selon un axe NW – SE qui pourrait correspondre à une frontière de plaques en convergence. Nous sommes en domaine océanique : contexte de subduction ?

Les mécanismes au foyer en coulissage sont associés à des failles décrochantes senestres orientées E – W qui pourraient contribuer à accommoder la convergence.

Le document 9 présente les vitesses de déplacement mesurées par GPS en considérant la plaque Nord-américaine fixe. Les vecteurs localisés sur la plaque Caraïbe sont orientés ENE au niveau de Haïti et NE au niveau des îles des Antilles situées dans le quart SE de la carte. Les premiers tendent à être parallèle à la frontière de plaques représentée sur le document. Ces vecteurs traduisent donc un mouvement relatif convergent entre les deux plaques qui tend à être décrochant dans la partie Ouest de la carte. L'orientation de ces mouvements est cohérente avec les mécanismes au foyer représentés sur le document 8.

On observe de plus sur cette carte que les îles sont localisées sur un arc de cercle, et constituent donc un arc insulaire.

L'ensemble de ces observations permet donc de conclure que la sismicité de la région est due à un contexte de convergence associé à une subduction de la plaque Nord-américaine sous la plaque Caraïbe.

NB :
L'arc insulaire est localisé sur la plaque chevauchante ce qui aide à déterminer quelle est la plaque subduite et quelle est la plaque chevauchante.

« trench » signifie « fosse », la carte permet donc de localiser la fosse de Puerto Rico et la fosse des Petites Antilles.

Question 1 :

1a. Quelles sont les caractéristiques qui vous permettent d'identifier une anaphase sur la figure 1B ?

Sur la figure 1B, on observe que la cellule présente une forme allongée (longueur 10 µm environ) avec un étranglement qui commence à séparer deux compartiments de taille inégale : une cellule-mère et un bourgeon. L'immunofluorescence met en évidence la présence de deux centres organisateurs des microtubules (COM), localisés l'un côté cellule mère, l'autre dans le bourgeon, entre lesquels le fuseau mitotique long de 5µm est orienté selon l'axe cellule-mère-bourgeon.

Par comparaison avec le schéma de la figure 1A, cette répartition des structures mises en évidence par immunofluorescence coïncide avec un matériel génétique séparé en deux lots, l'un dans la cellule mère, l'autre dans le bourgeon, ce qui caractérise l'anaphase.

1b. D'après les figures 1 et 2A, comment qualifieriez-vous le phénotype A ? Proposez un lien entre le phénotype B et le phénotype C.

Le phénotype A correspond aux représentations schématiques de la figure 1 : cellule-mère en phase G1 ou en phase G2 ou en anaphase. Il s'agit donc d'un témoin.

Les phénotypes B et C correspondent à des situations anormales :

- en B le fuseau mitotique est mis en place dans la cellule-mère et non entre cellule-mère et bourgeon, et son orientation est transversale par rapport à l'axe cellule mère – bourgeon ;
- en C une cellule-fille contient deux lots de matériel génétique alors que la deuxième n'en a pas.

L'orientation anormale du fuseau de division observée pour le phénotype B pourrait avoir comme conséquence que les deux lots de matériel génétique resteraient localisés dans la même cellule à l'issue de l'anaphase, et c'est ce que l'on constate pour le phénotype C.

On peut donc proposer que le phénotype C résulte de la poursuite de la mitose anormale réalisée chez le phénotype B.

1c. Analysez et interprétez les résultats des figures 2B et 2C.

Dans la figure 2B, pour la souche WT qui correspond au témoin, presque 100 % des cellules ont le phénotype A normal, tout comme la souche mutante kin4Δ. Ces souches ne présentent peu voire pas de phénotypes anormaux (B et C).

Il n'y a donc pas de différence entre les deux souches : la mutation de la protéine kin4 semble sans effet sur le déroulement de la mitose.

Chez le mutant dyn1Δ, 81 % des cellules sont de phénotype A et 19 % des cellules sont de phénotype B c'est-à-dire avec un défaut d'orientation du fuseau mitotique.

Or l'énoncé indique que la suppression de l'expression de la dynéine 1 chez les mutants (dyn1Δ) favorise un défaut d'orientation du fuseau mitotique.

Les 19 % de phénotype B dans ce cas sont ainsi expliqués.

Chez le double mutant dyn1Δkin4Δ, seules 56 % des cellules sont de phénotype A, 2 % sont de phénotype B et 42 % de phénotype C.

Par comparaison avec les simples mutants dyn1Δ, on constate ainsi qu'il y a moins de phénotypes normaux, très peu de phénotypes B et beaucoup de phénotypes C avec deux lots de matériel génétique dans la même cellule.

Il apparaît donc que l'effet de la mutation kin4 se révèle seulement en l'absence d'expression du gène dyn1 (mutation dyn1Δ)

Or les phénotypes C résulteraient de la poursuite de la mitose chez les phénotypes B.

On peut donc proposer que la mitose a été bloquée en anaphase chez les mutants dyn1Δ présentant un défaut d'orientation du fuseau, alors qu'elle n'a pas été bloquée chez les doubles mutants dyn1Δkin4Δ présentant ce même défaut, ce qui aboutit aux phénotypes C.

On peut donc conclure que la protéine Kin4 participerait à l'arrêt de la division en anaphase en cas de mauvaise orientation du fuseau mitotique.

La figure 2C indique la durée de l'anaphase chez les mutants dyn1Δ et dyn1Δ kin4Δ.

Concernant les cellules de phénotype A, qu'il s'agisse des mutants dyn1 Δ ou des doubles mutants dyn1Δ kin4Δ l'anaphase dure 30 min et les barres d'erreurs se chevauchant, il n'y a pas de différence significative entre elles

De même, chez les mutants dyn1Δ kin4Δ de phénotype B, l'anaphase dure aussi 30 min sans différence significative avec les précédentes puisque les barres d'erreurs se chevauchent.

En revanche après plus de 150 min aucun des mutants *dyn1Δ* de phénotype B, qui présentaient donc un défaut d'orientation du fuseau mitotique, n'a terminé son anaphase.

On met donc en évidence l'existence d'un mécanisme de blocage de la division cellulaire en anaphase en cas de mauvaise orientation du fuseau mitotique, qui fait intervenir la protéine kin4.

1d. Proposez une condition expérimentale complétant les données de la figure 2C.

Quelle information apporterait-elle ?

On pourrait compléter les données de la figure 2C en ajoutant des données concernant la durée de l'anaphase chez le témoin WT, afin d'évaluer s'il existe une différence de cinétique de l'anaphase entre témoin et mutants de phénotype A.

Question 2 :

2a. Analysez et interprétez la figure 3.

L'expérience dont les résultats sont présentés dans la figure 3 utilise la souche Gal-KIN4 chez laquelle on peut provoquer la surexpression du gène Kin4 par l'ajout de galactose dans le milieu.

Le graphique 3A de gauche montre que pour la souche sauvage (témoin) il n'y a aucune cellule en métaphase jusqu'à 40 min, ensuite leur nombre augmente pour atteindre un maximum de près de 60 % à 70 min. Ce nombre diminue ensuite jusqu'à moins de 5 % à 130 min. Il n'y a aucune cellule en anaphase jusqu'à 70 min, ensuite leur nombre augmente pour atteindre un maximum de près de 60 % à 100 min. Ce nombre diminue ensuite jusqu'à moins de 10 % à 150 min.

Les deux courbes sont très ressemblantes et décalées dans le temps d'environ 30 min ce qui suggère que la durée de la métaphase est de 30 min.

Le graphique 3A de droite montre que pour la souche Gal-KIN4 la fréquence des cellules en métaphase est un peu plus étalée dans le temps que pour les sauvages, puisqu'à 40 min on en observe déjà 3%, le pic à 70 min est un peu moins élevé, mais globalement cette phase ne semble pas affectée par la surexpression du gène.

En revanche, la différence est très marquée pour les cellules en anaphase au-delà de 100 min puisque leur % continue d'augmenter jusqu'à 70 % environ au bout de 120 min, et il ne diminue pas ensuite.

L'absence de terminaison de l'anaphase peut être mise en relation avec la surexpression du gène Kin4 en présence de galactose et permet de conclure que Kin4 inhibe la division des cellules, bloquant celles-ci en anaphase.

La figure 3B permet de comparer le nombre de colonies obtenues après mise en culture à différentes dilutions pour les souches sauvages et mutantes Gal-KIN4 en milieu standard et en présence de galactose.

En conditions standard, les souches témoin et mutante présentent le même nombre de colonies pour chacune des dilutions (sauf pour la dilution 4, pour laquelle on observe 6 colonies de WT contre 1 seule de Gal-KIN4, mais la différence est sans doute seulement liée à l'aléa du nombre de cellules déposées lors de l'ensemencement).

En revanche, en présence de galactose, on n'observe que 7-8 colonies pour les souches Gal-KIN4 à la dilution 1, deux à la dilution 2 et aucune à plus grande dilution, alors que cette condition ne change rien pour les souches sauvages.

Or la surexpression de *kin4* est dépendante de la présence de galactose dans le milieu. Ainsi, le nombre réduit de colonies, donc de cellules, lorsque la protéine kin4 est synthétisée en excès confirme que kin4 inhibe la division des cellules.

2b. Proposez, en la justifiant, une condition expérimentale complétant les données de la figure 3A.

Pour compléter les données de la figure 3A, la condition « milieu standard » serait intéressante et permettrait de vérifier que la présence de galactose est sans effet sur les cellules WT (dans le cas contraire le galactose pourrait avoir un autre effet que celui attendu sur l'expression de *kin4*).

2c. D'après les figures 2 et 3, concluez quant au rôle et à l'importance de la protéine Kin4.

En conclusion, la protéine Kin4 bloquerait les cellules en anaphase et son action serait activée lorsque le fuseau mitotique est mal positionné ; ce rôle est essentiel pour assurer une répartition équitable du matériel génétique dans les cellules filles issues de la mitose et empêcher l'apparition de cellules polypléïdes.

Question 3 :

3a. Précisez quel est l'intérêt d'utiliser du ³²P dans cette expérience.

³²P est un isotope instable du P, par conséquent le repérage et la quantification de la radioactivité permet de localiser et de quantifier les molécules qui contiennent un groupement phosphate dont le P est radioactif.

Seul le 3^e groupement phosphate de GTP contient un ³²P, donc l'hydrolyse produit un GDP non radioactif et libère un groupement Pi radioactif.

Ainsi, Tem1 est associée à de la radioactivité lorsqu'elle est liée au GTP non hydrolysé, en revanche elle n'est pas radioactive lorsqu'elle a hydrolysé le GTP en GDP + Pi. On mesure donc, par l'intermédiaire de la radioactivité, la proportion de Tem1 liée au GTP, forme activée de la protéine qui intervient dans la terminaison de l'anaphase.

3b. Analysez qualitativement et interprétez la figure 4A. Conclure sur le rôle possible de Bfa1 lors de la mitose.

A $t = 0$, 100 % de Tem1 est radioactive. Cette proportion diminue plus rapidement au cours du temps lorsque la protéine Bfa1 est ajoutée au milieu : environ 40 % au bout de 4 min en l'absence de Bfa1, contre moins de 10 % en présence de Bfa1.

La diminution de la proportion de Tem1 radioactive au cours du temps peut s'expliquer par l'hydrolyse du GTP auquel elle est liée.

La protéine Bfa1 stimule donc l'hydrolyse du GTP lié à Tem1 (activité GTPase). Ainsi la protéine Tem1 devient inactive (forme Tem1-GDP) ce qui empêche la terminaison de l'anaphase.

La protéine Bfa1 a donc un effet inhibiteur sur la poursuite de mitose au-delà de l'anaphase.

Question 4 :

Dans une figure complexe comme présentée ici, il est primordial de procéder méthodiquement, en analysant dans un premier temps les conditions « contrôle » (ou simple mutant) et en procédant à des comparaisons judicieuses pour conclure sur l'effet de tel ou tel gène.

4a. D'après la figure 5A, la protéine Bfa1 agit-elle en amont ou en aval de Kin4 ? Justifiez.

Les expériences dont les résultats sont présentés sur la figure 5A sont réalisées sur un milieu contenant du galactose, qui permet la surexpression de KIN-4 pour les souches Gal-KIN4.

Les résultats obtenus avec les souches WT (témoin) et Gal-KIN4 sont identiques à ceux de la figure 3B montrant que la surexpression de Kin4 inhibe la division des cellules.

La souche dont le gène Bfa1 est supprimé ($bfa1\Delta$) présente le même nombre de colonies aux différentes dilutions que le témoin WT, la seule suppression de ce gène est donc sans effet sur la division des cellules.

La souche Gal-KIN4 $bfa1\Delta$ présente le même nombre de colonies aux différentes dilutions que le témoin WT, ce qui montre que la surexpression de Kin4 est sans effet en l'absence de Bfa1.

Ainsi Bfa1 est nécessaire à l'action inhibitrice de Kin4 sur la division cellulaire et agit donc en aval de Kin4.

4b. D'après la figure 5B, quel est l'effet de la protéine Lte1 ? Justifiez.

Les expériences dont les résultats sont présentés sur la figure 5B sont réalisées sur un milieu standard.

La souche dont le gène Lte1 est supprimé ($lte1\Delta$) présente moins de colonies que le témoin WT aux dilutions 2 et 3, et aucune à partir de la 4^{ème} dilution.

En l'absence de Lte1, les mitoses sont moins nombreuses : Lte1 intervient donc dans le bon déroulement de la mitose.

4c. Comparez les double et simple mutants : quels liens pouvez-vous en déduire entre Lte1 et Bfa1, Kin4 ?

Les souches double-mutantes, $lte1\Delta bfa1\Delta$ et $lte1\Delta kin4\Delta$, prolifèrent aussi comme le témoin (et comme $bfa1\Delta$).

Lorsque les souches présentent une double délétion des gènes Lte1 et Bfa1 ($lte1\Delta bfa1\Delta$) ou Lte1 et Kin4 ($lte1\Delta kin4\Delta$), il y a autant de colonies pour chacune des dilutions que pour le témoin WT ou les simples mutants $bfa1\Delta$ et $kin4\Delta$. La délétion de Lte1 est donc sans effet.

On peut alors faire l'hypothèse que lorsque ces gènes sont fonctionnels, Lte1 agit sur ces protéines : elle inhiberait le blocage de la mitose par Kin4/Bfa1.

4d. Analysez la figure 5C. Que pouvez-vous en déduire concernant le lien entre Cdc5 et Bfa1 ?

Les expériences dont les résultats sont présentés sur la figure 5C sont réalisées sur un milieu standard.

Les souches cultivées possèdent toutes une protéine Cdc5 thermosensible, qui doit être dénaturée au-delà d'une certaine température, et donc perdre sa fonction.

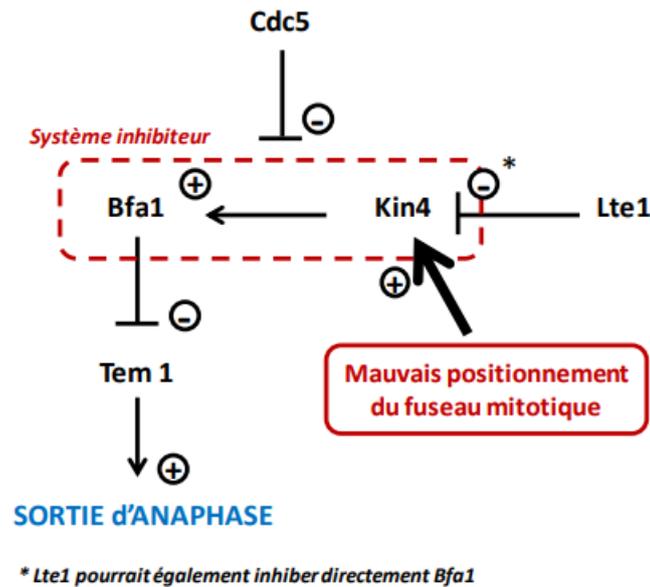
Pour les cultures à 24°C, il y a autant de colonies pour chacune des dilutions que le gène Bfa1 soit délété ou fonctionnel.

Pour les cultures à 32°C, seules quelques colonies sont présentes à la dilution 1, deux colonies à la dilution 2, alors que Cdc5 thermosensible a perdu sa fonctionnalité. Le nombre de mitose a donc été réduit, la mitose a été inhibée.

En revanche, pour les souches dont le gène Bfa1 a été délété, on observe le même nombre de colonies aux différentes dilutions que pour les souches cultivées à 24°C. Il n'y a pas eu d'inhibition de la mitose.

On peut alors proposer que lorsque Cdc5 est fonctionnelle, elle empêche l'action inhibitrice de Bfa1 sur le déroulement de la mitose.

Ce n'était pas demandé dans le sujet mais toutes ces informations peuvent être résumées dans le schéma ci-dessous :



Réseau de régulation de la transition Anaphase-Télophase

Les flèches associées à un signe « + » indiquent une activation alors que les barres associées à un signe « - » indiquent une inhibition. Le système inhibiteur principal constitué de Kin4 et Bfa1 est encadré en rouge.

[Pas de question 5]

Question 6 :

6a. Figure 6A et 6B : Quel est le rôle de la GAPDH dans cette expérience ?

La GAPDH est une protéine dont la concentration ne varie pas au cours du cycle cellulaire, c'est donc un témoin de charge permettant de valider l'expérience.

6b. Que pouvez-vous déduire de l'analyse des résultats quant à l'état de Bfa 1 au cours du cycle cellulaire ?

Bfa1 est spécifiquement mise en évidence grâce à des anticorps.

La figure 6A permet de suivre la quantité de protéine Bfa1 présente au cours du cycle cellulaire.

De 0 à 40 min, une seule bande de même largeur est observable : Bfa1 est présente en quantité constante sous une forme de poids moléculaire < 70 kDa (elle migre un peu au-delà). Puis de 50 à 110 min, soit juste avant le début de l'anaphase et juste après sa fin, on observe deux bandes moins larges : Bfa1 est présente sous deux formes : l'une de poids moléculaire < 70 kDa l'autre de poids moléculaire > 70 kDa puisqu'elle a migré moins loin.

Puis de 130 à 150 min, en G1, les résultats sont identiques à ceux obtenus de 0 à 40 min : Bfa1 est à nouveau présente sous une seule forme, celle < 70 kDa.

Etant données les conditions dénaturantes, la forme de moléculaire > 70 kDa doit s'expliquer par l'ajout d'un groupement lié à Bfa1 par liaison covalente.

La figure 6B montre qu'en présence de phosphatase, une enzyme qui catalyse la suppression d'un groupement phosphate, on obtient une seule bande correspondant à Bfa1 de poids moléculaire < 70 kDa, alors qu'en l'absence de cette enzyme on observe deux bandes, l'une correspondant à Bfa1 de poids moléculaire < 70 kDa, l'autre à Bfa1 de poids moléculaire > 70 kDa.

Ces bandes coïncident avec celles observées sur la figure 6A.

On peut en déduire que la forme de poids moléculaire > 70 kDa est une forme phosphorylée de Bfa1.

La mise en relation de ces deux séries de résultats permet de conclure que Bfa1 est phosphorylée peu avant l'anaphase puis déphosphorylée en début de phase G1.

6c. Quel est l'intérêt d'utiliser des anticorps dans l'expérience dont les résultats sont présentés figure 6C ?

Les informations fournies concernant le protocole indiquent que préalablement à la réalisation du Western-blot « précipitation », l'extrait cellulaire a été co-incubé avec des anticorps reconnaissant la protéine Tem1, ce qui entraîne la précipitation de ces protéines Tem1liées à l'Ac (mais pas des protéines qui ne sont pas liées à l'anticorps). On peut ainsi séparer un précipité contenant les protéines liées à l'Ac (utilisées pour le dépôt de la piste de gauche) du surnageant contenant les protéines non liées à l'Ac (utilisé pour le dépôt de la piste de droite).

6d. Que pouvez-vous déduire des résultats présentés dans cette figure quant aux relations entre Bfa1 et Tem1 ?

Les pistes « extrait avant précipitation » montrent Bfa1 (deux bandes, comme sur le document 6A à 70 min) et Tem1 (une bande) : elles servent de contrôle/témoin à l'expérience.

Après précipitation, on observe :

- pour la piste L (culot correspondant aux protéines liées par l'Ac anti-Tem1) : une bande pour Tem1, une bande pour Bfa1 de poids moléculaire < 70 kDa. On peut en déduire que Bfa1 est sous sa forme non phosphorylée, et sa présence dans cet extrait suggère qu'elle est liée à Tem1 (qui est elle-même liée à l'anticorps qui lui est spécifique).
- pour la piste NL (surnageant correspondant aux protéines non liées par l'Ac anti-Tem1) : une bande étroite pour Tem1 qui indique qu'il reste de la protéine Tem1 qui n'a pas été liée à l'Ac et précipitée, deux bandes pour Bfa1, l'une large correspondant à un poids moléculaire > 70 kDa, l'autre peu marquée correspondant à un poids moléculaire < 70 kDa. Cela indique qu'il y a majoritairement la forme phosphorylée de Bfa1 (bande large) et un peu de Bfa1 non phosphorylée (bande étroite).

On peut alors conclure que la protéine Tem1 est capable de se lier à la protéine Bfa1 sous sa forme non phosphorylée, au cours de l'anaphase (puisque l'extrait a été prélevé à 70 min).

6e. Quel pouvez-vous déduire des résultats présentés dans les figures 6D et 6E sur les relations entre Bfa1 et Cdc5 ?

Les résultats présentés sur la figure 6D résultent d'une autoradiographie du ³²P, après avoir incubé des protéines avec de l'ATP contenant du ³²P dans son groupement phosphate γ , puis extrait et soumis à électrophorèse ces protéines : on étudie *in vitro* la phosphorylation, à partir d'ATP, de protéines présentes dans le test.

Puits 1 : seule la protéine Cdc5 a été incubée avec l'ATP. Elle est détectée, donc phosphorylée ; on constate que son poids moléculaire est de 80 kDa.

Puits 2 : seule la protéine Cdc5 inactivée a été incubée avec l'ATP. Pas de détection donc la protéine Cdc5-in ne peut pas être phosphorylée.

Puits 3 : seule la protéine Bfa1 a été incubée avec l'ATP. Pas de détection donc la protéine Bfa1 ne peut pas être phosphorylée.

L'analyse des puits 1, 2, 3 permet de conclure à l'autophosphorylation de Cdc5 (puisque'il n'y a pas d'autre protéine ajoutée) qui a alors un poids moléculaire d'environ 80 kDa (et pas d'autophosphorylation possible de Bfa1).

Puits 4 : Bfa1 et Cdc5 ont été incubées avec l'ATP. On observe deux bandes, l'une vers 80 kDa qui correspond donc à Cdc5 phosphorylée, l'autre <70 kDa qui correspond donc à Bfa1 phosphorylée.

Puits 5 : Bfa1 et Cdc5-in ont été incubées avec l'ATP. On n'observe aucune bande : il n'y a aucune protéine phosphorylée dans ce cas.

Les puits 4 et 5 permettent de conclure à la phosphorylation de Bfa1 par Cdc5 *in vitro*.

La figure 6E présente une expérience similaire à celle de la figure 6A, cette fois avec une souche de levure dont le gène *cdc5* est délété. La souche ne possède donc pas de protéine Cdc5 fonctionnelle.

On observe quel que soit le moment du cycle une seule bande qui correspond à un poids moléculaire < 70 kDa, on peut donc en déduire qu'en l'absence de Cdc5 fonctionnelle, Bfa1 est sous forme non phosphorylée tout au long du cycle.

Par comparaison avec la figure 6A, on déduit le rôle indispensable de Cdc5 dans la phosphorylation de Bfa1 en anaphase *in vivo*.

On peut récapituler les conclusions de ces différentes expériences de la façon suivante :

Au moment de l'anaphase, Cdc5 est responsable de la phosphorylation de Bfa1.

Cette phosphorylation empêche l'interaction de Bfa1 avec Tem1, ce qui lève l'inhibition de Tem1 par Bfa1.

Tem1 est par conséquent active et va permettre la sortie d'anaphase.

Question 7 :

7a. A partir de l'analyse des résultats de l'expérience 7A, déduire l'effet de Kin-4 sur Bfa1.

La figure 7A montre que lorsque Bfa1 est préincubée avec Kin4 on observe une bande qui correspond à un poids moléculaire > 70 kDa, on peut en déduire que Bfa1 est phosphorylée.

L'autoradiographie montre également une bande qui indique la présence d'un groupement phosphate radioactif et confirme l'interprétation précédente.

Lorsque Bfa1 est préincubée avec une version inactive de Kin4, on observe une bande qui correspond à un poids moléculaire < 70 kDa, on peut en déduire que Bfa1 n'est pas phosphorylée. L'autoradiographie ne montre pas de bande : cela confirme qu'il n'y a pas de groupement phosphate radioactif lié à la protéine.

Ainsi, cela permet de conclure que Kin4 phosphoryle Bfa1 *in vitro*.

7b. A partir de l'analyse des résultats de l'expérience 7B, dégagez la différence entre l'effet de Kin-4 et celui de Cdc5 sur Bfa1.

La figure 7B permet de préciser la localisation de la phosphorylation de Bfa1 puisqu'on utilise des anticorps qui permettent de reconnaître spécifiquement Bfa1 phosphorylée sur un site 1 et Bfa1 phosphorylée sur un site 2.

Lorsque Bfa1 est seule (piste 1) ou préincubée avec Kin4 inactive (piste 5) la bande observée correspond à un poids moléculaire < 70 kDa, soit la forme non phosphorylée de Bfa1. Il n'y a pas de bande sur les pistes correspondant à la mise en évidence spécifique de site 1 ou 2 phosphorylée, les résultats sont cohérents.

Lorsque Bfa1 est incubée avec Cdc5 (piste 2) ou préincubée avec Kin4 inactive puis incubée avec Cdc5 (piste 6), on observe une bande correspondant à un poids moléculaire > 70 kDa, soit la forme phosphorylée de Bfa1, et dans les deux cas également on observe une bande correspondant à la détection du site 2 phosphorylé.

On peut en déduire que Cdc5 phosphoryle Bfa1 sur son site 2.

Lorsque Bfa1 est préincubée avec Kin4 (piste 3), ou lorsqu'elle est préincubée avec Kin4 puis incubée avec Cdc5 (piste 4), on observe une bande correspondant à un poids moléculaire > 70 kDa, soit la forme phosphorylée de Bfa1. On observe d'autre part une bande correspondant à la détection du site 1 phosphorylé.

On peut en déduire que Kin4 phosphoryle Bfa1 sur le site 1, et cela inhibe la phosphorylation par Cdc5 sur le site 2.

En conclusion, Kin4 et Cdc5 phosphorylent Bfa1 sur deux sites différents, respectivement le site 1 et le site 2, et lorsque le site 1 est phosphorylé, la phosphorylation du site 2 est inhibée.

7c. Dans l'expérience 7C, quel est le rôle de la GFP ?

Il est dit qu'il n'y a pas d'interaction entre la GFP et Kin4. La condition GFP + Kin4 sert donc de témoin et permet de déterminer que Kin4 a une activité catalytique (kinase) de 1 UA.

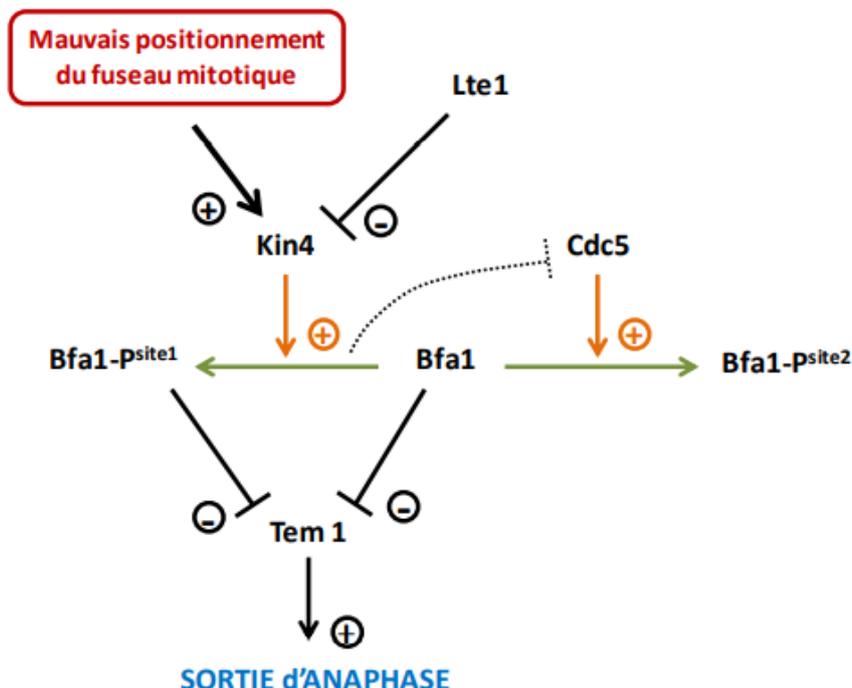
7d. Quel effet de Lte1 sur Kin4 pouvez-vous déduire de l'analyse de ces résultats ?

La figure 7C montre que l'activité kinase de Kin4 est près de 4 fois plus élevée pour un ratio Lte/Kin4 de 1,5 que pour un ratio de 10 : plus le ratio Lte1/Kin4 est élevé, plus l'activité kinase de Kin4 est faible.

On peut en déduire que Lte1 inhibe l'activité catalytique de Kin4. Cette observation est réalisée pour des expériences réalisées *in vitro*, par conséquent c'est l'interaction directe de Lte1 avec Kin4 qui est responsable de cette inhibition.

Question 8 : En admettant que Bfa1 phosphorylée sur le site 1 a le même effet sur Tem1 que Bfa1 non phosphorylée, réalisez un schéma bilan résumant les informations tirées des figures 2 à 7.

Dans le schéma proposé ci-dessous, les flèches associées à un signe « + » indiquent une activation alors que les barres associées à un signe « - » indiquent une inhibition. Les flèches orange indiquent qu'il s'agit d'une activation par phosphorylation ; les traits pointillés indiquent une interaction dont le mécanisme est hypothétique.



Réseau de régulation de la transition Anaphase-Télophase et point de contrôle de la position du fuseau mitotique