



Université de Lyon

Concours PACES 2019-2020



Epreuve du Jeudi 12 décembre 2019 – 14h00 / 15h00
Durée de l'épreuve : 60 minutes

Ce fascicule comprend 9 pages numérotées.

Nombre de questions : 15

Les questions sont notées sur 5 points.

L'ensemble correspond à un total de 75 points.

En réponse à chaque question vous pouvez noircir **zéro à cinq cases** sur la grille correspondant à des propositions **justes**.

IMPORTANT : vous devez impérativement vérifier au début de l'épreuve que votre livret est complet.

L'accumulation de protéines mal repliées entraîne l'activation d'une réponse cellulaire, le système UPR ("unfolded protein response"). Cette activation implique entre autres la dimérisation de IRE1, une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique (RE). On sait qu'une fois dimérisée, IRE1 possède une activité endoribonucléase qui va modifier dans le cytoplasme l'ARN du facteur de transcription XBP1 pour permettre la traduction d'une forme fonctionnelle de XBP1. Afin d'étendre les connaissances de cette voie, on recherche des protéines pouvant interagir avec IRE1.

Parmi les interacteurs potentiels de IRE1 les chercheurs identifient la filamine A (FLNA). Pour rappel, la filamine A crée des ponts entre les filaments d'actine pour les organiser en réseau.

Question 1 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. les protéines du nucléoplasme se replient dans le cytosol
- B. les protéines du RE qui sont mal repliées sont dégradées dans les lysosomes
- C. l'activation du système UPR provoque généralement une diminution de la synthèse des protéines chaperons
- D. lorsqu'une protéine transmembranaire de la membrane plasmique a été N-glycosylée, la N-glycosylation s'est toujours effectuée sur des asparagines présentes dans une partie extracellulaire de la protéine
- E. les protéines chaperons de la famille Hsp70 consomment de l'ATP

Question 2 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. les filaments d'actines sont constitués de monomères d'actine alpha et d'actine beta
- B. les monomères d'actine fixent le GTP
- C. les filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles déterminent la forme des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin
- D. l'actine participe à la cytodierèse
- E. la liaison des kinésines et des dynéines aux filaments d'actine permet aux cellules de se déplacer

Question 3 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

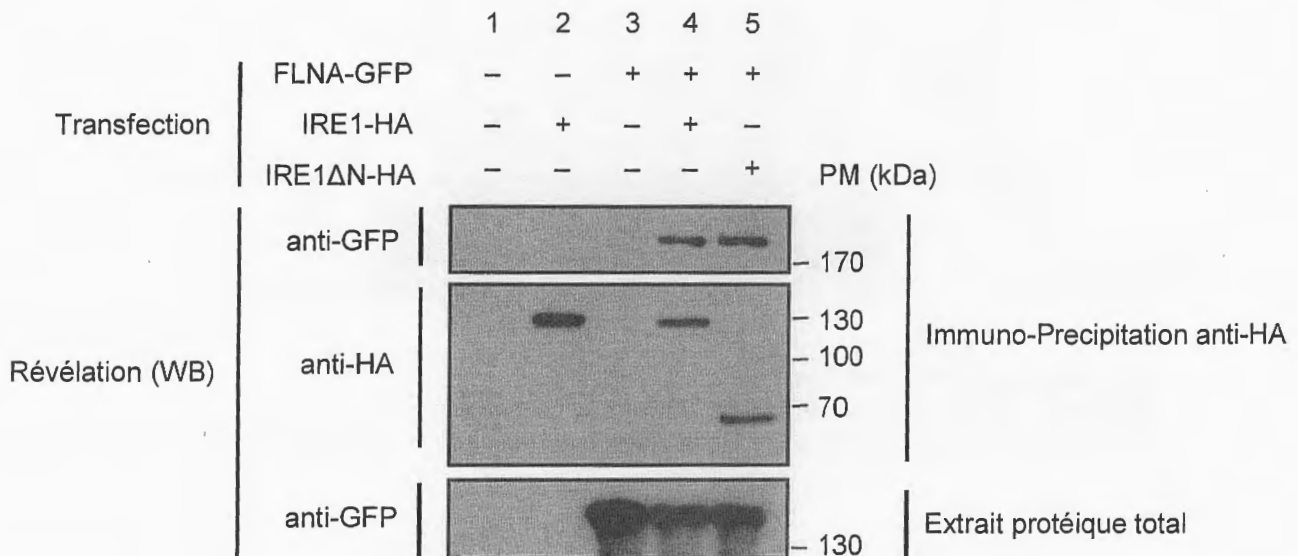
- A. la lamine est un filament intermédiaire
- B. le raccourcissement des microtubules du fuseau mitotique participe à la séparation des chromatides soeurs au cours de la mitose.
- C. pendant la mitose certains microtubules relient les pôles du fuseau mitotique à la membrane plasmique
- D. pendant la mitose, les microtubules perforent l'enveloppe nucléaire pour s'attacher aux kinétochores
- E. la contraction des filaments d'actine donne sa forme ovale au fuseau mitotique

Expérience 1 :

Les chercheurs cherchent à confirmer l'interaction entre IRE1 et la filamine A. Pour cela, ils transfectent des cellules HEK avec des vecteurs permettant l'expression de la forme entière de IRE1, de sa portion cytosolique uniquement (ΔN), ou de la filamine A fusionnée à la GFP. Pour faciliter sa détection, une séquence codant le peptide viral HA (9 acides aminés) est ajoutée en phase à la séquence de IRE1.

Une co-immunoprécipitation est réalisée avec des anticorps anti-HA de souris. L'extrait protéique de départ et les protéines immuno-precipitées sont analysés par western blot avec des anticorps anti-HA ou anti-GFP.

Remarque : la piste 1 correspond à l'expérience réalisée sur des cellules non transfectées.



Question 4 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

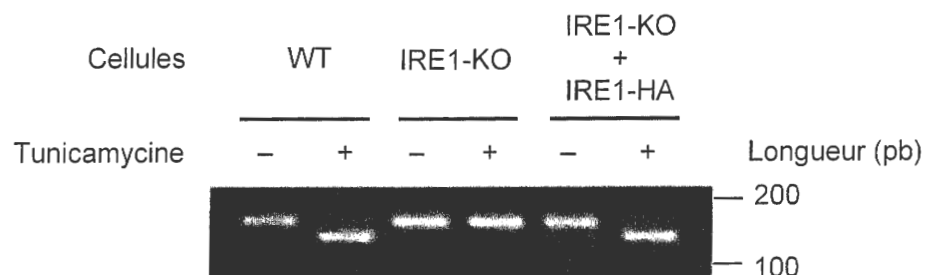
- A. l'absence de signal dans la piste 1 indique que la filamine A n'est pas exprimée dans les cellules HEK
- B. les contrôles montrent qu'on a bien utilisé une quantité équivalente d'extrait protéique dans toutes les conditions
- C. la filamine A interagit aussi bien avec IRE1 entière que IRE1 tronquée
- D. on peut exclure que la filamine A puisse interagir avec le peptide viral HA
- E. on peut exclure que les anticorps anti-HA puissent capter la filamine A

Question 5 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. le mutant ΔN de IRE1 a une masse moléculaire un peu inférieure à 70 kDa
- B. la masse moléculaire de la GFP est supérieure à 130kDa
- C. cette expérience ne prouve pas que la filamine A codée par le noyau interagit avec la protéine IRE1 codée par le noyau
- D. un avantage de travailler avec des protéines de fusion est de pouvoir utiliser des anticorps dirigés contre la partie rajoutée quand il n'existe pas d'anticorps disponible pour la protéine d'intérêt
- E. pour montrer une interaction directe, on aurait pu réaliser une co-immunoprécipitation avec des protéines filamine A et IRE1-HA purifiées

Expérience 2 :

Afin de confirmer cette interaction avec la filamine A, le gène codant IRE1 est inactivé dans des fibroblastes embryonnaires (MEFs) grâce au système CRISPR-Cas9. Les cellules KO ainsi produites sont ensuite transfectées avec un plasmide codant la fusion IRE1-HA placée sous le contrôle du promoteur de IRE1. On teste la capacité de IRE1-HA à modifier l'ARNm de XBP1. Les cellules sont traitées ou non à la tunicamycine, qui bloque la N-glycosylation des protéines, générant ainsi une surcharge en protéines mal repliées et un stress du réticulum. Les ARN sont ensuite purifiés, soumis à la Transcriptase inverse pour produire des ADNc qui seront amplifiés par PCR. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un intercalant fluorescent de l'ADN (le bromure d'éthidium).



WT : MEFs contrôle, non modifiées par CRISPR

IRE1-KO : MEFs KO pour IRE1

IRE1-KO+IRE1-HA : MEFs KO transfectées avec les plasmides exprimant IRE1-HA

Question 6 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. la technique CRISPR-Cas9 permet de modifier la séquence d'ADN à un endroit précis du génome
- B. la protéine Cas9 est une endonucléase
- C. dans la technique CRISPR-Cas9, l'ARN "guide" inactive l'expression du gène ciblé par dégradation de son ARN messager
- D. la transgénèse classique par injection d'un fragment ADN dans un ovocyte fécondé permet de cibler l'intégration du fragment dans les régions exprimées du génome
- E. la transgénèse par recombinaison homologe nécessite d'injecter dans les ovocytes fécondés un ADN homologue à la région ciblée en plus du transgène

Question 7 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

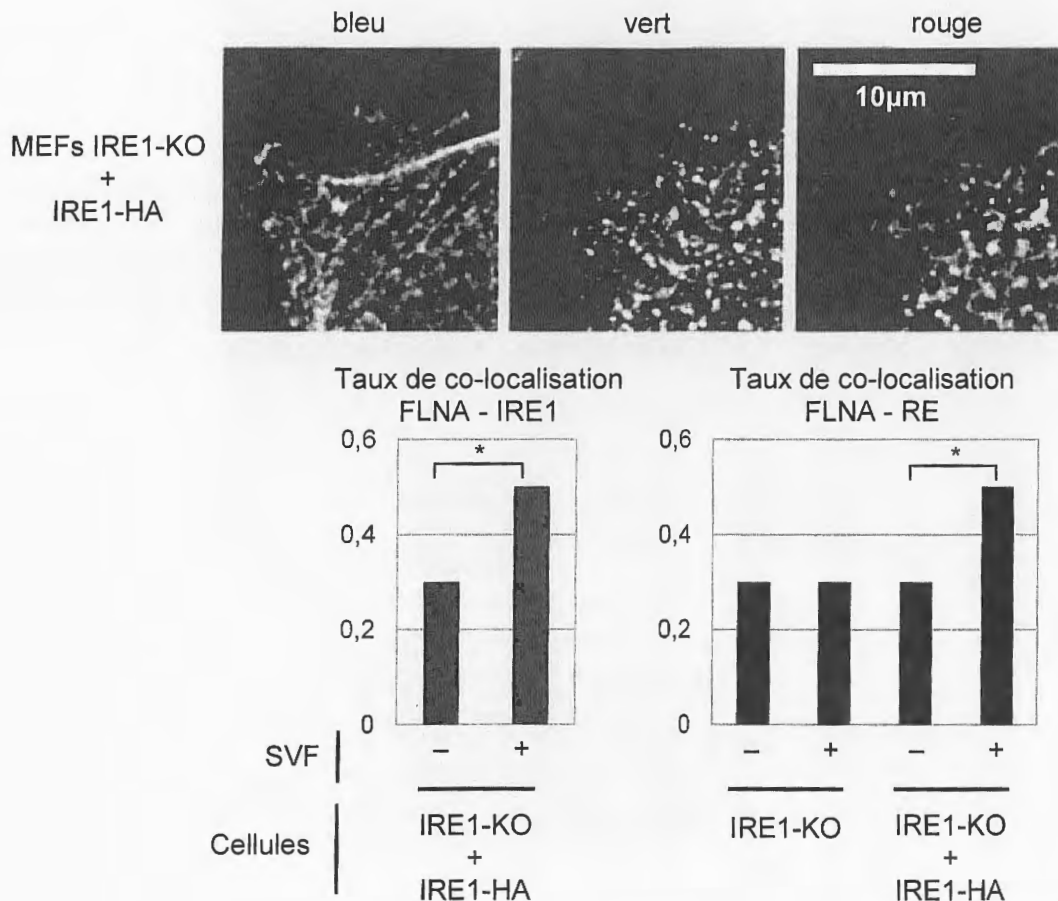
- A. les amorces de PCR utilisées doivent se situer de part et d'autre de la région modifiée de l'ARNm de XBP1
- B. la taille des fragments amplifiés par PCR montre que l'ARN messager de XBP1 modifié par IRE1 fait environ 150bp
- C. le résultat des PCR indique que le traitement par la tunicamycine induit une délétion dans l'ARNm de XBP1
- D. on peut conclure que la présence de IRE1 est indispensable à la modification de l'ARN messager de XBP1 en présence de tunicamycine
- E. la protéine de fusion IRE1-HA est fonctionnelle

Expérience 3 :

Les auteurs étudient par immunofluorescence la localisation relative de IRE1, de la filamine A, et du reticulum endoplasmique (RE), en absence ou en présence de sérum de veau fœtal (SVF), qui stimule la migration cellulaire.

Des cellules MEFs KO IRE1, transfectées ou non avec le plasmide IRE1-HA, sont fixées, perméabilisées, puis incubées avec des anticorps de lapin anti-filamine A, des anticorps de souris anti-HA, et des anticorps de rat anti-KDEL spécifiques du RE. Les anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes émettant différentes couleurs (anti-IgG-lapin-bleu, anti-IgG-souris-vert, anti-IgG-rat-rouge). Les observations sont faites en microscopie confocale.

* indique les différences qui sont statistiquement significatives.



Question 8 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

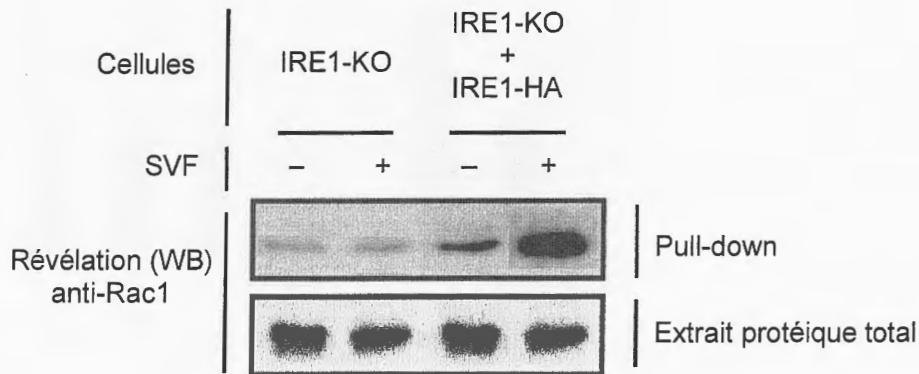
- A. les images correspondent à un champ d'observation comportant plusieurs dizaines de cellules
- B. l'effet du SVF sur la mobilité des cellules pourrait être observé par vidéo-microscopie, sans faire d'immunofluorescence
- C. le SVF entraîne une augmentation de la fraction de filamine A colocalisée avec IRE1
- D. l'activation de la motilité cellulaire s'accompagne d'une relocalisation d'une fraction de filamine A au niveau de la face interne de la membrane du RE
- E. l'augmentation du taux de recouvrement filamine A – RE est indépendante de IRE1

Question 9 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. pour s'assurer que le signal vert correspond bien à IRE1-HA, il faut nécessairement tester le marquage de cellules n'exprimant pas IRE1
- B. on ne peut pas utiliser de protéine de fusion filamine-GFP pour suivre sa relocalisation car l'observation de la GFP est incompatible avec la détection de IRE1-HA par immuno-fluorescence
- C. en utilisant des protéines de fusion, on pourrait imaginer une expérience de FRET pour déterminer si la filamine A et IRE1 interagissent dans les cellules
- D. l'expression d'une protéine de fusion filamine-GFP dans les cellules permettrait d'estimer la vitesse de déplacement de la filamine en réalisant une expérience de FRAP
- E. la microscopie confocale permettrait de déterminer si la filamine A est localisée à la surface interne ou externe du RE

Expérience 4 :

Rac1, une petite GTPase impliquée dans la polymérisation de l'actine, est régulée par la filamine-A. Afin de déterminer si l'activité de Rac1 est influencée par IRE1, les chercheurs réalisent des extraits protéiques de cellules déficientes pour IRE1, exprimant ou non IRE1-HA, traitées ou non avec du SVF. Ils font passer ces extraits dans des colonnes où a été fixée PAK1, une protéine qui interagit avec Rac1-GTP. Après lavage, les protéines retenues dans les colonnes sont décrochées avec du SDS, puis révélées par western-blot avec des anticorps anti-Rac1.

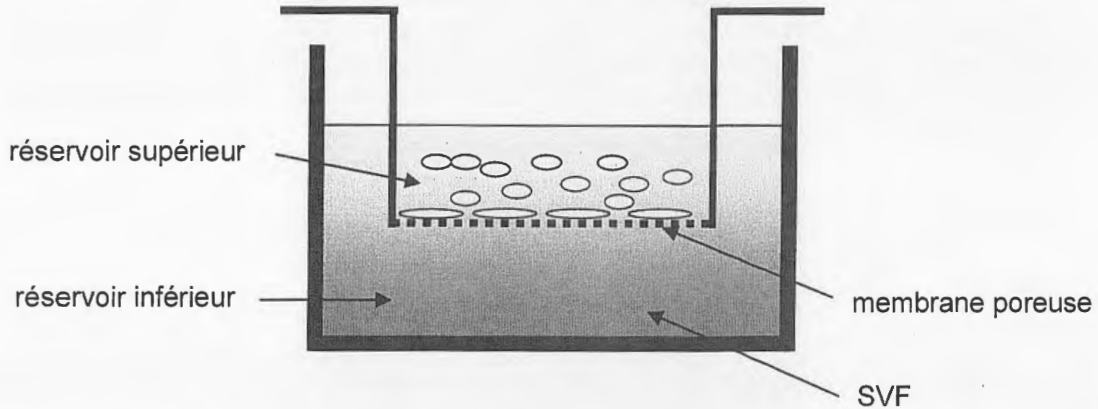


Question 10 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. la capture de Rac1 dépend de l'affinité des anticorps anti-Rac1
- B. Rac1 est activée par une GAP (GTPase Activating Protein)
- C. l'augmentation de la capture de Rac1 induite par le SVF requiert IRE1
- D. c'est la forme activée de Rac1 qui est retenue sur la colonne
- E. le SVF augmente l'affinité de Rac1 pour sa cible PAK1

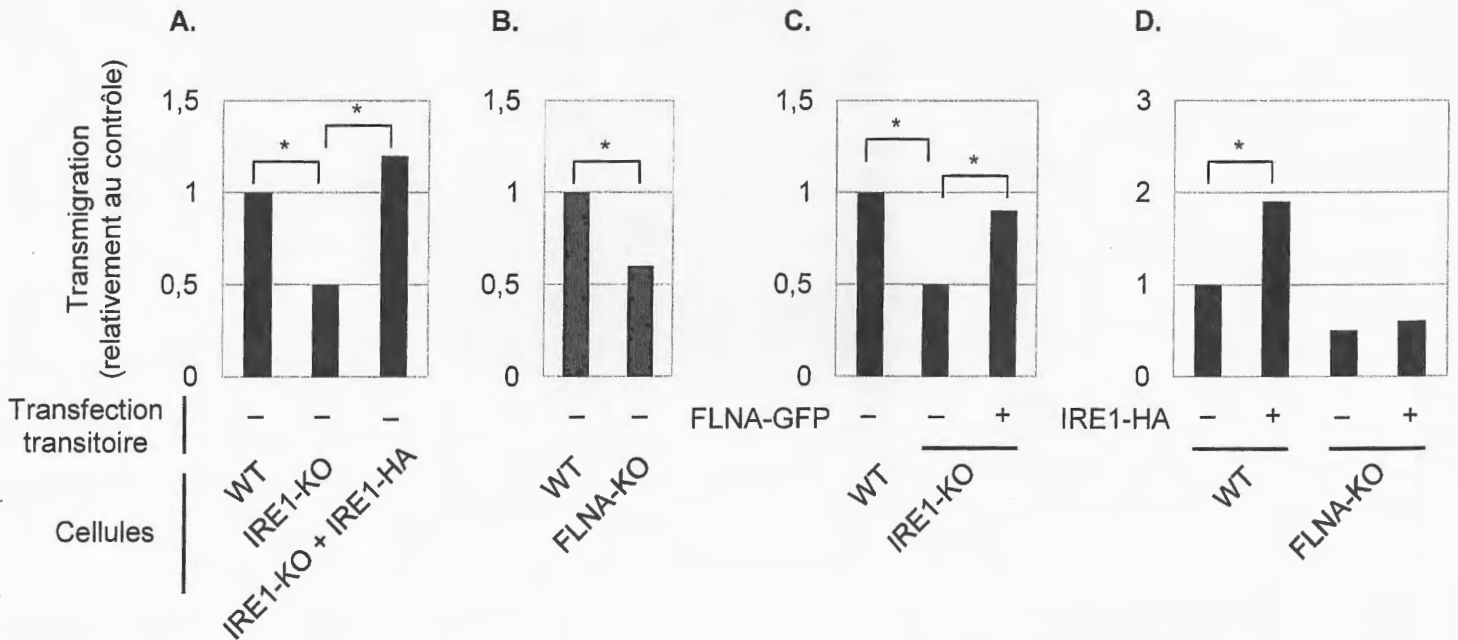
Expérience 5 :

Pour savoir si IRE1 influence la motilité cellulaire, on réalise une expérience de trans-migration avec une chambre de Boyden : les cellules MEFs sont placées dans le réservoir supérieur et le SVF dans le réservoir inférieur. Après 4h, le réservoir supérieur est ôté, et on compte les cellules présentes dans le réservoir inférieur, par coloration des noyaux au cristal violet et observation au microscope inversé.



En A, on compare les cellules KO IRE1, ou KO IRE1 exprimant IRE1-HA, aux cellules sauvages (WT). En B, on compare des cellules KO FLNA aux cellules sauvages. En C, on compare les cellules KO IRE1, éventuellement transfectées de manière transitoire avec le plasmide FLNA-GFP, aux cellules sauvages. En D, on compare les cellules sauvages et KO FLNA, chacune éventuellement transfectées avec le plasmide IRE1-HA.

* indique les différences qui sont statistiquement significatives



Question 11 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. IRE1 et FLNA ont chacune un effet inhibiteur sur la motilité cellulaire
- B. la surexpression de FLNA compense la perte de IRE1
- C. la surexpression de IRE1 compense la perte de FLNA
- D. ces résultats sont compatibles avec un modèle dans lequel IRE1 conduit à l'activation de FLNA
- E. on peut affirmer que l'effet sur la motilité du ciblage de IRE1 par CRISPR-Cas9 est bien dû à la perte de IRE1, et pas d'un autre locus

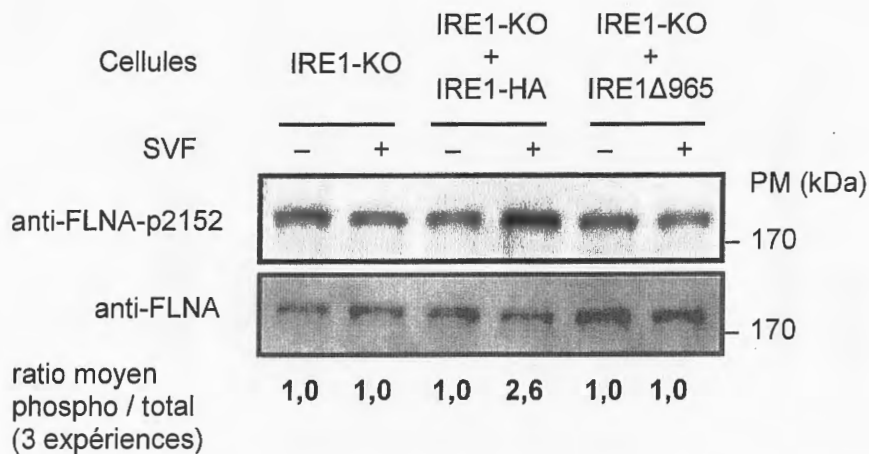
Question 12 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. les facteurs de croissance polypeptidiques contenus dans le sérum de veau foetal peuvent moduler la transcription des cellules MEFs en se fixant sur des récepteurs nucléaires
- B. la fixation d'un agoniste sur un seul GPCR conduit à l'activation de plusieurs molécules de protéine G
- C. l'AMPc active la PKA en se fixant sur ses sous-unités catalytiques
- D. la concentration du calcium libre dans le cytosol est environ 10.000 fois plus basse que dans le milieu extracellulaire
- E. l'augmentation du calcium cytosolique peut conduire à l'activation simultanée de plusieurs kinases dont la PKC

Expérience 6 :

On sait que l'activité de la filamine A sur la motilité cellulaire est modulée par sa phosphorylation sur sa sérine 2152.

Les auteurs mesurent cette phosphorylation par Western blot, à partir d'extraits protéiques totaux de cellules IRE1-KO, IRE1-KO + IRE1-HA, ou IRE1-KO exprimant un mutant de IRE1 délété de 10 acides aminés en position 965 (IRE1 Δ 965). On sait que ce mutant n'interagit pas avec FLNA. La membrane est révélée par des anticorps anti-FLNA totale, ou anti-FLNA phosphorylée sur la sérine 2152.

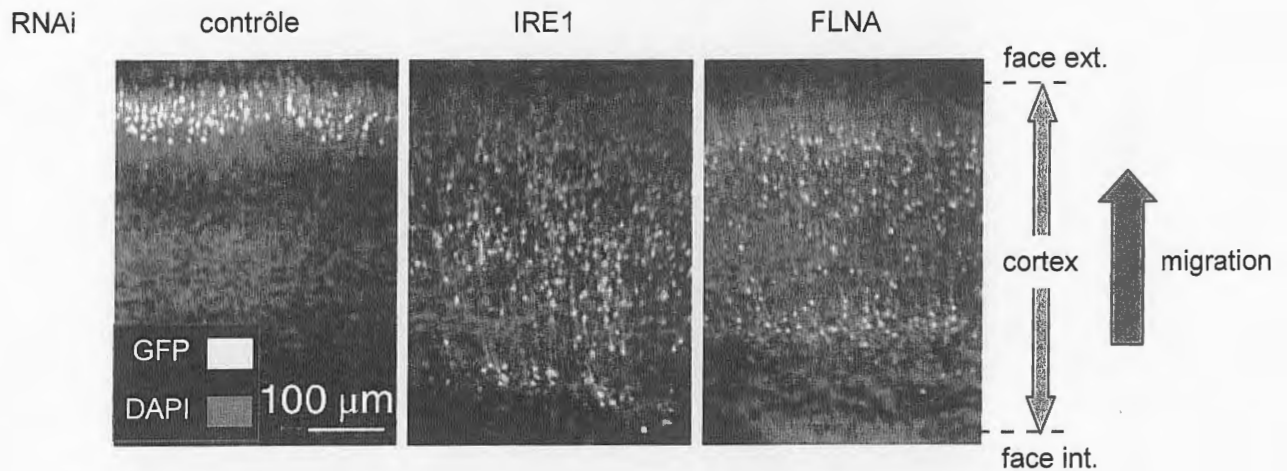


Question 13 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. cette expérience montre que l'interaction filamine A – IRE1 est renforcée en présence de SVF
- B. dans les cellules sauvages, le SVF n'a probablement pas d'effet sur la phosphorylation de la filamine A
- C. cette expérience montre que IRE1 phosphoryle la filamine A
- D. la phosphorylation de la filamine A ne dépend que de la présence de IRE1
- E. la phosphorylation de la filamine A induite par le SVF requiert le domaine d'interaction de IRE1 avec la filamine A

Expérience 7 :

Pour tester le rôle de IRE1 sur la motilité cellulaire *in vivo*, on étudie la migration neuronale dans le cortex cérébral en développement. On transfecte *in utero* la couche interne du cortex d'embryons avec un plasmide permettant l'expression neuronale de la GFP et d'ARN double brin induisant une interférence ARN (RNAi) ciblant IRE1, FLNA, ou une séquence aléatoire (contrôle). 5 jours plus tard, des sections du cortex sont fixées, perméabilisées, et marquées au DAPI (un agent fluorescent intercalant de l'ADN).



Question 14 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. sur ces coupes de cortex, on peut distinguer plusieurs dizaines de cellules
- B. sur ces coupes de cortex, on peut distinguer une modification des filaments intermédiaires après inactivation de FLNA
- C. après inactivation de IRE1 ou FLNA, la proportion de neurones ayant migré a augmenté
- D. la GFP permet de suivre la localisation de la filamine A
- E. la GFP permet d'identifier les cellules dans lesquelles l'expression des protéines IRE1 ou FLNA est diminuée

Question 15 - Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A. l'ARN interférence bloque généralement la transcription du gène ciblé
- B. les shRNAs ont une structure "tige-boucle"
- C. l'intérêt des shRNAs sur les siRNAs est leur plus grande spécificité
- D. le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) possède une activité ribonucléasique
- E. pour induire un phénomène d'interférence par ARN, on cotransfecte les ARN double brin avec la protéine Dicer