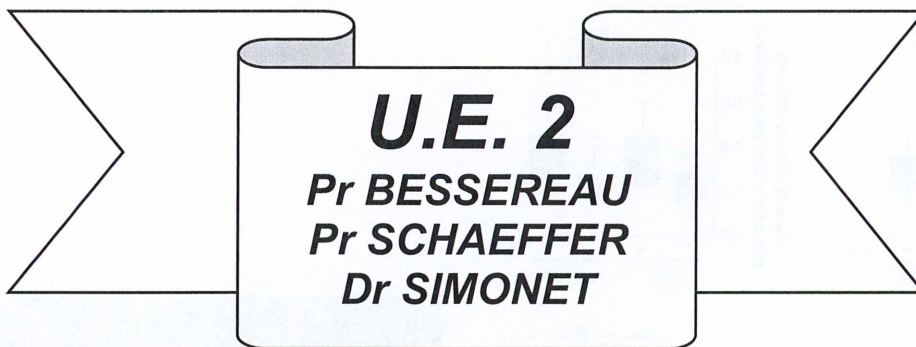


Université de Lyon

Concours PACES 2018-2019



Épreuve du Mardi 8 janvier 2019
Durée de l'épreuve : 60 minutes

Ce fascicule comprend 10 pages numérotées.

Nombre de questions : 15

Les questions sont notées sur 5 points.
L'ensemble correspond à un total de 75 points.

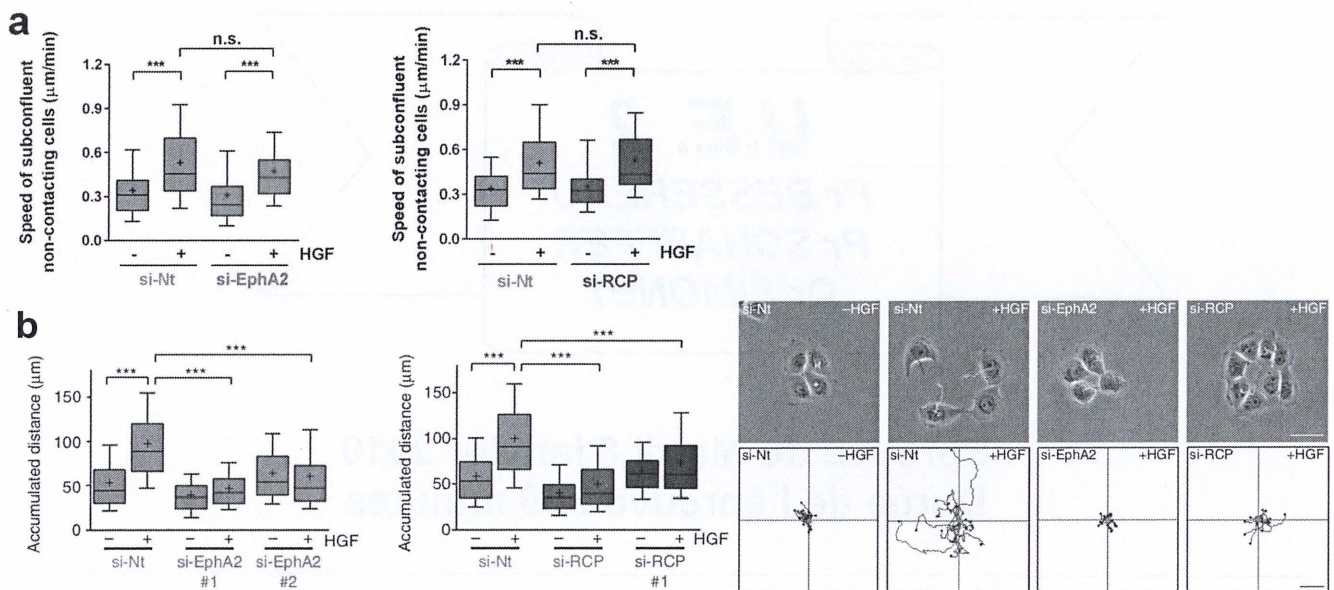
En réponse à chaque question vous pouvez noircir **zéro à cinq cases** sur la grille correspondant à des propositions **justes**.

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

La protéine RCP (Rab-coupling protein), un effecteur de la petite GTPase Rab11, est fréquemment surexprimée dans des cancers agressifs d'origine épithéliale. Des expériences préliminaires suggèrent que RCP pourrait interagir avec le récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase EphA2. Les auteurs vont essayer d'analyser les relations entre ces deux protéines.

Expérience 1 :

Les cellules H1299 dérivées d'un cancer du poumon peuvent former des petites colonies qui se dispersent rapidement après addition de HGF (hepatocyte growth factor) dans le milieu de culture. Les auteurs traitent les cellules avec des siRNA dirigés contre RCP (si-RCP et si-RCP#1), EphA2 (si-EphA2#1 et si-EphA2#2), ou aucune cible (si-Nt, No-target) et analysent la réponse des cellules au HGF en vidéo-microscopie en contraste de phase. Ils mesurent la vitesse de déplacement des cellules isolées (a) et la distance parcourue par les cellules qui sont dans une colonie (b).



Légende: *n.s.* : non significatif. *** : $p < 0,001$

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

- A) la microscopie en contraste de phase permet de visualiser des cellules n'ayant subi aucun traitement spécifique préalable à l'observation
- B) la microscopie en contraste de phase repose sur la visualisation de l'auto-fluorescence endogène des cellules
- C) les siRNAs sont des molécules d'ARN double brin
- D) pour être efficaces, les siRNAs doivent s'apparier avec leurs cibles sur au moins 100 nucléotides
- E) les siRNAs provoquent la dégradation des ARNm

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

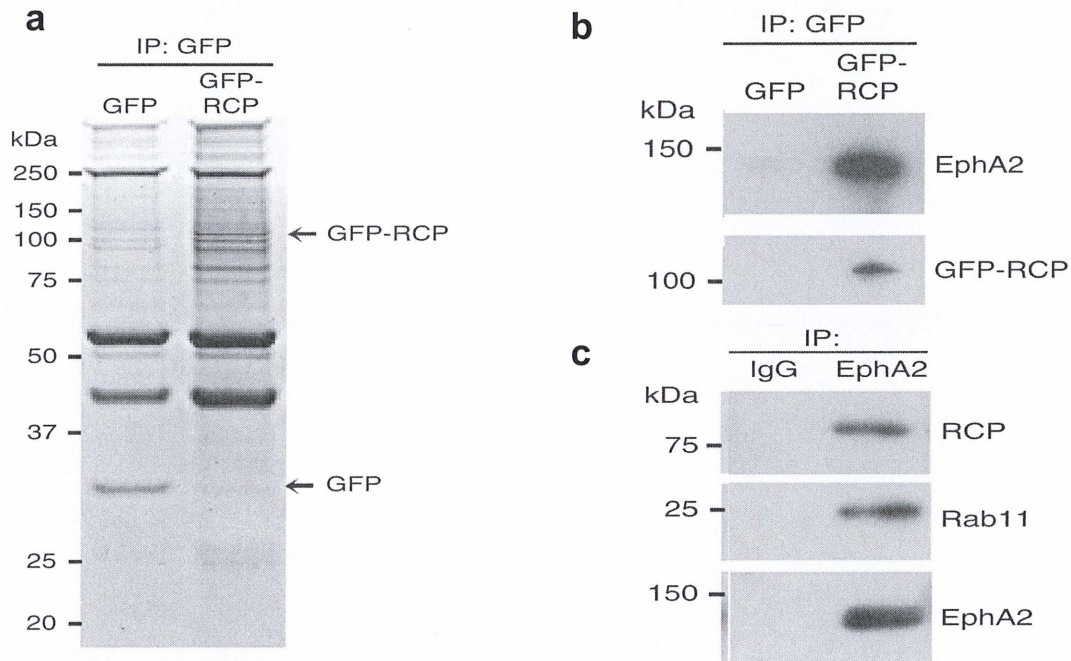
- A) ces résultats ne montrent pas que les siRNAs utilisés n'ont pas d'effet toxique sur les cellules analysées
- B) les si-EphA2 #1 et #2 n'ont pas la même efficacité
- C) ces résultats montrent que le HGF est un agoniste du récepteur EphA2
- D) ces données montrent que l'effet du HGF ne s'explique pas seulement par une stimulation de la vitesse de déplacement des cellules
- E) ces données montrent qu'en absence de RCP les cellules sont insensibles au HGF

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

- A) les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire en établissant des jonctions serrées
- B) les cadhérines forment des interactions homophiliques qui dépendent de la concentration extracellulaire de calcium
- C) les laminines interagissent directement avec les intégrines
- D) le cytosquelette d'actine interagit avec les intégrines pour former des hémidesmosomes
- E) le mouvement des moteurs moléculaires sur les microtubules est responsable des changements de la forme des cellules

Expérience 2 :

Pour identifier des interacteurs de RCP, les auteurs transfectent les cellules H1299 avec un vecteur exprimant soit la GFP, soit la GFP fusionnée à l'extrémité N-terminale de RCP (GFP-RCP). Les cellules sont lysées avec un détergent doux (0,15% Tween-20). L'extrait cellulaire total est immunoprécipité (IP) avec un anticorps anti-GFP et les protéines immuno-précipitées sont séparées par PAGE-SDS en présence d'un agent réducteur. Après migration le gel est coloré par du Bleu de Coomassie brillant, qui marque toutes les protéines (a). L'IP est également analysée par western blot en utilisant des anticorps anti-EphA2 ou anti-GFP (b). Le lysat de cellules non transfectées, réalisé dans les mêmes conditions de lyse, est également immunoprécipité avec des anticorps anti-EphA2 ou des anticorps contrôle ne reconnaissant pas EphA2 (IgG) ; le produit de l'IP est analysé par western blot avec des anticorps anti-EphA2, anti-RCP, ou anti-Rab11 (c).



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

- A) il manque un contrôle pour savoir quelles sont les protéines qui interagissent directement ou indirectement avec la GFP parmi les protéines visualisées dans le gel (a)
- B) dans le gel (a), la bande à 250kDa pourrait correspondre à l'anticorps anti-GFP utilisé pour l'immunoprécipitation
- C) dans le gel (a), chacune des bandes visibles peut représenter plusieurs chaînes polypeptidiques
- D) le gel (b) montre que l'immunoprécipitation de EphA2 est plus efficace que celle de la GFP
- E) ces résultats ne montrent pas que EphA2 et RCP interagissent directement

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

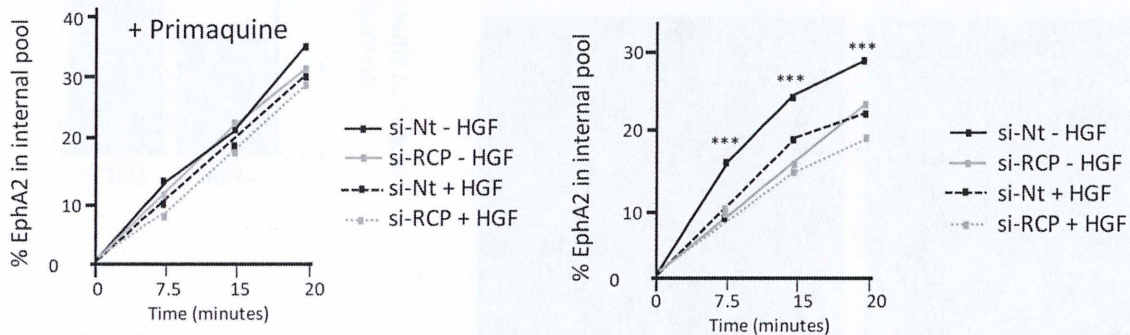
- A) dans l'expérience (c), on aurait pu utiliser comme contrôle négatif un anticorps anti-GFP
- B) l'expérience (c) montre que EphA2 interagit de façon directe ou indirecte avec RCP et Rab11 dans les cellules H1299
- C) L'expérience montre que dans les cellules H1299, EphA2, RCP et Rab11 sont au sein du même complexe
- D) ces résultats montrent que la présence de la GFP à l'extrémité N-terminale de RCP n'empêche pas la formation d'un complexe contenant RCP et EphA2
- E) si, au lieu d'utiliser du Tween-20, on avait utilisé dans la préparation des extraits cellulaires du SDS à la même concentration que pour le PAGE-SDS, cela aurait probablement été sans conséquence sur les résultats des IP

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

- A) les protéines Rab sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique granulaire
- B) les protéines Rab ne contiennent pas d'activité ATPase
- C) les protéines Rab sont toujours liées aux membranes
- D) l'activation des protéines Rab dépend d'un facteur GEF commun aux différentes protéines Rab
- E) les protéines Rab peuvent spécifier des sous-domaines membranaires au niveau des endosomes précoces

Expérience 3 :

Pour analyser la dynamique du récepteur EphA2 en présence ou en absence de HGF, on marque le récepteur EphA2 de surface sur des cellules traitées avec les si-RNAs utilisés dans l'expérience 1, puis on suit l'endocytose du récepteur aux temps indiqués. Dans le panneau (a), pour évaluer uniquement l'endocytose, on rajoute de la primaquine qui inhibe le recyclage des protéines internalisées vers la membrane plasmique.



***: $p < 0,001$ entre si-Nt + HGF et si-RCP + HGF.

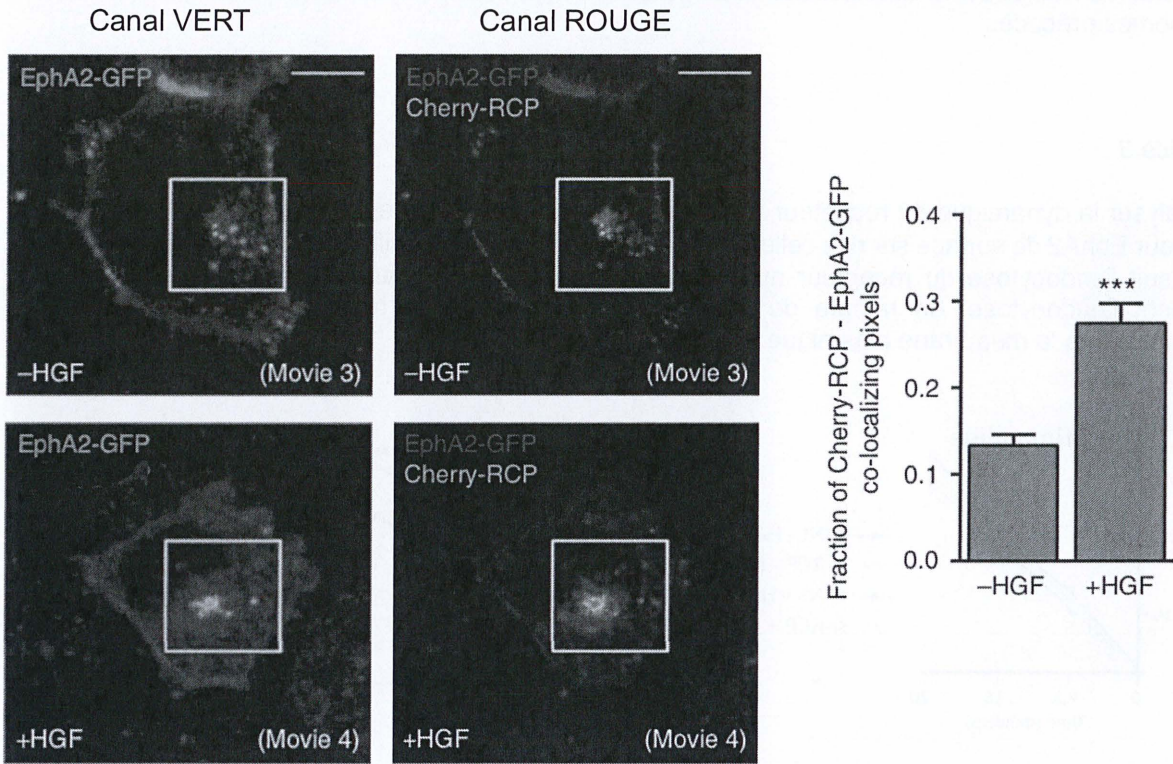
Dans le panneau a les différences ne sont pas significatives.

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

- A) ces données montrent que HGF stimule l'endocytose de EphA2
- B) ces données montrent que HGF stimule le recyclage de EphA2
- C) ces données sont en faveur d'un rôle de RCP dans l'endocytose de EphA2
- D) ces données sont en faveur d'un rôle de RCP dans le recyclage de EphA2
- E) on aurait pu utiliser un siRNA contre la dynamine à la place de la primaquine

Expérience 4 :

On exprime dans les cellules des protéines de fusion EphA2-GFP et Cherry-RCP (rouge) (les fluorescences vertes et rouges sont en noir et blanc sur la figure). On suit les signaux de fluorescence vert et rouge par microscopie confocale avant et après addition de HGF. La GFP est fusionnée à l'extrémité intracellulaire de EphA2. Elle est détectée à la périphérie de la cellule et dans des vésicules intracellulaires très mobiles en absence de HGF. La fluorescence de Cherry est principalement détectée dans des régions centrales de la cellule et est peu mobile.



Barre = 10μm

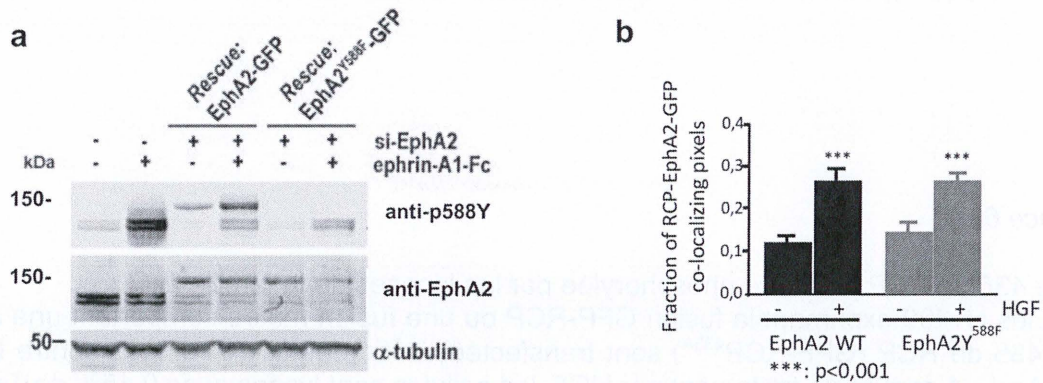
*** : $p < 0,001$

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

- A) après endocytose de EphA2-GFP, la GFP est dans la lumière des vésicules
- B) il est possible de voir en microscopie confocale des vésicules inférieures à 200 nm de diamètre
- C) ces résultats suggèrent que RCP interagit avec EphA2 pour le recruter dans des vésicules d'endocytose
- D) on peut supposer que pour pouvoir observer la colocalisation entre EphA2 et RCP il a fallu perméabiliser les cellules avec un détergent doux qui ne perturbe pas les interactions entre les protéines
- E) le caractère partiel de la colocalisation des signaux rouge et vert après addition de HGF exclut la possibilité d'une interaction directe entre EphA2 et RCP dans la cellule

Expérience 5 :

Le récepteur EphA2 peut être activé par l'Ephrin-A1, ce qui entraîne la phosphorylation de la tyrosine 588 de EphA2 et l'endocytose du récepteur. On traite des cellules H1299 avec un siRNA contre EphA2 et on réexprime dans ces cellules des ARNm résistants au siRNA anti-EphA2 qui codent soit la protéine de fusion EphA2-GFP, soit une forme mutée portant une phénylalanine en position 588 (EphA2^{Y588F}). Après 48h00, les cellules sont traitées pendant 10 minutes par de l'EphrinA1. Un extrait cellulaire total est ensuite analysé par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de la tyrosine 588 de EphA2 (anti-p588Y), contre EphA2, ou contre la tubuline (a). En parallèle, on traite des cellules avec du HGF et on détermine par immunofluorescence sur cellules fixées la colocalisation de EphA2-GFP et de EphA2^{Y588F}-GFP avec RCP (b).



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

- A) ces données montrent que si-EphA2 n'a pas un effet complet sur l'expression de EphA2
- B) ces données montrent que si-EphA2 n'a pas d'effet sur l'expression de EphA2-GFP
- C) ces données montrent que dans les conditions expérimentales utilisées, ephrin-A1 stimule la phosphorylation de EphA2 et de EphA2-GFP
- D) ces données montrent que la tyrosine 588 est la seule tyrosine phosphorylée après activation de EphA2 par l'ephrin-A1
- E) on utilise comme contrôle la tubuline car elle ne contient pas de tyrosine phosphorylable

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

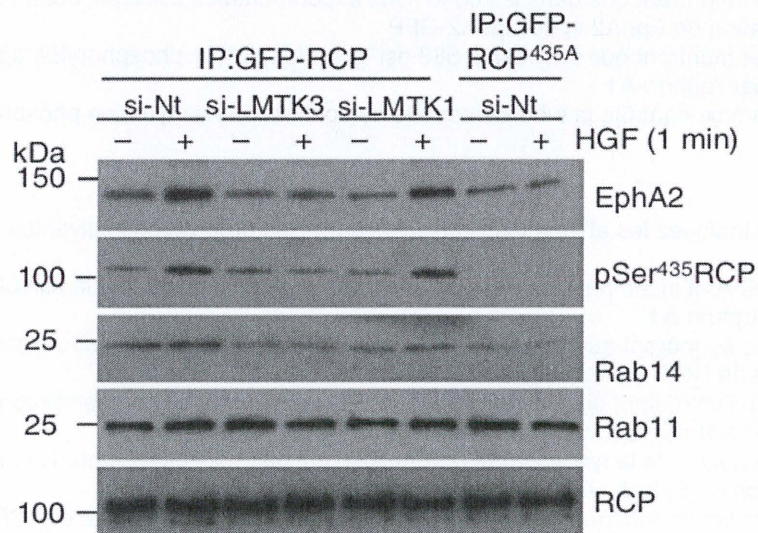
- A) ces données sont incompatibles avec un effet de l'HGF qui impliquerait la stimulation de la libération d'ephrin-A1
- B) ces données suggèrent que EphA2 ne subit pas de modification post-traductionnelle suite à l'application de HGF sur les cellules
- C) l'expression d'un mutant du site catalytique de EphA2 pourrait se comporter comme un dominant négatif sur l'activité EphA2 endogène
- D) la phosphorylation de la tyrosine 588 de EphA2 n'est pas nécessaire pour l'augmentation de la colocalisation de EphA2 et RCP induite par HGF
- E) ces résultats confirment que la stimulation de la colocalisation de EphA2 et RCP par HGF implique l'internalisation de EphA2

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

- A) La fixation d'un agoniste sur un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase provoque un changement de conformation de sa région intracellulaire
- B) La fixation d'un agoniste sur un récepteur transmembranaire à 7 hélices transmembranaires couplé aux protéines G provoque un changement de conformation de sa région intracellulaire
- C) L'activation d'un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase peut conduire à l'activation de sérine-kinases
- D) Certains récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase peuvent phosphoryler les inositol-phospholipides
- E) L'adénylate cyclase est une protéine de la membrane plasmique

Expérience 6 :

La sérine 435 de RCP peut être phosphorylée par les kinases de la famille LMTK. Des cellules H1299 exprimant la fusion GFP-RCP ou une fusion mutée comportant une alanine en position 435 de RCP (GPF-RCP^{435A}) sont transfectées avec des siRNA dirigés contre LMTK1 ou LMTK3. Après 1 minute de traitement par HGF, les cellules sont lysées avec 0,15% de Tween 20 et une immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-GFP. Le résultat de l'immunoprécipitation est analysé par western blot avec des anticorps dirigés contre EphA2, Rab11, Rab14, RCP et un anticorps dirigé contre la forme de RCP phosphorylée sur la sérine 435.

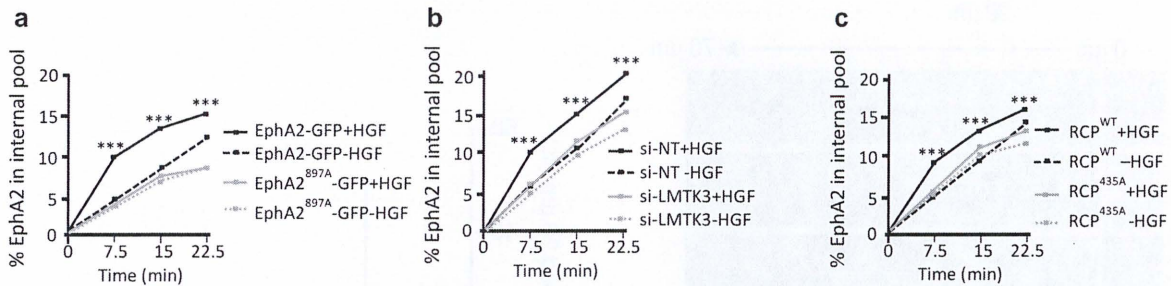


Question 12- Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) ces données montrent que le traitement par HGF augmente la phosphorylation de RCP
- B) ces données montrent que le traitement par HGF augmente la quantité de RCP
- C) ces données montrent que LMTK1 phosphoryle RCP
- D) ces données montrent que LMTK3 est nécessaire pour que HGF augmente la quantité de EphA2 coimmunoprécipitée par GFP-RCP
- E) ces données montrent que la sérine 435 de RCP est nécessaire à l'interaction entre RCP et EphA2

Expérience 7 :

EphA2 peut être activée par phosphorylation de la sérine 897 de façon indépendante de son ligand (l'Ephrin-A1). Des cellules H1299 sont transfectées avec des vecteurs d'expression de la fusion EphA2-GFP ou d'une fusion entre la GFP et un mutant de EphA2 non phosphorylable en position 987 (EphA2^{897A}-GFP). Comme dans l'expérience 3, on suit l'endocytose du récepteur EphA2 en présence ou en absence de HGF (a). La même expérience est réalisée avec des cellules H1299 traitées avec un siRNA dirigé contre LMTK3 (b) ou transfectées avec un vecteur d'expression de RCP (RCP^{WT}) ou d'un mutant de RCP non phosphorylable en position 435 (RCP^{435A}) (c).



***: $p < 0,001$ entre : - EphA2-GFP + HGF et EphA2-GFP – HGF (a)
 - si-NT + HGF et si-NT – HGF (b)
 - RCP^{WT} + HGF et RCP^{WT} – HGF (c)

Les autres différences ne sont pas significatives.

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

- A) ces données montrent que la sérine 897 de EphA2 est nécessaire à l'augmentation par HGF de la proportion de EphA2 internalisé
- B) ces données montrent que LMTK3 est nécessaire à l'augmentation par HGF de la proportion de EphA2 internalisé
- C) ces données montrent que la sérine 435 de RCP est nécessaire à l'augmentation par HGF de la proportion de EphA2 internalisé
- D) l'ensemble de ces données suggère que HGF provoque l'activation de plusieurs kinases
- E) Ces données suggèrent que LMTK3 phosphoryle EphA2 en position 897

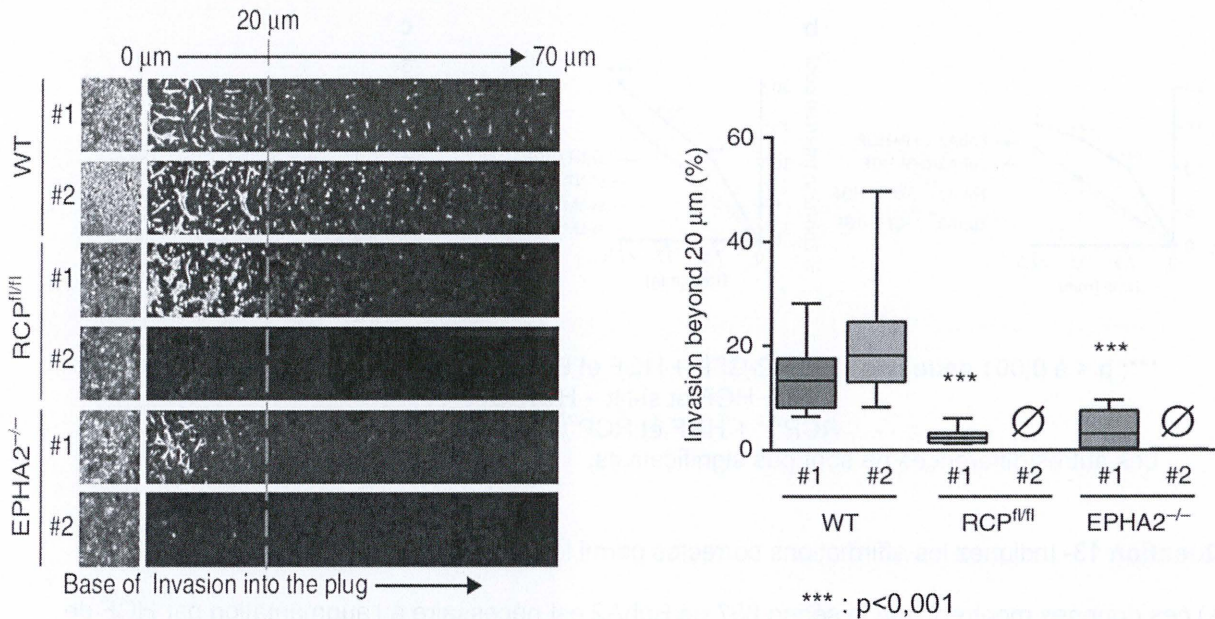
Question 14- Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) la formation d'un manteau de clathrine est spécifique des vésicules d'endocytose
- B) le pH de la lumière des endosomes est plus bas que celui du cytosol
- C) le contenu des endosomes tardifs est dégradé par les lysosomes
- D) le contenu des corps multivésiculaires visibles en microscopie électronique est dégradé par le protéasome
- E) les cavéoles sont recouvertes d'un manteau de cavéolines

Expérience 8 :

Les adénocarcinomes pancréatiques (ACP) sont des cancers très agressifs avec un fort potentiel métastatique. Des ACP sont induits chez des souris contrôle (WT) et des souris KO pour les gènes RCP ($RCP^{fl/fl}$) et EphA2 ($EPHA2^{-/-}$). Des biopsies des tumeurs pancréatiques sont prélevées et mises en culture. La migration des cellules à partir de ces explants est observée après 72 heures de culture par microscopie en contraste de phase.

Le panneau de droite montre la quantification du pourcentage de cellules ayant parcouru plus de 20 μm dans les boîtes de culture. 2 biopsies ont été testées par souris (#1 et #2). Le O barré signifie qu'aucune cellule n'a parcouru plus de 20 μm .



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

- A) pour inactiver un gène chez la souris on peut utiliser la recombinaison homologe ou la méthode CRISPR
- B) ces données montrent que RCP et EphA2 augmentent la vitesse de migration des cellules tumorales
- C) ces données montrent que RCP et EphA2 sont nécessaires à la migration des cellules tumorales
- D) si on considère que ce qui a été observé dans les expériences 1 à 7 avec les cellules H1299 est également valable pour le cancer du pancréas, on peut proposer que la modulation de la migration des cellules tumorales par RCP implique EphA2
- E) si on considère que ce qui a été observé dans les expériences 1 à 7 avec les cellules H1299 est également valable pour le cancer du pancréas, on peut proposer que l'action de EphA2 n'est pas dépendante de son ligand Ephrin-A1