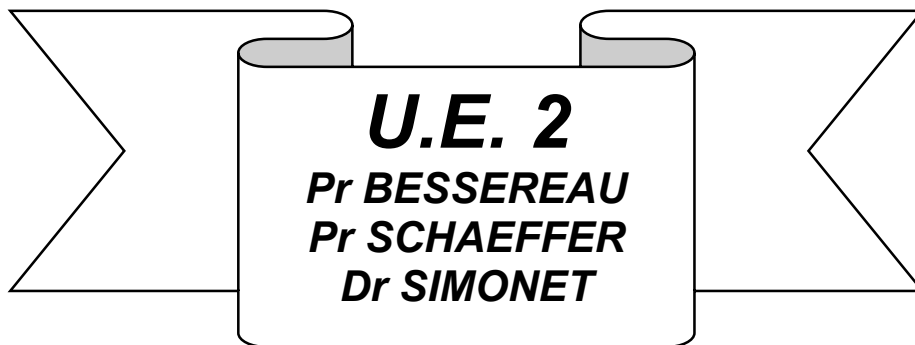




Université de Lyon

Concours PACES 2018-2019



Epreuve du Mardi 11 décembre 2018 – 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.

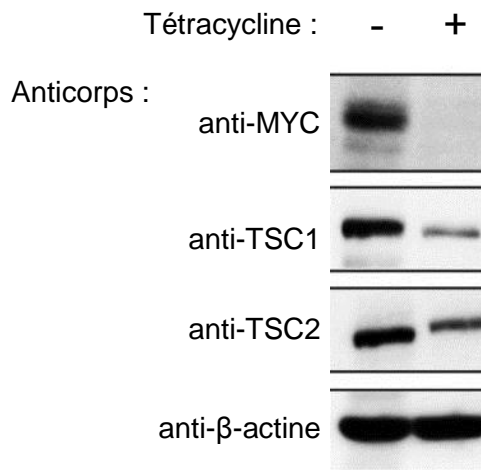
En réponse à chaque question vous pouvez noircir **zéro à cinq cases** sur la grille correspondant à des propositions **justes**.

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

Le lymphome de Burkitt, prolifération maligne de lymphocytes B particulièrement agressive, est caractérisé par une translocation chromosomique qui induit une très forte expression du facteur de transcription pro-oncogénique MYC. Dans l'idée de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, les chercheurs s'intéressent à la voie mTOR, et notamment au complexe TSC1/TSC2 connu pour réguler cette voie.

Expérience 1 :

Les chercheurs utilisent une lignée de lymphocytes B immortalisés dans lesquels on a intégré un fragment d'ADN contenant l'ADNc de MYC sous contrôle d'un promoteur naturellement très actif. On peut **réprimer** totalement ce promoteur par ajout de tétracycline dans le milieu de culture. Après 72 h de culture en présence (+) ou en absence de tétracycline (-), les cellules sont collectées et les protéines présentes dans un extrait cellulaire total sont analysées par western blot après électrophorèse PAGE-SDS :



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

- A) la β-actine est utilisée comme indicateur de la quantité de protéines chargées dans chaque piste du gel car elle codée par un gène dont l'expression n'est pas contrôlée par des facteurs de transcription
- B) il manque un contrôle expérimental pour s'assurer que la tétracycline ne modifie pas l'expression de TSC1 ou TSC2, indépendamment de MYC
- C) cette expérience montre que les niveaux de synthèse des protéines TSC1 et de MYC sont corrélés
- D) cette expérience montre que les variations des quantités de protéines TSC1 et MYC sont corrélées
- E) cette expérience montre que la modification de l'expression de TSC1 entraîne une modification de l'expression de MYC

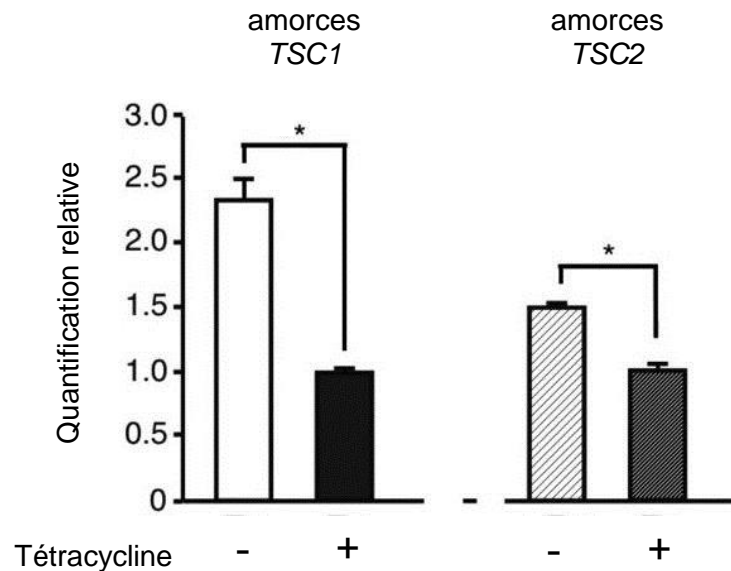
Question 2 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) cette expérience montre qu'en présence de tétracycline, le promoteur du gène *Myc* est plus actif qu'en absence de tétracycline
- B) cette expérience fournit les données permettant de s'assurer que l'anticorps anti-MYC reconnaît effectivement la protéine MYC
- C) en absence de tétracycline, les résultats du western blot montrent que les protéines TSC1 et TSC2 sont exprimées à un niveau équivalent
- D) on ne peut pas révéler TSC1 et TSC2 par l'incubation simultanée de leurs anticorps primaires respectifs car TSC1 et TSC2 sont dans le même complexe
- E) lors d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide, le SDS n'est pas capable de rompre les ponts disulfures qui relient deux chaînes polypeptidiques

Expérience 2 :

On analyse par RT-PCR quantitative les niveaux des ARNm *TSC1* et *TSC2* dans la lignée de lymphocytes B décrite précédemment, après 72 h de culture en présence (+) ou en absence (-) de tétracycline. Les niveaux mesurés d'ARNm de *TSC1* et *TSC2* sont normalisés à ceux de l'ARNm β -actine du même extrait. On compare les niveaux relatifs de *TSC1* et *TSC2* entre les conditions (+) et (-).

Dans cette figure et les suivantes, la présence d'une étoile indique que les différences observées sont statistiquement significatives.



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

- A) la normalisation à l'ARNm β -actine permet de comparer les niveaux de *TSC1* dans les différentes conditions
- B) la normalisation aux niveaux d'ARNm β -actine permet de conclure que *TSC2* est moins fortement exprimé que *TSC1* quand MYC est surexprimé
- C) la normalisation aux niveaux d'ARNm β -actine permet de conclure que le traitement des cellules par la tétracycline entraîne une baisse des ARNm de *TSC1* plus importante que celle des ARNm *TSC2*
- D) dans une RT-qPCR, la quantité d'ADN amplifié n'est pas proportionnelle aux niveaux des ARNm initiaux quand la réaction d'amplification atteint la phase de plateau
- E) on peut conclure que MYC influence directement ou indirectement le taux de synthèse des ARNm *TSC1* et *TSC2*

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

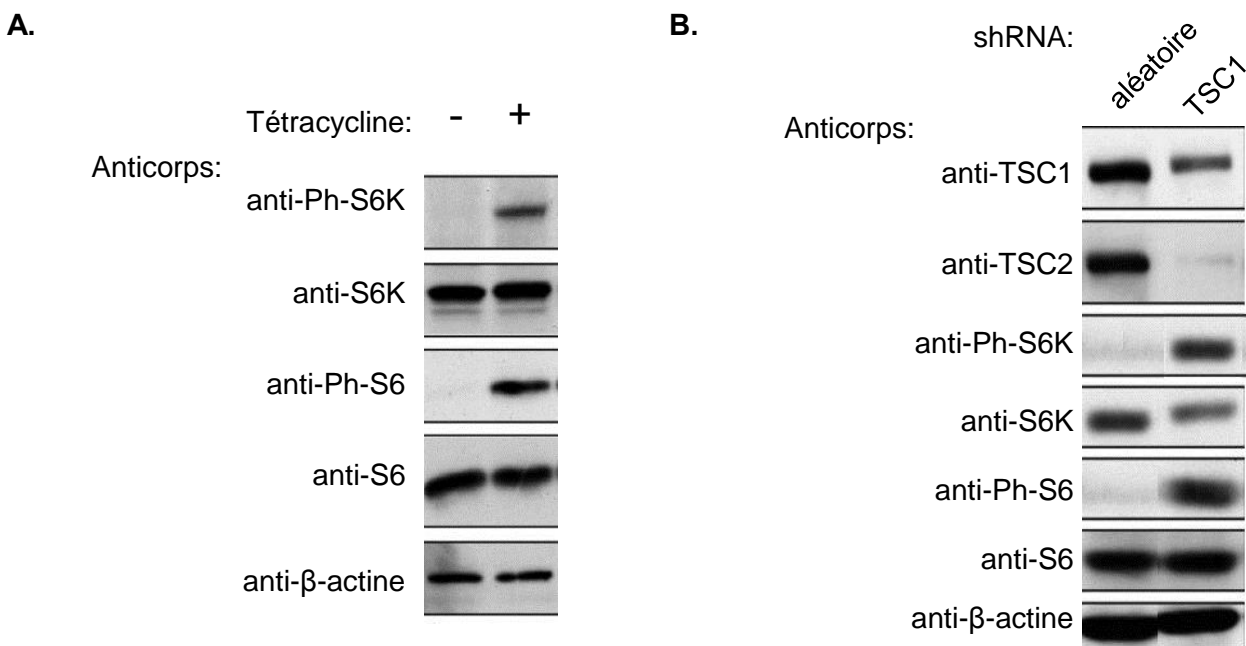
- A) l'ARN polymérase 2 transcrit les gènes qui codent pour les protéines
- B) les petites ribonucleoparticules nucléaires (snRNP) contiennent des petits ARN nucléaires (snRNA) et des protéines Sm
- C) les ARNm sont transportés dans le cytoplasme sous forme de pré-messagers
- D) l'épissage alternatif des ARN permet de créer des ARN polycistroniques
- E) les ARNm qui codent les protéines de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire sont traduits dans le noyau

On rappelle que TSC1 et TSC2 régulent l'activité de la kinase mTOR. TSC2 est une protéine activatrice de l'activité GTPase (GAP) de la protéine G Rheb (Ras homolog enriched in brain), dont la forme liée au GTP active l'activité kinase de mTOR. mTOR est une kinase qui contrôle positivement le métabolisme et la croissance cellulaire, notamment en phosphorylant la protéine kinase S6K, dont la cible est la protéine S6 de la sous-unité ribosomale 40S.

Expérience 3 :

A : expérience de western blot similaire à celle de l'expérience 1, révélée avec les anticorps indiqués. Les anticorps Ph-S6K et Ph-S6 ne reconnaissent que les formes phosphorylées de S6K et S6.

B : analyse par western blot d'un extrait cellulaire total réalisé 48h après expression d'un shRNA ciblant *TSC1* ou d'un shRNA sans cible déterminée ("aléatoire"), en absence de tétracycline.



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

- A) dans l'expérience A l'augmentation de la quantité de protéine S6 phosphorylée après répression de MYC peut s'expliquer par une augmentation de quantité de protéine S6
- B) les résultats de l'expérience A montrent qu'en présence de tétracycline l'activité de la protéine kinase de S6 augmente
- C) pour vérifier que le changement de phosphorylation de S6K induit par la baisse de quantité de MYC dépend de mTOR, on pourrait répéter l'expérience A en inactivant mTOR, et regarder si l'on observe encore une augmentation de Ph-S6K
- D) on peut prédire que l'inhibition de TSC2 provoquerait une augmentation de l'activité de S6K
- E) on peut prédire qu'en présence de tétracycline, il y a une augmentation de la forme phosphorylée de β-actine

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

- A) les shRNAs sont transfectés dans les cellules sous forme d'ARN double brin
- B) il est difficile de contrôler la concentration de shRNAs dans les cellules
- C) sachant que le shRNA dirigé contre *TSC1* ne reconnaît pas l'ARN de *TSC2*, l'expérience B montre que la quantité de TSC1 contrôle positivement la quantité de TSC2
- D) l'expérience B montre que la quantité de TSC1 contrôle négativement l'activité de S6K
- E) l'expérience B montre que TSC1 a probablement une activité phosphatase

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

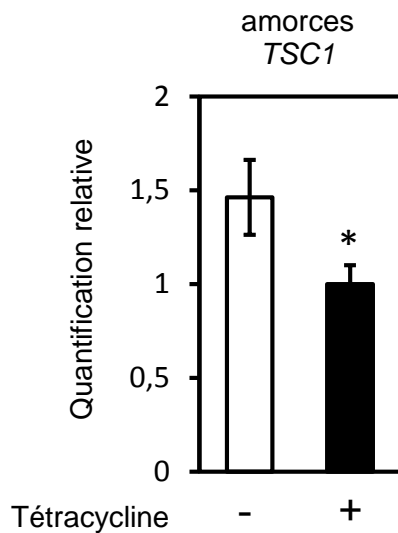
- A) les protéines de la super-famille des petites GTPases monomériques sont activées par phosphorylation
- B) certaines de ces petites GTPases sont associées à la membrane par une ancre lipidique
- C) les protéines GAP hydrolysent le GTP en GDP
- D) la protéine kinase A est une tyrosine kinase capable d'activer indirectement les MAP kinases
- E) la protéine kinase C est activée par le calcium et le diacylglycérol

Expérience 4 :

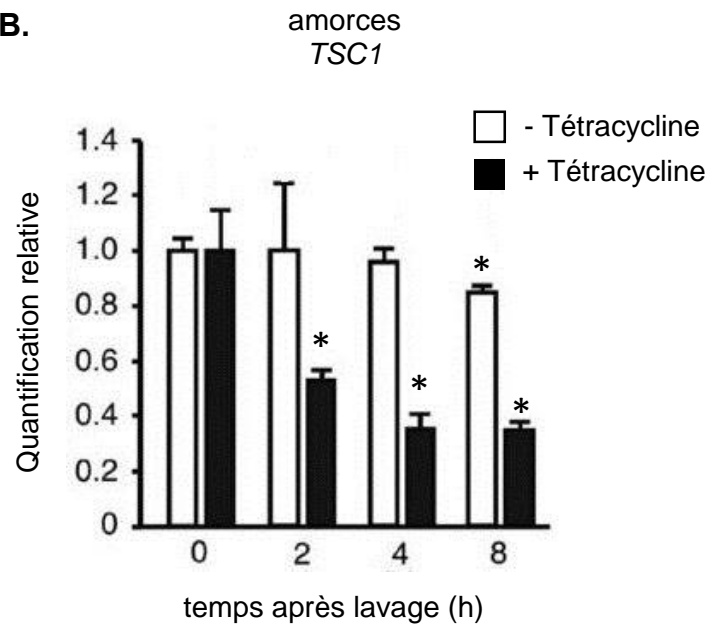
A : un analogue ribonucléotidique (5-ethynyl uridine, 5-EU) est ajouté au milieu. Après 3h d'incubation, l'ARN total est extrait et on purifie les molécules ayant incorporé le 5-EU. A partir de l'ARN ainsi isolé, l'ARNm *TSC1* est quantifié comme dans l'expérience 2.

B : les cellules sont cultivées en présence de 5-EU pendant 24h. Le 5-EU est ensuite lavé et l'ARN total est extrait à différents temps après lavage. Les molécules d'ARN contenant du 5-EU sont isolées, et parmi celles-ci l'ARNm *TSC1* est quantifié comme dans l'expérience 2. Dans chaque condition, les niveaux d'ARNm *TSC1* sont normalisés au niveau mesuré au moment du lavage (t=0).

A.



B.



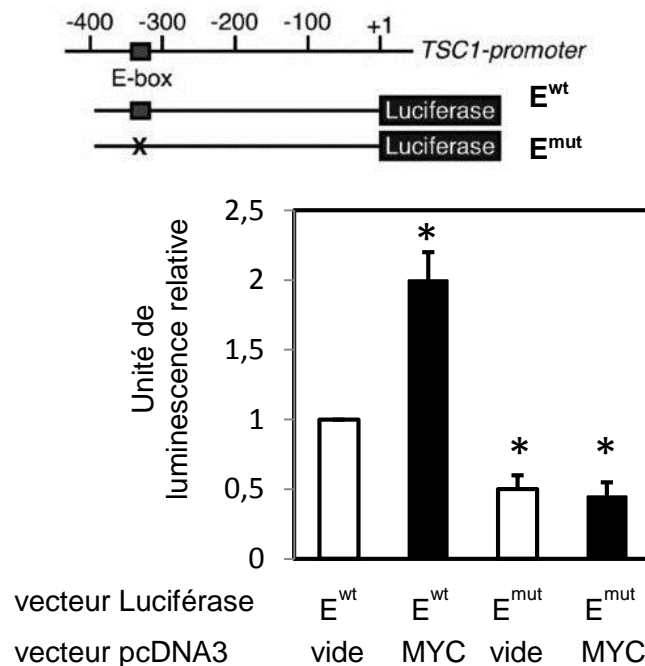
Question 8 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) l'expérience A permet de mesurer la quantité d'ARNm *TSC1* produit et accumulé en 3h
- B) l'expérience A montre que la diminution de la quantité d'ARNm *TSC1* en l'absence de MYC observée dans l'expérience 2 n'est pas entièrement imputable à une diminution de son taux de transcription
- C) l'expérience B montre que la stabilité de l'ARNm *TSC1* est influencée positivement par la présence de MYC
- D) l'expérience B permet de mesurer le taux de synthèse de l'ARNm *TSC1* pendant 24h
- E) l'expérience B montre que la durée de synthèse de l'ARNm *TSC1* est allongée en présence de MYC

Expérience 5 :

Les auteurs explorent la séquence du promoteur de *TSC1*, et trouvent un motif de fixation potentiel du facteur MYC, appelé boîte Enhancer (E), en position -317/-322 par rapport au site de démarrage de la transcription. Le fragment promoteur -393/+1 est cloné en amont de la séquence codant pour la luciférase. On construit également un vecteur avec le même fragment promoteur mais dans lequel la boîte E a été mutée (E^{mut}).

Les chercheurs transfectent les différentes constructions luciférase dans des cellules HeLa, soit avec un plasmide forçant l'expression de MYC, soit avec un plasmide contrôle ("vide"). 24 h après transfection, l'activité luciférase est mesurée par ajout d'un substrat luminescent. Les valeurs sont normalisées à l'activité mesurée avec la construction non mutée (E^{wt}) et le vecteur contrôle.



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

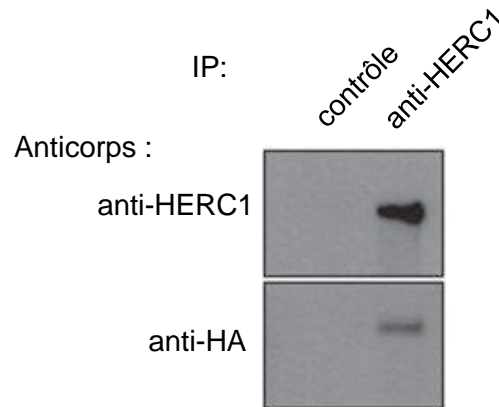
- A) cette expérience est suffisante pour conclure que MYC se fixe sur la boîte E de ce fragment promoteur
- B) cette expérience montre que la boîte E est nécessaire à l'activation du fragment promoteur de *TSC1* par MYC
- C) cette expérience montre que ce fragment promoteur n'est pas activé par des facteurs de transcription autres que MYC
- D) cette expérience montre que MYC stabilise l'ARNm codant la luciférase
- E) les auteurs pourraient étudier la liaison de MYC sur le promoteur endogène de *TSC1* par des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine

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

- A) pour que l'ARN polymérase puisse transcrire les deux brins d'ADN d'un gène il faut deux amorces différentes
- B) deux façons de replier la chromatine ont été proposées pour la formation des fibres de 30 nm
- C) le déplacement des nucléosomes dans la chromatine nécessite des enzymes qui utilisent l'ATP pour produire l'énergie nécessaire
- D) la transcription du gène de la protéine ribosomale S6 a lieu dans le nucléole
- E) l'initiation de la traduction des ARNm nécessite la présence de la coiffe et de la queue polyA

Expérience 6 :

HERC1 est une ubiquitine ligase E3 qui pourrait interagir avec TSC2. Afin de confirmer cette association, des cellules HeLa sont transfectées avec un plasmide forçant l'expression d'une protéine de fusion entre TSC2 et un peptide HA de 9 acides aminés (TSC2-HA). 48h après transfection, on prépare un lysat cellulaire sur lequel on réalise une expérience d'immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-HERC1 ou des anticorps contrôle ne reconnaissant pas HERC1. Les protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot après PAGE-SDS.



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

- A) l'expression de HERC1 est augmentée par la surexpression de TSC2-HA
- B) les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation et la détection par western blot peuvent provenir de la même espèce animale
- C) à partir des mêmes extraits protéiques, l'utilisation d'un anticorps anti-HA devrait permettre de co-immunoprécipiter HERC1
- D) ces résultats démontrent que les anticorps contrôle ne reconnaissent pas la protéine TSC2 dans les conditions d'immunoprécipitation
- E) il est possible de co-immunoprécipiter deux protéines même si elles interagissent indirectement au sein d'un même complexe

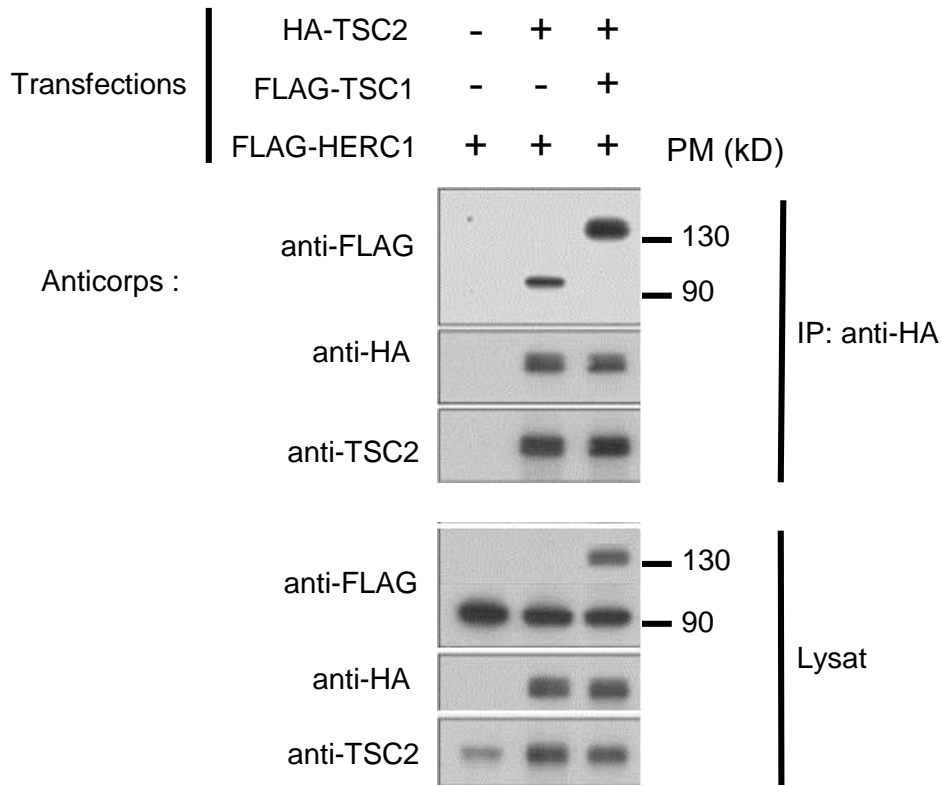
Question 12 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) la polyubiquitination des protéines de la lumière du réticulum endoplasmique dépend d'ubiquitines ligases cytosoliques
- B) après polyubiquitination, les protéines du noyau doivent être exportées en dehors du noyau pour être protéolysées par le protéasome dans le cytosol
- C) le protéasome a une taille similaire à celle des lysosomes
- D) après endocytose, la majorité des protéines non-membranaires sont dégradées par le protéasome
- E) la dégradation des protéines par le protéasome est consommatrice d'ATP

Expérience 7 :

Les auteurs déterminent qu'un fragment C-terminal de HERC1 est nécessaire et suffisant à l'interaction avec TSC2.

On co-transfecte dans des cellules HeLa des plasmides forçant l'expression de TSC2 fusionnée au peptide HA (HA-TSC2), TSC1 fusionnée au peptide Flag (FLAG-TSC1, 139kD), ou le fragment C-terminal de HERC1 fusionnée au peptide Flag (FLAG-HERC1, 96kD), comme indiqué dans la figure. 48h après transfection, on prépare un lysat cellulaire sur lequel on réalise une expérience d'immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA. Le lysat initial et les protéines immunoprécipitées sont analysés par western blot après PAGE-SDS.



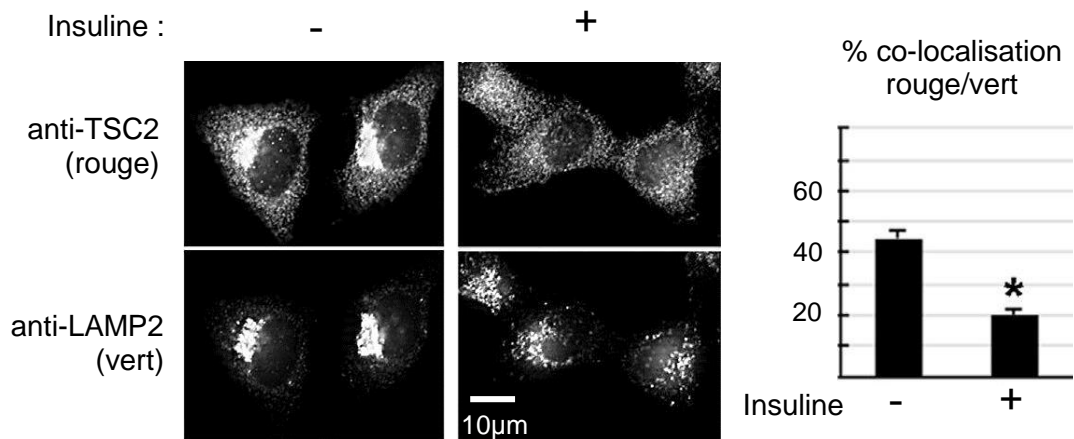
Question 13 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) ces résultats montrent que les cellules HeLa n'expriment pas TSC1 à l'état basal
- B) la surexpression de TSC1 inhibe l'expression de HERC1
- C) ces résultats montrent qu'en l'absence du tag HA, TSC2 n'interagit pas avec HERC1
- D) TSC1 inhibe l'interaction de TSC2 avec HERC1
- E) combinés aux données des expériences précédentes, ces résultats suggèrent que HERC1 a un effet activateur de la voie mTOR

Des travaux antérieurs ont montré que Rheb et mTOR sont localisés sur la face externe des lysosomes. L'insuline, une hormone qui active la voie mTOR, active une cascade de signalisation qui conduit à la phosphorylation de TSC2.

Expérience 8 :

Des cellules HeLa sont stimulées ou non avec de l'insuline pendant 10 minutes. On marque ensuite TSC2 et LAMP2, une protéine de la membrane des lysosomes, par immunofluorescence indirecte (IF). Les lames sont observées en épifluorescence, et la fraction du signal rouge superposé au vert est quantifiée.



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

- A) le marquage a été réalisé sur des cellules fixées et perméabilisées
- B) ces résultats montrent que l'insuline provoque une diminution de la quantité de lysosomes par cellules
- C) la forte colocalisation de TSC2 et LAMP2 en absence d'insuline indique que la forme non phosphorylée de TSC2 est ancrée dans la membrane lysosomale
- D) ces données montrent qu'en absence d'insuline TSC2 interagit avec LAMP2
- E) ces données montrent que l'insuline pourrait contrôler l'activité de mTOR indépendamment du niveau d'expression de TSC2

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

- A) la distribution des organelles dans la cellule dépend du réseau des filaments intermédiaires
- B) les monomères d'actine lient l'ATP
- C) les filaments d'actine sont composés de monomères d'actine α et d'actine β
- D) les dynéines sont impliquées dans le transport rétrograde le long des microtubules
- E) la formation du fuseau mitotique détruit l'enveloppe nucléaire