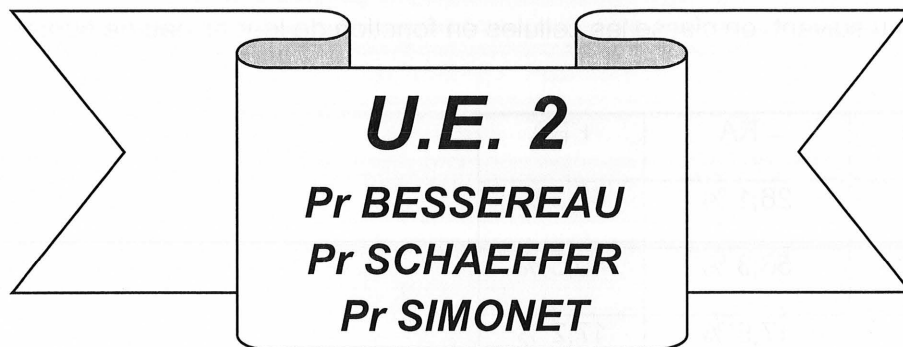




Université de Lyon

Concours PACES 2017-2018



Epreuve du Mardi 12 décembre 2017 – 14h15 / 15h15
Durée de l'épreuve : 60 minutes

Ce fascicule comprend 11 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.

Hes1, un effecteur de la voie de signalisation Notch, contrôle le maintien des cellules progénitrices durant le développement du système nerveux. En conséquence, les embryons chez qui le gène Hes1 a été inactivé présentent un défaut de développement du tissu cérébral et un engagement précoce des cellules souches neuronales dans la différenciation terminale post-mitotique. Des chercheurs étudient le fonctionnement et la régulation de la protéine Hes1.

Des cellules indifférenciées F9 peuvent être amenées à se différencier en présence d'acide rétinoïque (RA). On étudie le cycle cellulaire des cellules par la technique de cytométrie en flux dans laquelle on marque la chromatine avec une molécule fluorescente (l'iodure de propidium) et on mesure l'intensité de la fluorescence émise par chaque cellule. On attribue arbitrairement une valeur de 1 au niveau de fluorescence le plus bas.

Dans le tableau suivant, on classe les cellules en fonction de leur niveau de fluorescence:

Fluorescence	- RA	+ RA
1	26,1 %	42,3 %
1,1-1,9	56,3 %	40,5 %
2	17,6 %	17,2 %

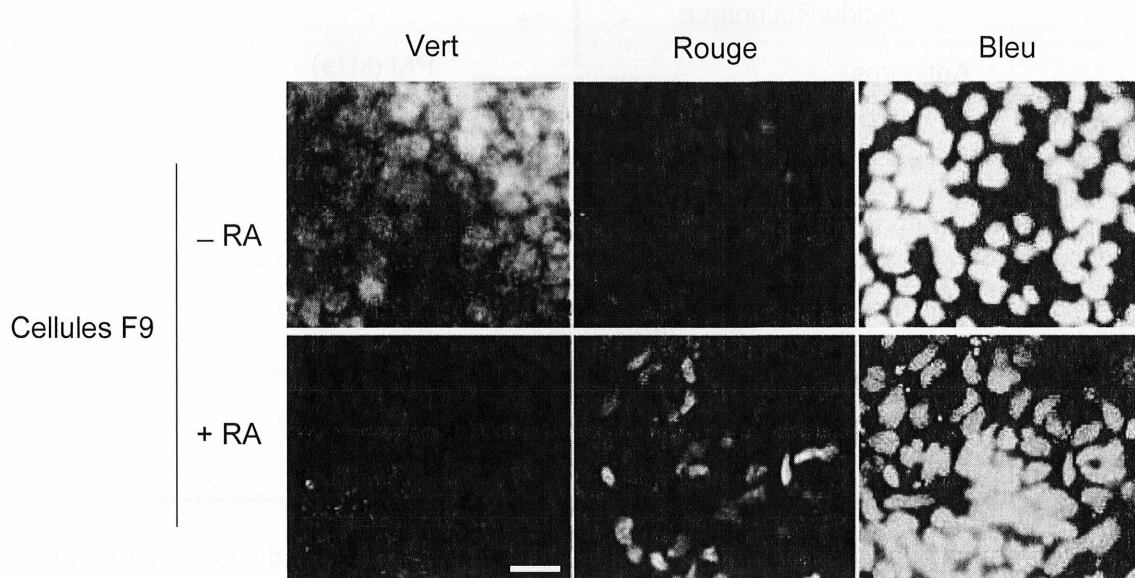
Question 1 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A) les cellules dont la fluorescence est égale à 1 sont en phase G0 ou G1
- B) les cellules dont la fluorescence est comprise entre 1,2 et 1,9 sont en phase S ou G2
- C) les cellules dont la fluorescence est égale à 2 sont en phase G2 ou M
- D) sachant que dans ces conditions, la durée du cycle cellulaire n'est pas modifiée par l'acide rétinoïque, les résultats montrent une augmentation de la proportion des cellules en G0
- E) les résultats suggèrent que l'acide rétinoïque active le point de contrôle G2/M

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

- A) les centrosomes sont répliqués pendant la phase S
- B) il existe un point de contrôle du cycle cellulaire au milieu de la phase S
- C) les cyclines sont de petites protéines possédant une activité kinase
- D) la dynamique de l'actine est essentielle au cours de l'anaphase
- E) l'activité CDK est basse en télophase

Les cellules F9 sont cultivées pendant 4 jours en présence ou en absence d'acide rétinoïque, après quoi elles sont fixées, perméabilisées, et incubées avec des anticorps de lapin anti-Hes1, des anticorps de souris anti-p27^{Kip1}, puis avec des anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à un fluorochrome vert, et anti-IgG de souris couplés à un fluorochrome rouge, ainsi qu'avec du DAPI qui marque la chromatine en bleu. Les cellules sont observées en épifluorescence (barre d'échelle : 20µm).



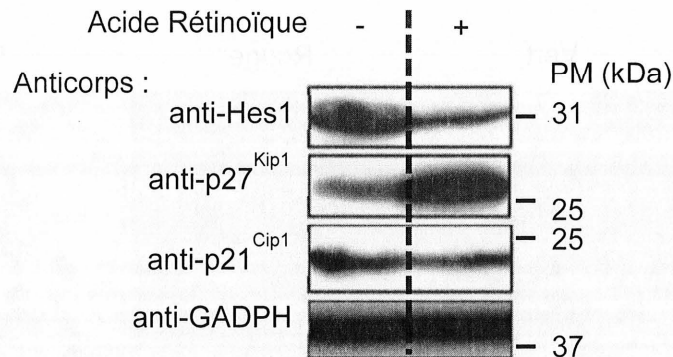
Question 3 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

- A) cette expérience montre que Hes1 est une protéine membranaire
- B) cette expérience montre qu'en absence de RA, toutes les cellules n'expriment pas Hes1 au même niveau
- C) cette expérience montre qu'en présence de RA, Hes1 est importé dans le noyau des cellules F9 et n'est plus accessible aux anticorps
- D) la résolution de la microscopie photonique est suffisante pour affirmer que p27^{Kip1} est principalement présent dans le noyau des cellules traitées par l'acide rétinoïque
- E) on aurait pu utiliser les anticorps anti-p27^{Kip1} rendus fluorescents et les appliquer sur des cellules vivantes pour suivre la dynamique de la protéine au cours de la phase M du cycle cellulaire

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

- A) p27^{Kip1} est probablement traduit dans le noyau
- B) les séquences de localisation nucléaire (NLS) sont enrichies en acides aminés hydrophobes
- C) les exportines ont une forte affinité pour leurs cargaisons lorsqu'elles sont liées à RAN-GTP
- D) l'énergie nécessaire à la fusion de deux membranes est apportées par l'hydrolyse du GTP en GDP
- E) les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 5 000 Daltons ne diffusent pas librement entre la lumière du réticulum endoplasmique et l'intérieur du noyau.

Les chercheurs analysent l'expression de Hes1 et des inhibiteurs de CDK p27^{Kip1} et p21^{Cip1} par Western Blot ; le niveau d'expression de GAPDH est considéré comme étant identique dans toutes les cellules.



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

- A) cette expérience suggère que le traitement par le RA provoque une diminution du niveau de protéine Hes1 exprimée par les cellules
- B) l'analyse du niveau d'expression de GAPDH n'est pas nécessaire dans cette expérience car GAPDH ne varie pas en présence ou en absence de RA
- C) p27^{Kip1} et p21^{Cip1} étant chacun un inhibiteur de CDK, seuls leurs poids moléculaires permettent de les distinguer dans une expérience de Western Blot.
- D) on peut conclure de cette expérience que Hes1 inhibe l'expression de p27^{Kip1}
- E) l'augmentation du niveau de p27^{Kip1} après traitement par le RA est compatible avec les résultats de l'expérience de cytométrie en flux

On utilise maintenant des cellules HeLa dans lesquelles on pourra contrôler l'expression de Hes1. Pour ce faire, on introduit dans le génome des cellules HeLa un fragment d'ADN comportant l'ADNc de Hes1 placé sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline (lignée HeLa-Tet-Hes1). Ce promoteur est naturellement très actif et est **réprimé en présence de tétracycline** dans le milieu de culture.

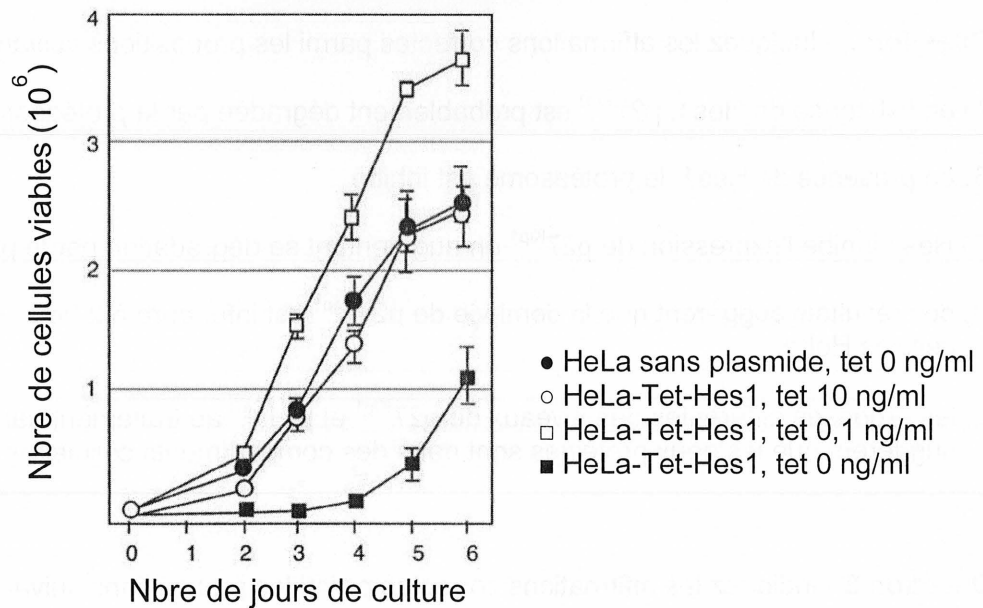
10⁵ cellules HeLa ou HeLa-Tet-Hes1 sontensemencées et cultivées en présence de différentes concentrations de tétracycline:

Figure a : WB avec les extraits protéiques des cellules après 48 heures en culture.

Figure b : quantification du nombre de cellules vivantes en fonction du nombre de jours de culture et de la concentration de tétracycline dans le milieu.



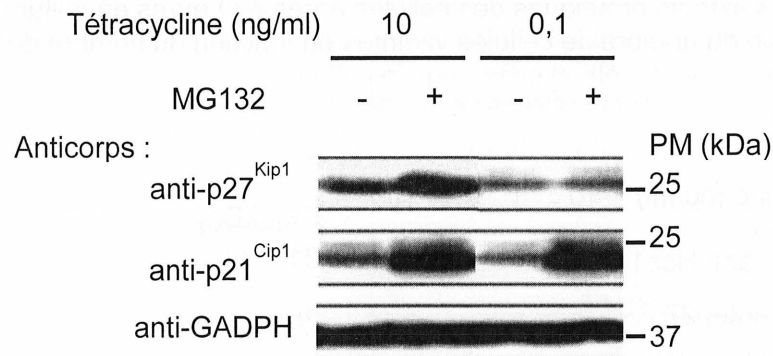
Figure b



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

- A) les effets de l'expression modérée de Hes1 (tet 0,1 ng/ml) pourraient s'expliquer par un raccourcissement de la durée du cycle cellulaire
- B) la baisse d'expression de p27^{Kip1} en absence complète de tétracycline (0 ng/ml) explique la diminution de la prolifération cellulaire
- C) l'insertion du plasmide dans le génome des cellules HeLa n'altère pas la viabilité cellulaire
- D) ces résultats permettent de conclure que la tétracycline n'altère pas la viabilité des cellules HeLa
- E) on peut conclure que l'expression de Hes1 inhibe l'expression de p27^{Kip1}

Pour analyser le mécanisme du contrôle de l'expression de p27^{Kip1} par Hes1, on cultive les cellules HeLa-Tet-Hes1 avec différentes doses de tétracycline. Après 4 jours, on bloque la transcription en ajoutant de l'actinomycine D dans le milieu, avec ou sans MG132, un inhibiteur du protéasome. Les cellules sont collectées 2 heures plus tard et analysées par Western Blot comme précédemment.



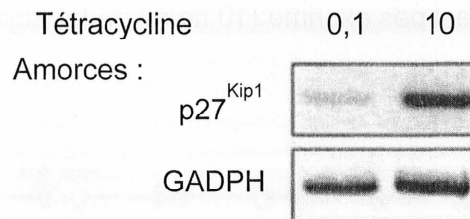
Question 7 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A) en l'absence de Hes1, p27^{Kip1} est probablement dégradée par le protéasome
- B) en présence de Hes1, le protéasome est inhibé
- C) Hes1 inhibe l'expression de p27^{Kip1} en augmentant sa dégradation par le protéasome
- D) ces résultats suggèrent que la demi-vie de p21^{Cip1} est inférieure à 2 heures dans les cellules HeLa.
- E) les réponses différentes des niveaux de p27^{Kip1} et p21^{Cip1} au traitement par le MG132 suggèrent que les deux protéines sont dans des compartiments cellulaires distincts

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

- A) la fonction du protéasome est de dégrader les protéines cellulaires
- B) l'ubiquitine permet au protéasome de reconnaître les protéines à dégrader
- C) le protéasome fonctionne à pH neutre
- D) le protéasome est localisé dans le réticulum endoplasmique
- E) les protéines nucléaires ne peuvent pas être dégradées par le protéasome

Les cellules HeLa-Tet-Hes1 sont cultivées en présence de différentes doses de tétracycline. Après 4 jours de culture, on récupère les cellules et on extrait l'ARN total. On analyse les niveaux d'expression des ARNm de p27^{Kip1} et de GAPDH dans chacun des échantillons par RT-PCR (réaction d'amplification en chaîne après transcription inverse). Pour chacun des couples d'amorces utilisés, on limite le nombre de cycles d'amplification pour se situer dans la phase exponentielle de la PCR. Le résultat des PCR est analysé par migration sur gel d'agarose et coloration au BET (qui fluoresce quand il est complexé aux acides nucléiques).



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

- A) lors de la réaction de transcription inverse, on ne peut pas utiliser une molécule d'ADN simple brin comme amorce
- B) lors de la réaction de transcription inverse, on peut utiliser un oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 5' de l'ARNm à amplifier
- C) dans le cas de la RT-PCR, le produit amplifié par PCR est de l'ADN double brin
- D) lors d'un cycle de PCR, l'étape de dénaturation permet de dissocier l'amorce du produit à amplifier
- E) les polymérase utilisées dans les réactions de PCR synthétisent l'ADN dans le sens 5' -> 3'

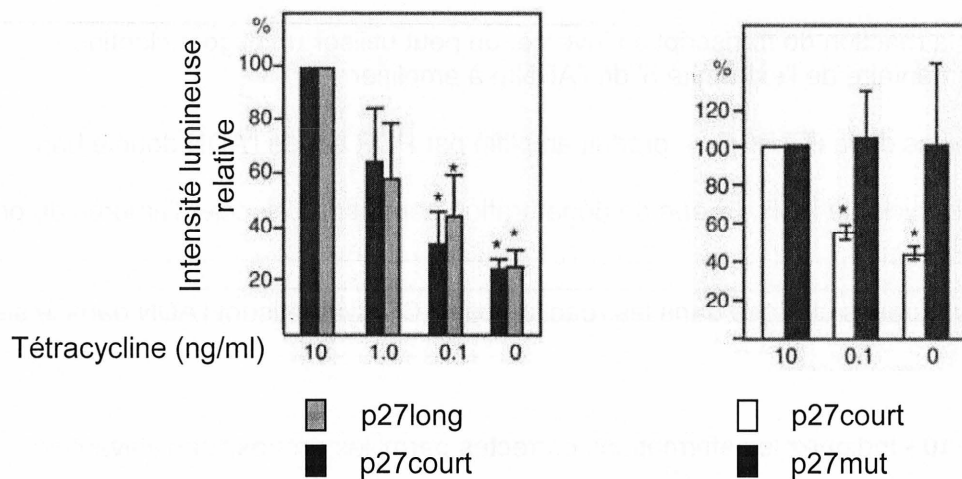
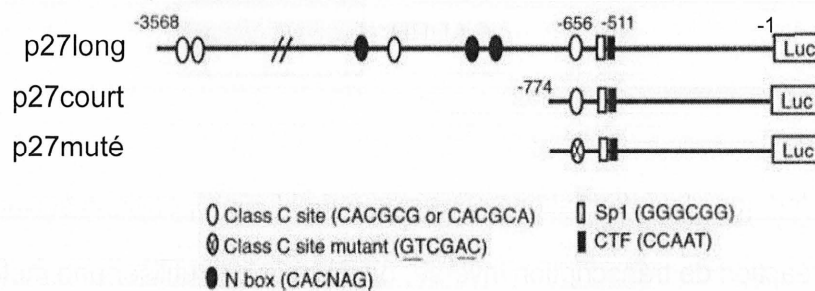
Question 10 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A) en l'absence de traitement par la DNase des extraits cellulaires à analyser, il reste possible par RT-PCR de différencier les produits d'amplification générés à partir de l'ADN génomique de ceux générés à partir de l'ARNm
- B) en absence de Hes1, l'ARNm de p27^{Kip1} est approximativement aussi abondant que l'ARNm de GAPDH
- C) cette expérience montre que l'expression de Hes1 fait diminuer la quantité d'ARNm de p27^{Kip1}
- D) cette expérience montre que Hes1 modifie l'expression de p27^{Kip1} en influençant la transcription
- E) on aurait pu obtenir une information similaire à celle obtenue dans cette expérience en réalisant un Northern blot.

Pour analyser l'effet de Hes1 sur la transcription du gène $p27^{Kip1}$, on construit des plasmides bactériens dans lesquels l'ADNc codant la luciférase est mis en aval de différents fragments d'ADN génomique situés en 5' du site de démarrage de la transcription du gène $p27^{Kip1}$ (position +1). Ces fragments d'ADN p27 contiennent de courtes séquences susceptibles de fixer des facteurs de transcription. Dans un des plasmides, on modifie la séquence du site de classe C en position -656.

Les cellules HeLa-Tet-Hes1 sont transfectées par les différents plasmides et cultivées avec des doses décroissantes de tétracycline. On collecte les cellules 2 jours après la transfection et on dose l'activité luciférase en mesurant la luminosité produite après ajout de luciférase, le substrat de la luciférase. Pour chacune des constructions, les résultats sont rapportés à la condition dans laquelle Hes1 n'est pas exprimé (10 ng/ml de tétracycline dans le milieu de culture).

Plasmides:



Chaque expérience a été répétée 10 fois. Les barres représentent l'écart type. Les étoiles indiquent que la différence avec la condition contrôle (10 ng/ml) correspondante est significative.

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

- A) on aurait pu obtenir des résultats similaires en mesurant l'ARNm de la luciférase par RT-PCR quantitative dans les cellules transfectées.
- B) dans les cellules transfectées, l'ARNm codant la luciférase est fusionné à celui de p27^{Kip1}
- C) le fragment inséré dans le plasmide p27long contient la totalité des éléments régulateurs du gène p27^{Kip1}
- D) pour interpréter les résultats, il a d'abord fallu normaliser l'activité de la luciférase à la quantité de cellules transfectées
- E) pour permettre l'accès de la luciférase à son substrat, on a dû perméabiliser les cellules avec un détergent et un traitement par la protéinase K (protéase non spécifique)

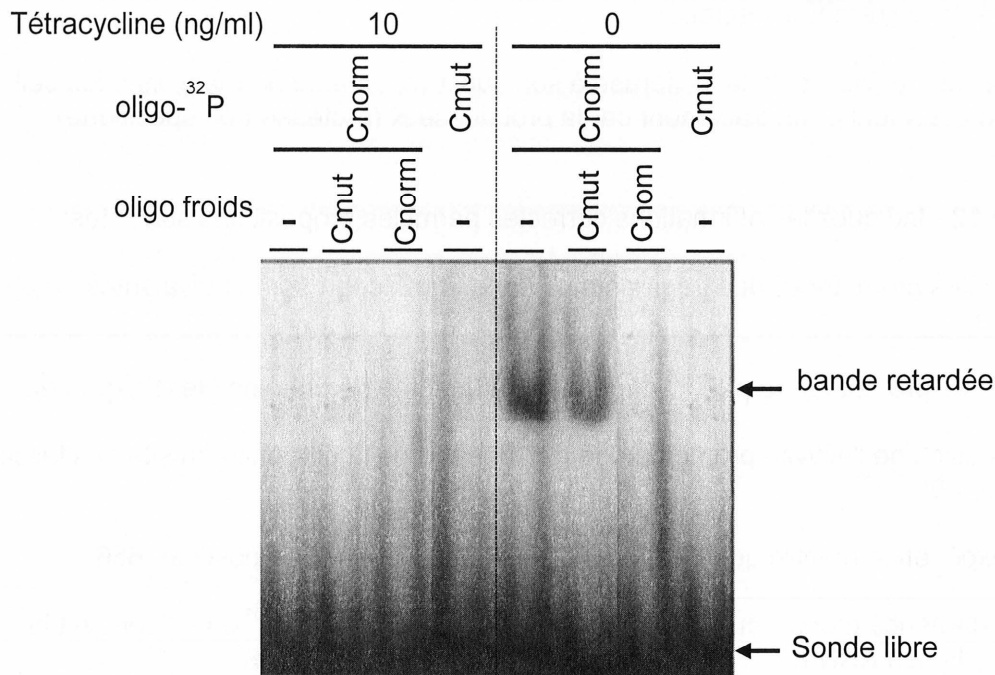
Question 12 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A) les activités promotrices des fragments p27long et p27court sont équivalentes en absence de Hes1
- B) l'activité du promoteur de p27^{Kip1} dépend de la quantité de protéine Hes1 exprimée
- C) la répression de l'activité promotrice de p27 dépend de la présence du site de classe C en position -656
- D) cette expérience montre que Hes1 se lie au site de classe C en position -656
- E) cette expérience montre que Hes1 modifie l'expression de p27^{Kip1} en influençant la stabilité de son ARNm

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

- A) certaines modifications covalentes des histones sont associées à l'activation de la transcription des gènes de classe 2
- B) dans les cellules, TBP est associé aux TAFs
- C) les ARN de transfert sont transcrits par l'ARN polymérase 1
- D) l'activation de la transcription par l'ARN polymérase 2 s'accompagne d'un remodelage de la chromatine
- E) le domaine C terminal de l'ARN polymérase 2 (CTD) participe au couplage de la transcription avec l'ajout de la coiffe et l'épissage

Les cellules HeLa-Tet-Hes1 sont cultivées avec 10 ng/ml ou 0 ng/ml de tétracycline. Deux jours après, on prépare des extraits nucléaires et on les incube avec des sondes oligonucléotidiques d'ADN double brin marquées au ^{32}P ; ces sondes contiennent le site de classe C présent en position -656, avec une séquence normale (Cnorm) ou mutée (Cmut). L'incubation peut se faire avec un large excès d'oligonucléotides de même séquence mais non radioactifs (« froids ») ; Après incubation avec les sondes, on fait migrer les extraits dans un gel de polyacrylamide, puis on détecte les sondes marquées par autoradiographie.



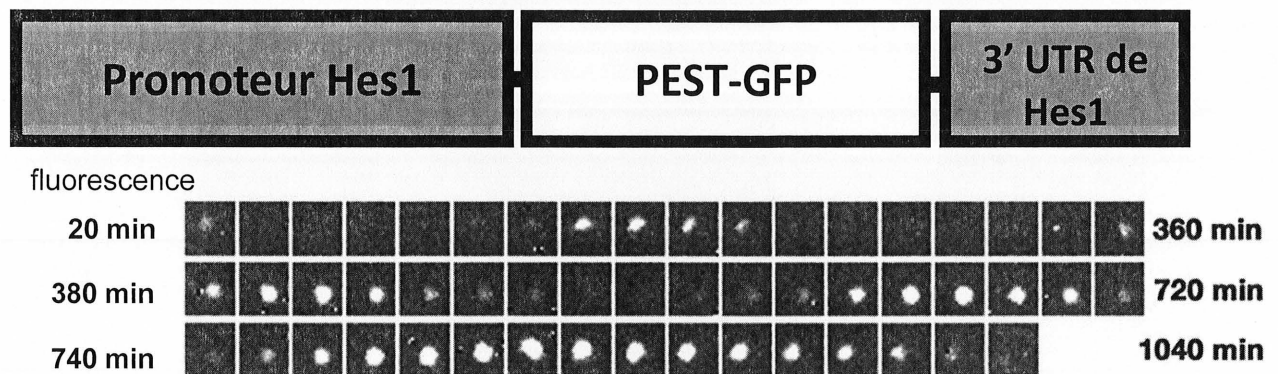
Question 14 - Indiquez les affirmations correctes parmi les propositions suivantes:

- A) dans les expériences de retard sur gel, l'ADN libre migre plus rapidement que l'ADN associé à un complexe protéique car il est plus chargé
- B) ces résultats permettent de conclure qu'en présence de Hes1, il se forme un complexe sur la séquence contenant le site de classe C
- C) ces résultats permettent de conclure que HES1 est présent dans le complexe associé au site de classe C
- D) pour avoir une idée plus précise de la taille des facteurs qui fixent la sonde d'ADN, on pourrait répéter cette expérience en présence de SDS
- E) dans cette expérience, les oligonucléotides non radioactifs ne sont pas capables de lier les protéines des extraits nucléaires

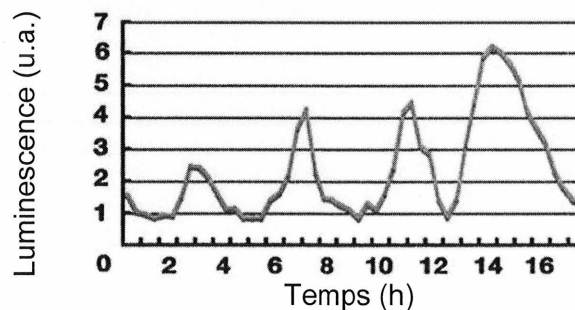
Pour étudier l'expression de Hes1 *in vivo*, on génère une souris transgénique dans laquelle a été intégré un vecteur comportant le promoteur de Hes1 suivi du cDNA de la GFP fusionné à une séquence PEST. Cette construction permet l'expression d'une protéine ayant bien l'activité GFP, mais dont la demi-vie est de 10 minutes. On isole des progéniteurs neuraux, issus du cerveau en développement des embryons de souris transgéniques et on les met en culture. On suit la fluorescence émise par les cellules en prenant une photo toutes les 20 minutes.

De nombreuses cellules sont ainsi suivies. L'image de fluorescence et la quantification montrent le suivi d'une cellule représentative de l'expérience.

plasmide



quantification



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

- A) cette expérience montre que la protéine Hes1 est instable
- B) cette expérience suggère que la protéine fluorescente fait la navette entre le noyau et le cytoplasme
- C) cette expérience montre que la transcription dépendante du promoteur de Hes1 est oscillatoire
- D) la transfection du même plasmide dans les cellules HeLa aurait nécessairement montré des résultats similaires
- E) sur la base de ces résultats, Hes1 pourrait réprimer sa propre transcription