



# Tutorat Lyon Est

Année Universitaire 2019 - 2020

## Unité d'Enseignement 2

Correction Annale 2018-2019 (janvier)

*Annale corrigée en cours le 28/11/2019 dans le cadre du Biocellothon par le  
Pr Bessereau*

*(Correction rapide fournie par le Pr et Correction détaillée réalisée par les  
tuteurs et basée sur sa présentation)*

**Martin BRÈS**  
**Guillaume COUDURIER-CURVEUR**

## Correction rapide

Questions	Item(s) juste(s)
1	ACE
2	AD
3	BC
4	ACE
5	ABD
6	BE
7	D
8	B
9	AC
10	CD
11	BCE
12	AD
13	ABC (D annulé)
14	BC
15	ACDE

Coucou les P1 !

Tout d'abord, courage en ces temps de révision, on croit en vous ! Ensuite, le Professeur Bessereau a donné quelques indications sur l'épreuve d'UE2 de Janvier 2019 et d'autres informations sur l'épreuve que vous passerez en Décembre 2019.

Pour commencer, l'épreuve de Janvier 2019 était particulièrement complexe compte tenu du contexte de report du concours de l'année dernière qui n'a pas permis aux Professeurs d'avoir assez de temps pour contrôler la difficulté de certains items ou de raccourcir les énoncés. Il ne faut donc pas se démoraliser en comptant ses points sur cette épreuve (la moyenne est beaucoup plus basse que d'habitude).

Par la suite, le Pr a insisté sur le fait que le prochain concours de Décembre sera beaucoup plus facile que le précédent concours et plus simple que les épreuves du Tutorat. Il y aura moins de texte et les questions seront juste plus simples. Il souhaite donc vous alerter sur le fait qu'il ne faut pas paniquer à la vue d'un item qui semble particulièrement facile : s'il a l'air facile c'est qu'il l'est.

Toujours dans cette optique, le Pr vous invite à bien savoir répondre aux questions simples ou de cours car les notes aux épreuves d'UE2 du concours ont une grande variance !

Vos tuteurs d'UE2 sont à fond derrière vous dans cette dernière ligne droite !!!

Cœur sur vous et vos mitochondries <3

PS : Un petit récapitulatif de toutes les expériences, leur but, leur lecture et leur interprétation se trouve à la fin de la correction pour vous permettre d'avoir une plus grande vision d'ensemble et vous aider à la compréhension ;)

La Team UE2

## Correction détaillée

### Question 1 : ACE

- 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

**A VRAI** Ceci est possible entre autres grâce aux sortes de halos blancs visibles grâce au décalage de phase qui délimitent les cellules et qui permet de bien les visualiser.

**B FAUX** Le microscope en contraste de phase utilise le décalage de phase pour obtenir son image.

**C VRAI**

**D FAUX** Les siRNAs font un peu plus d'une vingtaine de nucléotides de longueur (21 à 23 nucléotides). Ils ne peuvent donc pas s'apparier sur plus de 100 nucléotides.

**E VRAI** C'est ce qui permet aux siRNAs de diminuer l'expression d'un gène donné.

## Question 2 : AD

- 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

**A VRAI** Pour montrer si les siRNAs ont un effet toxique ou non sur les cellules, il aurait fallu un moyen de vérifier que l'ajout de siRNAs aurait cet effet. Ainsi, nous aurions dû avoir une situation où c'est le cas (présence de siRNAs) et une autre où ce n'est pas le cas pour pouvoir comparer les deux situations (absence de siRNAs). Or, nous n'avons aucun contrôle où aucun siRNAs n'est utilisé, donc ces résultats ne montrent pas que les siRNAs utilisés n'ont pas d'effet toxique sur les cellules analysées.

**B FAUX** Aucune différence significative (avec des petites étoiles) n'est observable entre les situations avec utilisation de si-Epha2#1 et #2 sur les figures. Rien ne nous laisse donc penser que ces derniers n'ont pas la même efficacité.

**C FAUX** L'expérience montre très bien un effet de Epha2 sur la distance de migration des cellules mais en rien un rapport direct avec le HGF. En effet, on voit bien que l'absence de Epha2 (en présence de si-Epha2), annule l'effet de HGF sur l'augmentation de la distance de migration des cellules mais l'expérience ne traite pas d'un effet agoniste ou antagoniste du HGF sur les récepteurs EphA2 (l'observation que nous avons faite aurait pu être justifiée par beaucoup de choses différentes de cette affirmation). De plus, on voit dans la suite de l'épreuve que ce n'est effectivement pas le cas.

**D VRAI** Il y a d'une part, l'augmentation de la vitesse de migration mais d'autre part la distance de migration, ou encore le déplacement.

**E FAUX** On peut observer dans la figure B qu'en absence de RCP (en présence de si-RCP), qu'il y ait ou non du HGF, la distance de migration cellulaire n'est pas significativement différente. Ce qui pourrait nous faire croire que l'item serait juste. Mais ce serait négliger la partie A (voir les images également) où l'on peut observer qu'en absence de RCP, en présence ou non de HGF, notre vitesse de migration cellulaire va changer (augmente en présence de HGF). Donc le HGF a un effet sur les cellules en absence de RCP également.

## Question 3 : BC

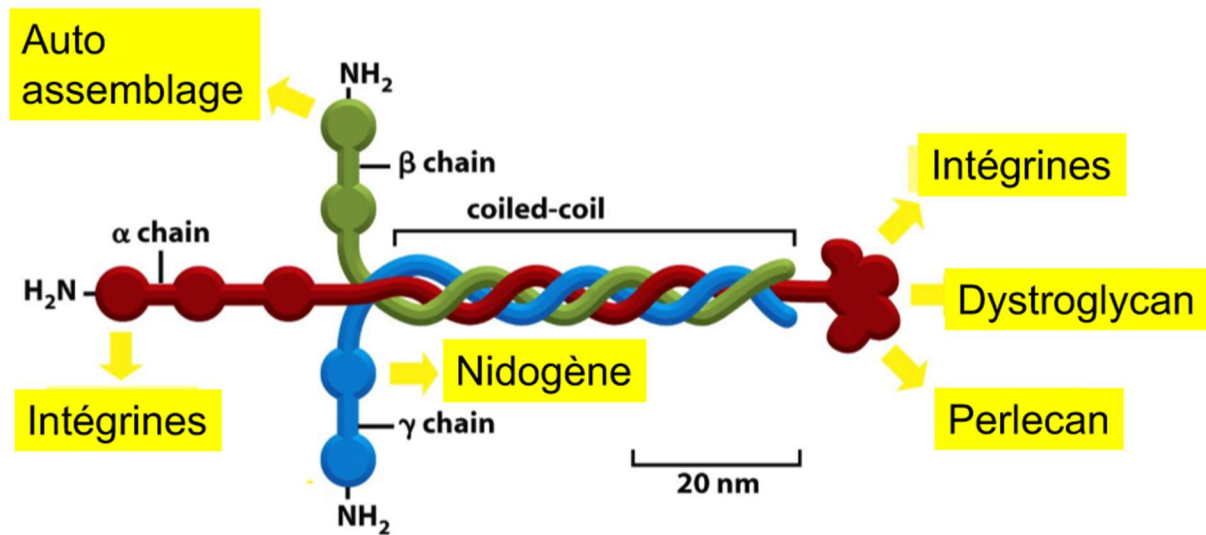
- A. Les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire en établissant des jonctions serrées
- B. Les cadhérines forment des interactions homophiliques qui dépendent de la concentration extracellulaire de calcium
- C. Les laminines interagissent directement avec les intégrines
- D. Le cytosquelette 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

**A FAUX** Les jonctions serrées sont des jonctions qui permettent de réaliser de l'étanchéité entre les cellules en bloquant la diffusion de nombreuses molécules (l'eau plus ou moins selon les jonctions serrées) d'un côté à l'autre de la cellule par la voie paracellulaire. Les jonctions permettant aux cellules d'interagir avec la matrice extracellulaire sont des classes de jonctions d'ancrage (les contacts focaux et les hémidesmosomes).

**B VRAI** Et elles permettent la formation de desmosomes ou de jonctions adhérentes.

**C VRAI** Cette information était présente dans un schéma du cours mais était aussi retrouvable en se rappelant que la laminine est un des composants majoritaires de la basale et que les intégrines s'y fixe. Donc à ce moment-là, il y aurait des chances que la laminine puisse se fixer aux intégrines.

Schéma de la laminine (on observe bien les différents domaines d'interaction avec les intégrines) :



**D FAUX** Les desmosomes et hémidesmosomes sont reliés au cytosquelette de filaments intermédiaires (ils participent donc à la résistance mécanique des cellules entre elles).

**E FAUX** Le changement de forme des cellules est dû aux modifications du cytosquelette d'actine et non aux microtubules qui eux servent plutôt au transport cellulaire.

#### **Question 4 : ACE**

- 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)
- Dans le gel (a), la bande à 250kDa pourrait correspondre à l'anticorps anti-GFP utilisé pour l'immunoprécipitation
- Dans le gel (a), chacune des bandes visibles peut représenter plusieurs chaînes polypeptidiques
- Le gel (b) montre que l'immunoprécipitation de EphA2 est plus efficace que celle de la GFP
- Ces résultats ne montrent pas que EphA2 et RCP interagissent directement

**A VRAI** Dans l'expérience A, nous avons un contrôle et nous pouvons analyser son utilité. Il nous montre la différence en termes de présence de protéine entre la situation avec le vecteur exprimant la GFP seule ou la GFP-RCP. Puisqu'entre les deux situations, ce qui a changé c'est la présence de RCP, ce contrôle nous permet de remarquer quelles protéines interagissent directement ou indirectement avec RCP mais pas avec GFP. En effet les bandes révélées dans la colonne GFP correspondent à des protéines s'étant fixées à la GFP de manière directe ou indirecte OU BIEN des protéines s'étant fixées aux anticorps anti-GFP. Ainsi, nous n'avons pas de contrôles nous permettent de savoir quelles protéines interagissent directement ou indirectement avec la GFP.

Si nous avons voulu avoir un tel contrôle, il aurait fallu réaliser la même immunoprécipitation avec des cellules non transfectées par un vecteur comprenant GFP. Ainsi, la seule différence entre ces deux colonnes serait la présence de GFP et nous excluons les interactions non spécifiques ainsi que les interactions avec les anticorps anti-GFP.

**B FAUX** On utilise dans cette expérience des réducteurs qui dissocient les différentes interactions entre protéines ou entre certaines portions de protéines comme les chaînes lourdes et légères. Or les chaînes légères et lourdes d'un anticorps sont à peu près de 25 et 50kDa et non pas 250kDa. Donc l'item est faux.

**C VRAI** Pour peu que deux chaînes soient de tailles similaires, elles apparaîtront dans la même bande. De plus, le Professeur note que ce phénomène se produit tout particulièrement entre 40 et 60kDa.

**D FAUX** On ne peut pas comparer l'intensité des signaux sur deux blocs indépendants car cela peut dépendre de la révélation ou de l'efficacité de la détection, qui sont des facteurs variés d'une expérience à l'autre.

**E VRAI** Nous avons bien une co-immunoprécipitation de EphA2 et RCP ce qui prouve une interaction directe OU indirecte. Mais rien ne peut nous faire savoir s'il s'agit de l'une ou de l'autre dans notre cas.

En effet, il y aurait pu avoir une ou plusieurs protéines intermédiaires entre EphA2 et RCP qui auraient permis cette interaction sans pour autant qu'elles soient liées de manière directe.

### **Question 5 : ABD**

- 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

**A VRAI** Dans l'expérience C, les cellules ne sont pas transfectées avec un vecteur exprimant la GFP. Donc elles ne sont pas censées avoir de la GFP dedans ni d'en détecter. Des anticorps anti-GFP seraient donc présents ici pour s'assurer qu'aucune GFP n'est présente ou détectée et de la bonne spécificité de l'anticorps anti-EphA2, ce qui revient à faire office de contrôle négatif.

**B VRAI** On remarque que EphA2 co-immunoprécipite avec Rab11 et RCP donc EphA2 interagit de manière directe ou indirecte avec Rab11 et RCP.

**C FAUX** Il est possible qu'au sein de la cellule on ait également un complexe EphA2-RCP d'un côté et un autre complexe EphA2-Rab11 de l'autre.

**D VRAI** En effet, dans l'expérience B, on EphA2 co-immunoprécipite avec GFP-RCP donc la liaison entre elles n'a pas été bousculée par la présence de la GFP en N-term.

**E FAUX** Utiliser de forts détergents, réducteurs et agents dénaturants sur des protéines quand on souhaite créer, utiliser et détecter des liaisons s'avère être contreproductif et source de biais importants puisque ces derniers produits dénaturent les liaisons protéiques.

### Question 6 : BE

- 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

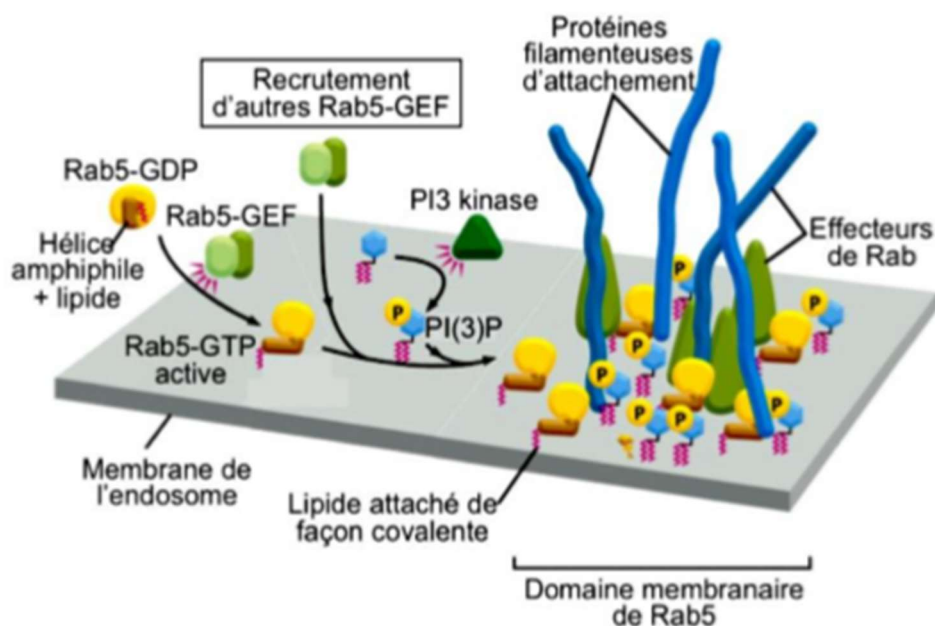
**A FAUX** Les protéines Rab sont des protéines cytosoliques. Ainsi, elles ne sont pas accrochées lors de leur synthèse à la membrane et n'ont donc pas besoin d'être synthétisées dans le réticulum endoplasmique granulaire.

**B VRAI** Elles contiennent une activité GTPase.

**C FAUX** Comme dit précédemment, les protéines Rab sont cytosoliques et peuvent occasionnellement se lier à la membrane. Mais elles ne le font pas toujours.

**D FAUX** Attention, les protéines Rab sont nombreuses dans la cellule et dans diverses localisations cellulaires. Un même GEF commun à toutes les Rab entraînerait leur activation générale, ce qui n'a fait perdre l'avantage de la réponse localisée et différentielle permise par les protéines Rab. Les GEF de Rab sont en effet plutôt spécifiques et se situent à des localisations différentes.

**E VRAI** On l'observe bien sur ce schéma.



Formation d'un domaine de Rab5 sur la membrane de l'endosome.

### Question 7 : D

- 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

**A FAUX** On peut observer l'endocytose dans la courbe de gauche, or aucune différence significative n'est observée en présence ou en absence de HGF. Donc HGF ne stimule pas l'endocytose.

**B FAUX** On peut voir sur la courbe de droite une différence à l'œil assez importante entre la présence ou l'absence de HGF vis-à-vis de la quantité d'EphA2 dans le pool interne de la cellule (notons qu'ici on a l'endocytose + le recyclage mais puisque l'endocytose n'est pas significativement changée dans toutes les situations présentées alors on en déduit que toute différence observée sera justifiée par un changement dans le recyclage de EphA2). Or cette différence n'est pas notée comme significative. Donc nous n'avons pas de différence significative entre les situations en présence ou en absence de HGF, ce qui nous interdit de conclure à une stimulation du recyclage de EphA2 en présence de HGF.

NB : Cette différence absolue grande mais non significative peut être justifiée par d'autres variables statistiques comme la variance.

**C FAUX** Puisqu'il n'y a aucune différence significative entre toutes les situations où on observe uniquement l'endocytose, nous ne pouvons pas non plus conclure à un rôle de RCP dans l'endocytose de EphA2.

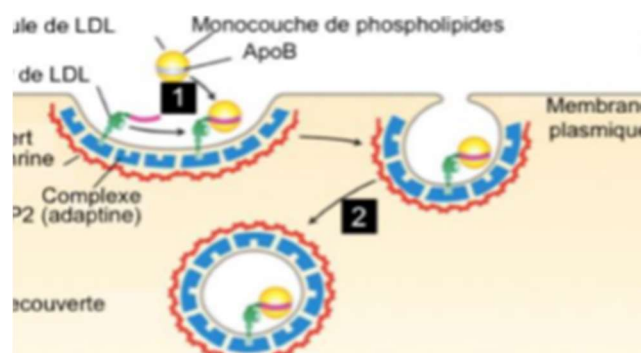
**D VRAI** Ici, nous avons une différence significative entre les situations si-Nt + HGF et si-RCP + HGF et il y a plus de recyclage lorsque RCP est présent (si-Nt puisque non réprimé), donc on peut présumer que RCP peut avoir un rôle dans le recyclage de EphA2.

**E FAUX** La dynamine joue un rôle très important dans l'endocytose. La réprimer empêcherait l'endocytose au lieu d'empêcher le recyclage des protéines. On n'aurait donc pas pu utiliser un si-RNA contre la dynamine à la place de la primaquine.

### Question 8 : B

- 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

**A FAUX** Si on regarde le schéma ci-dessous (sans faire attention à quelle protéine ou lipoprotéine on a), et qu'on s'intéresse à l'internalisation du récepteur (en vert) et de son ligand par endocytose, on voit que c'est l'extrémité extracellulaire qui est présente dans la lumière des vésicules. Pour la GFP sur EphA2-GFP, qui est présente sur la face intracellulaire, c'est donc l'inverse : elle se situe dans la face cytosolique.





**B VRAI** Attention à bien faire la différence entre « voir » et la « résolution ». Le premier consiste simplement en la détection de l'objet quand le second correspond à la distance minimale permettant la distinction de deux objets différents face au phénomène d'interférence.

S'il nous était impossible de voir les objets de moins de 200nm de diamètre, nous ne verrions pas grand-chose une beaucoup de western blot puisque ce que nous voyons sont des protéines (donc parfois moins de 200nm de diamètre).

**C FAUX** RCP se situe dans le cytosol de la cellule, et EphA2 dispose d'une portion intracellulaire exposée dans le cytosol lorsque cette dernière est internalisée durant l'endocytose. Donc le chemin le plus rapide et le moins coûteux pour faire interagir RCP et EphA2 est de les faire se rencontrer dans le cytosol et non pas dans les vésicules (car il faudrait internaliser RCP pour le faire rencontrer une autre partie de EphA2 et ensuite permettre une chaîne de signalisation cellulaire, ce qui est beaucoup trop contraignant et gaspillant pour la cellule).

De plus, comme dit précédemment, il est possible que RCP et EphA2 interagissent puisqu'ils colocalisent et que nous avons démontré précédemment leur interaction in vitro pendant l'immunoprécipitation.

**D FAUX** Puisque nos observations se font par fluorescence, il est inutile de perméabiliser la cellule car nous n'avons pas besoin de faire rentrer quelque chose dedans. Nous ne faisons donc pas de perméabilisation

**E FAUX** Si EphA2 et RCP colocalisent, même si ce n'est que partiel, il est possible qu'elles se rencontrent et donc qu'elles interagissent ensemble (directement ou non) si elles le peuvent. Le seul moment où nous pouvons nous prononcer, c'est si EphA2 et RCP ne colocalisaient pas du tout : à ce moment là aucune rencontre ne serait possible et aucune interaction ne le serait non plus en conséquence.

### **Question 9 : AC**

- 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

**A VRAI** En effet, il reste encore une petite quantité de protéine EphA2 en présence de si-EphA2. Cette bande est à la même hauteur que celle sans siRNA dans la ligne anti-EphA2, donc il s'agit bien du EphA2 endogène sensible au siRNA. Comme les deux autres protéines EphA2 transfectées sont plus lourdes à cause de la GFP, elles sont situées au-dessus sur le Western Blot. Donc ça veut dire que la ligne qui est la même hauteur que EphA2 sans si-EphA2 correspond forcément à EphA2 endogène (produite normalement par la cellule). Comme il reste un peu de protéine, on peut dire que le si-EphA2 n'a pas un effet complet sur l'expression de EphA2, puisqu'il n'éteint pas complètement son expression.

**B FAUX** Il manque un contrôle pour pouvoir dire ça. En effet, il faudrait comparer une condition où on transfecte EphA2-GFP sans le siRNA dirigé contre EphA2 et une condition où on transfecte EphA2-GFP mais cette fois avec un si-EphA2. Ici, on a seulement la 2<sup>ème</sup> condition (avec un siRNA), donc on ne peut pas comparer et dire que le si-EphA2 n'a pas d'effet sur l'expression de EphA2-GFP.

**C VRAI** Pour cela, on regarde déjà si la quantité de protéine EphA2 et EphA2-GFP change en présence de ephrin-A1. En effet, pour pouvoir ensuite comparer les quantités de protéines phosphorylées, il faut déjà s'assurer que les quantités de protéines totales ne changent pas. Ici, on peut voir sur la ligne anti-EphA2 que les quantités de protéine EphA2 endogène et EphA2-GFP ne sont pas vraiment différentes

en présence ou en absence d'ephrin-A1. Maintenant qu'on a vérifié cela, on peut s'intéresser aux quantités de protéines phosphorylées. On voit bien qu'elles augmentent pour EphA2 endogène et pour EphA2-GFP en présence d'ephrin-A1. Donc ces données montrent bien que l'ephrin-A1 stimule la phosphorylation de EphA2 et EphA2-GFP dans les conditions expérimentales.

**D FAUX** On ne peut pas du tout dire ça. En effet, ici on ne regarde qu'une seule tyrosine, donc on ne peut pas savoir si la phosphorylation sur d'autres tyrosines est stimulée par ephrin-A1. Il faudrait faire d'autres expériences pour le savoir.

**E FAUX** Ce n'est pas la raison pour laquelle on utilise la tubuline. En effet, cette protéine est utilisée pour vérifier qu'on a bien mis la même quantité de protéine dans toutes les conditions. Cette protéine est utilisée car elle n'a pas du tout de lien avec l'expérience (c'est une protéine ubiquitaire, dont le gène est un gène de ménage, elle est donc exprimée à peu près de la même façon dans toutes les cellules puisque son expression n'est pas régulée), donc elle sert juste de contrôle. Attention, il est nécessaire d'avoir un contrôle comme celui-là pour pouvoir conclure sur des changements de quantité des protéines sur le Western Blot.

### **Question 10 : CD**

- 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

**A FAUX** On peut voir que l'effet de HGF n'est pas dépendant de la phosphorylation de la tyrosine 588 stimulée par l'ephrin-A1, car sur le graphique en b la fraction de RCP-EphA2-GFP colocalisée augmente que la tyrosine 588 soit phosphorylable ou non (non=quand elle est mutée en alanine). Mais cette expérience ne nous dit rien sur un effet de l'HGF impliquant ephrin-A1. C'est tout à fait possible que l'effet de l'ephrin-A1 (si activée par HGF) ne soit pas la phosphorylation de EphA2 mais une autre action.

**B FAUX** Pareil, on ne peut rien dire là-dessus. Cette expérience ne nous dit rien d'une possible modification post-traductionnelle de EphA2 suite à l'application de HGF. Il faudrait là aussi faire d'autres expériences pour le savoir. Peut-être que EphA2 peut être phosphorylé sur d'autres tyrosines ou d'autres acides aminés. En tous cas on ne peut rien dire avec ces données.

**C VRAI** En effet, le récepteur EphA2 est un récepteur à activité tyrosine-kinase, donc il existe un phénomène de phosphorylation croisée du récepteur (chaque partie du dimère phosphoryle l'autre). Donc si un mutant du site catalytique (site permettant la phosphorylation) s'exprime, il peut agir comme un dominant négatif, c'est à dire empêcher le fonctionnement du récepteur puisque qu'une seule des deux parties du récepteur serait activée par phosphorylation et l'autre ne le sera pas car un des deux récepteurs du dimère dysfonctionne. Le récepteur pourrait ainsi ne plus fonctionner suite à l'expression d'un mutant du site catalytique, d'où l'effet dominant (un seul des 2 peut être muté) négatif (empêcher le fonctionnement).

**D VRAI** Sur la figure b, on peut voir quand même une augmentation de la colocalisation de EphA2 et RCP quand on applique HGF, et cela même si on empêche la phosphorylation de la tyrosine 588 par

mutation en alanine. Donc cette phosphorylation sur la tyrosine 588 n'est pas nécessaire pour l'augmentation de cette colocalisation.

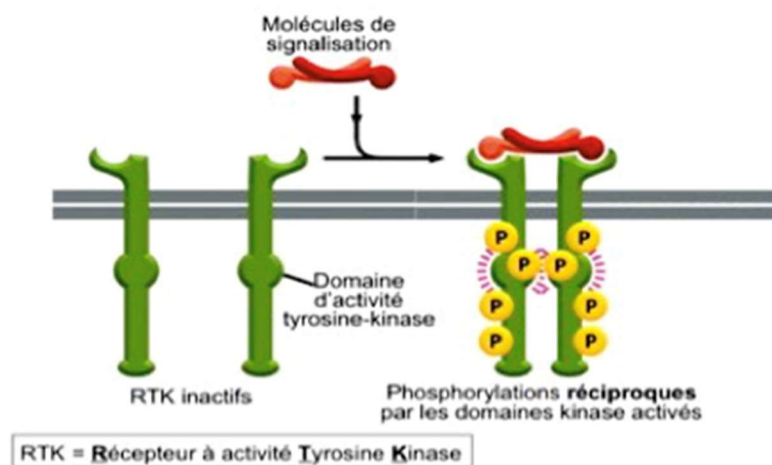
**E FAUX** Cette expérience ne s'intéresse pas à ça ! Du coup elle ne peut pas du tout confirmer cela, puisqu'on n'étudie pas ici l'internalisation de EphA2, on étudie juste sa colocalisation avec RCP et sa phosphorylation sur la tyrosine 588.

### **Question 11 : BCE**

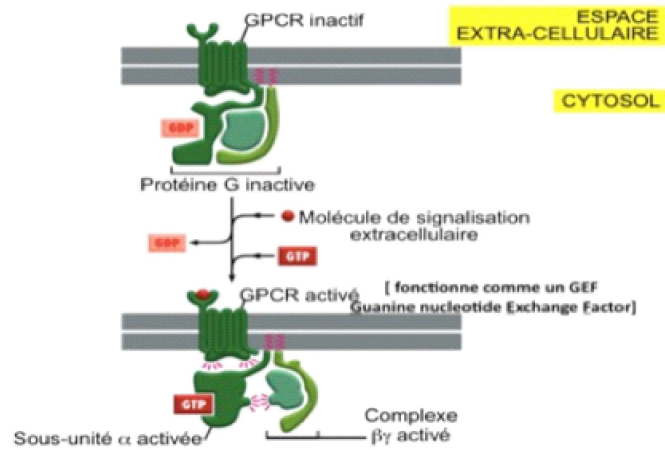
- A. La fixation d'un agoniste sur un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase provoque un changement de conformation de sa région intracellulaire
- B. La fixation d'un agoniste sur un récepteur transmembranaire à 7 hélices transmembranaires couplé aux protéines G provoque un changement 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

Rappel : Agoniste=molécule activant une autre molécule, un récepteur ici

**A FAUX** En effet, cette fixation n'implique pas un changement de conformation en intracellulaire pour les récepteurs à activité tyrosine-kinase, elle entraîne juste une dimérisation des récepteurs (deux récepteurs se rapprochent suite à la fixation d'un agoniste), et cela entraîne une phosphorylation mutuelle des récepteurs (chacun phosphoryle l'autre). Donc la fixation d'un agoniste n'entraîne pas un réel changement de conformation, mais juste une dimérisation.



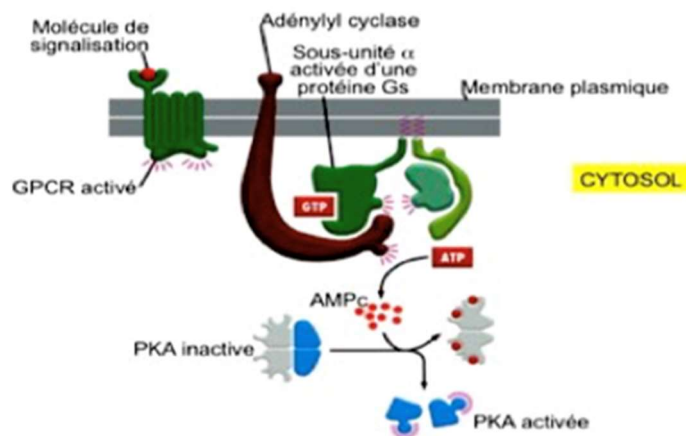
**B VRAI** Pour les récepteurs couplés à la protéine G, cela se passe bien comme ça. En effet, comme cette fois il y a 7 hélices transmembranaires (contre 1 pour les récepteurs à activité tyrosine-kinase), il est possible de voir un changement de conformation (une restructuration de la protéine) de la région intracellulaire suite à la fixation d'un agoniste. Et c'est bien ce qui va se passer pour les récepteurs couplés à la protéine G, ce qui va entraîner une activation des différentes sous-unités de la protéine G.



**C VRAI** En effet, cela est tout à fait possible. C'est le cas par exemple de la voie de signalisation impliquant Raf (=MAP kinase kinase), une sérine/thréonine kinase, qui va être activée par Ras, elle-même activée suite à l'activation d'un récepteur à tyrosine-kinase (p227 du poly pour les schémas).

**D FAUX** Ce n'est pas le rôle des récepteurs membranaires de phosphoryler les inositols phosphates. En effet, cela est réalisé par la PI3kinase, qui elle peut être certes activée par des récepteurs transmembranaires. De plus, le rôle des récepteurs à activité tyrosine-kinase est de phosphoryler des tyrosines, et les inositols phosphates ne sont pas du tout des tyrosines.

**E VRAI** L'adénylate cyclase est bien une protéine de la membrane plasmique. Elle catalyse la formation d'AMP cyclique (AMPc), et cela est réalisé au niveau de la membrane plasmique après une activation par la sous-unité alpha d'une protéine Gs par exemple.



### Question 12 : AD

- 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

**A VRAI** Pour vérifier cela, on compare les conditions sans et avec HGF dans la condition si-Nt. On vérifie déjà que la quantité de RCP sur le gel est constante dans ces deux conditions. Puis on s'intéresse à la

quantité de protéine RCP phosphorylée (ici sur la sérine 435), et on remarque bien qu'en présence de HGF, il y aura plus de protéine phosphorylée sur cette sérine.

**B FAUX** Attention, ici on n'a pas de contrôle comme la tubuline ou l'actine, mais c'est RCP qui joue ce rôle car en fait on a immunoprécipité RCP (couplé à la GFP), donc c'est cette protéine qui va servir de contrôle. Pour regarder si la quantité de RCP change vraiment, il faudrait prendre une autre protéine comme contrôle et ne pas immunoprécipiter seulement RCP, mais réaliser le Western Blot sur le lysat cellulaire.

**C FAUX** Tout d'abord, on n'a aucune preuve avec cette expérience pour dire si la phosphorylation va être directe ou indirecte (par le biais d'autres kinases). De plus, on peut voir que la quantité de RCP phosphorylée sur la sérine 435 augmente en présence de HGF alors qu'on a inhibé LMTK1.

**D VRAI** On regarde déjà (comme toujours), qu'on a la même quantité de RCP immunoprécipitée dans les conditions si-LMTK3 avec ou sans HGF (c'est le contrôle). Puis on remarque que la quantité de EphA2 ne change pas même si on a appliqué du HGF sur la cellule, alors qu'on observe cette augmentation dans les autres conditions. Donc on peut dire que c'est bien le fait d'avoir inhibé LMTK3 qui empêche l'augmentation de la quantité de EphA2 co-immunoprécipitée avec GFP-RCP. Du coup cela veut dire que si LMTK3 est inhibée, l'interaction entre GFP-RCP et EphA2 n'est pas augmentée par la présence de HGF. Donc LMTK3 est nécessaire pour augmenter cette interaction induite par HGF. Même si on pourrait croire qu'on peut voir plus de protéine sur le gel, le Pr Bessereau ne considère pas que cette différence est significative, surtout comparée aux différences observées après l'application du HGF dans les autres conditions.

**E FAUX** En effet, même quand on mute cette sérine en alanine, on observe qu'après immunoprécipitation de GFP-RCP mutée (on récupère seulement GFP-RCP mutée et toutes les protéines qui interagissent avec elle), et révélation d'EphA2 sur le Western Blot (on vérifie la présence de EphA2 parmi les protéines qui ont lié GFP-RCP), on arrive à détecter la protéine EphA2. Cela veut dire que EphA2 et RCP interagissent même si la sérine 435 est mutée. Donc cette sérine n'est pas nécessaire à l'interaction entre RCP et EphA2. Attention, on ne sait pas s'il s'agit d'une interaction directe ou indirecte !

### **Question 13 : ABC (D annulé)**

- 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

**A VRAI** Pour cela on regarde la figure a. Sur cette figure on remarque une différence significative seulement entre les conditions EphA2-GFP + HGF et EphA2-GFP – HGF. Il n'y a donc pas de différence entre les deux conditions avec ou sans HGF quand la sérine 897 de EphA2 a été mutée en alanine (ce qui empêche la phosphorylation de cet acide aminé). Donc l'HGF ne peut pas augmenter la quantité de EphA2 internalisé si cet acide aminé est muté alors qu'il le fait si la protéine est normale. Cela montre ainsi que la sérine 897 est nécessaire pour que HGF puisse augmenter la proportion de EphA2 internalisé.

**B VRAI** Ici on regarde la figure b. Là encore, il n'y a une différence significative seulement entre les conditions si-Nt + HGF et si-Nt – HGF. Donc il n'y a pas de différence entre les conditions si-LMTK3 +

HGF et si-LMTK3 – HGF, c'est à dire que le fait d'inhiber LMTK3 empêche l'augmentation par HGF d'EphA2 internalisé. Comme précédemment, on peut conclure que LMTK3 est nécessaire ici pour permettre l'augmentation de la proportion d'EphA2 internalisé grâce à HGF.

**C VRAI** Et là on regarde la figure c. Comme pour les précédentes, on peut voir que la différence n'est significative qu'entre les conditions RCP<sup>WT</sup> + HGF et RCP<sup>WT</sup> – HGF. Donc il n'y pas de différence entre les conditions RCP<sup>435A</sup> + HGF et RCP<sup>435A</sup> – HGF. Du coup, là aussi, la mutation d'un acide aminé phosphorylable empêche l'augmentation de la proportion de EphA2 internalisé suite à l'application du HGF. Donc la présence d'une sérine en position 435 est bien nécessaire à l'augmentation par HGF de la proportion d'EPHA2 internalisé.

**D ANNULÉ** Les professeurs ont décidé d'annuler cet item. En effet, beaucoup de personnes ont répondu vrai alors que les profs le considéraient faux. En fait, cette expérience ne suggère pas forcément que HGF provoque l'activation de plusieurs kinases. En effet, il pourrait exister une seule kinase, qui elle ensuite active de nombreuses autres kinases ou autres protéines. Donc HGF en soi ne pourrait activer qu'une seule kinase directement, même si les mécanismes ensuite impliquent d'autres protéines. Les profs ont décidé de l'annuler car cet item était trop ambigu, étant donné de la formulation avec le mot « suggère », qui du coup pouvait nous induire vraiment en erreur puisqu'il ne s'agissait pas d'une conclusion mais de quelque chose de possible avec toutes ces données (même si ce serait plutôt quelque chose que suggère cette expérience, ce qui en soi est faux car rien ne nous indique ça sur les figures).

**E FAUX** On ne peut rien dire là-dessus puisqu'on observe seulement la corrélation entre ces phénomènes (HGF a besoin de LMTK3 et de la sérine 897 de EphA2 pour pouvoir augmenter la proportion de EphA2 internalisé). Donc on ne peut pas dire cela, puisqu'on n'a pas étudié un phénomène en fonction de l'autre, mais juste les deux séparément. LMTK3 phosphoryle plutôt RCP en position 435.

#### **Question 14 : BC**

- 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

**A FAUX** Le manteau de clathrine n'est pas spécifique des vésicules d'endocytose puisqu'on le retrouve aussi pour les vésicules post-golgiennes qui partent de l'appareil de Golgi, comme par exemple les vésicules d'exocytose.

**B VRAI** L'endosome commence déjà à avoir un pH plus bas que dans le cytosol, et cet abaissement du pH se continuera tout au long de la maturation de l'endosome en lysosome (qui lui doit avoir un pH=4/5 pour que les hydrolases puissent fonctionner). L'acidification des endosomes est en effet progressive jusqu'au lysosome.

**C VRAI** C'est exactement le devenir du contenu l'endosome tardif qui sera donc bien dégradé par les lysosomes. Cette dégradation est signalée (=les protéines sont marquées) par la multi-ubiquitinylation des protéines devant être dégradées.

**D FAUX** Le contenu des corps multivésiculaires est dégradé par le lysosome et non le protéasome. Ce dernier dégrade les protéines nucléaires et cytosoliques, alors que les corps multivésiculaires sont le stade de l'endosome terminal juste avant la transformation en lysosome. Ce corps contient les protéines endocytées ou provenant d'autres vésicules.

**E FAUX** Il n'y a pas de manteau au niveau des cavéoles. Certes il y a la présence de cavéoline, une protéine plusieurs fois transmembranaire, au niveau des radeaux lipidiques, mais on n'observe pas une structure en forme de manteau telle que celle de la clathrine.

### **Question 15 : ACDE**

- 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

**A VRAI** Tout à fait ! Ces deux méthodes sont possibles. Pour ce qui est de la recombinaison homologe, elle peut permettre d'inactiver un gène par KO au bout d'un certain nombre de générations. On peut aussi utiliser la méthode CRISPR qui peut permettre également de faire un KO. Pour plus de détails sur les méthodes, on vous conseille de bien revoir votre cours, car il est essentiel pour la compréhension des expériences et aussi parfois pour répondre à des questions comme celle-ci !

**B FAUX** Comme on l'a vu dans l'expérience 1, la vitesse et la distance de migration sont 2 choses indépendantes. Ici, on étudie seulement la distance de migration (>20  $\mu\text{m}$  ou pas), et pas la vitesse puisqu'on n'a pas des données sur la vitesse, mais juste après avoir attendu 72h. Donc on ne peut rien dire sur les vitesses rien qu'avec ces données. RCP et EphA2 permettent certes une augmentation de la distance de migration, mais du coup on ne peut rien dire sur la vitesse.

**C VRAI** En effet, on peut voir que sans RCP et sans EphA2, les cellules migrent très peu (très peu de cellules au-delà de 20  $\mu\text{m}$ ) ou même pas du tout. Donc EphA2 et RCP sont nécessaires à la migration des cellules tumorales selon ces données.

**D VRAI** Cette question fait appel à un esprit de synthèse, d'où l'importance du schéma qui vous suit tout au long de l'épreuve ! Dans les expériences 1 à 7, on a réalisé des expériences sur les cellules H1299. On a pu tirer plusieurs conclusions sur l'impact de HGF dans cette lignée provenant d'un cancer du poumon. On vous a fait un résumé des conclusions importantes de chaque expérience ci-dessous (après la correction), comme un modèle de ce que pourrait être votre brouillon (allez le voir, ça peut valoir le coup). Si les observations des expériences 1 à 7 sont aussi valables pour le cancer du pancréas, RCP activé (phosphorylé sur Ser435) va recruter les récepteurs EphA2 dans son compartiment intracellulaire (d'où la colocalisation et l'interaction), et donc cet item est bien vrai.

**E VRAI** Dans les expériences précédentes, on a pu observer que la présence d'une sérine en position 897 était importante pour que EphA2 puisse être internalisé. Or la phosphorylation de cette sérine est indépendante du ligand Ephrin-A1 (voir énoncé expérience 7). De plus, on a montré dans l'expérience 6 que ce ligand Ephrin-A1 permet la phosphorylation de la tyrosine 588, mais cela n'a pas d'impact sur la colocalisation de RCP et EphA2.

Exemple de brouillon possible (ceci est un exemple plutôt bien détaillé mais du coup rigoureux, mais sinon mettez ce qui vous semble important et ce qui vous sert vraiment sur votre brouillon). Cela peut vous permettre d'avoir un aperçu plus clair et plus global de l'épreuve.

Introduction : RCP, effecteur de la GTPase Rab11, très exprimé dans cancers agressifs

Interaction possible avec EphA2, un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase.

Cellules H1299 dérivées d'un cancer du poumon

HGF=growth factor (facteur de croissance)

#### *Expérience 1 :*

- But : observer la migration des cellules dans différentes conditions
- Types d'expérience : a et b → graphiques qui montrent la vitesse et la distance de migration des cellules dans différents conditions : si-Nt=contrôle, si-RCP=inhibition de RCP et si-EphA2=inhibition de EphA2. À chaque fois, on met ou pas du HGF. À droite, microscopie en contraste de phase qui montre différentes cellules et leur migration dans différentes conditions
- Lecture des figures : HGF permet une **augmentation de la vitesse et de la distance** de migration. Quand on inhibe RCP ou EphA2, le traitement par HGF fait bien augmenter la vitesse mais pas la distance de migration
- Interprétation : Donc RCP et EphA2 ont un rôle dans l'augmentation par HGF de la distance de migration des cellules.

#### *Expérience 2 :*

- But : identifier les interactions entre RCP et EphA2 (et d'autres protéines)
- Types d'expérience : /!\ agent réducteur = séparation des protéines reliées par ponts disulfures
- a : électrophorèse sous SDS-PAGE et coloration Bleu de Coomassie (donc toutes les protéines sont révélées)
- b : coimmunoprécipitation : immunoprécipitation (IP) de GFP et immunoblot (IB) EphA2 et GFP-RCP
- c : coimmunoprécipitation : IP de EphA2 et IB de RCP, Rab11 et EphA2
- Lecture des figures et interprétation : on peut voir une **interaction** entre RCP et EphA2 (contrôle avec GFP et IgG), et entre EphA2 et Rab11. Ces interactions sont directes ou indirectes (on ne peut pas savoir).

#### *Expérience 3 :*

- But : analyser dynamique de EphA2 (internalisation) en fonction de HGF et RCP
- Types d'expérience : graphiques qui montrent la proportion d'internalisation de EphA2 en fonction du temps avec ou sans primaquine (inhibe recyclage des protéines internalisées vers la membrane plasmique). Inhibition ou pas de RCP, présence ou pas de HGF. /!\ la différence est significative seulement entre les conditions si-Nt + HGF et si-RCP + HGF.
- Lecture des figures : Sans inhibition du recyclage, l'inhibition du RCP empêche l'augmentation par HGF de la proportion de EphA2 internalisé. Si on inhibe le recyclage de EphA2, l'inhibition de RCP n'a plus d'impact.
- Interprétation : Donc **RCP** jouerait en **rôle** dans le **recyclage** de EphA2, et l'inhiberait peut-être (puisque quand on inhibe RCP, il y a + de recyclage que quand on ne l'inhibe pas).

#### *Expérience 4 :*

- But : regarder la colocalisation de EphA2 et RCP avec ou sans HGF
- Types d'expérience : microscopie confocale (/!\ résolution 200nm) et graphique montrant colocalisation
- Lecture des figures : RCP et EphA2 sont plus colocalisés (à l'intérieur de la cellule) avec HGF que sans



- Interprétation : HGF semble activer l'endocytose de EphA2 et son recrutement vers des régions où RCP est présente (et donc sûrement leur interaction montrée dans l'expérience 2).

#### *Expérience 5 :*

- But : observer l'implication de l'ephrin-A1 et de la tyrosine 588 dans la colocalisation de EphA2 et RCP activée par HGF (suite à l'expérience 4)
- Types d'expérience : on éteint l'expression de EphA2 et on la réexprime grâce à des vecteurs modifiés (les 2 couplés à la GFP et muté sur la tyrosine 588 pour un)
  - a : Western Blot révélant EphA2 total et EphA2 phosphorylé sur la tyrosine 588
  - b : graphique indiquant la colocalisation RCP-EphA2 avec ou sans HGF pour EphA2 normal et muté
- Lecture des figures : On remarque que le si-EphA2 n'éteint pas complètement l'expression endogène de EphA2. L'ephrin-A1 permet une plus grande phosphorylation de EphA2 sur la tyrosine 588. La mutation de la tyrosine 588 en alanine empêche bien la phosphorylation sur cet acide aminé. Mais cette mutation n'empêche pas l'augmentation par HGF de la colocalisation (et donc probablement l'interaction) de RCP et EphA2.
- Interprétation : la phosphorylation de la tyrosine 588 de EphA2 par ephrin-A1 n'est **pas vraiment importante** dans le phénomène activé par HGF

#### *Expérience 6 :*

- But : observer l'implication de la sérine 435 de RCP et des kinases LMTK sur la liaison de EphA2 et RCP activée par HGF (suite à l'expérience 2)
- Types d'expérience : Western Blot (et pas des moindres !). Protéine RCP couplée à la GFP mutée ou non sur la sérine 435. Inhibition de LMTK3 ou LMTK1 avec ou sans HGF. Immunoprécipitation de RCP, et révélation de EphA2, de RCP phosphorylé sur Ser435, de Rab14 et de Rab11.
- Lecture de la figure : HGF augmente la quantité de RCP phosphorylé sur la sérine 435 et la quantité de EphA2 liée à RCP. L'inhibition de LMTK1 n'a aucun effet sur ça, alors que l'inhibition de LMTK3 empêche ces augmentations de la même façon que la mutation de la sérine 435 en alanine (dans ce cas plus aucun RCP phosphorylé sur la Ser435)
- Interprétation : HGF augmente la phosphorylation de RCP sur la sérine 435, LMTK3 et la sérine en position 435 de RCP sont nécessaires à l'augmentation par HGF de la liaison de EphA2 à RCP.

#### *Expérience 7 :*

- But : observer l'impact de LMTK3, de la sérine 897 de EphA2 et de la sérine 435 de RCP dans l'augmentation par HGF de la proportion de EphA2 internalisé (suite à l'expérience 3)
- Types d'expérience : mutation des sérines 897(EphA2) et 435 (RCP) et inhibition de LMTK3 avec ou sans HGF. Graphique montrant la proportion d'EphA2 internalisé en fonction du temps
- Lecture des figures :
  - a : la différence est significative seulement entre EphA2 + HGF et EphA2 – HGF. La mutation de la sérine 897 de EphA2 empêche l'augmentation par HGF de EphA2 internalisé.
  - b : la différence est significative seulement entre si-Nt + HGF et siNt – HGF. L'inhibition de LMTK3 empêche l'augmentation par HGF de EphA2 internalisé.
  - c : la différence est significative seulement entre RCP<sup>WT</sup> + HGF et RCP<sup>WT</sup> – HGF. La mutation de la sérine 435 de RCP empêche l'augmentation par HGF de EphA2 internalisé.
- Interprétation : pour que le traitement par HGF agisse, il faut que la sérine 897 de EphA2 soit présente (et donc sûrement phosphorylée), que LMTK3 soit active et que la sérine 435 de RCP soit présente (et phosphorylée par LMTK3 → énoncé de la figure 6).

#### *Expérience 8 :*

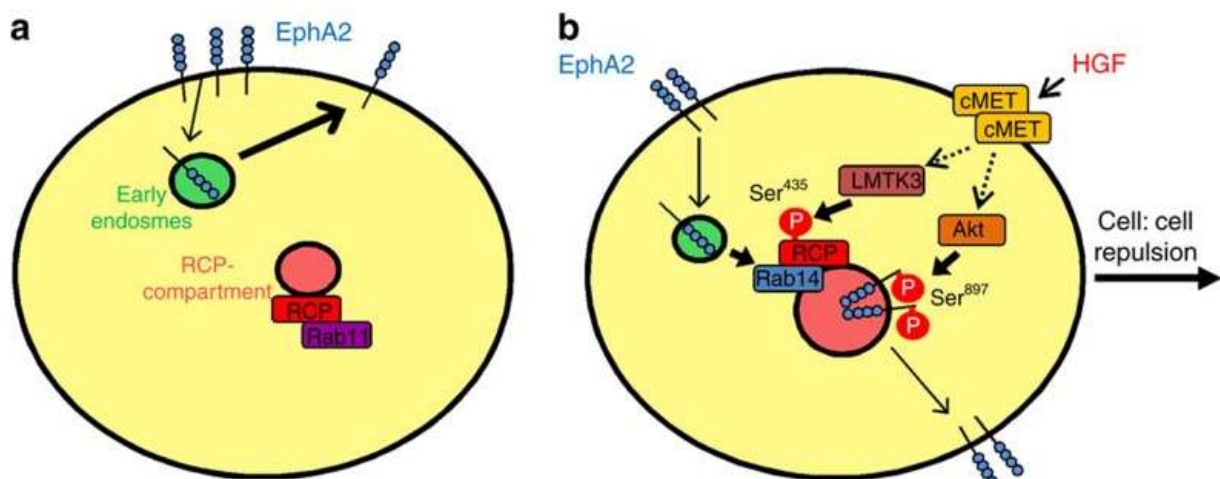
- But : étudier si dans les ACP (cancers pancréatiques) induits chez des souris, la migration des cellules dépend de RCP et EphA2
- Types d'expérience : microscopie en contraste de phase et graphique quantifiant le pourcentage de cellules ayant dépassé 20 µm. KO de RCP et EphA2. Étude de la distance de migration après 72h

- Lecture des figures : le KO de RCP et de EphA2 empêche les cellules de migrer beaucoup (de dépasser 20  $\mu\text{m}$ )
- Interprétation : RCP et EphA2 semblent aussi nécessaires pour augmenter la distance de migration des cellules tumorales dans les ACP. Peut-être les mêmes mécanismes que dans les cellules H1299

Voici un schéma représentant globalement les mécanismes étudiés dans cette épreuve (tiré de l'article avec lequel les profs ont fait le concours, il y a des éléments en plus non vu dans l'épreuve come Akt et cMET) :

Physiologiquement, EphA2 est endocyté et recyclé à la membrane très souvent (il a une dynamique importante, d'où les vésicules très mobiles de l'expérience 4) alors que RCP est dans son compartiment et est peu mobile (expérience 4 aussi).

HGF active cMET qui active d'une part LMTK3 qui à son tour phosphoryle RCP sur la sérine 435, et d'autre part Akt qui lui phosphoryle EphA2 (qui a été internalisé physiologiquement grâce à sa dynamique importante) sur la sérine 897. EphA2 est donc retenu en intracellulaire et ne peut plus retourner à la membrane, c'est pour cela que la quantité de EphA2 internalisé augmente de plus en plus au cours du temps. Cela augmente la répulsion cellulaire, ce qui permet aux cellules de s'éloigner les unes des autres et donc de migrer plus.



Voilà, cette épreuve était très très dure (même le prof l'a dit). On espère que vous n'êtes quand même pas trop déprimés, et que cela va vous remotiver pour tout donner ! Faites-vous confiance et ça vous facilitera le travail (même si l'excès de confiance peut être mauvais, il faut trouver le juste milieu). Si le prof pose certaines questions, c'est qu'il sait que vous en êtes capables !

Bon courage, vous allez tout défoncer, on croit en vous !

Cœur sur vous !

La team UE2 2019-2020, Guillaume et Martin