

ANNEE D' ETUDES : P.C.E.M. 1

- SESSION DE JANVIER
 SESSION DE JUIN

EPREUVE DE : BIOLOGIE CELLULAIRE

Date : Mercredi 02 juin 2004

Heure : de 09H30 à 11H00

Enseignant Responsable : Professeur Eric GILSON

TYPE D' EPREUVE : QCM

Durée de l'épreuve : 1 Heure et 30 minutes

Coefficient / Notation : 10

Le fascicule comporte 11 pages, numérotées de la page 1 à 11

Nom du candidat :

Prénom :

Numéro de place :

SIGNATURE

INSTRUCTIONS POUR L' EPREUVE

Usage de la calculatrice oui
 non

1. Les questions QCM sont sans patron de réponses. Chaque question comporte cinq propositions.
2. **Vous devez cocher sur la grille de réponse uniquement les propositions exactes de 0 à 5 possibilités par question.**
3. Toute marque qui apparaît en dehors des emplacements qui vous sont réservés peut motiver un zéro à votre épreuve.
4. Communications : depuis l'instant où vous aurez reçu votre cahier d'épreuves jusqu'à celui où vous aurez rendu la grille de réponse optique, **toute communication est interdite** quel qu'en soit le prétexte ou la nature. En cas de besoin, adressez-vous exclusivement aux surveillants présents dans la salle.
5. Rendre le fascicule des questions avec la fiche-réponse

Attention !

Vos réponses portées sur la grille de réponse QCM seront lues par un procédé optique qui implique obligatoirement que les cases correspondantes soient franchement et entièrement noircies et non pas seulement très légèrement ou partiellement crayonnées.

- Question 1 - Propositions concernant la théorie cellulaire de Schleiden, Schwann et Virchow.

- A- Toutes les formes de vie sont faites d'une ou de plusieurs cellules.
- B- Les cellules proviennent d'une cellule préexistante.
- C- Les cellules sont la plus petite forme de vie.
- D- Les cellules anormales se détruisent toujours par apoptose.
- E- Toutes les cellules somatiques normales peuvent se diviser un nombre illimité de fois.

- Question 2 - Quel type de microscopie utiliseriez-vous pour suivre dans des cellules vivantes l'ordre des évènements qui aboutissent à la séparation des chromosomes pendant la mitose ?

- A- Microscopie électronique à transmission.
- B- Microscopie optique.
- C- Téliscopie.
- D- Microscopie à fluorescence.
- E- Cryodécapage.

-Question 3 - Propositions concernant les fonctions exercées par le réticulum endoplasmique rugueux.

- A- La transduction d'un signal exogène à la cellule.
- B- La synthèse des protéines membranaires.
- C- La synthèse d'ATP.
- D- L'autophagie.
- E- La synthèse des ribosomes.

- Question 4 - Dans certaines maladies, un récepteur membranaire n'est plus fonctionnel. Dans la majorité des cas, cela provient d'une modification du récepteur qui n'est pas adressé correctement à la surface de la cellule. Les protéines anormales s'accumulent à leurs sites de synthèse et de maturation. Ces sites peuvent être :

- A - le noyau ;
- B - la mitochondrie ;
- C - l'appareil de Golgi;
- D - le lysosome ;
- E - le ribosome.

- Question 5 - La cytochalasine B est une drogue qui inhibe la polymérisation de l'actine en microfilaments. Propositions concernant le devenir le plus probable de cellules en début de mitose auxquelles sont ajoutées de la cytochalasine B.

- A- La cellule va activer le point de contrôle mitotique.
- B- La cellule va mourir par apoptose.
- C- La cellule va s'arrêter à l'étape de cytokinèse.
- D- La cellule va s'arrêter en anaphase.
- E- La cellule va rentrer en sénescence.

- Question 6 - Avant la mitose, chaque chromosome réplique son matériel génétique. Les deux produits de cette duplication sont connectés par les cohésines et sont appelés :**
- A- les chromosomes sexuels ;
 - B- les chromatides sœurs ;
 - C- les chromosomes homologues ;
 - D- les autosomes ;
 - E- les disomes.

- Question 7- Propositions concernant les mécanismes de contrôle de la progression du cycle cellulaire.**
- A- La division des cellules eucaryotes peut être contrôlée par ses contacts avec d'autres cellules ou en réponse à des molécules extracellulaires.
 - B- Le cycle cellulaire consiste en une succession d'évènements indépendants les uns des autres.
 - C- Un endommagement de l'ADN survenant dans une cellule en phase G1 entraîne un arrêt du cycle en phase G2.
 - D- Les transitions entre les phases du cycle sont contrôlées par différentes kinases appelées complexes cycline-CDK.
 - E- La traversée du point de restriction nécessite la déphosphorylation de la protéine Rb.

La kinase Chk1 (Checkpoint kinase 1) est activée pendant le point de contrôle intra-S en réponse à un stress de la réplication induit par des agents qui bloquent la réplication comme l'hydroxyurée (HU) qui diminue la quantité de nucléotides ou l'aphidicoline qui inhibe les ADN polymérases. L'irradiation des cellules en phase S déclenche aussi le point de contrôle intra-S.

La régulation de Chk1 a été étudiée en utilisant des extraits interphasiques d'œuf de xénope (figures 1 et 2). Ces extraits peuvent contenir les activités nécessaires à la réplication de l'ADN ou aux points de contrôle du cycle en réponse à un endommagement de l'ADN. Par exemple, la réplication peut être déclenchée en mélangeant de l'extrait interphasique avec des noyaux purifiés. De plus, une protéine donnée peut être éliminée de l'extrait après son immunoprécipitation avec des anticorps spécifiques (on dit alors que l'extrait a été immunodéplété pour cette protéine).

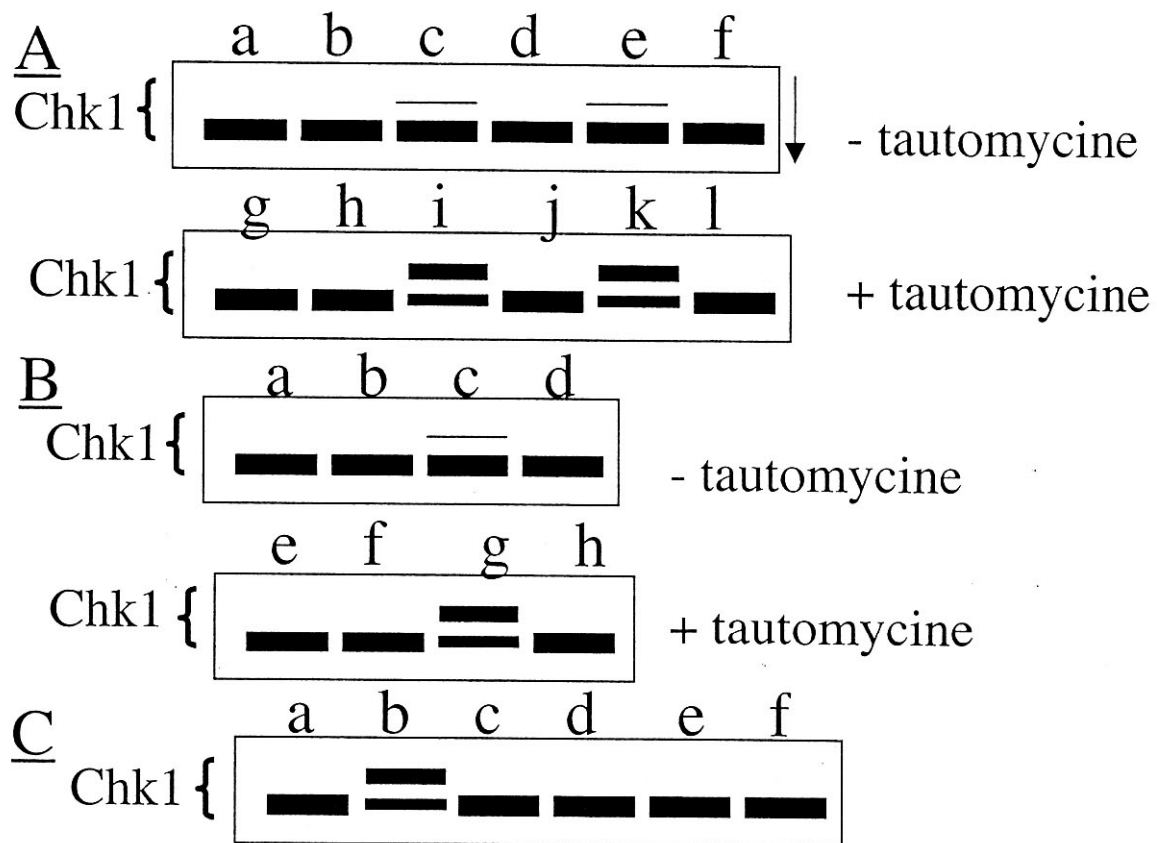


Figure 1

La protéine Chk1 radiomarquée a été incubée dans un extrait interphasique d'œuf de xénope selon différentes conditions expérimentales. Après incubation, chaque réaction a été séparée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (technique du PAGE-SDS). La figure est un dessin représentant les autoradiographies obtenues. Le sens de migration est indiqué par la flèche dans la partie A. La position des différentes isoformes de Chk1 est indiquée. La caféine inhibe les kinases ATM et ATR. La tautomycine est un inhibiteur de nombreuses phosphatases. L'aphidicoline est un inhibiteur des ADN polymérase, entraînant le blocage de la réplication de l'ADN.

(A) La protéine Chk1 radiomarquée a été incubée pendant 30 minutes dans un extrait interphasique d'œuf de xénope sans noyau (puits a et g), avec noyau (puits b et h), avec noyau et aphidicoline (puits c, d, i et j), avec des noyaux irradiés aux rayons UV (puits e, f, k et l). En plus, de la caféine a été ajoutée dans les réactions des puits d, f, j et l. Après 30 minutes, les extraits ont été divisés en deux et incubés pour encore 70 minutes en absence (puits a, b, c, d, e et f) ou en présence de tautomycine (puits g, h, i, j, k et l).

(B) La protéine Chk1 radiomarquée a été incubée pendant 30 minutes dans un extrait interphasique d'œuf de xénope en présence de différents oligonucléotides synthétiques : l'homopolymère pA (puits a et e), l'homopolymère pT (puits b et f) et un oligonucléotide double-brin appelé pA-pT obtenu par appariement des deux homopolymères pA et pT (puits c, d, g et h). De la caféine a été ajoutée dans les puits d et h. Les extraits ont été incubés pendant 100 minutes en absence (puits a, b, c et d) ou en présence (puits e, f, g et h) de tautomycine.

(C) La protéine Chk1 sauvage (puits a, b et c) et une protéine Chk1 mutée (puits d, e et f) ont été incubées en présence d'extrait interphasique d'œuf de xénope et de l'oligonucléotide pA (puits a et d) ou de l'oligonucléotide pApT (puits b, c, e et f). De la caféine a été ajoutée dans les réactions des puits c et f.

- Question 8 - D'après les résultats des expériences décrites dans la figure 1, une modification de la structure de la protéine Chk1 est observée quand:

- A- l'ADN se réplique ;
- B- la réplication est bloquée ;
- C- l'ADN est endommagé par les rayons UV ;
- D- en présence d'un oligonucléotide synthétique double-brin ;
- E- en présence de caféine.

- Question 9- D'après les résultats des expériences décrites dans la figure 1, en réponse à un stress réplicatif, la protéine Chk1 :

- A- est déphosphorylée ;
- B- s'homodimérise ;
- C- inhibe l'action d'une phosphatase ;
- D- phosphoryle les kinases ATM ou ATR ;
- E- agit comme une nucléase.

- Question 10 - D'après les résultats des expériences décrites dans la figure 1, en présence d'ADN endommagé, la modification de la protéine Chk1 :

- A- dépend des kinases ATM ou ATR ;
- B- est inhibée par une phosphatase ;
- C- inhibe les ADN polymérase ;
- D- déclenche le point de contrôle intra-S ;
- E- résulte de l'interaction entre Chk1 et un complexe cycline-CDK.

- Question 11 - D'après les résultats des expériences décrites dans la figure 1, l'accumulation d'isoformes de haut poids moléculaire de Chk1 qui se produit en présence de tautomycine dans certaines réactions suggère que :

- A- la tautomycine déclenche le point de contrôle intra-S ;
- B- la tautomycine déphosphoryle Chk1 ;
- C- la tautomycine permet de stabiliser la modification de Chk1 en réponse à un stress réplicatif ;
- D- la tautomycine inhibe une protéine modifiant Chk1 ;
- E- Chk1 est déphosphorylée en présence de réplication.

- Question 12 - Si la tautomycine est ajoutée en même temps que les noyaux et l'aphidicoline, aucune modification de Chk1 n'est observée. Ce résultat est en accord avec le fait que:

- A- l'addition prématurée de tautomycine bloque l'initiation de la réplication ;
- B- la réplication est suffisante pour induire la modification de Chk1 dans les extraits interphasique de xénope ;
- C- le blocage des fourches de réplication induit la modification de Chk1 ;
- D- la modification de Chk1 correspond à une déphosphorylation ;
- E- la tautomycine active le point de contrôle intra-S.

La protéine Chk1 purifiée et fixée sur des billes d'agarose a été mise en présence d'extraits interphasiques d'œuf de xénope dans différentes situations expérimentales. Ensuite les billes d'agarose ont été réisolées et les protéines associées analysées par PAGE-SDS. La protéine de 215 kDa a ensuite été purifiée en grande quantité pour servir d'antigène dans un protocole d'immunisation de lapin. Les résultats de ces expériences sont montrés sur la figure 2.

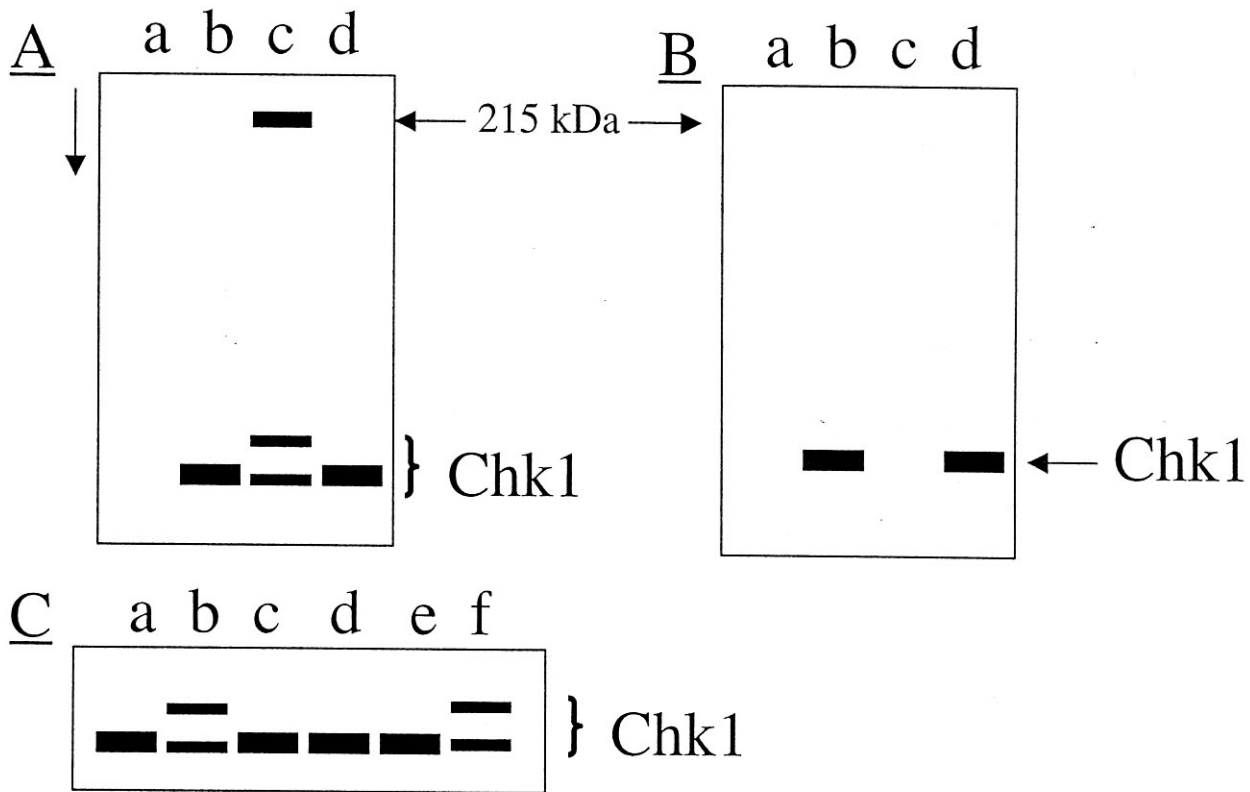


Figure 2.

(A) Des billes d'agarose recouvertes de Chk1 (puits b, c et d) ou sans Chk1 (puit a) ont été incubées avec un extrait interphasique d'œuf de xénope contenant de la tautomycine (puits a, b, c et d) et l'homopolymère pA (puit b) ou l'oligonucléotide double-brin pA-pT (puits a, c et d), en présence (puits d) ou en absence (puits a, b et c) de caféine. Les protéines associées aux billes ont ensuite été isolées et analysées par PAGE-SDS. Les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de coomassie.

(B) Des extraits interphasiques d'œuf de xénope auxquels ont été ajoutés de la tautomycine (puits a, b, c et d) ont été incubés en présence de noyaux purifiés (puits a, b et c) avec de l'aphidicoline (puit b et c), et de la caféine (puit c) ou en présence de l'oligonucléotide pA-pT (puit d). Les extraits ont ensuite été immunoprécipités à l'aide des anticorps dirigés contre la protéine de 215 kDa (partie A de la figure 2). Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par PAGE-SDS, transférées sur une membrane et incubées en présence d'anticorps contre Chk1 (technique de l'immunoblot). Seules les protéines interagissant avec les anticorps anti-Chk1 sont visualisées par cette technique.

(C) Des extraits interphasiques d'œuf de xénope immunodéplétés pour la protéine de 215 kDa (puits c, d, e et f) ou non immunodéplétés (puits a et b) ont été incubés en présence de l'homopolymère pA (puits a, c et e), de l'oligonucléotide pApT (puits b, d et f) et de la protéine 215 kDa purifiée (puits e et f). Les extraits ont ensuite été soumis à une expérience d'immunoblot avec des anticorps dirigés contre Chk1.

- Question 13 - Propositions concernant la figure 2.

- A- Chk1 interagit avec une protéine de 215 kDa en présence de l'homopolymère pA.
- B- Chk1 se multimérise en présence de l'oligonucléotide pA-pT.
- C- Chk1 est phosphorylée par une kinase de 215 kDa.
- D- Chk1 interagit avec une protéine de 100 kDa.
- E- L'association de Chk1 avec la protéine de 215 kDa est sensible à la caféine.

- Question 14 - Propositions concernant la figure 2.

- A- Un stress réplicatif induit la phosphorylation de la protéine de 215 kDa.
- B- La protéine de 215 kDa bloque la réplication.
- C- la phosphorylation de 215 kDa est nécessaire pour son association avec Chk1.
- D- Les anticorps dirigés contre la protéine de 215 kDa reconnaissent Chk1.
- E- La protéine Chk1 peut former un complexe avec la protéine de 215 kDa dans les extraits interphasiques.

- Question 15 - Propositions concernant la figure 2.

- A- La protéine de 215 kDa est nécessaire pour l'activité kinase de Chk1.
- B- La protéine de 215 kDa est un multimère de Chk1.
- C- La protéine de 215 kDa est suffisante pour induire la phosphorylation de Chk1 en présence de pA-pT.
- D- L'immunodéplétion de la protéine de 215 kDa bloque la phosphorylation de Chk1.
- E- Le défaut de phosphorylation de Chk1 dans l'extrait immunodéplété est dû à l'absence de la protéine de 215 kDa.

La séquence de peptides dérivés de la protéine de 215 kDa a été déterminée, ce qui a permis d'isoler le gène de xénope responsable de sa synthèse. Un gène humain détermine la synthèse d'une protéine qui présente de très fortes homologues avec la protéine de 215 kDa du xénope. La protéine synthétisée à partir de ce gène humain est appelée claspine. Un sérum polyclonal dirigé contre la claspine a été obtenu après immunisation d'un lapin. L'expression de la claspine a été étudiée dans une lignée immortalisée de cellules humaines dérivées d'un carcinome de la vessie (lignée T24) (Figure 3).

-Question 16- Propositions concernant l'obtention de lignées immortalisées de cellules humaines.

- A- Les lignées immortelles ne peuvent être obtenues qu'à partir de cellules cancéreuses.
- B- Les cellules somatiques humaines normales sont immortelles.
- C- Les cellules immortelles prolifèrent en absence d'ADN télomérique.
- D- Les cellules de lignées immortelles sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules normales.
- E- Les cellules immortelles prolifèrent en absence de facteur de croissance.

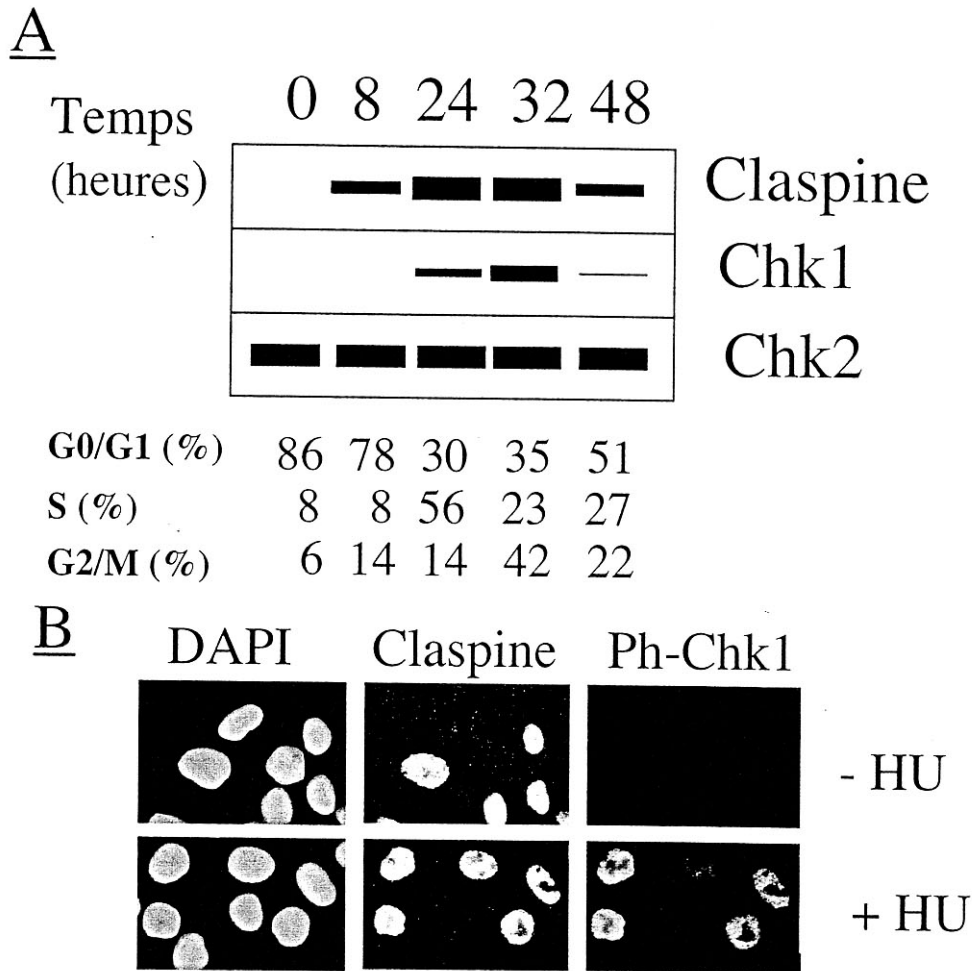


Figure 3.

(A) Des cellules T24 ont été bloquées en phase G0/G1 en retirant le sérum du milieu de culture. La réintroduction du sérum dans le milieu de culture permet aux cellules de redémarrer le cycle cellulaire de manière synchrone. Le temps écoulé après l'addition de sérum est indiqué en haut de la figure. Des lysats des cellules correspondant à cette cinétique ont été préparés et analysés par immunoblot en utilisant des anticorps dirigés contre la claspine, la kinase Chk1 ou la kinase Chk2 selon les indications de la partie droite de la figure. Pour chaque point de la cinétique, le pourcentage de cellules en G0/G1 ou S ou G2/M a été déterminé par cytométrie de flux et les résultats sont indiqués dans la partie basse de la figure.

(B). Expérience d'immunofluorescence indirecte sur des cellules T24 en croissance exponentielle en utilisant des anticorps primaires dirigés contre la protéine indiquée en bas des photographies : claspine ou la forme phosphorylée de Chk1 (Ph-Chk1). Pour la claspine, c'est le sérum polyclonal de lapin qui a été utilisé et pour Ph-Chk1, c'est un anticorps monoclonal de souris. La coloration au DAPI permet de visualiser l'ADN. Deux situations expérimentales ont été étudiées : les cellules ont été cultivées pendant 2 heures en absence ou en présence d'hydroxyurée (HU), un inhibiteur de la synthèse des nucléotides et donc de la réplication. Le même groupe de cellules a été coloré avec les deux types d'anticorps primaire pour chaque situation (sans ou avec HU).

- Question 17 - Propositions concernant l'expérience d'immunofluorescence de la figure 3 qui permet de visualiser séparément deux protéines de la cellule.

- A- Chaque anticorps primaire doit être révélé par un fluorochrome différent.
- B- Dans le cas de protéines cytoplasmiques, les cellules doivent être perméabilisées pour laisser pénétrer les anticorps.
- C- Les anticorps secondaires doivent avoir été obtenus de la même espèce.
- D- Un mélange d'anticorps secondaires qui peut être utilisé est : anticorps de chèvre anti-anticorps de souris et anticorps de souris anti-anticorps de lapin.
- E- Un mélange d'anticorps secondaires qui peut être utilisé est : anticorps de cheval anti-anticorps de lapin et anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin.

- Question 18 - Propositions concernant la Figure 3.

- A- Les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps anti Ph-Chk1 dans l'expérience d'immunofluorescence peuvent provenir d'un sérum de lapin.
- B- La protéine Chk1 est une protéine cytoplasmique en absence d'HU.
- C- L'expression de la claspine est régulée au cours du cycle cellulaire.
- D- Les cellules ont été synchronisées en bloquant le cycle cellulaire en G2.
- E- La durée du cycle cellulaire des cellules T24 est de 48 heures.

-Question 19 - Propositions concernant la Figure 3.

- A- L'expression de la claspine est indétectable en G0/G1 et augmente pendant la phase S.
- B- Le traitement par HU change la localisation cellulaire de la claspine.
- C- Chk1 est phosphorylée en présence d'HU.
- D- Seules les cellules qui sont positives pour l'immunodétection de la claspine sont positives pour la détection par l'anticorps contre Ph-Chk1 après le traitement HU.
- E- Les résultats de l'immunofluorescence montrent que Chk1 et claspine sont exprimées pendant la phase S du cycle cellulaire.

-Question 20 - Les résultats de la figure 3 suggèrent que :

- A- la claspine a une fonction pendant la phase S;
- B- Chk2 phosphoryle la claspine ;
- C- la phosphorylation de Chk1 est un des événements du point de contrôle intra-S ;
- D- les mécanismes de régulation de Chk1 sont conservés du xénope à l'homme;
- E- la claspine est impliquée dans la phosphorylation de Chk1.

L'expression de la claspine a été réprimée dans des cellules T24 par la technique de l'ARN interférence. Les résultats sont indiqués dans la figure 4.

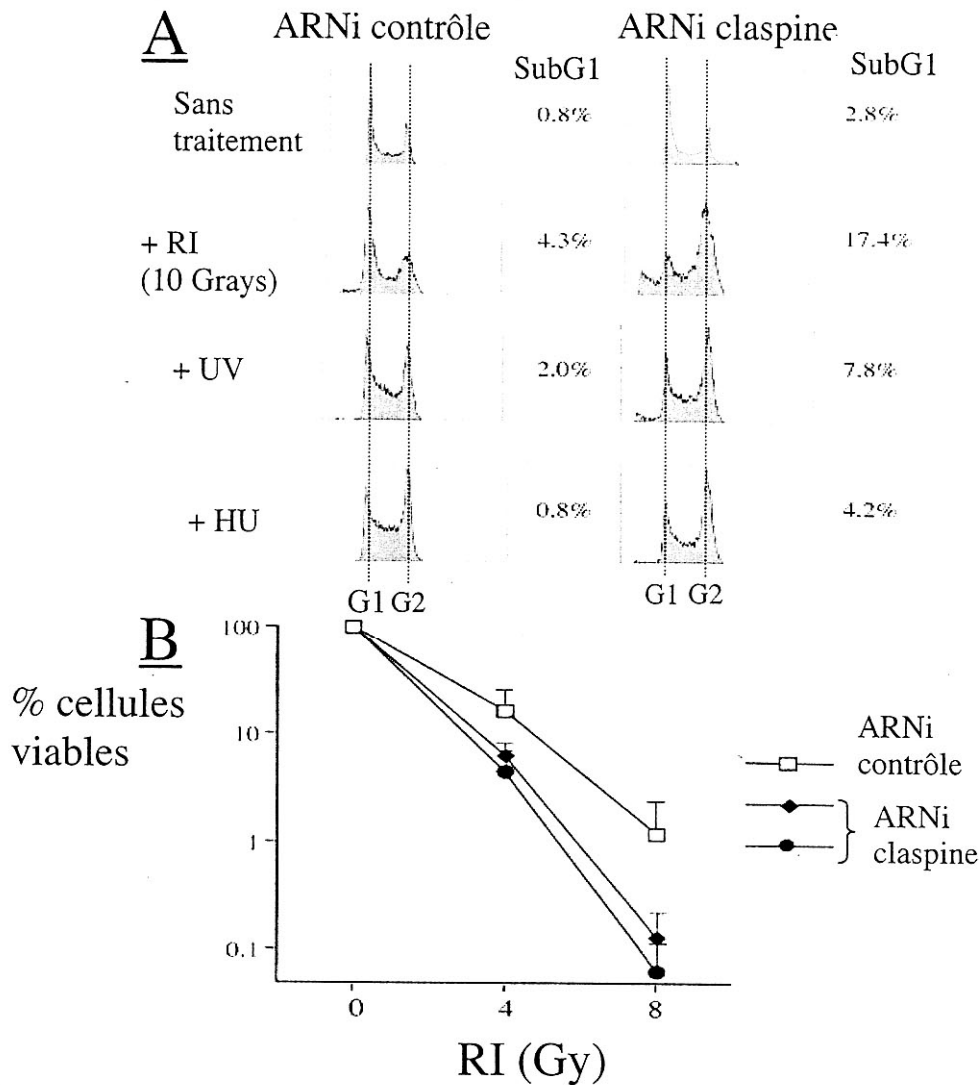


Figure 4.

(A) Des cellules T24 ont été transfectées par un ARN interférant (ARNi) contrôle ne modifiant pas l'expression du gène claspine et par un ARN interférant claspine diminuant de plus de 80% l'expression du gène claspine. 48 heures après la transfection, les cellules ont été soumises à différents types de stress : radiations ionisantes (RI 10 Grays), radiations UV et traitement à l'hydroxyurée (HU), comme indiqué sur la partie gauche de la figure. 72 heures après ces traitements, le contenu en ADN (axe des abscisses) a été déterminé par cytométrie de flux. Le pourcentage des cellules en subG1 est indiqué.

(B) Les cellules T24 ont été transfectées avec les ARNi contrôle et claspine décrits dans la partie (A). Les cellules transfectées ont été étalées à faible densité et exposées à des radiations ionisantes (la dose en Gray ou Gy correspond à l'axe des abscisses). Le nombre de colonies a été compté après 2 semaines (% cellules viables). Les résultats de deux expériences indépendantes menées avec l'ARNi claspine sont montrées.

-Question 21 - Propositions concernant la Figure 4.

A- Des cellules T24 où l'expression de la claspine est réprimée sont plus sensibles que des cellules contrôles aux radiations ionisantes.

B- Des cellules contrôles traitées à l'HU sont bloquées en phase G1.

C- Trois jours après l'exposition de cellules T24 contrôles à 10 Grays de radiations ionisantes, aucun signe de mort cellulaire n'est observé.

D- La transfection d'ARN interférant contrôle entraîne la mort des cellules T24.

E- Les cellules en subG1 sont apoptotiques.

-Question 22 - Les résultats de la Figure 4 suggèrent que :

A- la claspine joue un rôle important pour la cellule en plus de sa fonction dans la réponse au stress;

B- la claspine joue un rôle important en réponse au dommage à l'ADN et au blocage de la réplication ;

C- avant de mourir, les cellules dépourvues de claspine et soumises à des radiations ionisantes s'accumulent en phase G1;

D- la claspine ne joue pas de rôle dans le point de contrôle mitotique;

E- la claspine joue un rôle dans différents points de contrôle de la progression du cycle.