

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

EPREUVE DE MAI

EPREUVE DE : BIOLOGIE CELLULAIRE

Date : Mardi 20 mai 2008

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 : S/10

Le fascicule « questions » comporte 9 pages, numérotées de la page 1 à 9 + 1 feuille bleue en fin de fascicule.

Un 2^{ème} fascicule « figures » de 12 pages + 1 feuille rose en fin de fascicule comporte les figures n° 1 à 10.

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**
6. Vous pouvez conserver le fascicule « figures »

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 culture des cellules en laboratoire :

- A- les fibroblastes issus d'une biopsie de peau d'un individu ne présentant aucune pathologie sont incapables de se multiplier dans des boîtes de Pétri en présence d'un milieu de culture adéquate ;
- B- les cellules humaines peuvent se multiplier indéfiniment en laboratoire à condition de renouveler régulièrement leur milieu de culture ;
- C- les cellules issues des tumeurs humaines ne peuvent pas se diviser en laboratoire ;
- D- on peut immortaliser des cellules humaines normales en les infectant avec un virus oncogène ;
- E- les cellules en sénescence sont métaboliquement inactives.

Question 2. Propositions concernant la transformation et la tumorigénicité des cellules :

- A- le fait de proliférer en absence de sérum implique une signalisation mitogénique paracrine ;
- B- les cellules transformées sont incapables de croître sans support d'ancrage ;
- C- le sérum est une source de facteurs de croissance pour les cellules en culture ;
- D- les cellules transformées sont bloquées à la transition G1/S du cycle cellulaire ;
- E- dans les expériences de xénogreffe, on utilise des souris immunodéprimées pour empêcher les cellules injectées d'être éliminées par le système immunitaire.

Question 3. Propositions concernant la chromatine :

- A- tous les nucléosomes d'une même cellule sont identiques;
- B- les nucléosomes inhibe la transcription;
- C- l'histone H1 est indispensable pour que les facteurs de la transcription trouvent leur cible;
- D- les éléments insulateurs segmentent les chromosomes en domaines indépendants de régulation de la transcription;
- E- la localisation spatiale des gènes dans le noyau constitue une information régulatrice.

Des fibroblastes humains obtenus à partir d'une biopsie de peau d'un individu exempt de pathologie connue ont été transfectés avec un plasmide exprimant l'allèle oncogénique RasV12 puis cultivés en présence d'un milieu contenant du sérum de veau fœtal (abrégé en SVF). Les mêmes fibroblastes humains ont été cultivés d'abord en absence (culture A) puis remis en présence de SVF (culture B).

Les cellules ont ensuite été étudiées par différentes techniques. Une partie des cellules a été mélangée avec du X-Gal un substrat chromogénique (bleu) de la beta-galactosidase dans des conditions de pH acide (Figure 1). Une autre partie des cellules a été incubée pour 24 heures avec du 5-bromodeoxyuridine (BrdU). L'incorporation de BrdU dans les cellules, qui se fait lors de la réplication, a été révélée par immunofluorescence indirecte avec des anticorps anti-BrdU (Figure 2). Une troisième partie des cellules a été étudiée par immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée du variant d'histone H2AX (figure 3A) ou avec des anticorps dirigés contre la protéine d'hétérochromatine HP1 γ et contre la forme acétylée de l'histone H3 en lysine 9 (Ac-H3K9) (figure 3B). Pour une quatrième partie, les noyaux ont été purifiés, la chromatine extraite en absence de sel et la composition protéique de cette chromatine étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (Figure 4).

Question 4. Les images de microscopie optique schématisées dans la figure 1 démontrent :

- A- que l'expression de RasV12 permet aux cellules de croître sans SVF;
- B- l'activité bêta-galactosidase est réprimée par le SVF ;
- C- la morphologie des cellules dépend uniquement du temps passé en culture ;
- D- la bêta-galactosidase induit un arrêt de la croissance des cellules ;
- E- RasV12 immortalise les fibroblastes.

Question 5. Propositions concernant la figure 2 :

- A- L'immunofluorescence indirecte permet de visualiser une protéine dans des cellules vivantes ;
- B- les cellules incorporent le BrdU dans le noyau ;
- C- les anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte sont couplés à un fluorochrome ;
- D- l'incorporation de BrdU se fait au cours de la réplication de l'ADN nucléaire ;
- E- Les anticorps secondaires utilisés dans l'expérience d'immunofluorescence anti-BrdU sont nécessairement dirigés contre les immunoglobulines humaines.

Question 6. Les résultats des figures 1 et 2 :

- A- sont compatibles avec une stimulation de la prolifération induite par RasV12 ;
- B- suggèrent que l'absence de sérum induit la sénescence des cellules ;
- C- démontrent que l'expression de RasV12 induit un arrêt réversible de la prolifération des cellules ;
- D- démontrent que la croissance en absence de sérum empêche les cellules non transfectées de rentrer en sénescence ;
- E- suggèrent que l'entrée en sénescence est déterminé par le temps chronologique passé en culture.

La figure 3A schématise le marquage nucléaire le plus significatif obtenu par une expérience d'immunofluorescence indirecte dirigée contre la forme phosphorylée du variant d'histone H2AX (γ H2AX) qui est un marqueur des cassures de la double hélice d'ADN.

Question 7. Les résultats des figures 1, 2 et 3A :

- A- démontrent que la phosphorylation d'H2AX déclenche l'activation de la bêta-galactosidase ;**
- B- suggèrent que la bêta-galactosidase est un bon marqueur des cellules quiescentes ;**
- C- suggèrent une corrélation entre la phosphorylation d'H2AX et la réplication des cellules ;**
- D- sont compatibles avec l'hypothèse que RasV12 induit un dommage de l'ADN non réparé ;**
- E- montrent que γ H2AX est une protéine du nucléole.**

La figure 3B schématise le marquage nucléaire le plus significatif obtenu par des expériences de double immunofluorescence avec des anticorps primaires de souris dirigés contre la l'histone H3 acétylé en K9 et des anticorps primaires de lapin anti-HP1 γ .

Question 8. Propositions concernant les combinaisons appropriées d'anticorps secondaires utilisables pour les expériences de la figure 3B :

- A- anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris ;**
- B- anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris ;**
- C- anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de chèvre ;**
- D- anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin et des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris ;**
- E- anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin et des anticorps de cheval anti-immunoglobuline de souris.**

Question 9. Les résultats des figures 1, 2 et 3 :

- A- montrent une accumulation d'HP1 γ dans les cellules sénescences ;
- B- suggèrent que l'acétylation de l'histone H3 en K9 puisse être nécessaire à la réplication de l'ADN ;
- C- suggèrent qu' un arrêt irréversible de la prolifération s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'hétérochromatine ;
- D- démontrent une colocalisation entre HP1 γ et l'histone H3 acétylée en K9 dans les noyaux des cellules sénescences ;
- E- montrent qu'HP1 γ induit la sénescence.

Question 10. Les résultats de la figure 4 :

- A- sont en accord avec ceux de la figure 3B pour les cellules qui expriment RasV12 mais pas pour les cellules cultivées sans sérum ;
- B- suggèrent que le profil d'expression des histones est identique pour les cellules cultivées avec ou sans SVF ;
- C- suggèrent que l'expression de RasV12 induit l'expression de deux nouvelles protéines (appelées bande 1 et bande 2) qui pourraient avoir un rôle dans la structure de la chromatine des cellules quiescentes;
- D- montrent que l'acétylation de l'histone H3 en K9 permet la prolifération des cellules exprimant RasV12 ;
- E- élimine l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'acétylation de l'histone H3 en K9 résulte de la diminution de l'expression de l'histone H3.

Les protéines présentes dans bande 1 et bande 2 ont été microséquencées par spectrométrie de masse. De nombreux peptides correspondant à la protéine HMGA1 (bande 1) et HMGA2 (bande 2) ont été trouvés. Les résultats d'une double immunofluorescence dirigée contre HP1 γ HMGA1 sont représentés dans la figure 5.

Question 11. Les résultats de la figure 5 :

- A- montrent qu'HMGA1 est localisée de manière diffuse dans le nucléoplasme des cellules quiescentes ;
- B- montrent qu'HMGA1 est colocalisée avec l'histone H3 acétylée en K9 dans les cellules sénescences ;
- C- suggèrent qu'HMGA1 est une protéine de l'euchromatine ;
- D- montrent que tous les foyers HMGA1 colocalisent avec HP1 γ ;
- E- sont compatibles avec un rôle important d'HMGA1 dans l'entrée en sénescence.

Question 12. Propositions concernant la figure 6 :

- A- les images de la figure 6 sont compatibles avec les résultats de la figures 5 ;
- B- la figure 6 suggère qu'HMGA1 est une protéine localisée dans le nucléole ;
- C- la figure 6 montre une grande concentration d'HMGA1 dans une zone faiblement opaque aux électrons ;
- D- les anticorps sont associés à des particules d'or ;
- E- en microscopie électronique à balayage, le faisceau d'électrons traverse la préparation traitée aux sels de métaux lourds.

Question 13. Propositions concernant la progression du cycle cellulaire :

- A- les cyclines sont des sous-unités indispensables à l'activité kinase des protéines CDK ;
- B- les étapes du cycles cellulaires sont uniquement régulées par l'activation des complexes cycline-CDK ;
- C- les inhibiteurs de CDK accélèrent la progression du cycle cellulaire ;
- D- la protéine p53 intègre un grand nombre de signaux de stress pour induire la transcription de gènes bloquant la prolifération des cellules;
- E- les inhibiteurs de CDK sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeur.

L'expression d'HMGA1, d'HMGA2, del'inhibiteur de CDK p16 et du facteur de transcription p53 a été inhibée par la transfection d'ARN interférant (ARNi) spécifiquement dirigés contre l'ARNm de ces gènes. Des cellules exprimant un ARNi contre la GFP ont été utilisés comme contrôle négatif. Les résultats sont montrés dans la Figure 7.

Question 14. Les résultats de la Figure 7A :

- A- suggèrent que RasV12 est reconnu comme un stress par les cellules ;
- B- démontrent que p53 induit la transcription de p16 ;
- C- démontrent que la stimulation de l'expression d'HMGA1 par RasV12 est dépendante de p53;
- D- montrent que les ARNi inhibent spécifiquement l'expression de leur cible ;
- E- suggèrent que l'inhibition d'HMGA1 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules.

Question 15. Les résultats de la figure 7B :

- A- confirment certains des résultats des figures 1 et 2 ;
- B- démontrent que l'inhibition d'HMGA1 empêche l'entrée en sénescence de certaines cellules;
- C- démontrent qu'HMGA2 contribue à l'entrée en sénescence, en coopération avec d'autres facteurs ;
- D- sont compatibles avec l'hypothèse qu'HMGA1 coopère avec p53 pour induire la sénescence ;
- E- suggèrent qu'HMGA1 et HMGA2 sont requis pour réprimer l'expression de gènes activant la prolifération des cellules.

Question 16. L'ensemble des résultats des figures 1 à 7 sont compatibles avec les hypothèses suivantes :

- A- les protéines HMGA1 et HMGA2 s'accumulent dans la chromatine des cellules sénescents et quiescentes;
- B- l'action antiproliférative de la protéine HMGA1 réside dans la formation de domaines d'hétérochromatine qui antagonise l'action de facteurs mitogéniques ;
- C- HMGA1 pourrait être un gène suppresseur de tumeur ;
- D- la sénescence induite par l'érosion télomérique se distingue de la sénescence provoquée par RasV12;
- E- RasV12 agit comme oncogène car il induit l'expression d'HMGA1.

L'oncogène BRAF est une serine-thréonine protéine kinase qui fonctionne comme un effecteur de Ras. Il active la MAP kinase MEK qui à son tour active les kinases ERK1 et ERK2. Des mutations activatrices de BRAF sont trouvées à une grande fréquence dans les mélanomes. Près de 90 % de ces mutations sont des substitutions d'acide glutamique vers valine à la position 600 (BRAFFV600E). Ces mutations activent constitutivement la voie BRAF-MEK-ERK. Ces mutations de BRAF sont retrouvées dans plus de 82 % des naevi mélanocytiques, lésions bénignes de la peau qui se transforment rarement en mélanome. En accord avec le fait que BRAFFV600E induit la sénescence des mélanocytes in vitro, les mélanocytes des naevi sont sénescents et expriment la β -galactosidase. Un criblage a été effectué pour identifier les facteurs qui sont nécessaires pour que BRAFFV600E bloque la prolifération des cellules. Une collection de 62 400 ARNi dirigés contre environ 28 000 gènes ont été transfectés dans des mélanocytes. Ces cellules ont ensuite été transfectées par un vecteur plasmidique exprimant BRAFFV600E. Les mélanocytes qui n'ont pas été transfectés avec un ARNi et qui expriment BRAFFV600E (appelées BRAFFV600E/mel) arrêtent rapidement de proliférer et rentrent en sénescence. Il en est de même pour les cellules transfectées avec un ARNi contrôle (appelé NS) ou avec la plupart des ARNi de la collection. Quelques ARNi empêchent les cellules exprimant

BRAFV600E de bloquer la prolifération. Leurs séquences indiquent qu'ils sont dirigés contre 17 gènes candidats (Figure 8A).

Question 17. Expérience nécessaire pour savoir si c'est bien l'inhibition de l'expression des gènes candidats qui bloque la sénescence induite par BRAFV600E :

- A- mesurer l'expression des gènes candidats par immunodétection en Western blot dans les cellules transfectées par l'ARNi correspondant ;
- B- pour les 17 gènes candidats, tester la capacité d'inhiber la sénescence induite par BRAFV600E d'un ARNi différent de celui de la collection mais dirigé contre le même gène ;
- C- mesurer l'expression des 17 gènes candidats dans les mélanocytes transfectés par BRAFV600E ;
- D- pour les 17 gènes candidats, tester si la transfection du gène portant une mutation le rendant résistant à l'action inhibitrice de l'ARNi restaure la sénescence induite par BRAFV600E dans les lignées de mélanocytes exprimant l'ARNi correspondant ;
- E- tester la capacité d'inhiber la sénescence répliquative des ARNi dirigés contre les 17 gènes candidats.

Question 18. Propositions concernant la mort cellulaire :

- A- l'apoptose est une mort programmée des cellules qui est nécessaire au développement normal des individus;
- B- lors de l'apoptose, les phosphatidylsérines sont exposées sur le feuillet externe la membrane plasmique;
- C- la détection de la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN génomique après migration sur gel est une méthode de choix pour détecter la fragmentation de la chromatine lors de l'apoptose;
- D- l'apoptose peut se dérouler en absence d'ATP;
- E- contrairement à la nécrose, il y a libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire au cours de l'apoptose.

La majorité des mélanocytes exprimant BRAFV600E rentrent en sénescence, mais 10% d'entre eux rentrent en apoptose (Figure 8B).

Question 19 : Les résultats de la figure 8 montrent que :

- A- le gène BUB1 est nécessaire pour que BRAFV600E inhibe l'apoptose ;
- B- l'inhibition du gène HIRA provoque la mort des cellules ;
- C- les cellules sénescences meurent par apoptose ;
- D- IGFBP7 est le seul gène nécessaire pour l'induction de l'apoptose et de la sénescence par BRAFV600E ;
- E- BNIP3L induit l'expression d'IGFBP7.

IGFBP7 (*insulin growth factor binding protein 7*) code pour une protéine sécrétée.

Question 20. Les résultats de la figure 9 :

- A- confirment que BRAFV600E induit l'apoptose ;
- B- suggèrent que BRAFV600E bloque la prolifération cellulaire par une signalisation autocrine et paracrine;
- C- montrent qu'IGFBP7 est nécessaire et suffisant pour l'action de BRAFV600E sur la sénescence ;
- D- suggèrent que la prolifération des mélanocytes normaux est régulée par IGFBP7 ;
- E- suggèrent que la transformation d'un naevi en mélanome implique l'inhibition d'IGFBP7.

Une lignée humaine de cellule tumorale exprimant BRAFV600E a été injecté en sous-cutané (xénogreffe) dans des souris immunosupprimées. 6 jours plus tard, les souris ont été injectées en intra-veineux avec des quantités croissantes de protéine IGFBP7 purifiée. Les résultats sont donnés dans la figure 10.

Question 21. Les résultats de la figure 10 :

- A- montrent qu'IGFBP7 active la croissance de la tumeur ;
- B- montrent qu'IGFBP7 induit l'apoptose des cellules de la tumeur ;
- C- suggèrent que la perte d'expression d'IGFBP7 est une étape critique dans le développement des mélanomes ;
- D- suggèrent que l'inhibition d'IGFBP7 pourrait être une stratégie thérapeutique contre les mélanomes humains;
- E- montrent une régression tumorale des souris traitées avec IGFBP7.