

Sujet modifié du concours 08/09 Gilson Lyon

c-Myc est un régulateur transcriptionnel clef pour le contrôle de la croissance cellulaire. La quantité de c-Myc dans la cellule est très bien régulée, aussi bien au niveau de la transcription et de la traduction de la protéine que de sa stabilité dans la cellule. On a étudié la localisation subcellulaire de c-Myc dans une lignée de cellules : COS-7 (dérivées de cellules de rein de singe vert d'Afrique). Dans un premier temps, la localisation de c-Myc a été étudiée par une double immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps primaires de souris dirigés contre la protéine c-Myc et des anticorps primaires de lapin dirigés contre la protéine histone H2A. Les résultats de l'expérience ont montré que la fluorescence émise par les anticorps primaires anti-c-Myc et celle émise par les anticorps primaires anti-H2A étaient localisées dans le noyau.

Question 5. Propositions concernant l'utilisation d'anticorps secondaires pour visualiser séparément c-Myc et H2A dans les mêmes cellules.

- A- Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine.
- B- Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à la fluorescéine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine.
- C- Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de chèvre couplés à la fluorescéine.
- D- Anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine.
- E- Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de cheval anti-immunoglobuline de souris couplés à la rhodamine.

Par la suite, on a transfecté transitoirement les cellules COS-7 avec un ADN correspondant à un vecteur d'expression codant pour la protéine c-Myc-GFP. c-Myc-GFP est une protéine de fusion constituée dans sa partie N-terminale de la protéine c-Myc et dans sa partie C-terminale de la protéine GFP. Trois jours après la transfection, la visualisation des cellules par un microscope à fluorescence montre que 10 % des cellules émettent une fluorescence correspondant à l'excitation de la GFP dans le noyau. Les autres cellules n'émettent aucune fluorescence.

Question 6. Propositions concernant cette expérience de transfection transitoire.

- A- Le vecteur d'expression contenait obligatoirement un gène conférant la résistance à un antibiotique.
- B- Au moins 20 % des cellules ont été transfectées avec l'ADN du vecteur d'expression.
- C- L'ADN du vecteur d'expression s'est nécessairement intégré dans l'ADN génomique de 10% des cellules.
- D- La protéine c-Myc-GFP ne peut pas s'exprimer à partir du vecteur d'expression.
- E- L'addition d'une étiquette GFP à c-Myc n'empêche pas la protéine c-Myc de se localiser dans le noyau.

L'expérience suivante a consisté à photoblanchir par irradiation une zone de fluorescence dans le nucléoplasme des cellules COS-7 exprimant c-Myc-GFP (après transfection). Après un photoblanchiment d'une seconde, une photo est prise immédiatement puis toutes les secondes. Dans cette expérience, la restauration de la fluorescence au niveau de la zone photoblanchie est tellement rapide qu'il est impossible d'en mesurer la vitesse.

Question 7. Propositions concernant cette expérience de photoblanchiment.

- A- La réaction normale de fluorescence est de réémettre l'énergie absorbée sous forme de photons de longueur d'onde plus petite que celle qui a servi à l'excitation.
- B- Le photoblanchiment résulte d'un transfert d'énergie non radiatif entre deux protéines fluorescentes.
- C- L'expérience de photoblanchiment démontre que la vitesse de diffusion de la protéine c-Myc-GFP est très lente.
- D- La restauration de fluorescence provient nécessairement de molécules c-Myc-GFP traduites après le photoblanchiment.
- E- L'expérience de photoblanchiment démontre que l'addition d'une étiquette GFP à c-Myc immobilise la protéine c-Myc dans le noyau.

Dans une autre expérience, dont les résultats sont présentés dans la figure 1, on a cette fois photoblanchi de façon répétée une zone du cytoplasme et suivi en vidéo microscopie l'effet de ce photoblanchiment sur le signal de fluorescence de la cellule concernée.

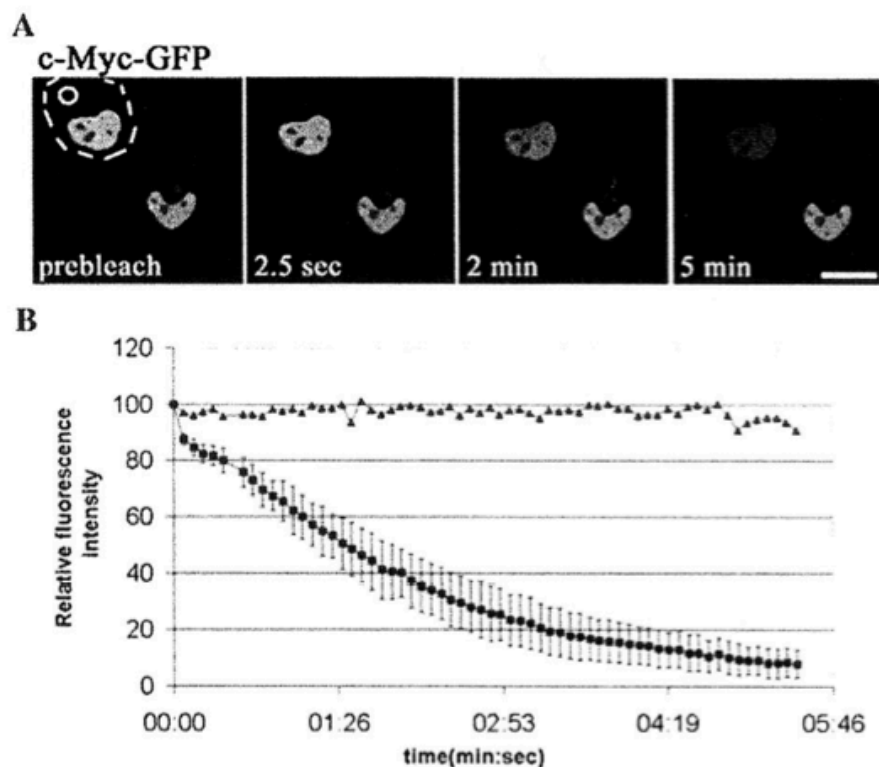


Figure 1 : Analyses de l'intensité de fluorescence de c-Myc-GFP lors de l'extinction d'une zone du cytoplasme dans les cellules COS-7 exprimant c-Myc-GFP (après transfection transitoire).

A : Images séquentielles réalisées entre 2 pulses de photoblanchiment avec un microscope confocal (longueur d'onde d'excitation 470/40nm, filtre GFP). La zone irradiée de manière répétée est délimitée par un cercle blanc et le cytoplasme de cette cellule est délimité par des pointillés.

prebleach = image prise avant le photoblanchiment Le temps écoulé depuis le début de l'irradiation et la prise de la photographie est indiquée : 2.5 sec = 2,5 secondes ; 2 min = 2 minutes, 5min = 5 minutes. La barre blanche représente 20 μ m

B : Comparaison de la perte de fluorescence dans la cellule située en haut de la figure 1A qui a subi l'irradiation répétée de son cytoplasme (carrés noirs) avec la perte de fluorescence dans la cellule « non irradiée » en bas à droite (triangles noirs). En ordonnée : intensité relative de fluorescence (Relative fluorescence intensity) et en abscisse : temps en minute:seconde (time(min :sec)).

Question 8. Les résultats de la figure 1 :

- A- suggèrent que c-Myc-GFP est capable d'être transférée d'une cellule à une autre.
- B- suggèrent que c-Myc-GFP est localisée dans le nucléole ;
- C- démontrent que c-Myc-GFP sort du noyau en moins de deux minutes.
- D- suggèrent que la durée de vie de c-Myc-GFP dans le noyau est inférieure à deux minutes ;
- E- sont compatibles avec l'hypothèse que l'irradiation induit la synthèse d'une ubiquitine ligase qui va modifier c-Myc-GFP et entraîner sa dégradation par le protéasome.

Question 9. Propositions concernant la microscopie électronique.

- A- La cryofracture a l'avantage d'éviter la fixation chimique et donc de limiter les risques de dénaturation.
- B- La cryofracture est une technique de choix pour visualiser les reliefs du nucléole.
- C- Le microscope électronique en transmission permet de séparer deux points distants de 0.2 nm.
- D- Dans la microscopie en transmission, l'objet est balayé par un faisceau d'électrons qui excitent la surface de l'objet émettant des électrons secondaires recueillis par un détecteur.
- E- La coloration à l'or permet de visualiser une protéine particulière.

Une lignée de fibroblastes humains, appelée LF, a été obtenue à partir de la mise en culture primaire de biopsie de peau. Les cellules de cette lignée sont cultivées *in vitro* dans des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif complété avec 10% de sérum de veau foetal (ou SVF). Les modifications accompagnant la sénescence cellulaire sont recherchées en fonction du nombre de doublement de la population de cellules (appelé DP pour Doublement de la Population). Ces modifications sont l'expression de β -galactosidase acide (appelée β -GalA) et une modification de leur morphologie avec un aplatissement des cellules sur le plastique de la boîte de Pétri.

Dans certaines expériences, à 30 DPs ou à 55 DPs, les cellules sont transférées dans un milieu dépourvu de SVF pendant 5 jours (appelées cellules LF30-SVF ou LF55-SVF, respectivement) puis remises en présence de 10% de SVF pour 24 heures (appelées cellules LF30-SVF+ et LF55-SVF+, respectivement).

Dans d'autres expériences, à 5 DPs, des cellules sont transfectées par des vecteurs qui expriment soit l'ADNc de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) soit l'ADNc de l'antigène T du virus oncogène SV40. Les cellules transfectées et exprimant ces transgènes sont appelées LF(hTERT) et LF(AgT) dans le tableau 1. Il est rappelé que l'antigène T de SV40 inhibe les voies de surveillance du génome dépendant de p53 et de Rb.

D'autres cellules LF, après 12 DPs, ont été transfectées avec un vecteur exprimant la forme oncogénique de Ras, appelée RasV12. Cette forme de Ras induit une activation constitutive des voies effectrices de Ras. Ces cellules sont appelées LF(RasV12).

Dans une autre série d'expériences, des cellules LF, après 12 DPs, ont été transfectées simultanément avec un vecteur exprimant RasV12 et des vecteurs exprimant soit hTERT soit AgT. Ces cellules sont appelées LF(RasV12-hTERT) et LF(RasV12-AgT), respectivement.

Tableau 1

Type de cellules	Nombre de DP	% de cellules exprimant β -GalA	% cellules avec une morphologie aplatie	Taille moyenne des télomères (en kilobase ou kb)	% cellules en G1	% de cellules en S	% de cellules G2/M
LF	9	0	0	8,5	40	45	15
LF	12	0	0	8	nd	nd	nd
LF	30	15	10	7	47	40	13
LF	55	80	80	5,7	89	5	6
LF	60	85	85	5	nd	nd	nd
LF30-SVF	30	5	5	7	90	0,5	9,5
LF55-SVF	55	20	25	5,5	97	0	3
LF30-SVF+	30	18	17	6,8	31	60	9
LF55-SVF+	55	80	70	5,3	88	7	5
LF(hTERT)	30	0	0	8	47	40	13
LF(hTERT)	55	0	0	9	47	40	13
LF(AgT)	30	0	0	7	nd	nd	nd
LF(AgT)	55	0	0	5,5	nd	nd	nd
LF(RasV12)	12	80	85	8	90	4	6
LF(RasV12-hTERT)	12	82	79	8	90	3	7
LF(RasV12-AgT)	12	0	0	8	40	42	18
LF(RasV12-AgT)	55	0	0	5,5	45	45	10

nd = non déterminé

Question 10. Propositions concernant la culture de fibroblastes humains normaux.

- A- Les fibroblastes ne peuvent pas croître sans adhérer à un support.
- B- La présence d'une source de carbone et d'acides aminés n'est pas suffisante pour permettre aux cellules de se diviser.
- C- Les fibroblastes peuvent se diviser sans limite à condition d'ajouter des facteurs de croissance dans le milieu de culture.
- D- La sénescence cellulaire est déclenchée lorsque les cellules sont privées de sérum.
- E- Les cellules sénescents sont métaboliquement actives.

Question 11. On ajoute du SVF dans les cultures de cellules humaines pour :

- A- éviter la contamination des cellules avec des levures;
- B- fournir une source de carbone;
- C- fournir une source d'acide aminé;
- D- stimuler leur croissance;
- E- les immortaliser.

Question 12. Les résultats du tableau 1 démontrent que :

- A- la taille des télomères augmente avec le nombre de divisions des cellules;
- B- la télomérase empêche les cellules de rentrer en mitose;
- C- la télomérase empêche le raccourcissement des télomères;
- D- la télomérase empêche les cellules de rentrer en sénescence;
- E- la sénescence est immédiatement déclenchée lorsque la télomérase s'exprime.

Question 13. Les résultats du tableau 1 démontrent que :

- A- l'expression de RasV12 empêche les cellules de mourir;
- B- la sénescence résulte nécessairement du raccourcissement des télomères;
- C- la télomérase empêche RasV12 d'induire un blocage de l'entrée en phase S;
- D- RasV12 bloque les cellules en phase G1;
- E- la sénescence s'accompagne du blocage des cellules à la transition G1-S.

Question 14. Les résultats du tableau 1 démontrent que :

- A- la sénescence est inhibée en absence de facteur de croissance;
- B- le raccourcissement des télomères des cellules LF30-SVF+ et LF55-SVF+ en réponse à la stimulation mitogénique est la cause de leur entrée en sénescence;
- C- les télomères de cellules dépourvues de télomérase se raccourcissent lorsqu'elles sont privées de sérum;
- D- la stimulation mitogénique coopère avec l'absence de télomérase pour induire la sénescence;
- E- des télomères de taille inférieure à 5 kb n'induisent pas la sénescence si les cellules reçoivent un stimulus mitogénique.

Question 15. Les résultats du tableau 1 suggèrent que :

- A- la sénescence est un mécanisme suppresseur de tumeur;
- B- la présence de SVF induit la prolifération des cellules;
- C- la sénescence est réversible en absence de sérum;
- D- le niveau d'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire présents dans les cellules sénescents est suffisant pour contrebalancer la stimulation mitogénique causée par le SVF;
- E- toutes les cellules bloquées en G1/S sont sénescents.

Question 21. Propositions concernant l'endocytose.

- A- Il existe trois voies d'endocytose : la pinocytose, l'endocytose par récepteur interposé et la phagocytose.**
- B- L'exocytose permet l'élimination de cellules sénescents ou apoptotiques.**
- C- L'endocytose par récepteur interposé est un mode d'endocytose non spécifique.**
- D- Le manteau de clathrine est constitué d'une association de triskèles.**
- E- Le rôle principal de la phagocytose est le renouvellement de la membrane cellulaire.**

Question 22. Propositions concernant l'endocytose

- A- Lors de la pinocytose, les macrophages émettent des pseudopodes.**
- B- Le contenu des vésicules d'endocytose est toujours dégradé.**
- C- Lors de la transcytose, le contenu des vésicules d'endocytose est dégradé à pH acide puis éliminé au pôle cellulaire opposé par autophagie.**
- D- Les vésicules de stockages sont alimentées par le processus d'exocytose.**
- E- Les anticorps du lait maternel sont transmis au nouveau-né grâce au processus d'endocytose par récepteur interposé puis par pinocytose.**

Question 23. Propositions concernant le système membranaire.

- A- Les peroxysomes sont des organelles à pH acide contenant de nombreuses hydrolases.**
- B- Le pH des endosomes augmente au cours de la maturation des endosomes précoces vers les endosomes tardifs.**
- C- La V-ATPase permet de coupler l'hydrolyse de l'ATP en ADP +Pi à l'import de protons dans les lysosomes.**
- D- Les protéases lysosomales sont actives à un pH optimal de 7.**
- E- Les autophagosomes résultent de la phagocytose des auto-anticorps.**