Banque « Agro - Véto »
A – 0115 – 2ème partie –

SVT, ÉPREUVE SUR SUPPORT DE DOCUMENTS
BIOLOGIE

Durée : 2 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.
Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.

Protéine Rac1 et cancer

- **Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances.**

- Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générales.

- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités.**

- Les **numéros des documents** étudiés seront clairement indiqués.

- **Un schéma bilan** récapitulant les interprétations des parties 1 et 2 **devra être réalisé**, en complétant l'annexe page 8.

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'erreur standard à la moyenne (ou écart standard). Dans certains documents, on admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas. UA signifie 'unités arbitraires' ; WT signifie 'wild type', la version sauvage d'un allèle ou d'une protéine ; Rac1 signifie Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1.

Références bibliographiques :

Davis, M-J. et al. 2013. *PNAS* **110**:912-917
Wang, P. et al. 2013. *Oncogene* **32**:1-11
Krauthammer, M. et al. 2012. *Nature Genetics* **44**:1006-1018
Joffre, C. et al. 2011. *Nature cell biology* **13**:827-840
Chan, A-Y. et al. 2005. *Oncogene* **24**:7821–7829
Singh, A. et al. 2004. *Oncogene* **23**:9369–9380

Partie 1 : Dysfonctionnements cellulaires liés à une activité anormalement élevée de la protéine Rac1

Les cancers regroupent l'ensemble des maladies résultant d'une prolifération cellulaire anarchique. En se divisant, les cellules cancéreuses forment des tumeurs locales. Puis, certaines cellules cancéreuses peuvent parfois se propager, envahir d'autres organes et y former des métastases, petits massifs de cellules cancéreuses en division. Selon le stade de la maladie, la cancérisation peut impliquer plusieurs dysfonctionnements cellulaires : prolifération non contrôlée, dérégulation de l'apoptose (mort cellulaire programmée), insensibilité aux signaux locaux, altération de la migration cellulaire et de la capacité à quitter un tissu.

Une activité anormalement élevée de la protéine Rac1 est observée dans plusieurs types de cancers. Dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques, les effets d'un inhibiteur de la synthèse de la protéine Rac1 sont testés (**documents 1-1 et 1-2**).

A l'aide des documents 1-1 et 1-2, formulez des hypothèses sur les dysfonctionnements cellulaires impliqués dans la cancérisation liée à une activité anormalement élevée de la protéine Rac1.

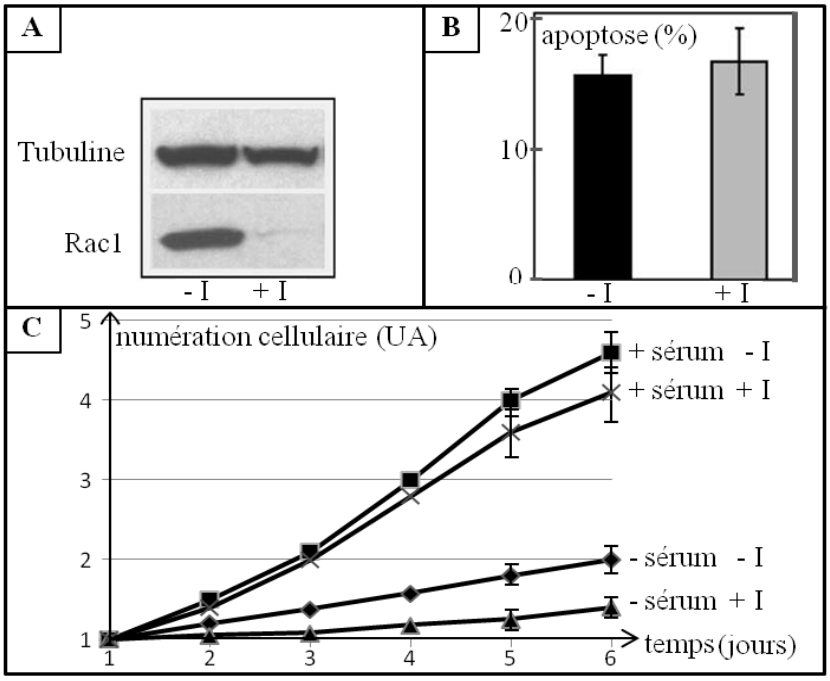
Document 1-1 : Prolifération et mort cellulaires

Des cellules cancéreuses, extraites d'une tumeur maligne et présentant une activité anormalement élevée de la protéine Rac1, sont mises en culture en présence (+I) ou en absence (-I) d'un inhibiteur spécifique de la synthèse de la protéine Rac1.

Document 1-1A : Après trois jours de culture, les protéines sont extraites des cellules, séparées par électrophorèse et transférées sur membrane. Elles sont repérées à l'aide d'anticorps spécifiques de la tubuline ou de la protéine Rac1 (Western blot).

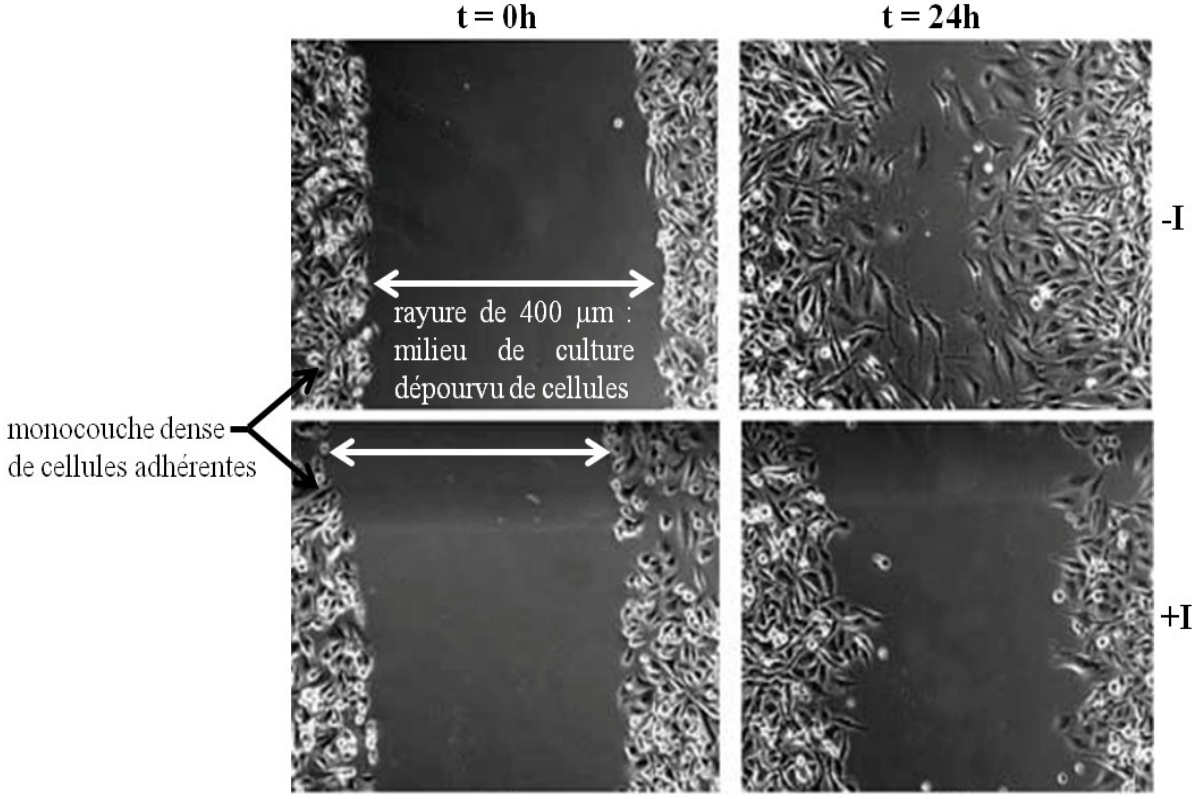
Document 1-1B : Après six jours de culture, le pourcentage de cellules mortes par apoptose (mort cellulaire programmée) est quantifié dans les deux lots de cellules.

Document 1-1C : A partir d'un jour de culture, les cellules sont dénombrées tous les jours pendant six jours dans les deux cultures. L'expérience est reproduite en ajoutant au milieu de culture un sérum contenant des facteurs de croissance qui stimulent la division cellulaire.

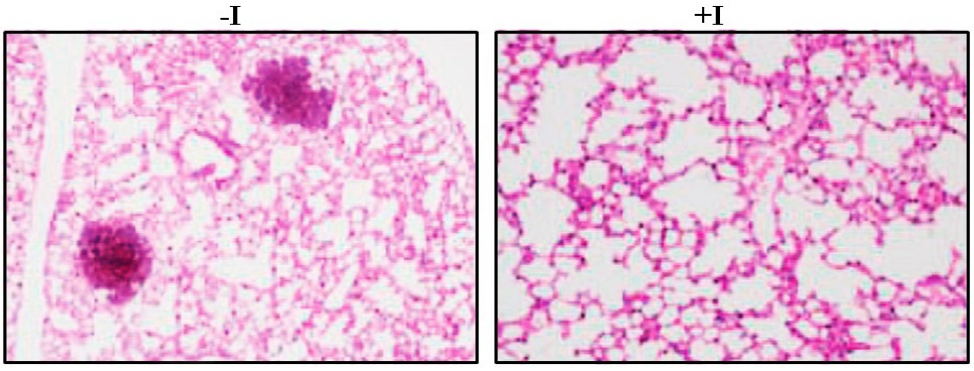


Document 1-2 : Migration cellulaire

Document 1-2A : Les cellules cancéreuses utilisées dans les expériences du document 1-1 sont étalées sur un milieu nutritif solide (sans ajout de sérum), en présence (+I) ou en absence (-I) de l'inhibiteur spécifique de la synthèse de Rac1. Dans ces conditions, il se forme dans les deux cultures une monocouche dense de cellules adhérentes. Une rayure franche est réalisée à la surface de la monocouche de cellules. La réponse des cellules est suivie au microscope à contraste de phase. Les résultats 24 heures après l'opération sont présentés ci-dessous.



Document 1-2B : Les mêmes cellules cancéreuses sont cultivées en présence (+I) ou en absence (-I) d'un inhibiteur spécifique de la synthèse de la protéine Rac1. L'effet de cet inhibiteur est durable dans le temps, dans les cellules qui le contiennent. Ces cellules sont transplantées dans la rate de souris. Dix jours après l'opération, des foyers de prolifération (métastases) sont recherchés. Les résultats ci-dessous présentent des coupes histologiques réalisées au niveau des poumons et observées au microscope optique : coloration des cytoplasmes en rose et des noyaux en violet, grossissement x100 (-I) ou x200 (+I). Les clichés sont choisis pour être représentatifs des résultats de l'expérience.



Partie 2 : Dysfonctionnements moléculaires liés à une forme altérée de la protéine Rac1 (P29S)

Parmi les versions altérées de la protéine Rac1 conduisant à une activité anormalement élevée, le variant Rac1 P29S, qui résulte d'une mutation, a été identifié dans plusieurs types de cancers dont 9% des cas de cancers de la peau.

On cherche à identifier des dysfonctionnements de la forme P29S de la protéine Rac1 (**documents 2-1 à 2-4**). On s'intéresse en particulier au cycle d'activation de la protéine, ainsi qu'à sa sensibilité au Mg^{2+}.

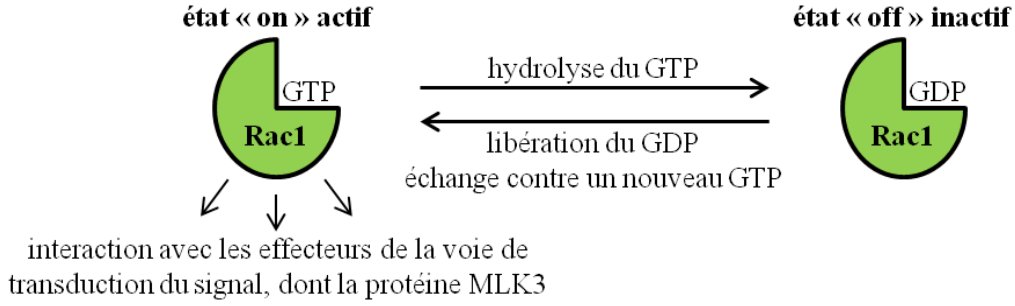
- Utilisez les documents 2-1 à 2-4 pour identifier des dysfonctionnements moléculaires chez le variant Rac1 P29S. Une attention particulière sera portée à l'exploitation du document 2-3.

- Réalisez un schéma bilan récapitulant les interprétations des parties 1 et 2, en complétant l'annexe fournie en page 8 qui devra être découpée et collée dans la copie.

Annexe : le cycle d'activation de la protéine Rac1, une petite protéine G

(donnée à titre informatif et à ne pas analyser pour elle-même)

La protéine Rac1 est une petite protéine G impliquée dans les voies de transduction de nombreux signaux. Les petites protéines G fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires, oscillant réversiblement entre un état « on » actif lié au GTP et un état « off » inactif lié au GDP. Au cours de la transduction d'un signal, le cycle d'activation de la petite protéine G Rac1 peut être résumé ainsi :



Cycle d'activation de la petite protéine G Rac1

Document 2-1 : Interaction entre Rac1 et les effecteurs des voies de transduction

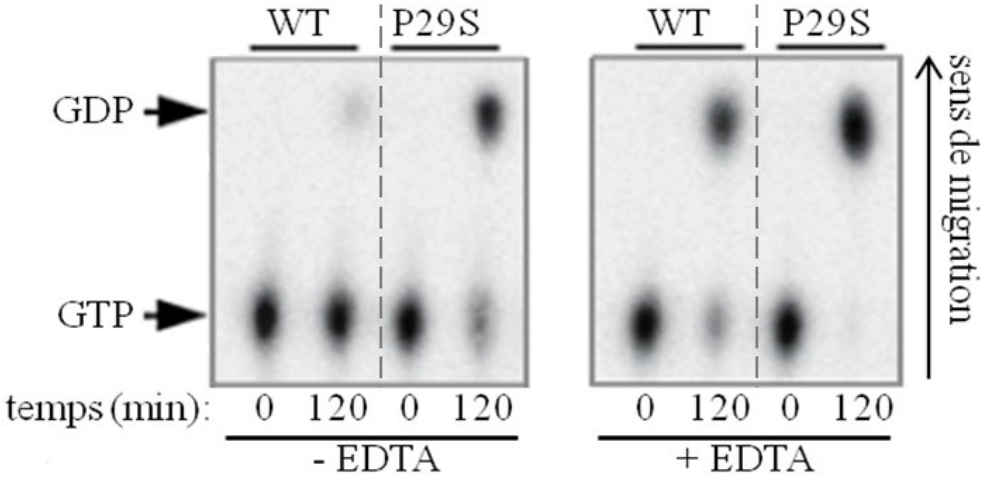
La protéine kinase MLK3 (mixed-lineage kinase 3) est un effecteur qui interagit avec la protéine Rac1 lors de la transduction du signal. L'affinité de la forme mutée de la protéine Rac1 (P29S) pour cet effecteur est recherchée, à l'aide du protocole suivant :
- étape 1 : des protéines Rac1 sous leur forme sauvage (WT) ou mutée (P29S) sont fixées sur des billes ;
- étape 2 : ces billes sont incubées pendant 8 heures avec un lysat de cellules cancéreuses (ce lysat contient toutes les protéines solubles présentes dans ces cellules), seul ou en présence d'un excès de GDP ou de GTP ;
- étape 3 : les billes sont récupérées et lavées. Les protéines fixées dessus sont dissociées, dénaturées et séparées par électrophorèse. La protéine MLK3 est révélée à l'aide d'un anticorps spécifique (Western-blot). Les résultats relatifs aux formes sauvage (WT) et mutée (P29S) de la protéine Rac1 sont présentés ci-dessous. D'autres effecteurs connus sont également recherchés à l'aide d'autres anticorps spécifiques : les résultats sont les mêmes que pour la protéine MLK3 (*résultats non montrés*).

Une schématisation du complexe obtenu après l'étape 2 du protocole est attendue.

protéine préalablement fixée sur les billes (étape 1)	aucune	**Rac1 WT**			**Rac1 P29S**		
nucléotide ajouté au mélange d'incubation (étape 2)	aucun	aucun	GDP	GTP	aucun	GDP	GTP
protéine MLK3 révélée par un anticorps spécifique (étape 3) →							

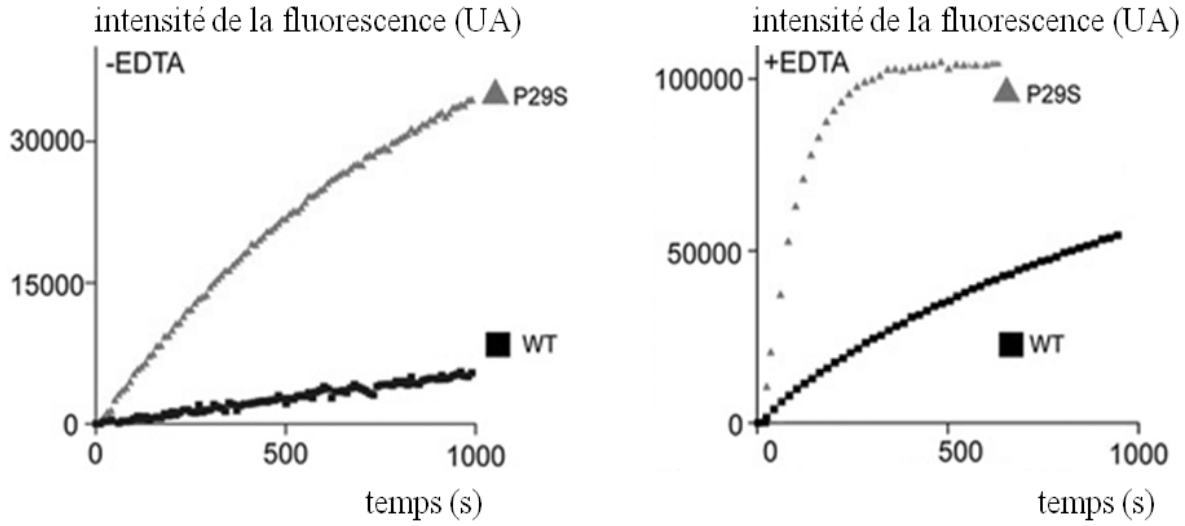
Document 2-2 : Devenir du GTP

La protéine Rac1 sous sa forme sauvage (WT) ou mutée (P29S) est purifiée pour un test d'activité *in vitro*. Elle est incubée en présence de GTP radioactif (α-^{32}P) et de Mg^{2+} avec ou sans EDTA, qui est un puissant chélateur des ions divalents tels que le Mg^{2+} (en présence d'EDTA, il n'y a plus de Mg^{2+} libre en solution). A t = 0 ou 120 minutes après incubation, les composants sont séparés par chromatographie sur couche mince et la radioactivité est révélée par autoradiographie. Les résultats relatifs à la protéine Rac1 sauvage (WT) ou mutée (P29S) sont présentés ci-dessous.



Document 2-3 : Devenir du GDP

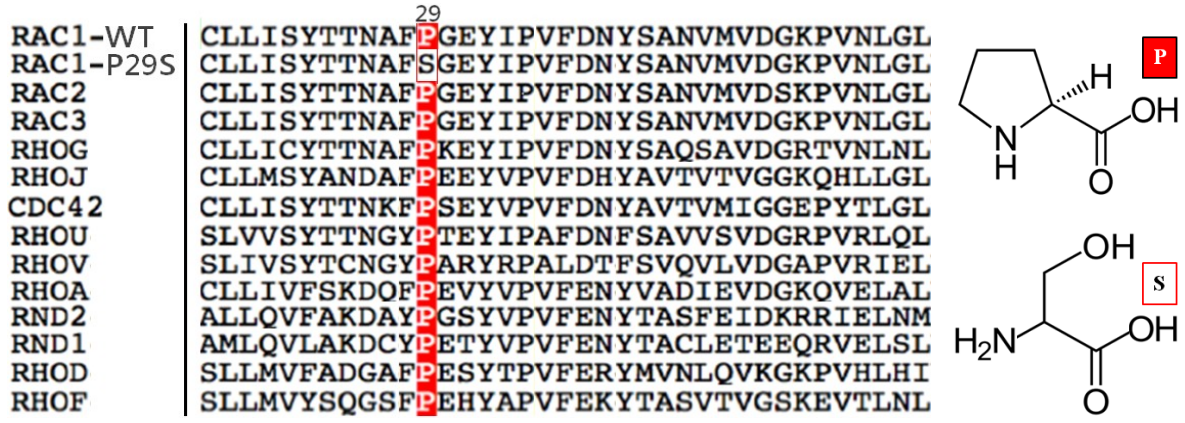
Un test est réalisé *in vitro* :
- la protéine Rac1 purifiée sous sa forme sauvage (WT) ou mutée (P29S) est chargée de GDP, suite à une incubation longue en présence d'un excès de GDP ;
- à t = 0, la protéine Rac1 WT ou P29S chargée de GDP est incubée avec un analogue non hydrolysable et fluorescent du GTP, noté GTP* ;
- la fluorescence du GTP* associé à la protéine Rac1 est quantifiée. Les résultats relatifs à la protéine Rac1 WT ou P29S, en présence ou en absence d'EDTA, sont présentés ci-dessous.



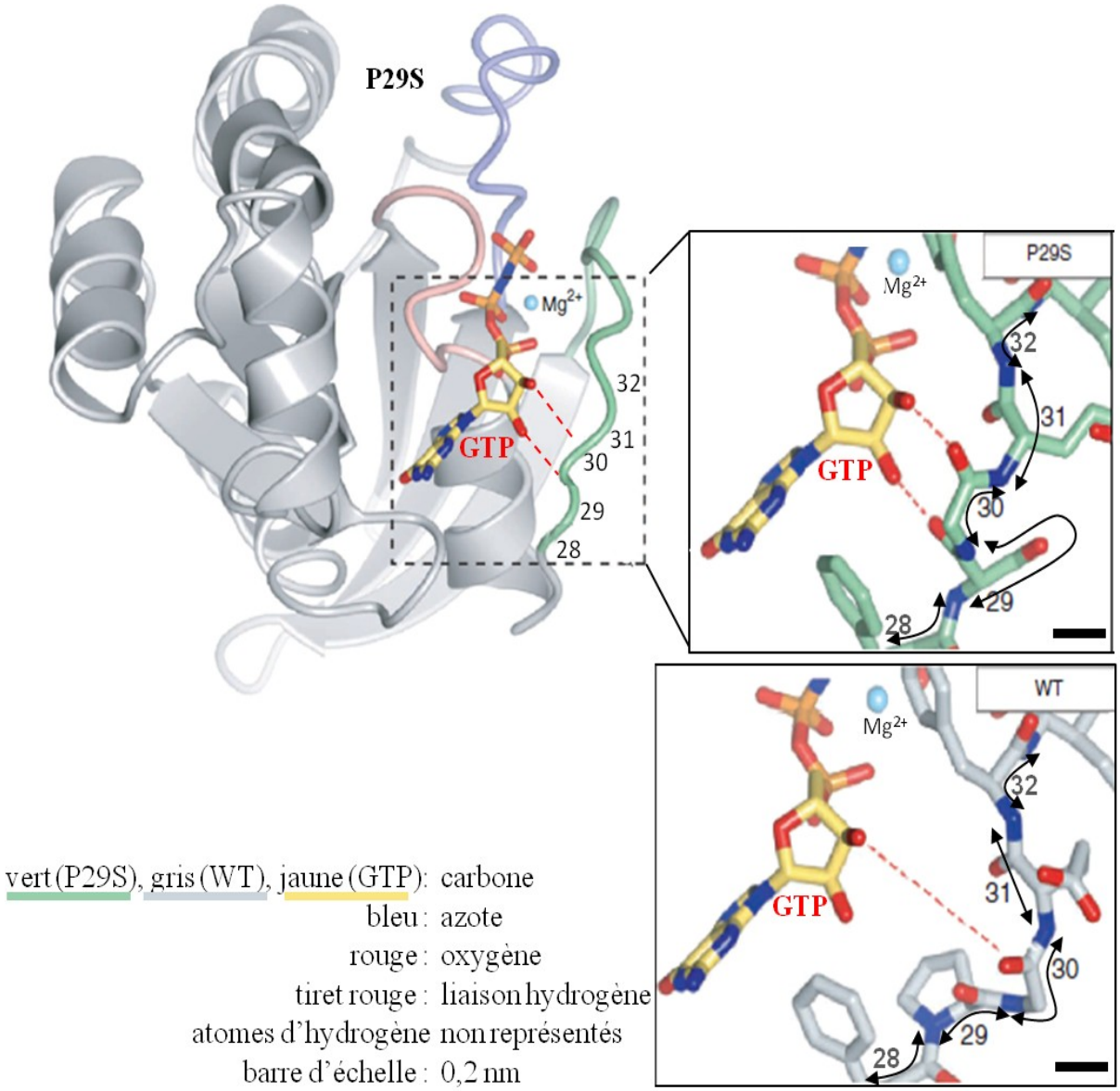
Document 2-4 : Fixation du GTP

Le variant Rac1 P29S résultant d'une mutation, une modification de séquence est recherchée, ainsi que ses conséquences à l'échelle moléculaire.

<u>Document 2-4A</u> : Les séquences en acides aminés de quelques membres de la famille des petites protéines G humaines, à laquelle la protéine Rac1 appartient, sont alignées pour comparaison. Seul un extrait partiel de l'alignement des séquences, incluant le 29ème acide aminé, est présenté. Le document présente également les séquences de la protéine Rac1 sous sa forme sauvage (WT) ou mutée (P29S). Chaque ligne correspond à un membre de la famille des petites protéines G chez l'Homme. La structure de la proline (P) et celle de la sérine (S) sont indiquées.



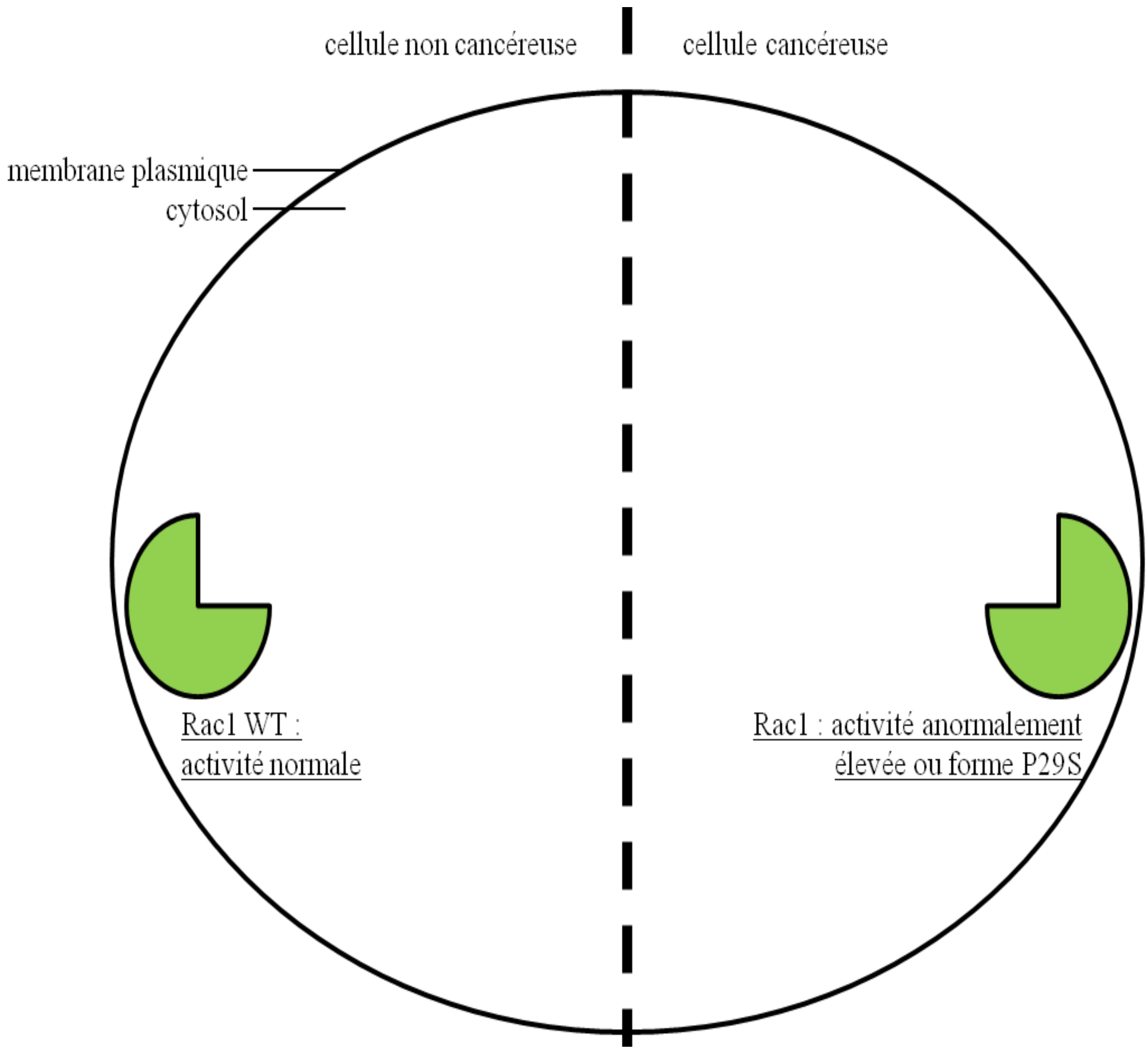
Document 2-4B : La structure de la protéine Rac1 a été résolue par cristallographie aux rayons X, sous sa forme mutée (P29S) ou sauvage (WT), complexée au GTP et au Mg^{2+}. Les numéros 28 à 32 indiquent la position de l'acide aminé dans la séquence. La zone encadrée est détaillée en modèle éclaté.



Réalisez un schéma bilan reprenant les conclusions issues de l'étude des documents et récapitulant les dysfonctionnements cellulaires (partie 1) et moléculaires (partie 2) impliqués dans la cancérisation liée à une activité anormale de la protéine Rac1.

Ce schéma bilan sera réalisé en complétant l'annexe ci-dessous, à découper et à coller sur votre copie. Vous envisagerez sur chaque moitié du schéma la situation d'une cellule non cancéreuse, quand l'activité Rac1 est normale, et la situation d'une cellule cancéreuse, quand l'activité de Rac1 est anormalement élevée.

- -

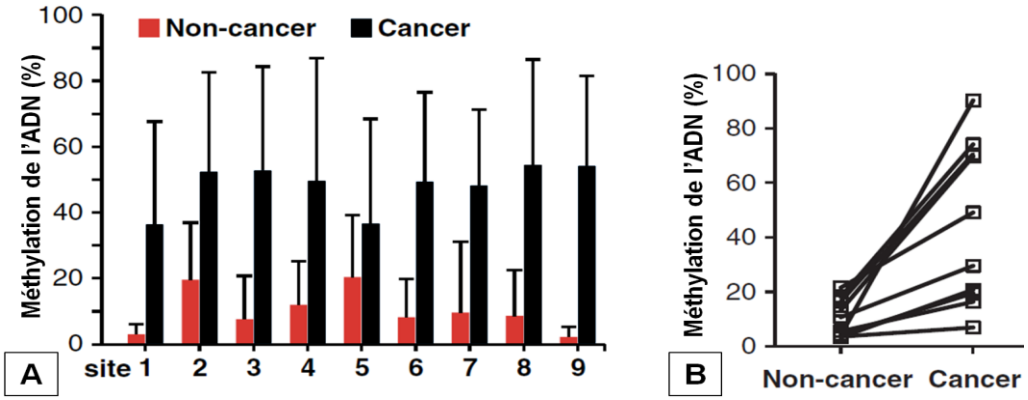


Partie 3 : Une autre origine possible pour la cancérisation liée à la protéine Rac1

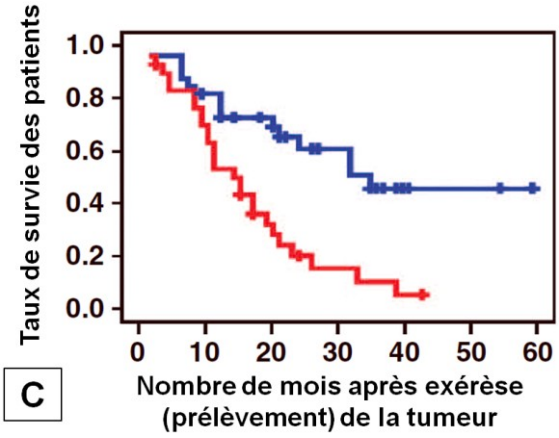
A l'aide du document 3, proposez :
- un modèle explicatif succinct montrant un lien possible entre niveau de méthylation de l'ADN au niveau du gène codant miR-124, activité Rac1 et cancérisation ;
- le principe d'une expérience qui permettrait de tester votre modèle.

Le petit ARN régulateur miR-124 étant connu pour inhiber la synthèse de la protéine Rac1, le gène codant miR-124 est séquencé chez des patients atteints d'un cancer du pancréas. Aucune modification de séquence n'est identifiée. Le pourcentage de méthylation de l'ADN au niveau de 9 sites de méthylation du gène codant miR-124 est quantifié chez 10 patients atteints d'un cancer du pancréas ("Cancer") et chez 10 personnes saines ("Non-cancer").

Document 3A : Chaque barre correspond à la moyenne des pourcentages de méthylation pour un site de méthylation donné, chez 10 personnes atteintes d'un cancer ou non.
Document 3B : Chaque carré représente la moyenne des pourcentages de méthylation des 9 sites de méthylation, chez une personne atteinte d'un cancer ou non.



Document 3C : Le pourcentage de méthylation du gène codant miR-124 a été quantifié dans 64 tumeurs, après leur exérèse (prélèvement chirurgical) chez des patients, hommes et femmes, d'âges différents et présentant les symptômes associés à des stades variables de la maladie. Ces 64 patients, sous surveillance médicale, sont répartis en deux groupes de 32 personnes selon le pourcentage de méthylation du gène codant miR-124 quantifié dans les tumeurs. Le taux de survie est comparé dans ces deux groupes (bleu : groupe dont les tumeurs ont présenté les pourcentages de méthylation les plus faibles ; rouge : groupe dont les tumeurs ont présenté les pourcentages de méthylation les plus élevés).



FIN DE L'ÉPREUVE