

# Annales L2

## Régulation et Expression des Gènes S4

## **Sommaire**

- Sujet session 1, 2018-2019 : page 3  
Correction session 1, 2018-2019 : page 11
- Correction session 1, 2020-2021 : page 19
- Correction session 2, 2020-2021 : page 27
- Correction session 1, 2021-2022 : page 36
- Correction session 1, 2022-2023 : page 43



**Amicale Paris Sciences**

**Licence Sciences Biomédicales  
2018-2019**

**Session 1 – S4  
Sujet**

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



UNIVERSITÉ  
PARIS  
DESCARTES

Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales

?

Année Universitaire 2018-2019

??  
??  
?

Licence Sciences Biomédicale

2<sup>ème</sup> année

??  
??  
?

Semestre 2 Session 1 ~~PREUVE~~ Régulations des Gènes

??  
??  
?  
?  
?  
?  
?  
?

?

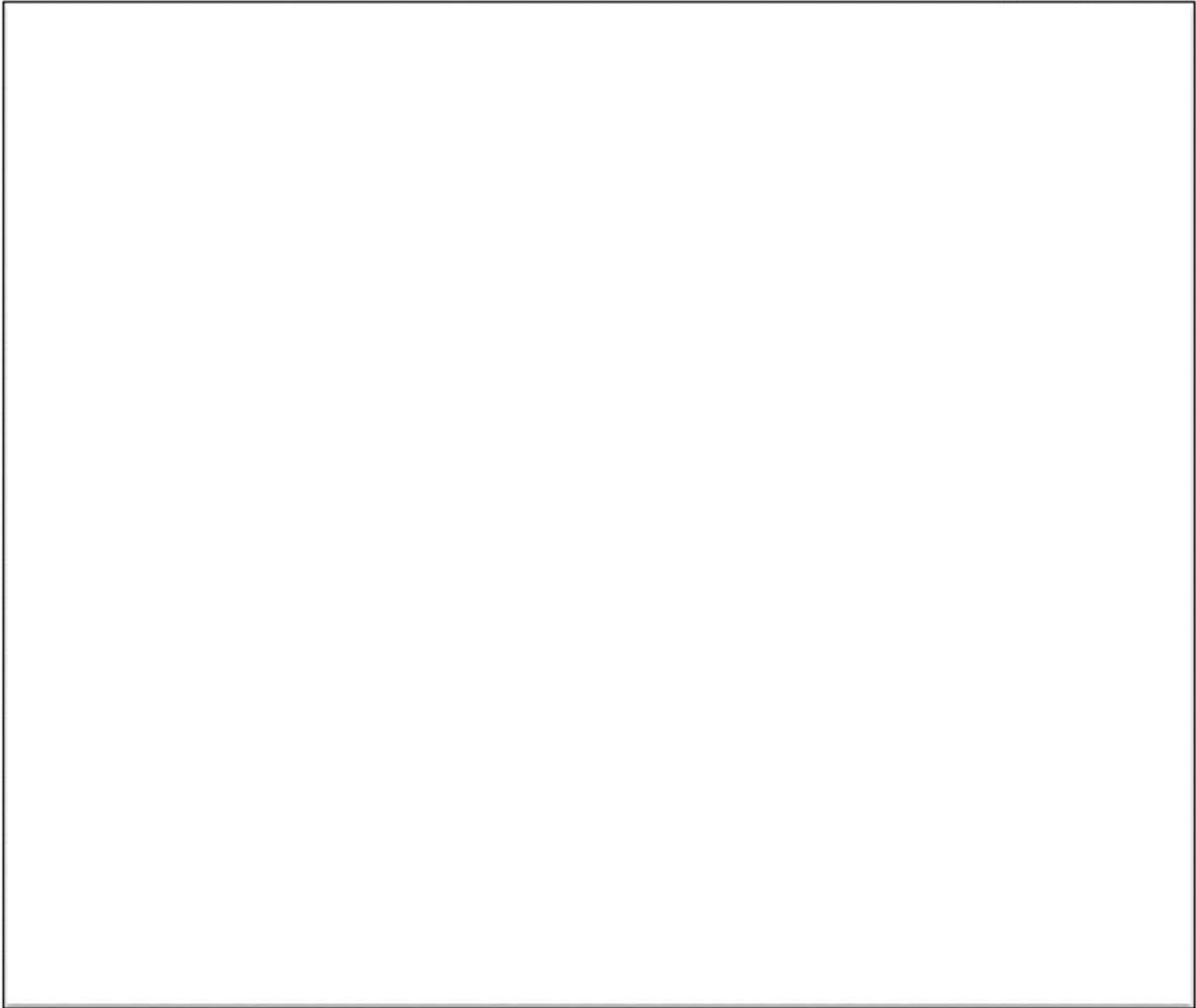
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?

Le sujet comporte 7 pages numérotées

Les réponses CONCISES sont à noter dans les encarts prévus à cet effet

Les schémas sont autorisés

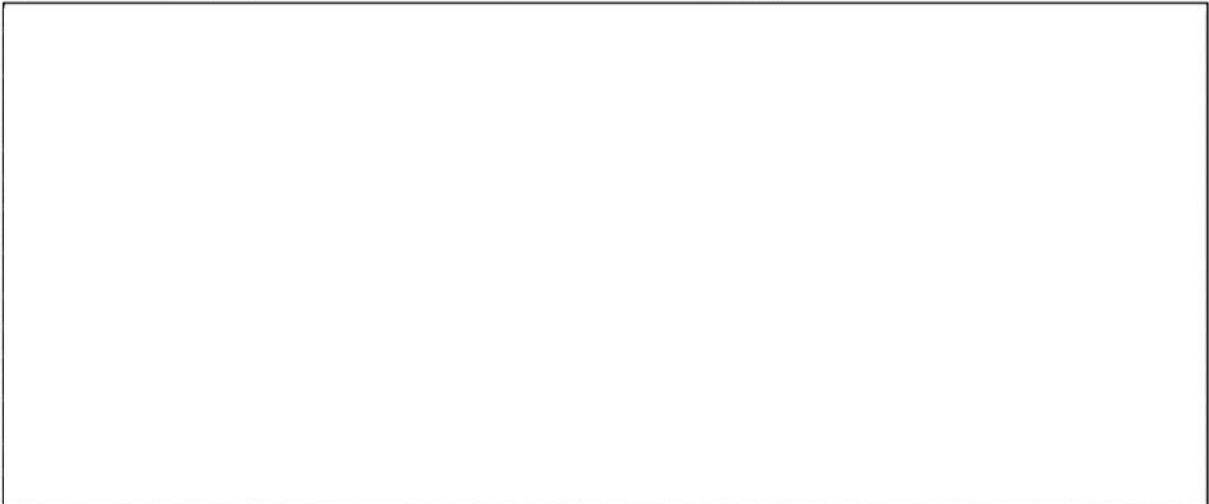
**Question 1:** Décrire la technique de MeDIP et proposer un schéma illustratif. (3 points)



**Question 2:** On veut mettre en évidence l'association d'un ARNm avec une protéine. Citez les deux techniques que l'on peut utiliser. (1 point)

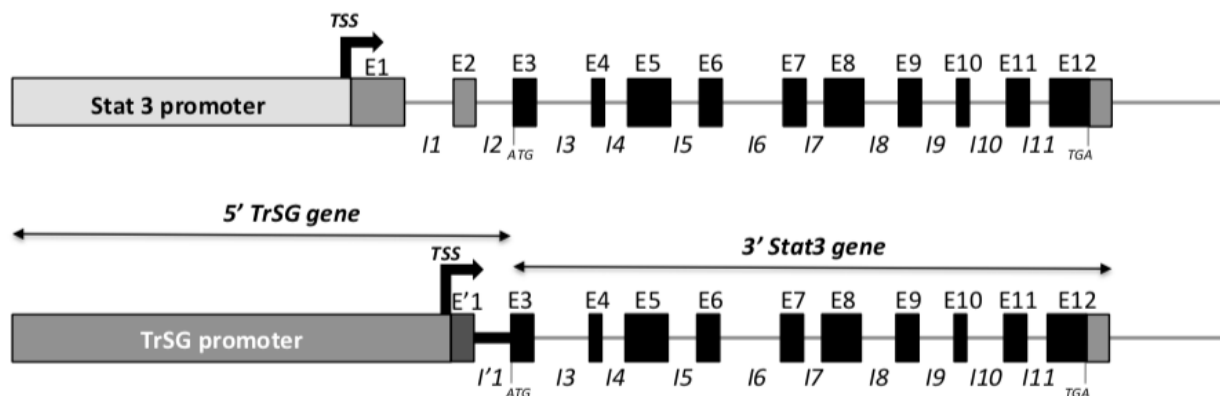


**Question 3:** Expliquez brièvement ce qu'est un IRES. (2 points)



### Axe Stat3 – HGF-R et cellules cancéreuses

Certains cancers présentent une surexpression de Stat3 due à une cassure chromosomique entraînant la fusion du gène TrSG (Transformation Stimulating Gene) avec Stat3 (Facteur de Transcription de la voie JAK/STAT). Les cartes du gène Stat3 porté par les cellules normales ou cancéreuses sont présentées ci-dessous:



**Figure 1: représentation schématique de la structure du gène Stat3 normal (en haut) et fusionné avec TrSG (en bas) tel qu'on le trouve dans certaines cellules cancéreuses.** La séquence transcrite de Stat3 comporte 12 exons (E1 à E12) et 11 introns (I1 à I11). Le codon initiateur (ATG) est localisé au début de E3, le codon stop (TGA) dans E12. La fusion génique entraîne le remplacement du promoteur de Stat3 par celui de TrSG et la perte de E1 et E2 de Stat3 et des séquences introniques I1 et I2 au profit de l'exon E'1 et de l'intron I'1 de TrSG. TSS: Transcription Start Site.

Cette fusion modifie profondément l'expression de Stat3 dans les cellules cancéreuses.

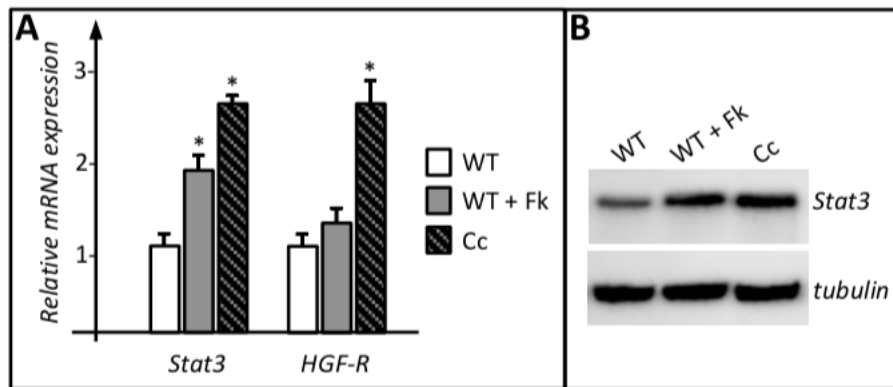
**Question 1: Pourquoi?** (1,5 point)

La surexpression de Stat3 dans les cellules cancéreuses s'accompagne d'une surexpression de **HGF-R** (récepteur au facteur de croissance HGF), **gène cible de Stat3** impliqué dans la prolifération cellulaire.

Dans une première expérience, les chercheurs tentent de reproduire les effets de la surexpression de Stat3 sur son gène cible HGF-R dans des cellules normales. Pour cela, on cultive des cellules normales en présence de Fk pour induire la surexpression de Stat3. On extrait ensuite les ARN et on quantifie ceux codant pour Stat3 et HGF-R. On extrait également les protéines pour mettre en évidence la protéine Stat3. À titre de comparaison on répète les mêmes extractions à partir de cultures de cellules cancéreuses.

**Question 2: Quelles techniques a t'on utilisé ici pour analyser l'expression des ARN et des protéines?** (0,5 point)

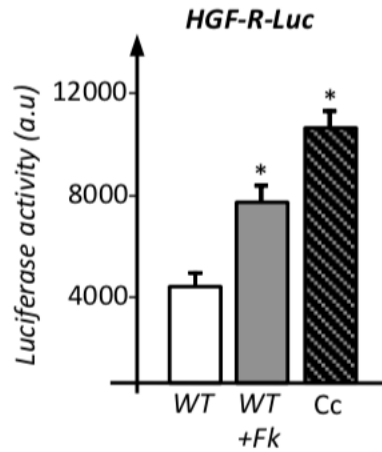
Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante:



**Figure 2: Niveaux d'expression des transcrits Stat3 et de son gène cible HGF-R (A) et des protéines Stat3 (B) dans des cellules normales (WT) ou cancéreuses (Cc) cultivées en absence ou en présence de Fk pendant 24h.** A: Pour chaque gène, les quantités d'ARNm ont été normalisées par rapport au niveau d'expression observé dans les cellules WT cultivées en absence de Fk. \* indique une différence significative par rapport à la condition WT. B: Tubulin est utilisé comme témoin de charge.

**Question 3: Analyser et comparer les niveaux d'expression des différents gènes en fonction des conditions expérimentales. Pourquoi vérifier l'expression de Stat3 au niveau protéique?** (3 points)

Les chercheurs mènent ensuite une étude fonctionnelle en transfection transitoire du promoteur de HGF-R. Pour cela, le promoteur de HGF-R a été cloné en amont du gène rapporteur Luciférase dans un plasmide rapporteur (HGF-R-Luc). Suite à **la transfection de cette construction dans les cellules Cc ou WT** (induites ou non par la Fk), les chercheurs obtiennent les résultats suivants:



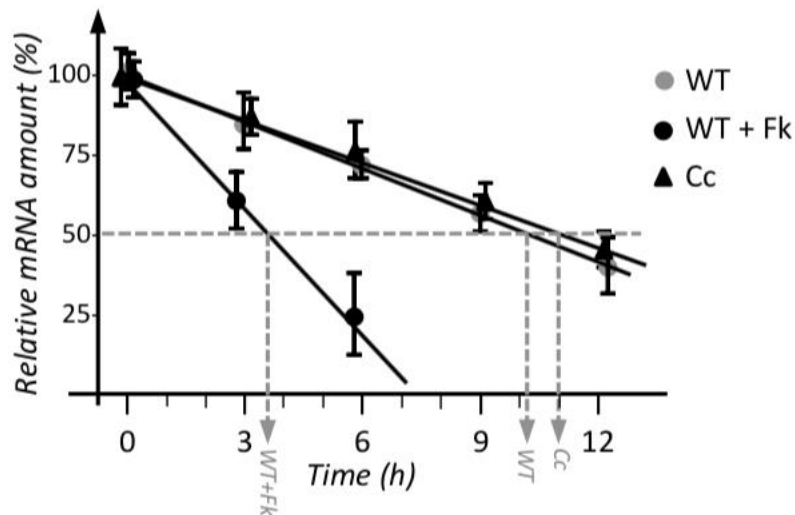
**Figure 3:** *Activité transcriptionnelle du promoteur de HGF-R au sein des cellules normales cultivées en absence ou en présence de Fk et dans les cellules cancéreuses.* Le plasmide HGF-R-Luc est transfecté dans les cellules WT ou Cc. Le lendemain, les cellules WT sont induites ou non par la Fk pendant 24h et l'activité luciférase est mesurée et exprimée en unité arbitraire (a.u). \* indique une différence significative par rapport à la condition WT.

**Question 4:** Analyser les résultats obtenus. Compte tenu des résultats de l'expérience précédente, s'attendait-on à un tel profil ici? Pourquoi? (3 points)

Les disparités dans les résultats obtenus ont poussé les chercheurs à étudier la stabilité des ARN dans les différentes conditions de culture.

**Question 5:** Comment détermine t'on la demi-vie des ARN? (1 point)



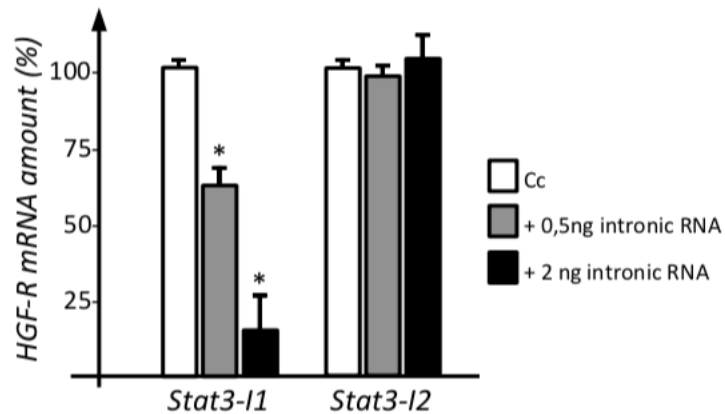


**Figure 4:** Mesure de la stabilité de l'ARN de HGF-R dans les cellules normales (WT) traitées ou non à la Fk et les cellules cancéreuses (Cc). Les cellules sont incubées en absence ou en présence de Fk 12h avant le début de l'expérience (t=0). La quantité d'ARNm codant pour HGF-R, exprimée en %, est rapportée à la quantité d'ARNm HGF-R mesurée au temps t=0 dans chaque condition de culture. La demi-vie des ARNm HGF-R est de: 10h dans les cellules normales - 3,5h dans les cellules normales traitées à la Fk - 11h dans les cellules cancéreuses.

**Question 6:** Analyser les données obtenues. Cela permet-il d'expliquer le précédent résultat? (2 points)

**Question 7:** Compte tenu du remaniement génétique de Stat3 dans les cellules cancéreuses, émettez une hypothèse expliquant les profils observés. (1 point)

Afin de tester cette hypothèse, les chercheurs décident de transfecter des cultures de cellules cancéreuses avec des ARN correspondants aux séquences des introns 1 ou 2 du gène Stat3 normal. On extrait ensuite les ARNm et on quantifie ceux codant pour HGF-R:



**Figure 5: Effet de la transfection des ARN introniques 1 ou 2 de Stat3 sur les niveaux d'expression des transcrits HGF-R dans des cellules cancéreuses.** Les cellules ont été transfectées avec 0,5ng ou 2 ng d'ARN intronique 1 ou 2 de Stat3 (Stat3-11 et Stat3-12) 24h avant extraction des ARNm. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'ARNm HGF-R retrouvée dans les cellules cancéreuses non transfectées (Cc). \* indique une différence significative par rapport à la condition Cc.

**Question 8: Analyser les résultats obtenus. Concluez sur la régulation de l'expression de HGF-R par Stat3 dans les cellules normales et dans les cellules cancéreuses.** (4 points)



**Amicale Paris Sciences**

**Licence Sciences Biomédicales  
2018-2019**

**Session 1 – S4  
Correction**

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

Association régit par la loi 1901 enregistrée à la préfecture de Paris



UNIVERSITÉ  
PARIS  
DESCARTES

Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales

?

Année Universitaire 2018-2019

??  
??  
?

Licence Sciences Biomédicale

2<sup>ème</sup> année

??  
??  
?

Semestre 2 Session 1 ~~PREUVE~~ Régulations des Gènes

??  
??  
?  
?  
?  
?  
?  
?

?

?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?  
?

Le sujet comporte 7 pages numérotées

Les réponses CONCISES sont à noter dans les encarts prévus à cet effet

Les schémas sont autorisés

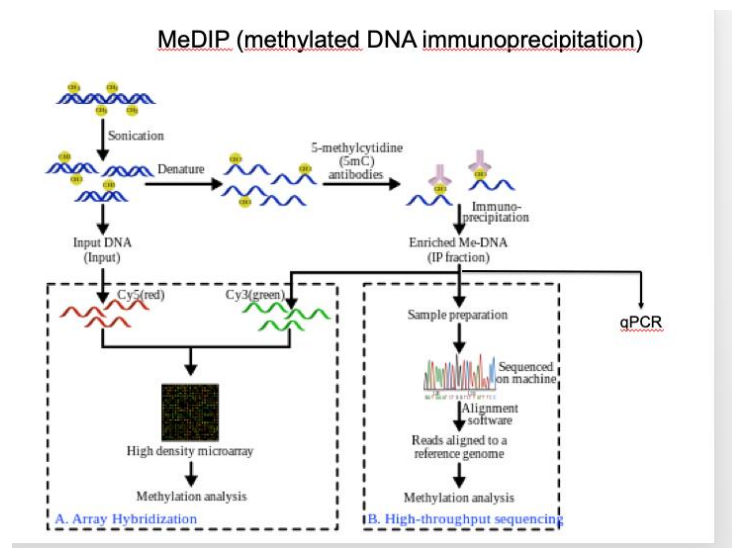
**Question 1: Décrire la technique de MeDIP et proposer un schéma illustratif. (3 points)**

**MeDIP (Methylation DNA immunoprecipitation)**

Le MeDIP a pour but d'isoler par immunoprécipitation les régions d'ADN dont les îlots CpG sont méthylés.

Le MeDIP est une technique qui utilise des anticorps dirigés contre les cytosines méthylées. Les anticorps sont couplés à des billes magnétiques ou lourdes afin d'immunoprécipiter les régions d'ADN méthylé au niveau des cytosines.

L'ADN de l'échantillon est fragmenté par ultrasons puis les anticorps y sont ajoutés. Une fois ceux-ci fixés sur les méthylcytosines, on récupère les fragments méthylés grâce à un aimant, ou par centrifugation : L'ADN méthylé est précipité alors que l'ADN non méthylé reste dans le surnageant. On a donc enrichi en séquences méthylées et on peut alors analyser et identifier quels sont les régions méthylées par qPCR, puce à ADN ou séquençage.



**Question 2: On veut mettre en évidence l'association d'un ARNm avec une protéine. Citez les deux techniques que l'on peut utiliser. (1 point)**

- Immunoprécipitation de l'ARN pour isoler les ARNs associés à une protéine d'intérêt
- Chromatographie d'ARN pour isoler les protéines associées à un ARN d'intérêt
- EMSA pour vérifier l'interaction entre l'ARN et la protéine (in vitro)

**Question 3: Expliquez brièvement ce qu'est un IRES. (2 points)**

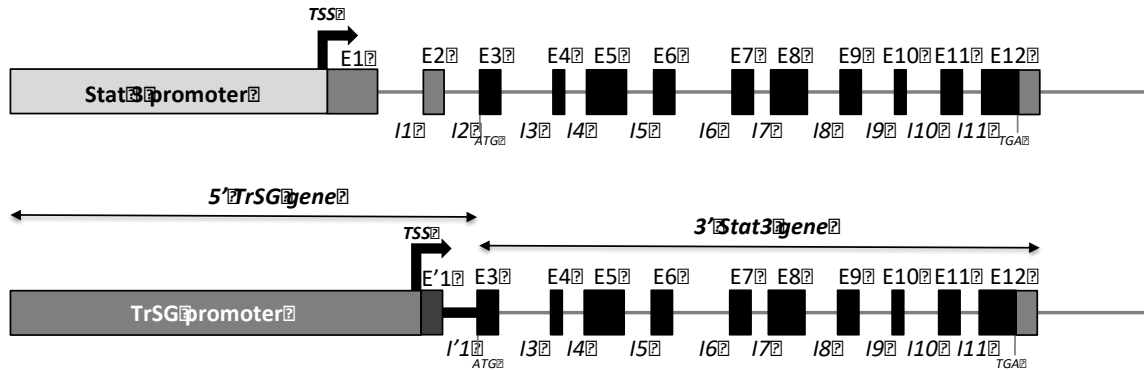
**IRES (Internal ribosome entry site/ séquence d'entrée interne du ribosome)**

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes débute classiquement par le recrutement de la sous-unité du ribosome en 80S du messageur via la coiffe et le facteur eIF4E.

Certains messages ont des ARN viraux possédant des sites d'entrées internes des ribosomes (IRES) qui permettent un mécanisme d'initiation de la traduction indépendant de la coiffe et d'eIF4E. Les IRES recrutent le ribosome directement en interne soit en montant du codon d'initiateur soit directement sur le codon initiateur.

**Axe Stat3-HGF-R et cellules cancéreuses**

Certains cancers présentent une surexpression de Stat3 due à une cassure chromosomique entraînant la fusion du gène TrSG (Transformation Stimulating Gene) avec Stat3 (Facteur de Transcription de la voie AK/STAT). Les cartes du gène Stat3 portées par les cellules normales ou cancéreuses sont présentées ci-dessous :



**Figure 1 :** représentation schématique de la structure du gène Stat3 normal (en haut) et fusionné avec TrSG (en bas) tel qu'on le trouve dans certaines cellules cancéreuses. La séquence transcrite de Stat3 comporte 12 exons (E1 à E12) et 11 introns (I1 à I11). Le codon initiateur (ATG) est localisé au début de E3, le codon stop (TGA) dans E12. La fusion génique entraîne l'emplacement du promoteur de Stat3 par celui de TrSG et la perte de E1 et E2 de Stat3 et des séquences introniques I1 et I2 au profit de l'exon E'1 et de l'intron I'1 de TrSG. TSS : Transcription Start Site.

Cette fusion modifie profondément l'expression de Stat3 dans les cellules cancéreuses.

**Question 1 : Pourquoi? (1,5 point)**

Promoteur de Stat3 remplacé par celui de TrSG  
 => expression de Stat3 soumise à l'influence des régulations transc spécifiques de TrSG

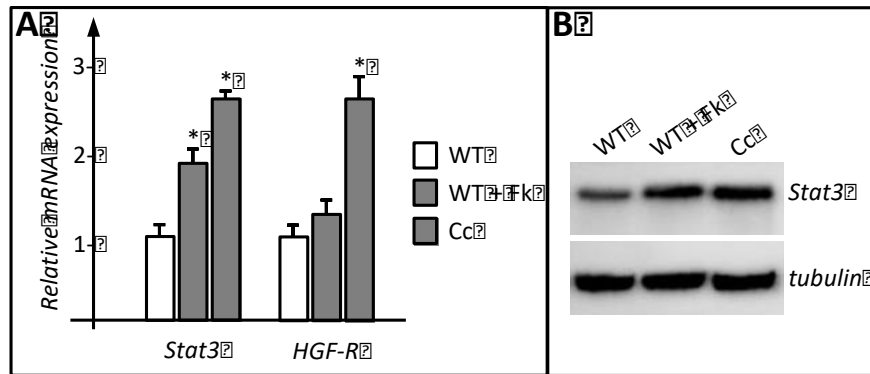
La surexpression de Stat3 dans les cellules cancéreuses s'accompagne d'une surexpression de HGF-R (récepteur au facteur de croissance HGF), gène cible de Stat3 impliqué dans la prolifération cellulaire.

Dans une première expérience, les chercheurs tentent de reproduire les effets de la surexpression de Stat3 sur son gène cible HGF-R dans des cellules normales. Pour cela, on cultive des cellules normales en présence de Fk pour induire la surexpression de Stat3. On extrait ensuite les ARN et on quantifie ceux codant pour Stat3 et HGF-R. On extrait également les protéines pour mettre en évidence la protéine Stat3. À titre de comparaison on répète les mêmes extractions à partir de cultures de cellules cancéreuses.

**Question 2 : Quelles techniques a-t-on utilisé ici pour analyser l'expression des ARN et des protéines? (0,5 point)**

RT-qPCR      Western-Blot

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante :



**Figure 2:** Niveaux d'expression des transcrits Stat3 et de son gène cible HGF-R (A) et des protéines Stat3 (B) dans des cellules normales (WT) ou cancéreuses (Cc) cultivées en absence ou en présence de Fk pendant 24h. A: Pour chaque gène, les quantités d'ARNm ont été normalisées par rapport au niveau d'expression observé dans des cellules WT cultivées en absence de Fk. \* indique une différence significative par rapport à la condition WT. B: Tubulin est utilisé comme témoin de charge.

**Question 3:** Analyser et comparer les niveaux d'expression des différents gènes en fonction des conditions expérimentales. Pourquoi vérifier l'expression de Stat3 au niveau protéique?

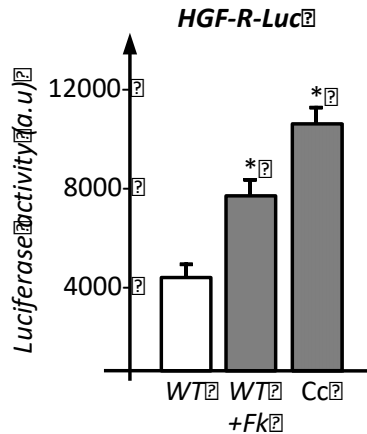
Expression des ARNm de Stat3: significativement augmentée dans les cellules normales traitées de Fk d'environ 2 fois dans les cellules cancéreuses de plus de 2,5 fois

Expression des ARNm de HGF-R: reste inchangé dans les cellules sauvages traitées de Fk par rapport au contrôle, augmente significativement de plus de 2,5 fois dans les cellules cancéreuses

Expression de la protéine Stat3: est bien augmentée dans les cellules sauvages traitées de Fk et de façon encore plus prononcée dans les cellules cancéreuses

=> On vérifie que la surexpression des ARNm de Stat3 par la Fk entraîne bien l'augmentation du niveau protéique de Stat3 car dans les cellules sauvages on ne voit pas d'augmentation de la quantité des ARNm d'HGF-R, pourtant le gène cible de Stat3.

Les chercheurs mènent ensuite une étude fonctionnelle en transfection transitoire du promoteur de HGF-R. Pour cela, le promoteur de HGF-R a été cloné en amont du gène rapporteur Luciférase dans un plasmide rapporteur (HGF-R-Luc). Suite à la transfection de cette construction dans des cellules Cc ou WT (induites ou non par Fk), les chercheurs obtiennent les résultats suivants:



**Figure 3: Activité transcriptionnelle du promoteur de HGF-R au sein des cellules normales cultivées en absence ou en présence de Fk et dans les cellules cancéreuses.** Le plasmide HGF-R-Luc est transfecté dans les cellules WT ou Cc. Le lendemain, les cellules WT sont induites ou non par la Fk pendant 24h et l'activité luciférase est mesurée et exprimée en unité arbitraire (a.u.). \* indique une différence significative par rapport à la condition WT.

**Question 4: Analyser les résultats obtenus. Compte tenu des résultats de l'expérience précédente, s'attendait-on à un tel profil ici? Pourquoi?** (3 points)

Activité transc du promoteur de HGF-R:

est stimulé de presque 2 fois lorsque les cellules sauvages sont traitées de la Fk

est stimulé de plus de 2,5 fois dans les cellules cancéreuses

Le résultat obtenu dans les cellules cancéreuses attendu car la surexpression de Stat3 semble stimuler de plus de 2,5 fois l'expression des ARNm de HGF-R. Stimulation passerait par stimulation de l'activité transc du promoteur de HGF-R dans ces cellules, comme le suggère les résultats de cette figure.

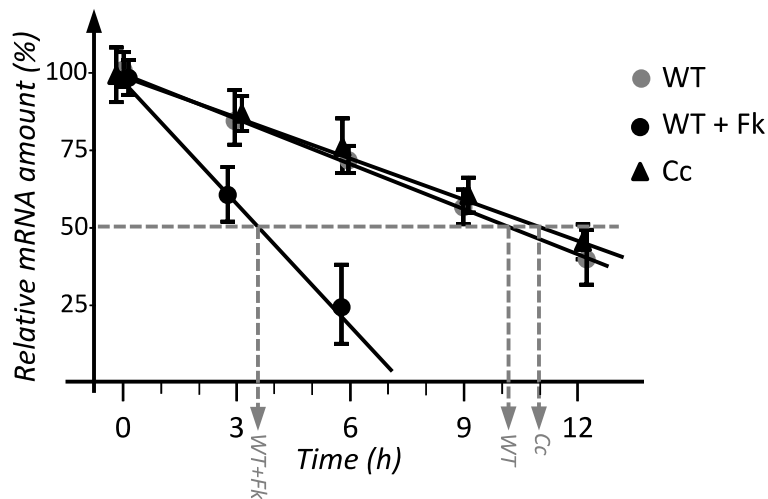
Le résultat obtenu dans les cellules sauvages traitées de la Fk est déroutant puisque les analyses précédentes suggèrent que la surexpression de Stat3 par Fk n'augmente pas la quantité d'ARNm HGF-R et donc l'activité transc du promoteur de HGF-R. Ce qui n'est pas le cas ici.

Les disparités dans les résultats obtenus ont poussé les chercheurs à étudier la stabilité des ARN dans les différentes conditions de culture.

**Question 5: Comment déterminer on la demi-vie des ARN?** (1 point)

Blocage de la transc (actinomycine D) puis suivi de la décroissance de la quantité d'ARNm en fonction du temps par qPCR





**Figure 4: Mesure de la stabilité de l'ARN de HGF-R dans les cellules normales (WT) traitées ou non à la Fk et les cellules cancéreuses (Cc).** Les cellules sont incubées en absence ou en présence de Fk 12h avant le début de l'expérience (t=0). La quantité d'ARNm codant pour HGF-R, exprimée en %, est rapportée à la quantité d'ARNm HGF-R mesurée au temps t=0 dans chaque condition de culture. **La demi-vie des ARNm HGF-R est de: 10h dans les cellules normales - 3,5h dans les cellules normales traitées à la Fk - 11h dans les cellules cancéreuses.**

**Question 6: Analyser les données obtenues. Cela permet-il d'expliquer le précédent résultat?** (2 points)

*La demi-vie de l'ARNm de HGF-R*

*est de 10h dans les cellules normales*

*et tombe à 3,5h quand les cellules sont traitées à la Fk*

*⇒ Le traitement à la Fk semble induire une dégradation des ARNm de HGF-R*

*est de 11h dans les cellules cancéreuses*

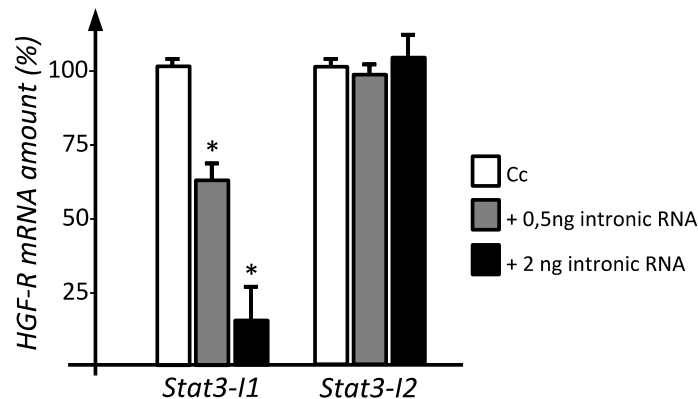
*⇒ La stabilité des ARNm HGF-R est identique à celle mesurée dans les cellules normales NON TRAITÉES à la Fk*

*⇒ Dans les cellules normales, la surexpression de Stat3 induite par la Fk n'induit pas d'augmentation de la quantité d'ARNm d'HGF-R car dans ces conditions cet ARNm est moins stable*

**Question 7: Compte tenu du remaniement génétique de Stat3 dans les cellules cancéreuses, émettez une hypothèse expliquant les profils observés.** (1 point)

*Dans les cellules cancéreuses, l'ARNm de HGF-R n'est pas dégradé malgré la surexpression de Stat3 (fusion avec le promoteur de TrSG) ⇒ fusion génétique a éliminé une structure dans le gène Stat3 qui peut déstabiliser les ARNm de HGF-R = intron donneur de miARN?*

Afin de tester cette hypothèse, les chercheurs décident de transfecter des cultures de cellules cancéreuses avec des ARN correspondants aux séquences des introns 1 ou 2 du gène Stat3 normal. On extrait ensuite les ARNm et on quantifie ceux codant pour HGF-R:



**Figure 5: Effet de la transfection des ARN introniques 1 ou 2 de Stat3 sur les niveaux d'expression des transcrits HGF-R dans des cellules cancéreuses.** Les cellules ont été transfectées avec 0,5ng ou 2 ng d'ARN intronique 1 ou 2 de Stat3 (Stat3-I1 et Stat3-I2) 24h avant extraction des ARNm. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'ARNm HGF-R retrouvée dans les cellules cancéreuses non transfectées (Cc). \* indique une différence significative par rapport à la condition Cc.

**Question 8: Analyser les résultats obtenus. Concluez sur la régulation de l'expression de HGF-R par Stat3 dans les cellules normales et dans les cellules cancéreuses.** (4 points)

*Lorsqu'on transfecte les cellules cancéreuses avec des quantités croissantes de séquences introniques 1 de Stat3 => la quantité d'ARNm de HGF-R diminue significativement de façon dose-dépendante*  
*de séquences introniques 2 de Stat3 => la quantité d'ARNm de HGF-R reste stable*  
 => *L'intron 1 de Stat3 est capable d'induire la dégradation de l'ARNm de HGF-R*  
 => *l'intron 1 de Stat3 est une séquence d'ARN capable de donner naissance à un miARN impliqué dans la dégradation spécifique de l'ARNm de HGF-R.*  
*dans les cellules normales traitées à la Fk il n'y pas de surexpression de HGF-R malgré la stimulation de l'expression de Stat3*  
 => *Cet intron est absent dans le gène Stat3 dans les cellules cancéreuses.*  
*Il ne peut donc pas induire la dégradation des ARNm de HGF-R qui se retrouve surexprimé dans ces cellules.*



**Amicale Paris Sciences  
Licence Sciences Biomédicales  
2020-2021**

**Session 1 – S4  
Correction**

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

## **Année Universitaire 2020-2021**

Licence Sciences Biomédicales  
2ème année

**Semestre 2 - Session 1**

**EPREUVE : Régulation des gènes**

Le sujet comporte **8 pages numérotées**

Les réponses sont à noter dans les encarts prévus à cet effet

**LES SCHÉMAS SONT AUTORISÉS**

**Cancer oestrogéno-dépendant et efficacité thérapeutique du Tamoxifen**

On s'intéresse au cancer du sein oestrogéno-dépendant caractérisé par une surexpression du récepteur aux oestrogènes (ER) dans les cellules épithéliales mammaires. Dans ce cancer, les cellules épithéliales se multiplient de façon anarchique et se détachent de la matrice extracellulaire pour envahir le corps et créer des métastases dans différents organes.

La stratégie thérapeutique utilisée consiste à traiter les patients avec un antagoniste du ER (Tamoxifen) pour contrer les effets de sa surexpression. Les études épidémiologiques montrent une efficacité satisfaisante des traitements au tamoxifen sur la croissance des tumeurs mais des résultats décevants sur l'invasion : les patients traités au Tamoxifen voient la croissance des tumeurs fortement ralentie mais l'occurrence d'apparition des métastases ne faiblit pas.

**Question 1 : À quelle famille de protéine appartient le ER ? Décrire son mode d'action**

**2 POINTS**

**superfamille des récepteurs nucléaires**

**fixation estroG sur récepteur => dimérisation et fixation sur ERE promoteur gène cible  
recrutement coactivateur et induction transcription**

Pour tenter de comprendre ces disparités des chercheurs s'intéressent à l'expression :

- de CDK4, enzyme du cycle cellulaire favorable à la prolifération cellulaire et connu pour être dérégulé dans de nombreux cancers,
- des Intégrines  $\beta_1$ , protéines transmembranaires impliquées dans la formation des points d'adhésion focaux, nécessaires aux cellules pour adhérer à la matrice extracellulaire.

Ils réalisent d'abord des RT-qPCR et des western-blots à partir d'extraits de tissus épithéliaux mammaires issus de patients sains, cancéreux (cancer) et cancéreux traités au tamoxifène (cancer+Tamox). Voici les résultats obtenus :

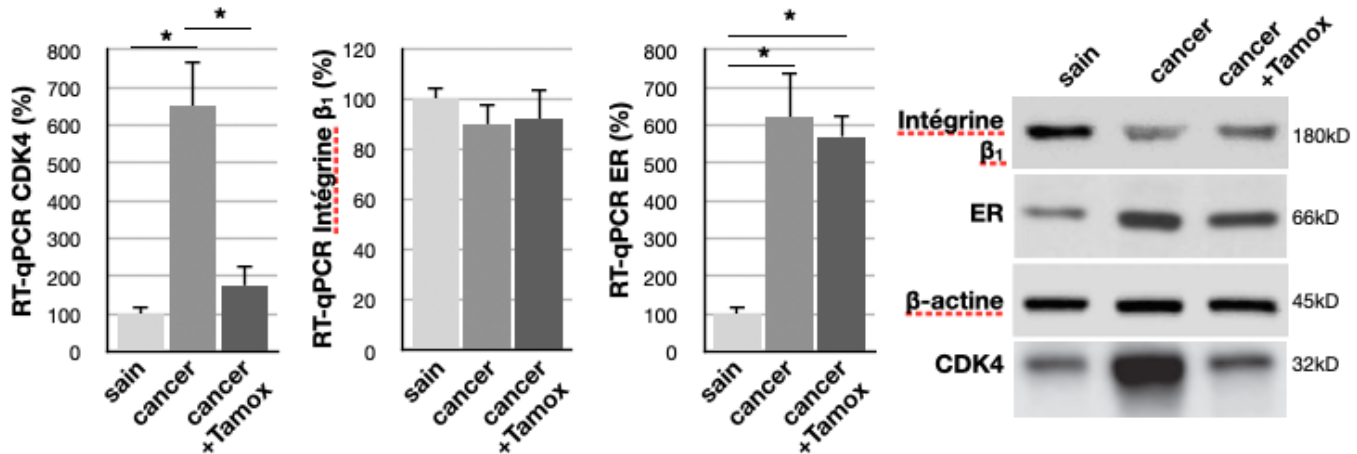


Figure 1 : Expression de CDK4, des Intégrines  $\beta_1$  et du ER dans les cellules épithéliales mammaires issues de patients sains ou cancéreux traités ou non au Tamoxifène. Les résultats de quantification des RT-qPCR sont exprimés en % par rapport au niveau mesuré dans le tissu sain. Les poids moléculaires apparents de CDK4 et des Intégrines  $\beta_1$  sont de 32kD et 180kD, respectivement. Le ER présente un poids moléculaire apparent de 66kD. La  $\beta$ -actine (45kD) est utilisée comme témoin de charge.

**Question 2 : Quels types de macromolécules sont analysés ici ? Commentez les résultats, notamment la corrélation entre niveau d'expression du ER, modulation de l'activité du ER et niveau d'expression des Intégrines  $\beta_1$  et de CDK4.**

**Tamox = ligand du ER qui DIMINUE son activité transcriptionnelle**

**5 POINTS**

**ARN et protéines**

qté ARN codant pour CDK4 augmentée dans cancer / diminué quand +tamox

qté ARN intégrine inchangée dans cancer+/-tamox

qté ARN ER augmentée dans cancer / tamox pas d'influence

qté PROT CDK4 augmentée dans cancer / diminuée quand +tamox => corrélation ok avec son ARNm (activité trasc ER DIMINUÉE avec Tamox => baisse expr. gène cible, ici CDK4)

qté PROT intégrine diminuée dans cancer +/-tamox => PAS de corrélation avec son ARNm

qté PROT ER augmentée dans cancer +/-tamox => corrélation avec son ARNm

=> activité de la PROT ER liée à expression de CDK4 (ARN et protéine) ?

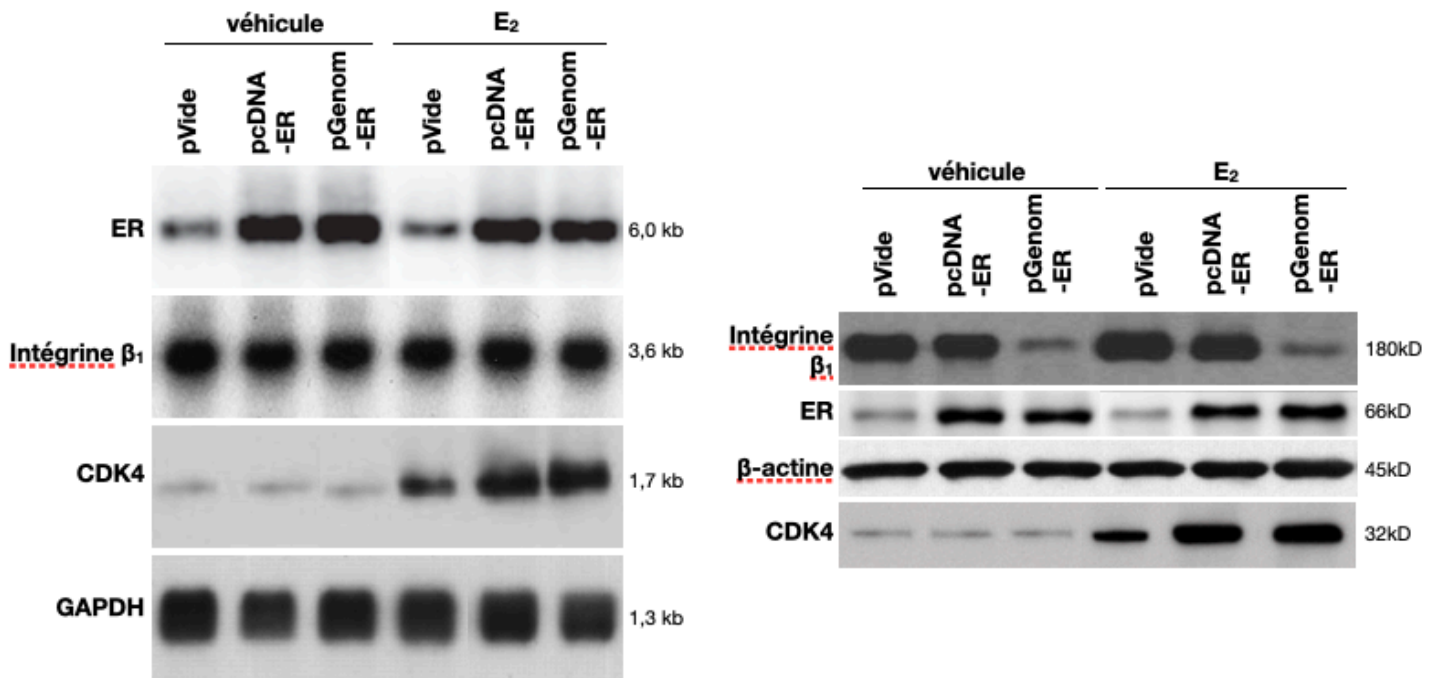
=> qté ARN ou de prot ER inversement liée à qté PROT INTEGRINE (mais rien sur ARN) ?

Afin de comprendre les liens fonctionnels entre ER, CDK4 et les Intégrines  $\beta_1$  dans les cellules cancéreuses, les chercheurs décident dans des cultures de cellules épithéliales mammaires NORMALES de surexprimer le ER en utilisant deux plasmides différents :

- pcDNA-ER qui contient le cDNA issu de l'ARN<sub>m</sub> du ER,
- pGenom-ER qui contient le fragment génomique codant pour le ER

tous deux clonés en aval d'un promoteur fort toujours actif dans les cellules mammaires.

Ils traitent ensuite les cellules transfectées avec les oestrogènes pour analyser les niveaux d'expression des CDK4 et Intégrines  $\beta_1$  :



**Figure 3 : Effet de la surexpression du ER codé par pcDNA-ER ou pGenomER sur les quantités d'ARN<sub>m</sub> et de protéines ER, CDK4 et Intégrines  $\beta_1$  dans les cellules traitées ou non par les oestrogènes.** Les cellules sont cultivées dans un milieu défini dépourvu de stéroïdes. Elles sont induites par les oestrogènes ( $E_2$ ) ou le véhicule en guise de témoin 24h après la transfection des plasmides de surexpression ou du plasmide vide (pVide). On extrait ensuite les ARN<sub>m</sub> pour mettre en évidence les transcrits codant le ER, les Intégrines  $\beta_1$ , CDK4 et la GAPDH qui sert de témoin de charge au moyen de sondes antisens radioactives spécifiques. On extrait également les protéines pour étudier les Intégrine  $\beta_1$ , ER et CDK4 avec la  $\beta$ -actine utilisée comme témoin de charge.

**Question 3 : Quelle technique a-t-on utilisé pour mettre en évidence les transcrits ? Commenter les résultats obtenus.**

**4 POINTS**

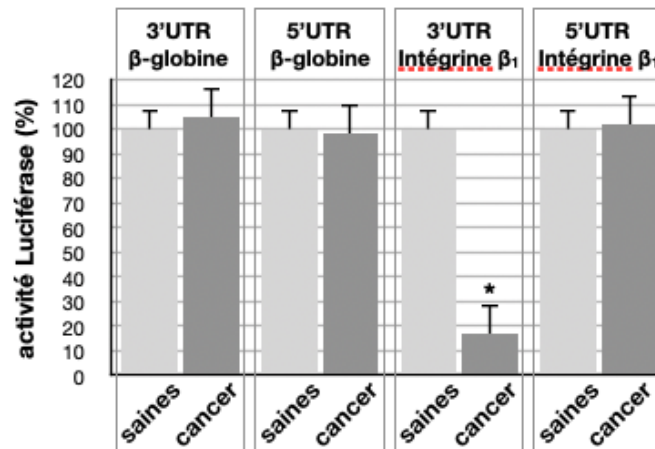
**Northern blot**

surexpression cDNA ou Genom => augmente qté ER ARNm et PROT = manip ok  
=> AUCUNE influence sur ARNm intégrine mais sur prot oui si utilisation pGENOM-ER, si utilisation pcDNA-ER  
& pas d'influence de E2 sur ARN ou prot intégrine => effet E2 sur activité protéine ER n'a pas d'influence sur ARN ou prot intégrine

effet de surexpression de ER sur INTEGRINE dépend de l'expression du GENOMIQUE / pas du cDNA ni de E2

=> aucune influence sur ARN et prot CDK4 sans E2 - avec E2 = potentialise effet surexpression de ER sur ARN et Prot de CDK4  
effet de surexpression ER (via pcDNA ou pGENOM indistinctement) sur CDK4 dépend de la présence de E2 - ACTIVITÉ de la protéine ER influence expression ARN et donc Prot de CDK4

Au vu des derniers résultats, les chercheurs décident d'utiliser un système rapporteur luciférase. La luciférase est sous le contrôle d'un promoteur toujours actif et l'on étudie soit la 3'UTR soit la 5'UTR de l'ARN<sub>m</sub> des Intégrines  $\beta_1$ . Les 3'UTR et 5'UTR issues des ARN<sub>m</sub> codant pour la  $\beta$ -globine sont utilisés en guise de témoin. On transfecte ces constructions dans des cellules épithéliales mammaires saines ou cancéreuses (cancer) puis on dose l'activité luciférase. Voici les résultats obtenus :



**Figure 3 : Analyse de l'activité de la luciférase dans les cultures de cellules mammaires humaines saines ou cancéreuses.** L'activité luciférase est exprimée en % par rapport à la condition « saines » pour chaque construction testée. \* indique une différence significative par rapport à la condition « saines ».

**Question 4 : Comment a-t-on procédé pour intégrer les séquences 3' et 5'UTR des ARN<sub>m</sub> de la  $\beta$ -globine et des Intégrines  $\beta_1$  dans la construction luciférase ? Vous pouvez vous aider d'un schéma. Commentez les résultats obtenus. Proposez un modèle de l'effet de la surexpression du ER dans les cellules cancéreuses pouvant expliquer les variations d'expression de CDK4 et des Intégrines  $\beta_1$ . Vous pouvez vous aider d'un schéma. 5-6 POINTS**

#### Clonage de la 3'UTR et 5'UTR

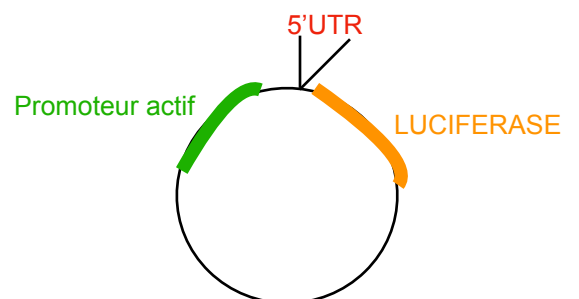
RT-PCR pour cloner ces séquences → obtention de produits PCR : CDNA de la 3'UTR et 5'UTR. On profite de la PCR pour ajouter des sites de restrictions permettant l'intégration de ces produits PCR dans le plasmide D'accueil.

Le plasmide d'accueil contient la luciférase sous le contrôle d'un promoteur toujours actif. Le gène luciférase est ainsi toujours transcrit.

On clone les 5'UTR de chaque gène en amont de la luciférase :

Promoteur actif—5'UTR  $\beta$ globine- luciférase

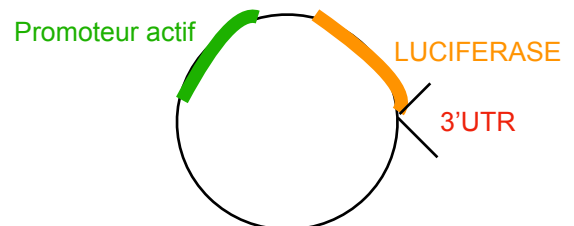
Promoteur actif-5'UTR intégrine  $\beta_1$ -luciférase



et les 3'UTR sont clonées en aval de la luciférase

Promoteur actif- luciférase - 3'UTR -  $\beta$ globine

Promoteur actif- luciférase - 3'UTR intégrine  $\beta_1$



La régulation de la luciférase dépendra donc de la 5'UTR en amont ou de la 3'UTR en aval de l'ARN<sub>m</sub> Luciférase : régulation de la stabilité de l'ARN<sub>m</sub> ou/et régulation de la traduction.



Fig 3 :

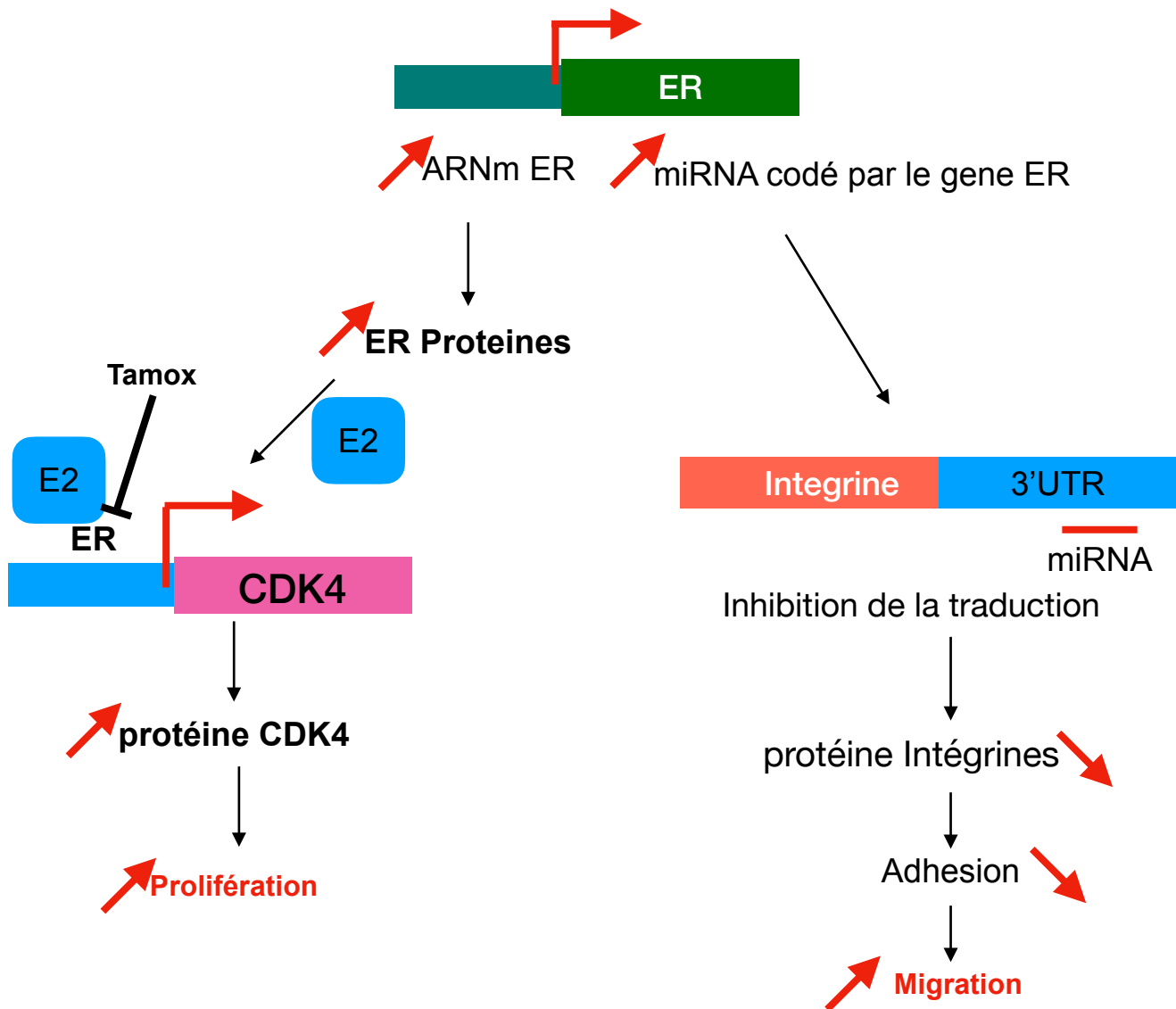
Pas d'effet de la 3' et 5'UTR de la globine ni de la 5'UTR de la  $\beta$ -intégrine sur l'activité luciférase.

En revanche en présence de la 3'UTR de la  $\beta$ -intégrine, l'activité luciférase est diminuée dans les cellules cancéreuses. La 3'UTR de  $\beta$ -intégrine recule négativement l'expression de la luciférase dans les cellules cancéreuses.

Lors de cancer où le ER est surexprimé, la  $\beta$ -intégrine subit donc une régulation post-transcriptionnelle qui passe par sa 3'UTR: induction de dégradation et/ou inhibition de la traduction

Puisque seulement quand l'ADN génomique du ER est transfecté, on observe une diminution des  $\beta$ -intégrines et seulement au niveau protéique, on peut supposer qu'un miARN est produit à partir des introns du transcrit ER et se fixe sur la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -intégrine et inhibe sa traduction.

### Modele d'action du ER dans les cancers du sein sur la prolifération et migration cellulaire



**Question 5 (question de cours indépendante du sujet de réflexion) : Donnez un exemple de modification chromatinienne et de modification épigénétique, expliquer la différence.**

**3 POINTS**

Modification chromatinienne : modification de la chromatines (histone ou ADN) qui va influencer le niveau de compaction de la chromatine : euchromatine et heterochromatine

Acetylation des histones, methylation des histones, phosphorylation des histones, methylation de l'ADN

Modifications epigenetiques sont des modificationschromatiniennes mais ceux sont les modification heritables lors de la mitose ou de la méiose.

Par exemple methylation de l'ADN —> heterochromatine

Methylation de la lysine 27 de l'histone H3—> heterochromatine



**Amicale Paris Sciences  
Licence Sciences Biomédicales  
2020-2021**

Session 2 – S4  
Correction

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

---

**UE SA04M120**

**RÉGULATION  
DE L'EXPRESSION DES GÈNES**

---

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

**Durée totale de l'épreuve : 1 heure**

Le sujet comporte **8 pages numérotées**  
Les réponses sont à noter dans les encarts prévus à cet effet  
**LES SCHÉMAS SONT AUTORISÉS**

**Question 1 :** Citez deux techniques permettant d'étudier les variations de quantités d'un transcrit. Citer les technologies sur lesquelles elles reposent. Lister les avantages et les limites de chacune. (3 points)

### **RT-qPCR**

=> amplification par polymérisation / utilisation d'amorces spécifiques = séquences complémentaires à des tronçons uniques du transcrit d'intérêt

avantages = très rapide / spécifique / sensible / quantitatif

inconvénients = pas d'infos sur la « qualité » du transcrit (taille, séquence...)

### **Northern Blot**

=> séparation des ARN par électrophorèse / transfert / révélation séquences d'intérêt via sonde marquée

avantages = assez rapide / spécifique / étude de la taille possible

inconvénients = moins sensible / semi-quantitatif

**limites pour les deux** = information biologique partielle (quantité ARN mais pas prot + quantité résultante balance synthèse/stabilité = origine variation qté toujours inconnue)

**Question 2 :** Donnez la définition d'un promoteur. Citez ses principales fonctions et les facteurs/enzymes nécessaires à une expression génique basale. (3 points)

Cf diapo 4 cours 2 (promoteur)

**Définition**

fragment d'ADN contenant les séquences nécessaires à la fixation de l'ARN polymérase et de ses facteurs associés afin d'initier la transcription

**Fonctions**

- ⇒ définit où la transcription commence
- ⇒ définit la direction de la transcription
- ⇒ définit le brin matrice (=brin antisens)
- ⇒ en 5' du brin codant

Cf diapo 5 cours 2 (promoteur)

**Facteurs/Enzymes pour expression BASALE**

- ⇒ TFIID sur TATA box
  - ⇒ Stabilisé par TFIIA
    - ⇒ Recrutement de TFIIIB et TFIIF (fonction hélicase)
      - ⇒ Stabilisation de ARN Pol II + TFIIE,F par TFIIIB, D
      - ⇒ Phosphorylation de C-term ARN Pol II par TFIIF
- ⇒ ARN Pol II se détache du complexe      ⇒ Synthèse ARN

**Question 3 : Qu'est-ce que la polyadénylation alternative ? Donner un exemple de régulation de ce processus. (3 points)**

Lors de la terminaison de la transcription, l'ARNm est clivé en aval du site de polyadénylation puis l'ARNm est polyadénylé.

La polyadénylation alternative est le fait que le clivage de l'ARNm peut avoir lieu à différents endroits si il y a plusieurs site de polyadénylation produisant alors des ARNm avec des 3'UTR de taille différentes.

**Ex de regulation :**

la quantité de facteur de clivage (CPSF) : si peu de facteurs, c'est le niveau du site de polyadénylation le plus « fort » qu'a lieu le clivage (en général le PAS discal). Si bcp de facteurs, on augmente les chances que le clivage est lieu sur des site de polyadénylation plus faible

Présence d'activateurs qui favorisent la liaison du complexe de clivage sur un site

Présence d'inhibiteur qui empêchent le recrutement du site de clivage sur un site.

**Question 4 : A quoi sert l'analyse des polysomes ? Expliquez cette technique. (3 points)**

L'analyse des polysomes a pour but de déterminer si un ARNm est associé à des polysomes et est donc traduit.

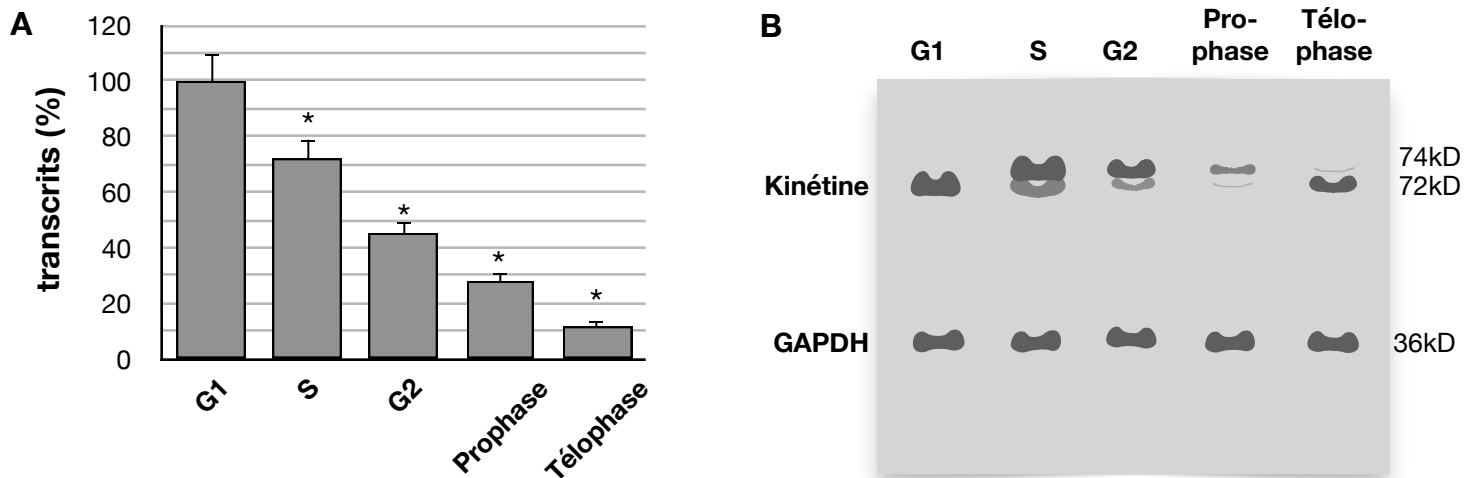
Cette technique consiste à séparer les macromolécules dont les ARNm et ribosomes en fonction de leur vitesse de sédimentation par centrifugation sur un gradient du sucrose.

Les ARNm non associés aux ribosomes/ aux polysomes ont une vitesse de sédimentation faible alors que les ARNm en traduction donc associés aux polysomes, ont une vitesse de sédimentation élevée.

En récupérant des fractions dans l'ordre de densité du gradient de sucrose, On peut déterminer comment à sédimenté l'ARNm d'intérêt (en faisant des RT-PCR ou Northern) et si il est associé ou non au polysomes



À partir de cultures synchrones de cellules HEK293 (toutes les cellules sont dans la même phase du cycle), on suit l'expression de la kinétine lors de la progression du cycle cellulaire. On s'intéresse aux transcrits et aux protéines. Les résultats sont présentés dans la figure 1.



**Figure 1 : Mise en évidence des transcrits de la kinétine (A) et des protéines kinétine (B) en fonction de la progression du cycle des cellules HEK293.** On découpe le cycle en 5 phases, phase G1, phase S, phase G2, prophase (début de mitose) et télophase (fin de mitose). (A) Les résultats de quantification des RT-qPCR sont exprimés en % par rapport au niveau mesuré en phase G1. (B) L'extraction protéique et le western-blot sont effectués en présence d'inhibiteur de phosphatases. Lorsque l'extraction est réalisée sans inhibiteur de phosphatases, la kinétine migre à 72kD pour toutes les phases du cycle. La GAPDH est utilisée comme témoin de charge. \* indique une différence significative par rapport à la condition G1.

**Question 6 : Panel A - Décrivez les résultats présentés dans la figure. (1,5 points)**

La quantité de transcrit KINETINE diminue de façon régulière et significative à mesure que le cycle cellulaire progresse.

En fin de mitose il ne reste que 10% des transcrits de KINETINE comparé à la quantité trouvée en phase G1

**Question 8 : Panel B - Quel type de modification peut expliquer la migration électrophorétique atypique de la kinétine ? (0,5 point)**

PHOSPHORYLATION de la protéine car si pas d'ajout d'inhibiteur de phosphatase lors de l'extraction des protéines = migration électrophorétique est modifiée

**Question 9 : Panel B - Décrivez les résultats présentés dans la figure. (4 points)**

1-En phase G1 la protéine Kinétine a une MM app de 72kD

2-En phase S une 2ème bande apparaît à 74kD qui suggère que la prot subit des phosphorylations

3-La quantité de kinétine 72kD en phase S est diminuée par rapport à la quantité présente en phase G1 - cette décroissance se poursuit en G2 puis Prophase (Kinétine 72 kD pratiquement indetectable)

4-La quantité de kinétine 72kD réaugmente en Téléphase par rapport à la quantité très faible détectée en Prophase

5-La quantité de Kinétine 74kD (forme phosphorylée de la prot) diminue pendant la progression du cycle et est pratiquement indetectable en Téléphase

6-La quantité de Kinétine 74kD diminue moins rapidement que la quantité de Kinétine 72kD à mesure que le cycle cellulaire progresse

**Question 10 : interprétez les résultats, à savoir les discordances des résultats montrés dans les panels A et B. Mentionnez les DEUX phénomènes qui semblent expliquer ces disparités lors de la phase S d'une part et lors de la télophase d'autre part. (4 points)**

*(Question 6)*

*La quantité de transcrit KINETINE diminue de façon régulière et significative à mesure que le cycle cellulaire progresse*

*ET*

*(Question 9)*

*3-La quantité de kinétine 72kD en phase S est diminuée par rapport à la quantité présente en phase G1 - cette décroissance se poursuit en G2 puis Prophase (Kinétine 72 kD pratiquement indetectable)*

*=> profil quantité protéine suit profil quantité ARN*

*MAIS*

*6-La quantité de Kinétine 74kD diminue moins rapidement que la quantité de Kinétine 72kD à mesure que le cycle cellulaire progresse*

*= Kinétine 74kD plus stable que Kinétine 72kD*

**=> Kinétine 72kD / Kinétine 74kD = phosphorylation stabilise la protéine ?**

*(Question 6)*

*En fin de mitose il ne reste que 10% des transcrits de KINETINE comparé à la quantité trouvée en phase G1*

*ET*

*(Question 9)*

*4-La quantité de kinétine 72kD réaugmente en Télophase par rapport à la quantité très faible détectée en Prophase*

*=découplage entre chute quté ARN et réaugmentation quté prot*

**=> Traduction Kinétine est **STIMULÉE** en Télophase ?**



**Amicale Paris Sciences  
Licence Sciences Biomédicales  
2021-2022**

**Session 1 – S4  
Correction**

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

**L2**  
Année 2021-2022  
Deuxième Semestre  
Session initiale

UFR des Sciences Fondamentales et  
Biomédicales

---

**UE SA03M120**

**RÉGULATION DE L'EXPRESSION  
DES GÈNES**

---

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Document et/ou matériel autorisés :

**Durée totale de l'épreuve :**

**1 heure**

## QUESTIONS DE COURS (6 points)

### Définir les 6 termes suivants :

=> *VOIR LES DÉFINITIONS EN DÉBUT DE FASCICULE !!*

#### **Activité transcriptionnelle**

Résulte de la capacité d'une séquence promotrice à induire la synthèse d'ARN à partir de la séquence codante qui lui succède.

#### **Coactivateur de la transcription**

Protéine qui n'interagit pas avec l'ADN mais qui est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle d'un promoteur. Ces coactivateurs sont recrutés par les AF des FdeT ou RN liés à l'ADN.

#### **Epigénétique**

Étude des changements dans l'expression des gènes qui sont héréditaires lors de la mitose et/ou de la méiose, et qui ne résultent pas de modifications de la séquence de l'ADN

#### **Ilot CpG**

Le dinucléotide CpG est segment d'ADN de 2 nucléotides, une cytosine suivie d'une guanosine : abréviation de cytosine– liaison phosphate–guanine. Les dinucléotides CpG sont plus concentrés (îlot CpG) dans les régions promotrices et jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, les cytosines du dinucléotide peuvent être méthylées ce qui conduit à une hétérochromatinisation et une répression transcriptionnelle.

#### **Polysome**

Ensemble de ribosomes portés par un même ARNm en cours de traduction ( structure en collier de perle)

#### **Récepteur nucléaire**

Facteur de transcription à activité ligand-dépendante. Ils se lient à l'ADN sur des éléments de réponse spécifique (les response elements, RE).

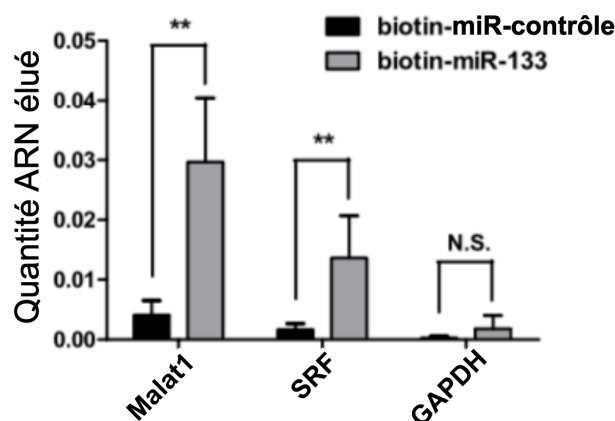
## SUJET RÉDACTIONNEL (14 POINTS)

**SRF** est un facteur de transcription essentiel à la différenciation musculaire (myogenèse) dont l'expression est régulée par le micro ARN 133 (**miR133**). Par ailleurs, **Malat1** -un long ARN non codant- est connu pour être essentiel au bon déroulement de la myogenèse. Des chercheurs s'intéressent donc au rôle de **Malat1** dans la régulation par **miR133** de l'expression de **SRF**. Ils disposent pour cela de cultures primaires de myoblastes dont on peut induire la différenciation en myotubes et d'outils de biologie moléculaire permettant de moduler l'expression des différents acteurs étudiés dans les cellules.

Dans une première série d'expériences, les chercheurs veulent isoler les cibles de miR133 :

Ils synthétisent des microARN contrôle ou miR133 associés à de la biotine (biotin-miR-contrôle et biotin-miR-133, respectivement) et les transfectent dans des myoblastes. Après différenciation en myotubes, les cellules sont lysées et les miRNA Contrôle ou 133 sont isolés grâce à des billes associées à de la streptavidine, molécule affine à la biotine. Les ARN co-élués sont alors analysés par RT-PCR.

Les résultats sont décrits dans la figure 1.



**Figure 1 : Isolation des cibles de miR-133.** Les myoblastes sont transfectés avec biotin-miR-contrôle ou biotin-miR-133. Après différenciation en myotubes, les miARN biotinylés sont isolés et la quantité d'ARN Malat1, SRF et GAPDH co-éluée est mesurée par RT-PCR.

\*\* désigne une différence de quantité significative entre les conditions testées. N.S. = non significatif

**Question 1 : Quelle technique a-t'on utilisé ici pour isoler les cibles de miR133 ?**

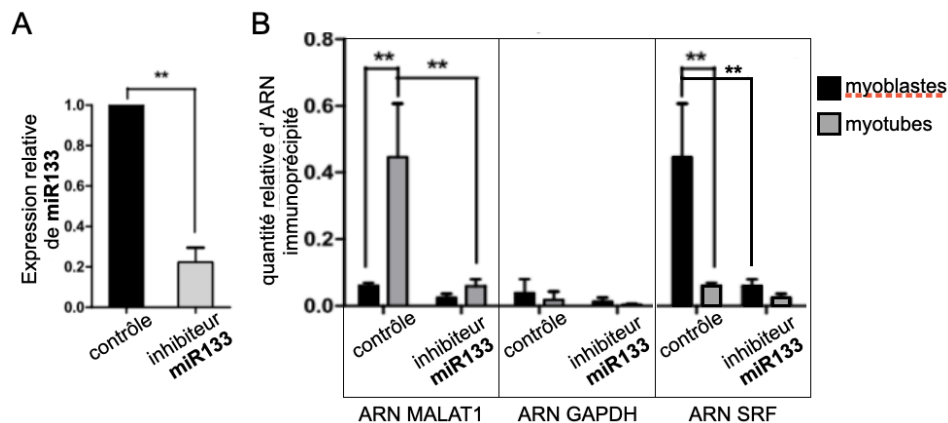
Chromatographie ARN ou RNA pull down. On cherche à co purifier des ARN associés au miR133. Par RT-qPCR, on estime si un ARN a été co-purifié. Le miR contrôle est le contrôle négatif.

**Question 2 : Analysez et interprétez les résultats.**

Dans les myotubes, les ARN Malat1 et SRF sont co-purifiés avec l'ARN miR133 mais pas avec le miARN contrôle. l'ARNm GAPDH n est pas co-purifié, contrôle négatif. => dans les myotubes, miR-133 peut interagir spécifiquement avec les ARN Malat-1 et SRF

L'analyse se poursuit en étudiant les conséquences d'une perte de fonction de miR133 grâce à l'utilisation d'un inhibiteur. Les chercheurs réalisent une expérience d'immunoprécipitation d'ARN (RIP) avec un anticorps anti-Ago2 à partir de lysat de myoblastes ou de myotubes, préalablement traités ou non avec l'inhibiteur de miR-133.

La figure 2 décrit les résultats obtenus.



**Figure 2 : Immunoprécipitation des ARN extraits des myoblastes ou des myotubes à l'aide d'un anticorps dirigé contre Ago2 dans des cellules traitées ou non par un inhibiteur de miR133.** Les myoblastes ou myotubes sont traités ou non (contrôle) avec un inhibiteur de miR133 avant analyse de leurs ARN extraits par immunoprécipitation de Ago2. (A) Quantité de miR133 déterminée par RT-PCR avant (contrôle) ou après traitement avec un inhibiteur du miR133. (B) Quantité d'ARN Malat1, GAPDH ou SRF déterminée par RT-PCR isolée par RIP contre Ago2 dans les myoblastes ou les myotubes traités ou non (contrôle) avec l'inhibiteur de miR133.

\*\* désigne une différence de quantité significative entre les conditions testées.

**Question 3 : D'après vos connaissances, dans quel processus la protéine Argonaute 2 (Ago2) est-elle impliquée ?**

Régulation de l'expression des gènes par les petits ARN non codants (si et miRNA)

**Question 4 : Analyser et interpréter les résultats de ces expériences.**

A : expression de miR-133 est bien inhibée par l'inhibiteur miR-133 (d'environ 80%)  
=> on peut analyser l'effet de cet inhibiteur dans la suite des expériences

B : CONDITIONS CONTRÔLE = l'ARN SRF coprécipite avec Ago2 dans les myoBLASTES MAIS PAS dans les avec myoTUBES

l'ARN Malat1 coprécipite avec Ago2 dans les myoTUBES mais pas dans les myoBLASTES

CONDITIONS + inhibiteur de miR133 = en présence d'inhibiteur, NI l'ARN Malat1 ni l'ARN SRF ne co-précipite avec Ago2

=> en fonction du stade de différenciation des cellules musculaires, Ago2 est retrouvé associé soit à SRF (myoblastes) soit à Malat1 (myotubes)

=> cette association dépend de la présence de miR133

**Question 5 : Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer ses résultats ?**

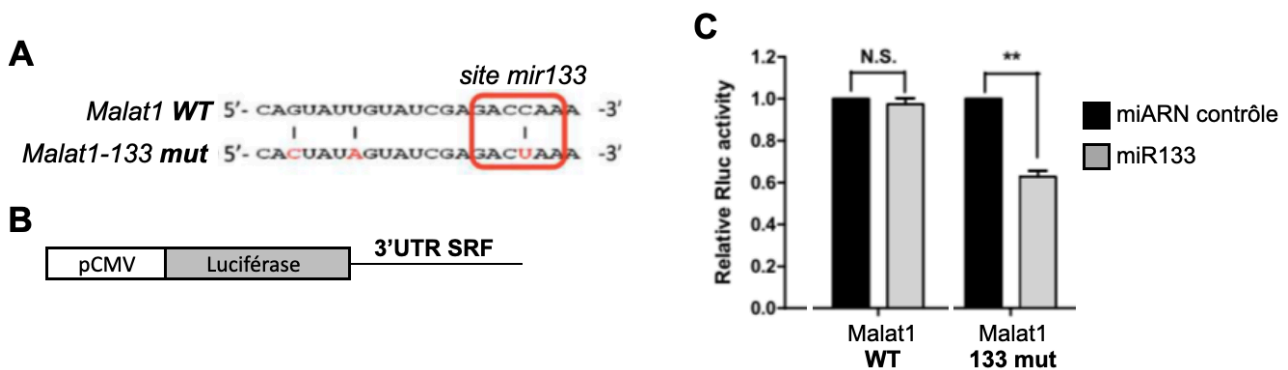


- SRF nécessaire pour différenciation des cellules musculaires
  - Ago2 impliqué dans inhibition (dégradation ou blocage traduction) des ARNm
  - Ago2 et SRF s'associent en présence de miR133 au stade myoblastes mais pas myotubes (où Ago2 est retrouvé sur Malat1)
- => au stade myoBLASTES miR133 est associé à l'ARNm de SRF et recrute Ago2 pour inhiber l'expression de la protéine SRF
- => pendant la différenciation en myoTUBES, miR133 (avec Ago2) s'associe à l'ARN Malat1 et délaisse l'ARNm SRF qui peut alors être traduit

Les chercheurs ont identifié le site de liaison du miR133 sur Malat1 qu'ils mutant ou pas (Malat1-133mut ou Malat1 WT, respectivement, figure 3A). Ils veulent tester l'effet de cette mutation sur l'expression de SRF. Les chercheurs clonent pour cela la 3'UTR de SRF en aval du gène codant la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur fort toujours actif (pCMV) (Figure 3B). Ils transfectent ensuite des cellules qui n'expriment ni Malat1 ni miR133 avec :

- le plasmide rapporteur luciférase,
- un plasmide d'expression de Malat1 WT ou Malat1-133mut
- soit des miARN contrôle, soit le miR133.

Après culture de ces cellules pendant 24h, les chercheurs quantifient l'activité luciférase présente dans les cellules. Les résultats obtenus sont décrits dans la figure 3C.



**Figure 3 : Relation fonctionnelle entre le 3'UTR de SRF et Malat1 vis à vis de miR133.** (A) séquence nucléotidique de Malat1 sauvage (WT) ou mutée pour son site de liaison à miR133 (-133 mut). (B) Structure du plasmide rapporteur luciférase sensible au 3'UTR de SRF. (C) Étude fonctionnelle de la sensibilité du 3'UTR de SRF à miR133 en présence de Malat1 sauvage (WT) ou muté pour ses sites de liaison à miR133 (133mut).

\*\* désigne une différence significative d'activité luciférase entre les conditions testées. N.S. = non significatif

### Question 6 : Expliquer l'intérêt de l'expérience luciférase

La luciférase est un gène rapporteur, elle est sous le contrôle d'un promoteur toujours actif, et la 3'UTR de SRF a été clone en aval. Le niveau de la luciférase dépendra alors uniquement des régulations post-transcriptionnelles dues à la 3'UTR de SRF. On étudie donc les régulations induites par la 3'UTR de SRF.

### Question 7 : Analysez et interprétez les résultats décrits dans cette figure.

Le niveau de l'activité luciférase en présence de l'ARN malat1 WT ne varie pas quand on surexprime miR133.

En revanche, en présence de l'ARN Malat1 133 mut, qui ne lie plus le miR133, la surexpression de miR133 induit une baisse de l'activité luciférase

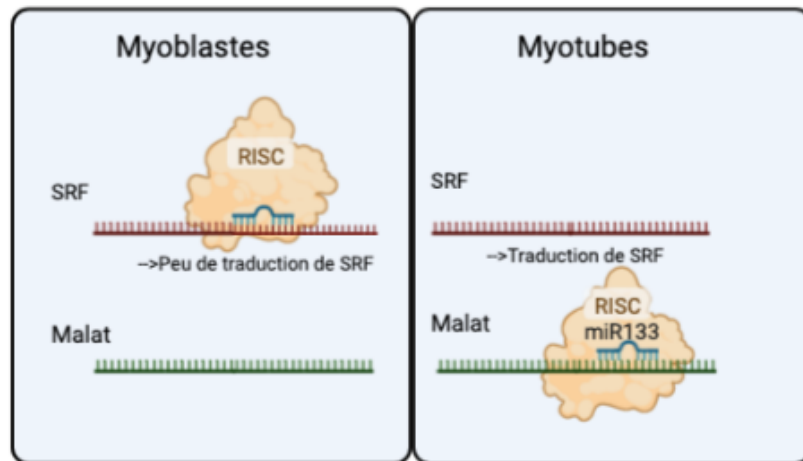
L'absence du site de liaison du miR133 sur malat induit la baisse d'expression de la luciférase dépendant de la 3'UTR de SRF en présence du miR133.

Conclusion : La liaison du miR133 sur MALAT1 empêche le miR133 d'inhiber l'expression de SRF

**Question 8 : Quel serait l'effet d'une perte de fonction de Malat1 sur l'expression de SRF dans les myotubes ?**

L'absence de Malat1 induirait une baisse d'expression de SRF dans les myotubes, car le miR133 pourrait se lier à l'ARNm SRF

**Question 9 : A l'aide d'un schéma, expliquez le lien entre Malat1, miR133 et SRF**



Régulation de l'expression de SRF via le miR133. Malat sequestre le miR133 (éponge) dans les myotubes ce qui permet la traduction de SRF.



**Amicale Paris Sciences  
Licence Sciences Biomédicales  
2022-2023**

**Session 1 – S4  
Correction**

**Régulations de l'expression des gènes**

Les annales reprises par l'association Amicale Paris Sciences ne présentent en rien des documents officiels distribués par l'UFR Biomédicale. Aucune réclamation ne pourra être effectuée à l'encontre de l'UFR.

Siège administratif : Amical Paris Sciences – 45 Rue des Saints-Pères – 75006 Paris  
<http://www.aps-paris5.fr> - Email : [assosaps@gmail.com](mailto:assosaps@gmail.com)

---

**UE SA04M120**

**Régulation de l'expression des gènes**

---

NB : Tout signe distinctif porté sur la copie pouvant indiquer sa provenance constitue une fraude.

Document et/ou matériel autorisés : *AUCUN document autorisé / calculatrice inutile*

**Durée totale de l'épreuve :**

**1 heure**

**Donnez les définitions des termes suivants :**

**1- COACTIVATEUR DE LA TRANSCRIPTION (0,5 point)**

**Protéine qui n'interagit pas avec l'ADN mais qui est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle d'un promoteur.  
Ces coactivateurs sont recrutés par les AF des FdeT ou RN liés à l'ADN.**

**2- IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE (1 point)**

**Technique permettant de mettre en évidence la présence d'une protéine sur un fragment chromatinien in vivo.  
Après fixation et fragmentation du matériel génétique de cellules (cultivées dans des conditions données ou extraites d'un tissu), celui-ci est soumis à l'action d'un Ac précipitant dirigé contre la protéine d'intérêt.  
Après purification des précipités, on détecte par qPCR les fragments de chromatine d'intérêt qui avaient co-précipité avec la protéine.**

**3- IMMUNOCYTOCHIMIE (1 points)**

**Technique de détection des protéines dans des cellules/tissus préalablement fixés. On utilise pour cela un agent polymérisant comme le paraformaldéhyde qui crée des ponts moléculaires et fige ainsi le système biologique et tous ses constituants. Après perméabilisation de l'échantillon, les protéines d'intérêts sont mises en évidence grâce à un Ac primaire qui est rendu détectable grâce à l'ajout d'un Ac secondaire marqué (souvent avec un fluorophore) qui reconnaît la partie constante de l'Ac primaire.  
On peut ainsi analyser la localisation sub-cellulaire des protéines ou leur domaine d'expression dans le tissu.**

**4- PROMOTEUR (0,5 point)**

**Séquence d'ADN située en amont de la séquence codante, reconnue par les FdeT généraux et spécifiques pour induire la synthèse d'ARN par la machinerie transcriptionnelle basale.**

## Sujet de Réflexion

### TMF et protection contre l'arthrite

#### Introduction

La dérégulation du statut inflammatoire des chondrocytes peut être à l'origine de l'arthrite. Des recherches antérieures ont ainsi montrés que les niveaux d'expression des gènes pro-inflammatoires (comme IL $\beta$  ou TNF $\alpha$ ) étaient augmentés et que ceux des gènes anti-inflammatoires (comme TGF $\beta$  ou Hème Oxygénase-1) étaient diminués chez les patients atteints d'arthrite.

Dans les chondrocytes, la voie canonique Wnt est connue pour stimuler l'expression des gènes IL $\beta$  et TNF $\alpha$  et le facteur de transcription Foxo3a a été montré nécessaire pour l'expression des gènes TGF $\beta$  ou Hème Oxygénase-1 (HMOX1).

Par ailleurs, il a été mis en évidence que les effets bénéfiques du tetraméthoxyflavone (TMF) sur l'arthrite passait par la restauration des niveaux d'expression protéique de Foxo3a altérés dans la maladie.

**Question 1 = Par quelle technique les chercheurs ont-ils pu mettre en évidence l'altération du niveau d'expression de Foxo3a dans la maladie ? (0,5 points)**

**Expression protéique = WESTERN BLOT**

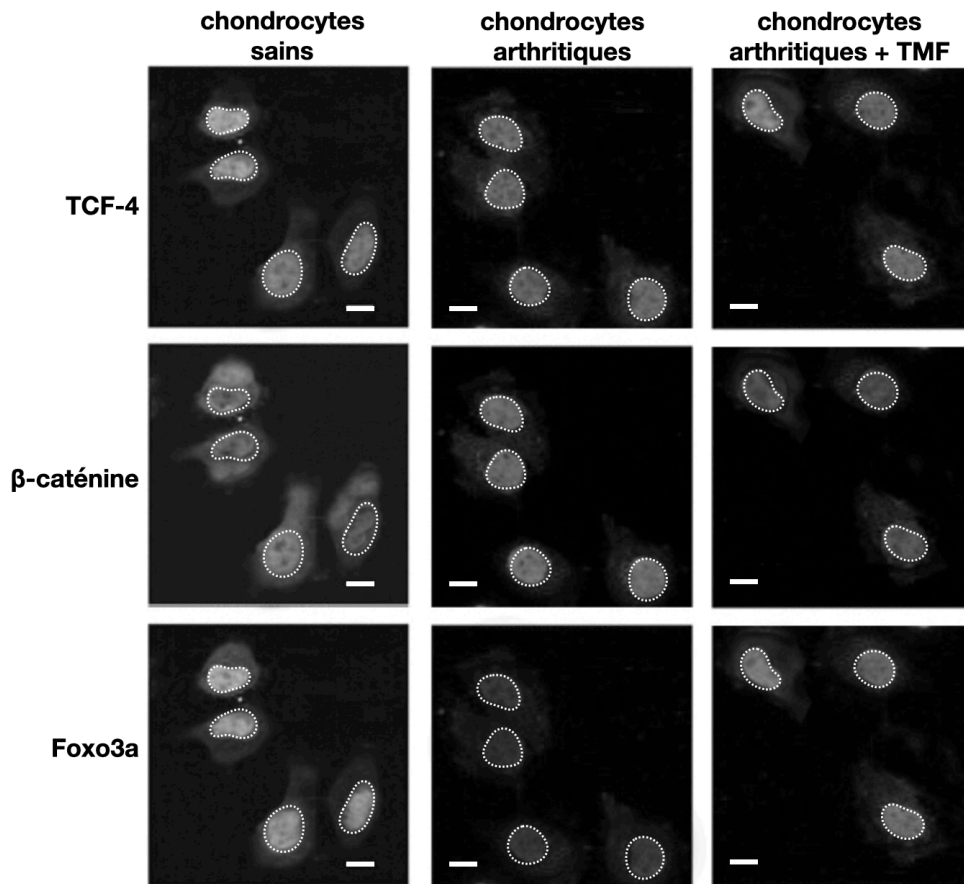
**Les chercheurs s'intéressent dès lors à la relation entre Foxo3a et les protéines  $\beta$ -caténine (coactivateur de la voie canonique Wnt) et TCF-4 (facteur de transcription de la voie canonique Wnt).**

.....  
*Matériel et Méthodes =*

*Cultures de Chondrocytes issus de patient SAIN / ARTHRITIQUE / ARTHRITIQUE + TMF 50 $\mu$ M pendant 24h*  
.....

## I- Les voies Wnt et Foxo3a +/- TMF dans les chondrocytes sains ou arthritiques traités ou non au TMF

Mise en évidence de TCF-4,  $\beta$ -caténine et Foxo3a dans les chondrocytes sains, arthritiques ou arthritiques + 50 $\mu$ M de TMF pendant 24h :



*Figure 1 : Marquage immunocytochimique des protéines TCF-4,  $\beta$ -caténine et Foxo3a de chondrocytes sains, arthritiques ou arthritiques traitées au TMF. L'immunomarquage est réalisé sur des cultures primaires de chondrocytes sains ou arthritiques traités ou non par du TMF 50 $\mu$ M pendant 24h. Les images sont prises au moyen d'un microscope confocal qui permet d'étudier la localisation sub-cellulaire des protéines immunofluorescentes. Les noyaux sont détournés en pointillés. Barre d'échelle = 10 $\mu$ m*

**Question 2 = Analysez les résultats décrits dans la figure 1 (1,5 points)**

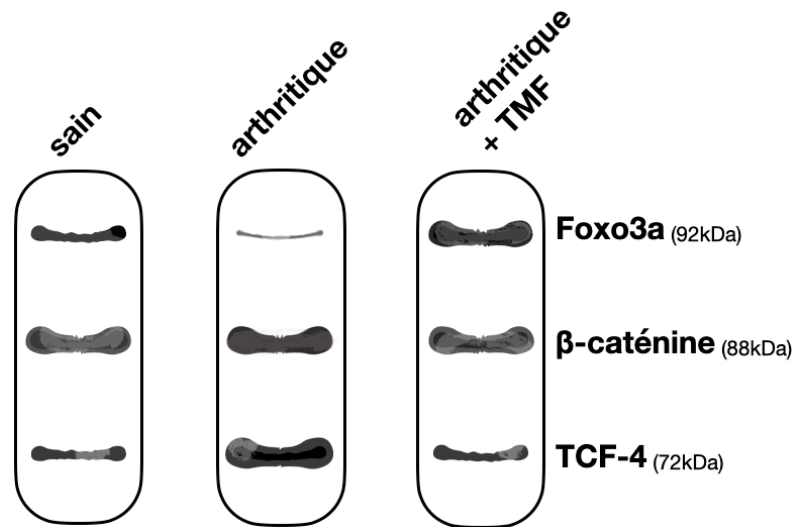
**TCF-4 = Localisation majoritairement nucléaire qqsoient les conditions  
quantité protéique SEMBLE stable qqsoient les conditions**

**$\beta$ -caténine = Localisation cytopl. et nucl. en condition sain / majoritairement  
nucl. en condition arthritique et arthritique + TMF  
qté prot. semble stable stable qqsoient les conditions**

**Foxo3a = Localisation majoritairement nucl. qqsoient les conditions  
qté prot. beaucoup plus faible en condition arthritique**

## II- Dialogue entre les voies Wnt et Foxo3a dans les chondrocytes sains ou arthritiques traités ou non au TMF

a- Isolation de la  $\beta$ -caténine et TCF-4 ou Foxo3a dans des lysats de chondrocytes sains, arthritiques ou arthritiques + 50 $\mu$ M TMF pendant 24h.



*Figure 2 : Coimmunoprécipitation de la  $\beta$ -caténine avec TCF-4 ou Foxo3a dans des cultures de chondrocytes sains / arthritiques / arthritiques + TMF. Après lyse douce des cultures de chondrocytes sains ou arthritiques traitées ou non au TMF à 50 $\mu$ M pendant 24h, les lysats totaux sont incubés avec un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -caténine. L'anticorps est associé à une bille lourde. Les immunoprécipitats sont ensuite traités au SDS et on réalise western-blot pour mettre en évidence les protéines Foxo3a,  $\beta$ -caténine et TCF-4.*

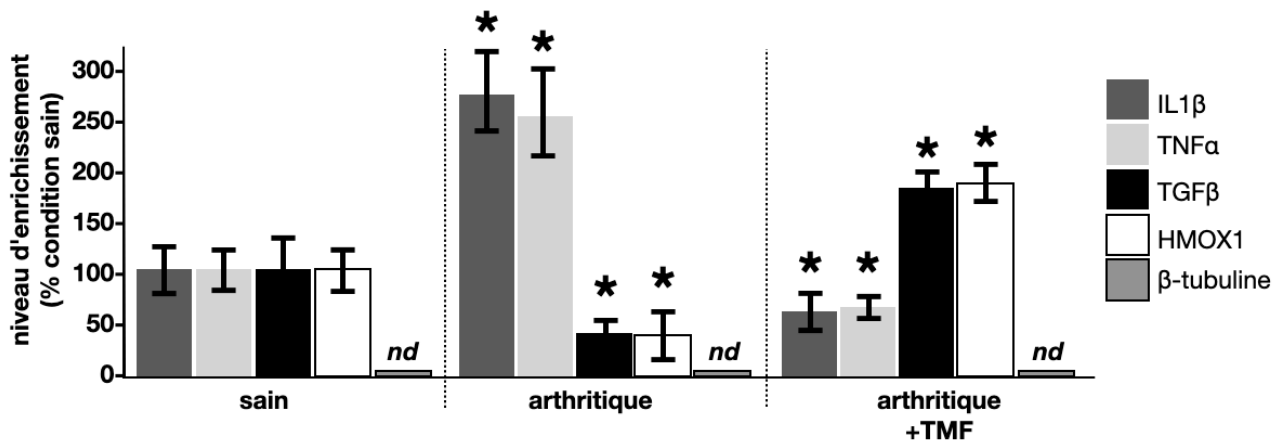
**Question 3 = Analysez les résultats décrits dans la figure 2 (2 points)**

### **Immunoprécipitation de la $\beta$ -caténine :**

- en condition sain = entraîne un peu de Foxo3a et un peu de TCF-4
- en condition arthritique = entraîne beaucoup de TCF-4 et très peu de Foxo3a
- en condition arthritique + TMF = entraîne beaucoup de Foxo3a et peu de TCF-4



b- Présence de  $\beta$ -caténine au niveau des gènes cibles de Wnt ( $IL1\beta$  et  $TNF\alpha$ ) ou Foxo3a ( $TGF\beta$  et  $HMOX1$ ) dans des chondrocytes sains, arthritiques ou arthritiques + 50 $\mu$ M TMF pendant 24h.



**Figure 3 : ChIP de la  $\beta$ -caténine à partir de cultures cellulaires de chondrocytes sains, arthritiques ou arthritiques traitées au TMF (1 point)**

Les cultures de chondrocytes sains ou arthritiques traités ou non au TMF à 50 $\mu$ M pendant 24h sont fixées et les noyaux sont isolés après lyse des cellules. La chromatine est fragmentée par sonication et on immunoprécipite la  $\beta$ -caténine. On isole les immunoprécipitats et on se débarrasse des protéines après réversion de la fixation. On procède à des qPCR en utilisant des amorces flanquant les sites de fixation de TCF-4 sur les gènes  $IL1\beta$  et  $TNF\alpha$ , les sites de fixation de Foxo3a sur les gènes  $TGF\beta$  et  $HMOX1$  et la boîte TATA du gène de la  $\beta$ -tubuline. Les résultats de quantification sont rapportés au niveau d'amplification de chaque couple d'amorces de la condition sain. \* désigne une différence significative par rapport à la condition sain, "nd" signifie "non détectable".

**Question 4 = Analysez les résultats décrits dans la figure 3**

**- amorces  $\beta$ -tubuline : (1 point)**

**La qPCR ne permet pas d'amplifier une quantité détectable de séquence TATA BOX de la  $\beta$ -tubuline**

**=> l'IP de  $\beta$ -caténine n'entraîne pas de fragments chromatiniens contenant la boîte TATA de la  $\beta$ -tubuline**

**=> IP spécifique ?**

- amorces **IL1 $\beta$**  et **TNF $\alpha$**  : (2 points) + *bonus 0,5 point si via TCF-4*

La qPCR des fragments de chromatine portant les sites de fixation TCF présents dans les promoteurs **IL1 $\beta$**  et **TNF $\alpha$**  montrent

- que l'IP de  $\beta$ -caténine entraîne de façon significative 2,5 X plus de ces fragments en condition arthritique qu'en condition sain et significativement presque 50% de moins en condition arthritique + TMF

=> la  $\beta$ -caténine est **PLUS** recrutée au niveau des promoteurs **IL1 $\beta$**  et **TNF $\alpha$**  en condition arthritique et **MOINS** en condition arthritique + TMF

=> recrutement *via* TCF-4 au niveau des promoteurs pro-inflammatoires en condition arthritiques ?

- amorces **TGF $\beta$**  et **HMOX1** : (2 points) + *bonus 0,5 point si via Foxo3a*

La qPCR des fragments de chromatine portant les sites de fixation **Foxo3a** présents dans les promoteurs **TGF $\beta$**  et **HMOX1** montrent

- que l'IP de  $\beta$ -caténine entraîne de façon significative 50% de moins de ces fragments en condition arthritique qu'en condition sain et significativement environ 2X plus en condition arthritique + TMF

=> la  $\beta$ -caténine est **MOINS** recrutée au niveau des promoteurs **TGF $\beta$**  et **HMOX1** en condition arthritique et **PLUS** en condition arthritique + TMF

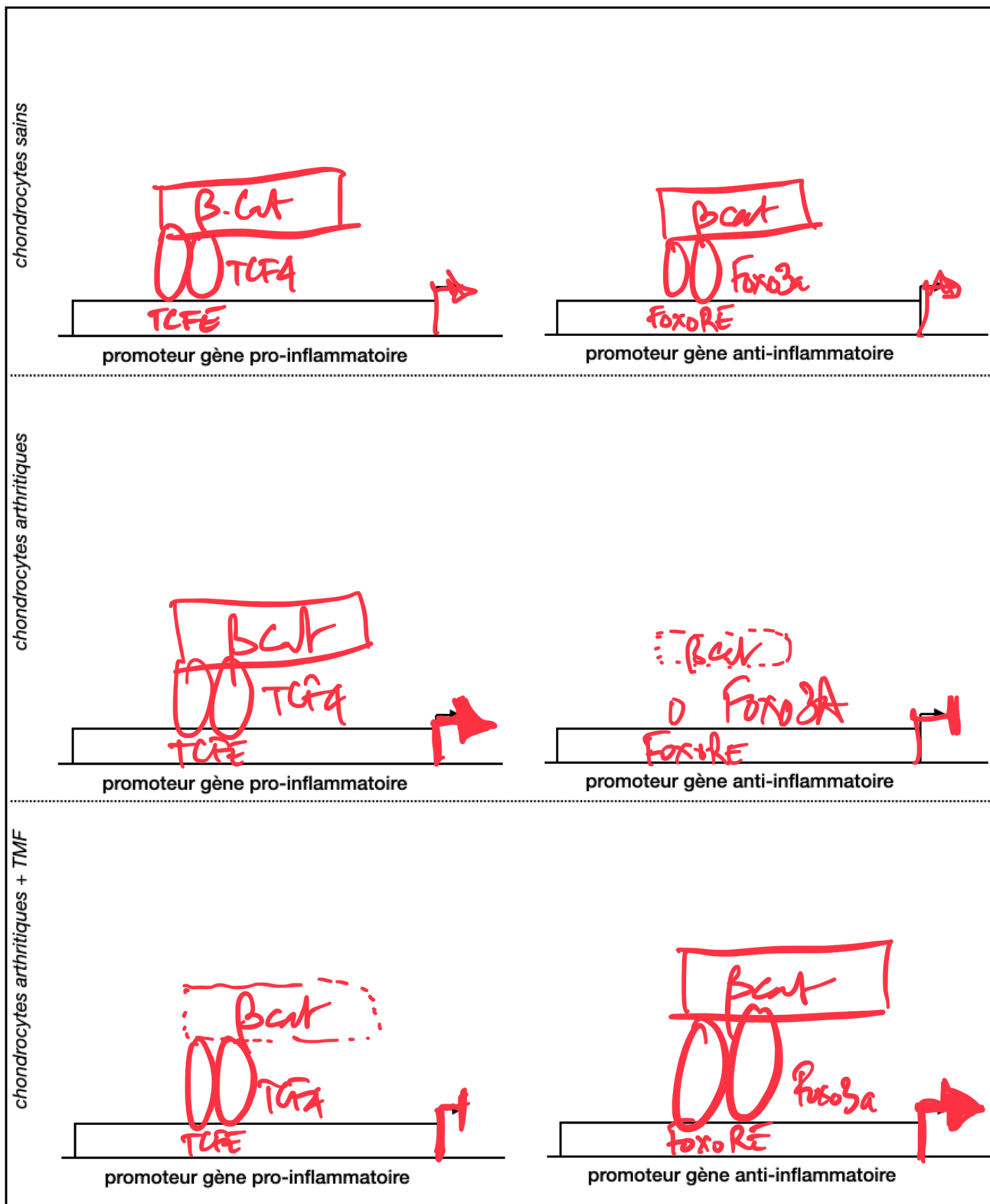
=> recrutement *via* Foxo3a au niveau des promoteurs anti-inflammatoires en condition arthritique + TMF ?

**- Conclusion Question 4 : (2 points)**

**L'arthrose entraîne un recrutement préférentiel de la  $\beta$ -caténine au niveau des promoteurs des gènes PRO-inflammatoires par TCF-4**

**Le traitement au TMF entraîne un recrutement préférentiel de la  $\beta$ -caténine au niveau des promoteurs des gènes ANTI-inflammatoires par Foxo3a**

Question 5 = Proposez un schéma bilan qui résume comment la  $\beta$ -caténine se comporte sur le promoteur d'un gène pro- et anti-inflammatoire en fonction des conditions cellulaires (3 points)



L'activation de la voie canonique Wnt dans l'arthrite s'accompagne de l'augmentation de la quantité du microARN miR-29a qui semble jouer sur le niveau d'expression de Foxo3a.

**Question 6 = Proposez un mécanisme de régulation de l'expression de Foxo3a par la voie Wnt *via* miR-29a. (1 point)**

**Activation Wnt**

- => **expression de miR-29a**
- => **interagit avec ARNm Foxo3a**
- => **bloque sa traduction voire induit sa dégradation**
- => **diminue la synthèse de protéine Foxo3a**
- => **diminue la quantité de protéine Foxo3a dans la cellule**

**---Question indépendante du sujet de réflexion---**

**Question 7 = Définir l'épigénétique. Citez 2 modifications épigénétiques et leur effets. Pourquoi ces modifications sont dites "épigénétiques" contrairement aux autres modifications chromatinienne ? (3 points)**

**Epigénétique : Étude des changements dans l'expression des gènes qui sont héréditaires lors de la mitose et/ou de la méiose, et qui ne résultent pas de modifications de la séquence de l'ADN**

- **Méthylation des îlots CpG : répression de la transcription**
- **Tri Méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 : H3K27me3: déposée par le complexe Polycomb2 et H3K27 est reconnue par le complexe polycomb 1 qui inhibe le recrutement de polII**

**Ces 2 modifications sont copiées lors de la réplication. Elles seront donc héritées par les cellules-filles.**