

TUTORAT ASSOCIATIF TOULOUSAIN

Année universitaire 2023 – 2024

Compilation d'annales de Recherche



Tutorat Associatif Toulousain



tutoweb.org



tutoratassociatifoulouseain

Compilation d'annales Recherche

Relu partiellement Lucas CHATILLON (RM 2023/2024)

Cette compilation d'annales a été réalisée par l'équipe de tuteurs de Recherche 2022-2023 et reprend les annales des examens classants de PACES des facultés de Purpan, Rangueil et Maraîchers, ainsi que la promotion de PACES doublants de 2021. Elle n'engage en aucun cas les professeurs ayant réalisés ces QCM, qui ont simplement été jugés comme encore utiles par l'équipe dans le cadre du programme de l'année 2022-2023.

Merci à Astrid Rontes, Clarisse Tocanne, Fanny Benard, Inès Faure, Julie Castera, Lise Pailler, Louise Fauvel, Marion Chazelle, Natacha Deporte et Timothée Brunet pour leur travail.

Compilé par Margot Limozin et Paul Félix

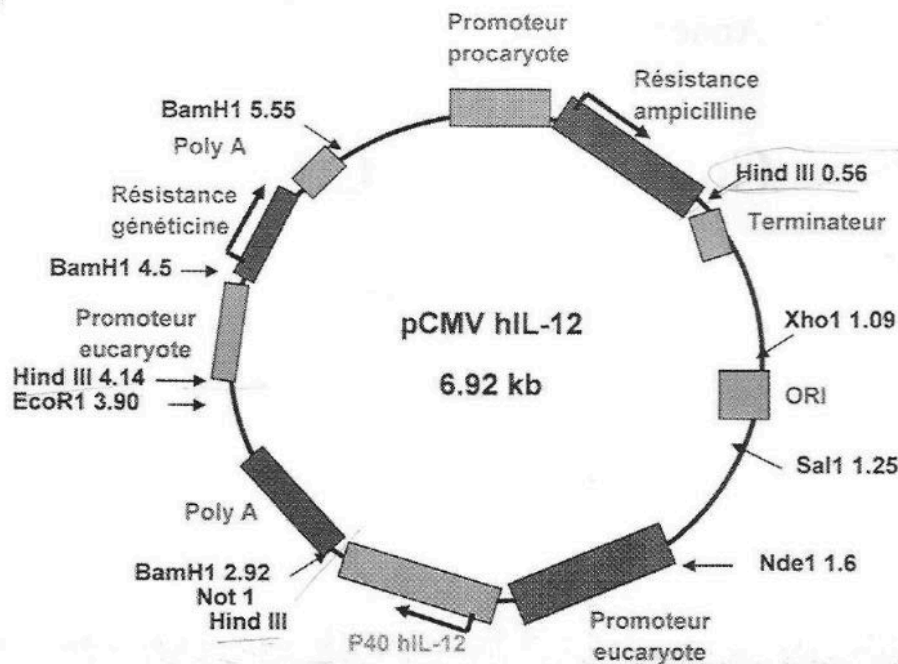
Sommaire

Compilation d'annales Recherche.....	1
Maraîchers 2010-2011.....	3
Correction.....	9
Maraîchers 2011-2012.....	11
Correction.....	16
Maraîchers 2012-2013.....	19
Correction.....	26
Maraîchers 2013-2014.....	28
Correction.....	31
Maraîchers 2014-2015.....	33
Correction.....	37
Maraîchers 2015-2016.....	40
Correction.....	44
Maraîchers 2016-2017.....	48
Correction.....	50
Maraîchers 2017-2018.....	52
Correction.....	56
Maraîchers 2018-2019.....	59
Correction.....	65
Maraîchers 2019-2020.....	69
Correction.....	74
Purpan 2012-2013.....	78
Correction.....	82

Purpan 2013-2014.....	84
Correction.....	87
Purpan 2015-2016.....	89
Correction.....	97
Purpan 2016-2017.....	99
Correction.....	111
Purpan 2017-2018.....	116
Correction.....	126
Purpan 2018-2019.....	131
Correction.....	139
Purpan 2019-2020.....	144
Correction.....	151
Rangueil 2012-2013.....	154
Correction.....	157
Rangueil 2013-2014.....	159
Correction.....	168
Rangueil 2014-2015.....	171
Correction.....	174
Rangueil 2015-2016.....	176
Correction.....	180
Rangueil 2016-2017.....	182
Correction.....	184
Rangueil 2017-2018.....	187
Correction.....	192
Rangueil 2018-2019.....	194
Correction.....	197
Rangueil 2019-2020.....	200
Correction.....	205
PACES doublants 2020-2021.....	207
Correction.....	214

Maraîchers 2010-2011

QCM1 : Des chercheurs ont construit le plasmide pCMV hIL-12 représenté ci-dessous afin d'exprimer dans des cellules eucaryotes une sous-unité de l'interleukine 12 humaine (hIL-12).



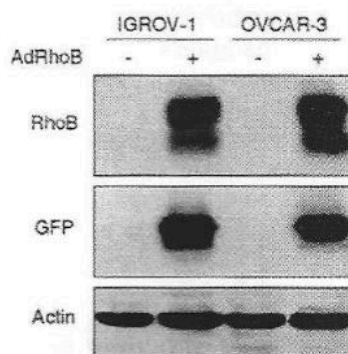
- Des bactéries ont été transformées avec le plasmide pCMV hIL-12. Les bactéries recombinantes seront sélectionnées par leur résistance à la généticine.
- Des cellules eucaryotes ont été transfectées avec le plasmide pCMV hIL-12. Les cellules eucaryotes transfectées seront sélectionnées avec de l'ampicilline.
- La sous-unité de l'IL-12 s'exprimera dans les bactéries transformées par ce plasmide.
- Si le plasmide pCMV hIL-12 est digéré par l'enzyme Hind III, trois fragments de restriction seront obtenus.
- La séquence ORI est une séquence permettant la répllication du plasmide dans les cellules eucaryotes.

QCM2 : Des chercheurs ont modifié génétiquement des cellules humaines d'adénocarcinome ovarien par un vecteur viral (AdRhoB). Ce vecteur code à la fois la protéine RhoB et la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein).

- A. Un vecteur viral est un plasmide.
- B. Le vecteur viral AdRhoB contient un gène rapporteur codant la protéine fluorescente GFP.
- C. La construction génique qui a permis de réaliser le vecteur viral comprend au minimum 2 cadres de lecture ouverts eucaryotes.
- D. Le vecteur viral AdRhoB pourrait éventuellement être utilisé pour faire de la thérapie génique.
- E. Les promoteurs du vecteur viral sont des promoteurs procaryotes.

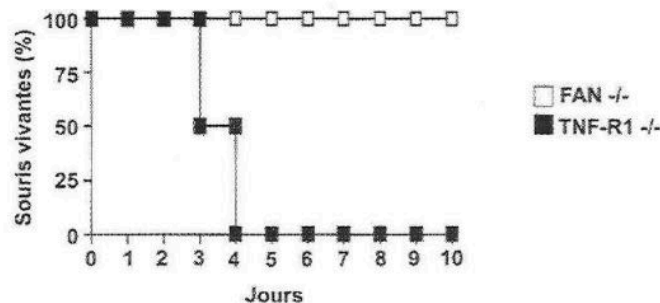
-Page 1 sur 8-

QCM3 : Le vecteur viral (AdRhoB) présenté ci-dessus (cf QCM2) est utilisé pour transduire deux types cellulaires (IGROV-1 ou OVCAR-3). Des extraits protéiques de cellules non-transduites (piste AdRhoB -) et des cellules génétiquement modifiées (piste AdRhoB +) ont été réalisés et analysés par western blot en utilisant soit un anticorps dirigé contre la protéine RhoB, soit un anticorps dirigé contre la GFP, soit un anticorps dirigé contre l'actine.



- A. La protéine RhoB endogène n'est pas détectée dans les cellules non-transduites.
- B. Les cellules expriment l'actine lorsqu'elles sont génétiquement modifiées.
- C. Les cellules génétiquement modifiées expriment à la fois RhoB et la GFP.
- D. Les vecteurs viraux sont faiblement efficaces pour la transduction des cellules.
- E. Les vecteurs viraux peuvent être utilisés *in vivo*.

QCM4 : Des chercheurs souhaitent évaluer le rôle de la protéine adaptatrice FAN du récepteur 1 au TNF (TNF-R1) dans la réponse anti-infectieuse chez la souris. Des souris FAN KO (FAN $-/-$), ou TNF-R1 KO (TNF-R1 $-/-$), ont été infectées par la bactérie *L. monocytogenes*. La capacité des souris à éliminer la bactérie est appréciée en déterminant le pourcentage de souris vivantes dans les jours qui suivent l'infection.



- A. Les souris FAN $-/-$ sont des souris hétérozygotes pour le gène codant FAN.
- B. Les souris FAN $-/-$ n'expriment pas la protéine FAN contrairement aux souris TNF-R1 $-/-$.
- C. Au 10^{ème} jour suivant l'infection, seules les souris vivantes ont développé une réponse immunitaire efficace contre *L. monocytogenes*.
- D. Le TNF-R1 joue un rôle important dans l'élimination de *L. monocytogenes*.
- E. Cette expérience indique que la signalisation du TNF-R1 dépendante de FAN est indispensable à la réponse immunitaire contre *L. monocytogenes*.

-Page 2 sur 8-

QCM5 : La protéine DICER recombinante est produite dans la bactérie *E. coli* afin d'étudier le mécanisme d'action de cette enzyme. Pour cela, l'ADNc de cette protéine est cloné, en fusion avec la séquence codant une étiquette « FLAG », dans un vecteur d'expression procaryote. Une souche d'*E. coli* est ensuite transformée par le vecteur obtenu. Cette souche permettant d'exprimer DICER étiquetée est sélectionnée sur un milieu contenant de l'ampicilline.

- A. L'étiquette FLAG permet de purifier facilement la protéine recombinante par une technique de chromatographie échangeuse d'ions.
- B. Le vecteur utilisé doit contenir obligatoirement un gène codant la résistance à l'ampicilline.
- C. L'utilisation d'anticorps reconnaissant l'étiquette FLAG fixés sur des billes permet de réaliser des immunoprécipitations.
- D. L'activité de DICER est mesurée en utilisant un substrat protéique.
- E. Il y a forcément un codon STOP entre la séquence de DICER et celle de l'étiquette FLAG.

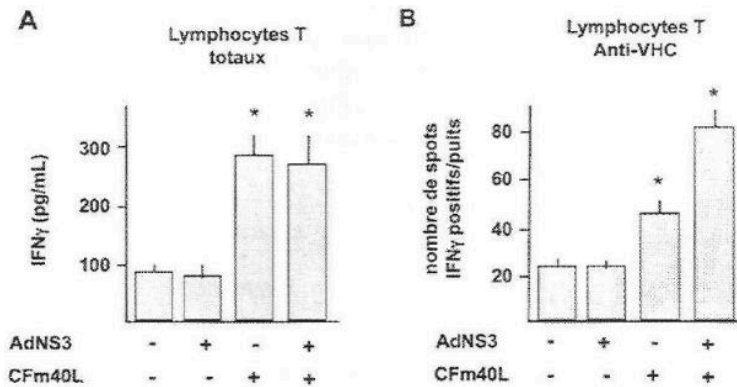
QCM6 : Des chercheurs veulent extraire et purifier du lysozyme à partir du blanc d'œuf. Le lysozyme est une enzyme de 14,3 kDa. Cette protéine représente 8 % des protéines du blanc d'œuf, son point isoélectrique (pI) est de 11. Toutes les autres protéines ont un pI inférieur à 11. La stratégie de purification est la suivante : le blanc d'œuf est dilué dans un tampon pH=10, puis le mélange obtenu est déposé sur une colonne contenant une résine échangeuse de cations. L'élution est ensuite réalisée à l'aide d'un gradient de concentration de NaCl. La présence de lysozyme dans les différentes fractions est décelée par la mise en œuvre d'un test d'activité spécifique du lysozyme.

- A. Le lysozyme se fixe sur la résine car cette protéine est chargée négativement au pH utilisé.
- ☒ B. L'activité spécifique de chaque fraction obtenue est calculée en faisant le rapport de l'activité mesurée par la quantité de protéine éluée.
- ☒ C. Si 2 mg de lysozyme sont purifiés à partir de 100 mg d'un extrait de protéines totales de blanc d'œuf, le rendement de purification est de 25%.
- D. La pureté des différentes fractions peut être évaluée par une électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes.
- E. Si le lysozyme existe sous différentes formes (monomères, dimères) dans l'extrait total, l'utilisation d'une technique de chromatographie d'exclusion sur les fractions permettrait d'isoler la forme monomérique.

QCM7: Concernant les techniques d'immunoanalyse utilisant la réaction antigène-anticorps, l'immunolyse dépendante du complément :

- A. est utilisable pour détecter la présence d'allo-anticorps cytotoxiques (activateurs du complément) dans le sérum d'un receveur d'organe.
- B. permet d'analyser l'activité cytotoxique d'un lymphocyte tueur.
- C. peut être utilisée pour éliminer spécifiquement des populations cellulaires dans une suspension cellulaire complexe.
- D. n'est utilisable qu'avec des cellules nucléées.
- E. peut être induite par un anticorps monoclonal.

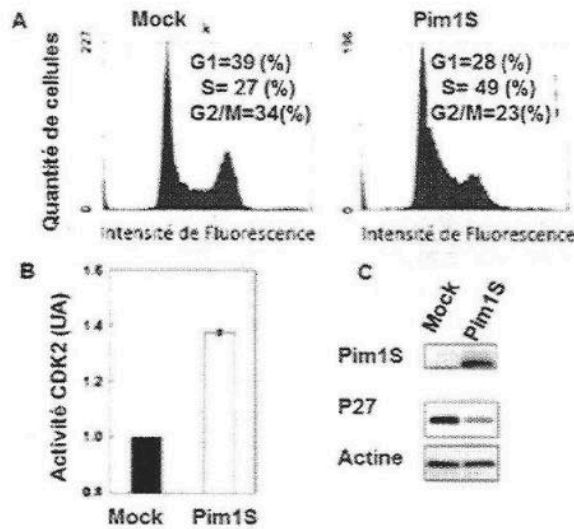
QCM8 : Dans le but de stimuler la réponse immune anti-virale de patients infectés de façon chronique par le virus de l'hépatite C (VHC), il est envisagé de leur injecter des cellules dendritiques (CDT) génétiquement modifiées. Pour cela, des CDT sont transduites *ex vivo* à l'aide de 2 vecteurs viraux : AdNS3 et CFm40L. AdNS3 code une protéine vaccinnante du VHC, tandis que CFm40L code une protéine d'activation des lymphocytes qui va être exprimée à la surface des CDT. Des lymphocytes T d'un patient infecté par VHC sont cultivées en présence de différentes CDT, transduites ou non par AdNS3 et/ou CFm40L. Après culture, les résultats suivants ont été obtenus concernant les lymphocytes du patient :



* = Comparativement à des lymphocytes T cultivés avec les CDT non-transduites, la différence est statistiquement significative.

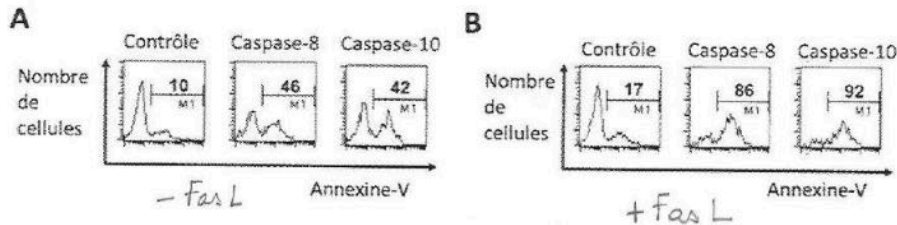
- La seule expression de l'antigène viral codé par AdNS3 stimule la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T spécifiques anti-VHC.
- Dans la figure A, la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T totaux peut être quantifiée par la technique ELISA.
- CFm40L code une protéine qui permet de potentialiser la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T totaux.
- Dans la figure B, l'évaluation de la production d'IFN γ par les lymphocytes T anti-VHC a été faite par technique ELISA.
- CFm40L code pour une protéine qui permet de potentialiser la production d'IFN γ par les lymphocytes T spécifiques de VHC.

QCM11 : Afin d'étudier la protéine Pim1S, des chercheurs ont transfecté une lignée cellulaire humaine soit par un plasmide exprimant la protéine Pim1S (Pim1S), soit par un plasmide contrôle vide (Mock). Ils ont obtenu 36h après transfection les résultats présentés dans les figures ci-dessous. Figure A : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux après marquage de l'ADN. Figure B : Analyse de l'activité kinase de la protéine CDK2. Figure C : Analyse de l'expression des protéines Pim1S, P27 et actine par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques.



- L'expression de Pim1S augmente le nombre de cellules diploïdes.
- Le test *in vitro* réalisé montre que la protéine kinase CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2) active la protéine Pim1S par rapport au contrôle.
- L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité en ADN du noyau des cellules.
- La protéine Pim1S induit une augmentation de l'activité kinase de CDK2 dans le test *in vitro*.
- Dans les cellules transfectées par le plasmide codant Pim1S, le niveau d'expression de la protéine P27 est diminué.

QCM12 : Des cellules leucémiques T humaines déficientes en caspase-8 ont été transfectées avec un plasmide non codant (Contrôle), un plasmide porteur de l'ADNc codant la caspase-8 (Caspase-8) ou un plasmide codant l'ADNc de la caspase-10 (Caspase-10). Le lendemain, les cellules ont été incubées en absence (Figure A) ou en présence (Figure B) de FasL pendant 8 heures. Les cellules ont été marquées avec de l'Annexine-V couplée à un groupement fluorescent avant d'être analysées par cytométrie en flux afin de quantifier le pourcentage de cellules mortes. Les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages de cellules présentes dans la fenêtre M1.



- Les cellules contenues dans la fenêtre M1 sont marquées par l'Annexine-V couplée à un groupement fluorescent.
- L'expression de la caspase-8 s'accompagne d'une induction de la mort cellulaire, même en absence de FasL.
- L'expression de la caspase-8 sensibilise les cellules à la mort induite par FasL.
- Cette expérience montre que la caspase-8 est indispensable à la mort induite par FasL.
- L'expression de la caspase-10 restaure une sensibilité à FasL dans les cellules déficientes en caspase-8.

Correction

QCM 1 - D

- Le gène codant la résistance à la généticine est précédé d'un promoteur eucaryote, donc impossible de sélectionner des bactéries avec.
- Pareil que pour la A, sauf qu'ici le promoteur est procaryote donc impossible de sélectionner des cellules eucaryotes avec ce gène.
- La sous unité de l'IL-12 ne s'exprimera pas dans les bactéries car son promoteur est spécifique eucaryote, donc elle ne s'exprimera que chez les eucaryotes.
- La séquence ORI permet la répllication du plasmide dans les cellules **procaryotes**.

QCM 2 - BCD

- Les vecteurs viraux sont une classe différente de vecteurs, les plasmides sont retrouvés dans les bactéries et non les virus.
- Pas forcément, on peut aussi avoir des promoteurs eucaryotes. Rien ne prouve qu'on a des promoteurs procaryotes.

QCM 3 - ABCE

- Au contraire, ils sont très efficaces.

QCM 4 - BCD

- Ce sont des souris homozygotes car elles sont (-/-) pour le gène codant FAN.
- Non, car on voit bien que FAN n'est pas nécessaire pour résister à cette infection, vu que les souris ne l'exprimant pas survivent très bien.

QCM 5 - BC

- A. Non, par une chromatographie d'affinité en utilisant l'étiquette FLAG.
- D. La protéine DICER est une enzyme donc on utilisera un substrat enzymatique (qui n'est pas forcément protéique).
- E. Pas forcément, rien n'indique que c'est obligatoirement nécessaire.

QCM 6 - BCDE

- A. La protéine est chargée positivement à pH 10 car son pHi est de 11, et on sait que lorsque $\text{pH} < \text{pHi}$ la protéine est chargée +.

QCM 7 - ACE

- B. Non, permet d'analyser la réaction antigène anticorps, pas l'activité cytotoxique.
- D. Cellules nucléées ou non, cela n'a aucun rapport.

QCM 8 - BCE

- A. On voit dans la figure B que ce n'est pas le cas, avec uniquement AdNS3, il n'y a pas de différence significative.
- D. Non, pour quantifier le nombre de cellules sécrétrices on utilise la technique ELISpot. Ici c'est confirmé par la légende (nombre de spots par puits, c'est bien du ELISpot).

QCM 11 - CDE

- A. Non, elle augmente la quantité d'ADN et le nombre de cellules en phase S.
- B. C'est plutôt l'inverse, c'est Pims1 qui augmente l'activité CDK2 et donc active la protéine CDK2.

QCM 12 - ABCE

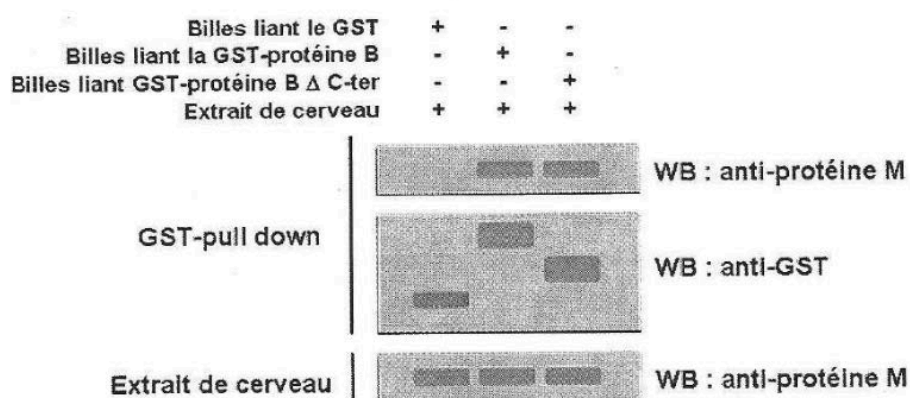
- D. Non, car on voit que la mort cellulaire est aussi induite dans les cellules à caspase-10.

Maraîchers 2011-2012

QCM3 : Des chercheurs désirent purifier l'alpha-lactalbumine, une protéine de 14,2 kDa, issue du lait de vache. Le protocole met en jeu deux étapes de précipitation successives qui permettent d'éliminer la caséine et la bêta-lactoglobuline, et une chromatographie échangeuse d'anion réalisée sur le surnageant obtenu. Cette étape de chromatographie permet d'obtenir une fraction contenant un mélange d'alpha-lactalbumine et d'une protéine contaminante de 45 kDa.

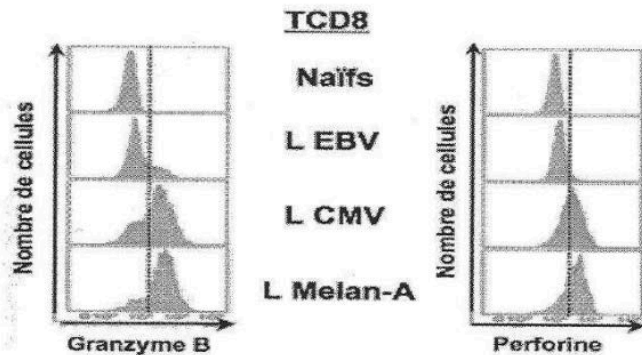
- Une étape de gel filtration supplémentaire doit permettre d'obtenir une fraction pure d'alpha-lactalbumine.
- La colonne utilisée pour l'étape de chromatographie échangeuse d'anion contient une résine chargée négativement.
- Le chromatogramme obtenu pour l'étape de la chromatographie échangeuse d'anion permettra d'observer 2 pics d'absorbance à 280nm correspondant aux deux protéines.
- Les deux étapes de précipitation permettront de dénaturer l'alpha-lactalbumine pour la concentrer.
- L'alpha-lactalbumine purifiée pourra être injectée à des souris pour obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine.

QCM4 : Des expériences de GST-pull down sont réalisées avec une construction exprimant la protéine B étiquetée GST (Glutathion-S-Transferase). Une expérience identique est réalisée avec une construction utilisant une forme tronquée en C-terminal de la protéine B étiquetée GST (Protéine B-Δ C-ter). Pour cela, les billes liant la GST ou la protéine B ou la protéine B tronquée sont incubées avec un extrait de cerveau. Après lavage, les billes utilisées pour le GST-pull down sont traitées par une solution dénaturante contenant un agent réducteur avant d'être analysées par Western Blot (WB) avec un anticorps anti-protéine M ou un anticorps anti-GST. L'extrait de cerveau utilisé est également analysé en WB avec un anticorps anti-protéine M. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :



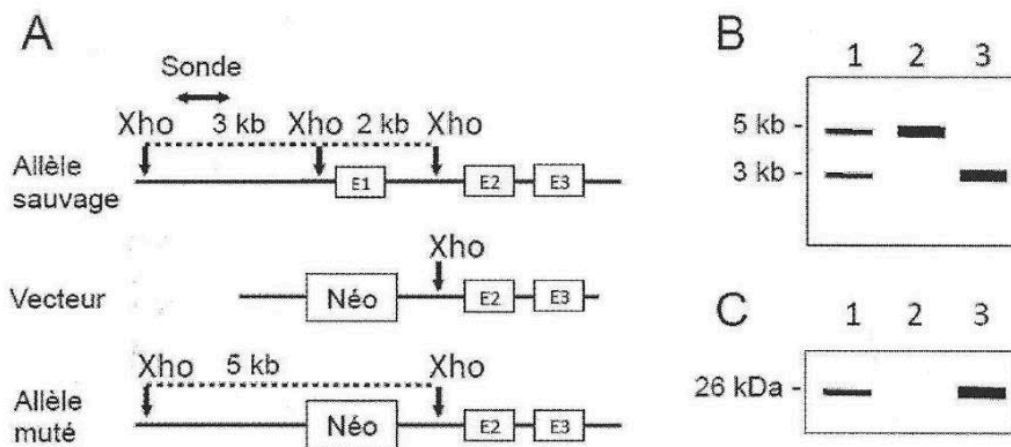
- La protéine M est exprimée dans les extraits de cerveau.
- La protéine M se lie avec la GST.
- Cette expérience permet de conclure que les protéines B et M interagissent.
- La liaison entre la protéine B et la protéine M fait intervenir du glutathion.
- Le domaine C-terminal de la protéine B est impliqué dans la liaison avec la protéine M.

QCM5: Des chercheurs souhaitent évaluer la présence de lymphocytes TCD8 spécifiques anti-mélanome (L Melan-A) chez des patients malades porteurs de métastases de cette tumeur cutanée. Pour cela, des lymphocytes TCD8 du sang périphérique sont isolés puis marqués par un tétramère présentant un peptide de Melan-A, un antigène protéique du mélanome. Certains TCD8 spécifiques se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de molécules tueuses : granzyme B et perforine. Pour comparaison, ont été analysés : 1) A l'aide de tétramères présentant des peptides viraux, les TCD8 spécifiques des virus CMV (L CMV) et EBV (L EBV) chez des sujets sans mélanome mais infectés, respectivement, par CMV et EBV, 2) les TCD8 de sujets exempts (Naïfs) d'infection CMV, EBV et de mélanome. L'analyse de l'expression de granzyme B et de perforine a été réalisée par la technique de cytométrie en flux, sur des lymphocytes TCD8 naïfs et sur des lymphocytes TCD8 spécifiques des virus CMV (L CMV) ou EBV (L EBV), ou spécifiques des cellules de mélanome (L. Melan-A). Concernant cette analyse :



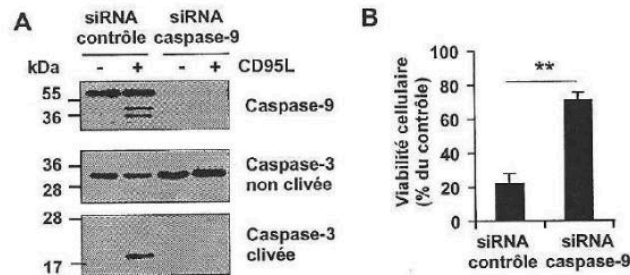
- A. L'étude des TCD8 spécifiques du virus CMV nécessite l'utilisation de tétramère présentant un peptide de Melan-A.
- B. Chez les patients souffrant de mélanome, la technique utilisée permet la détection simultanée du CD8 et du TCR spécifique de Melan-A, mais aussi de granzyme B.
- C. Les TCD8 spécifiques du virus EBV expriment plus de perforine que les TCD8 spécifiques de Melan-A.
- D. Les TCD8 spécifiques du CMV expriment plus de perforine que les TCD8 spécifiques d'EBV.
- E. L'évaluation de l'expression de perforine et de granzyme B a été réalisée par ELISPOT.

QCM8 : Des chercheurs souhaitent générer des souris KO pour le gène du TNF. Dans ce but, ils ont transfecté des cellules ES avec un vecteur porteur du gène "néo" et, en 5' et en 3' de ce gène, des séquences homologues du gène du TNF. La figure A montre l'organisation générale des allèles sauvages et mutés du gène du TNF et du vecteur utilisé. Afin de valider le KO, l'ADN génomique des souris 1, 2 et 3 a été extrait puis digéré par l'enzyme de restriction Xho et un Southern blot a été réalisé à l'aide d'une sonde radiomarquée (Figure B). Alternativement, les protéines des souris 1, 2 et 3 ont été analysées par Western blot avec un anticorps anti-TNF (Figure C). Les sites de l'enzyme de restriction Xho et les séquences d'ADN s'hybridant avec la sonde sont mentionnés dans la figure A.



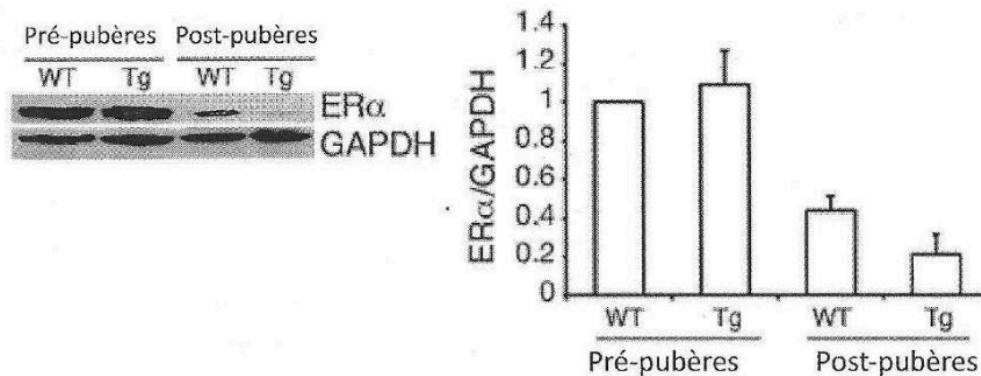
- A. La souris 1 est hétérozygote pour le gène du TNF, elle possède un allèle sauvage et un allèle muté.
- B. Les souris 1, 2 et 3 présentent une insertion du vecteur dans le génome.
- C. La souris 2 est KO pour le gène du TNF.
- D. La souris 3 est homozygote pour le gène du TNF, elle possède deux allèles sauvages.
- E. Les résultats du Western blot ne sont pas cohérents avec les résultats du Southern blot.

QCM9 : Des chercheurs souhaitent étudier le rôle de la caspase-9 dans la signalisation apoptotique de CD95. Ils transfectent des cellules Jurkat avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre l'ARNm codant la caspase-9. Trois jours après la transfection, ils incubent les cellules en présence ou en absence du ligand de CD95 (CD95L) pendant 8 heures. L'expression des caspases est évaluée par Western blot (Figure A). La viabilité des cellules incubées avec du CD95L est évaluée (Figure B). (**: les différences sont statistiquement significatives).



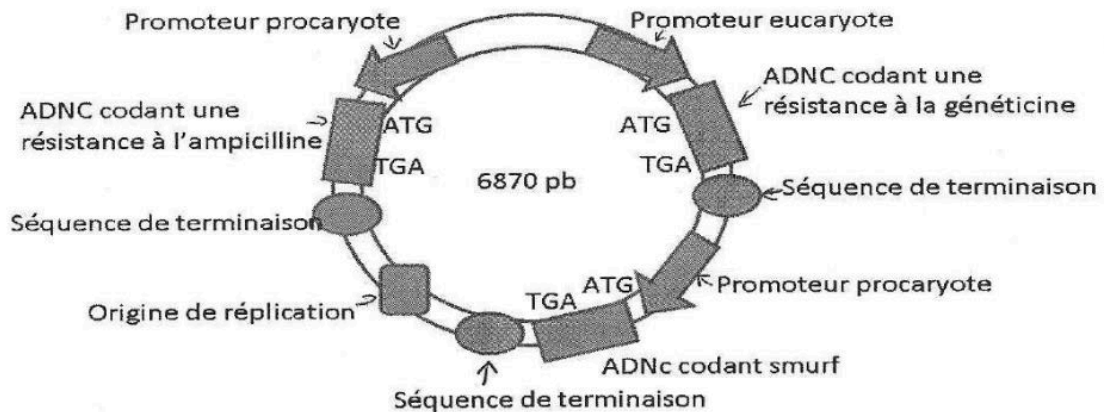
- Le siRNA dirigé contre l'ARNm codant la caspase-9 n'est pas spécifique car il supprime l'expression de la caspase-3.
- Dans les cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre l'ARNm codant la caspase-9, la caspase-3 n'est pas activée en réponse à CD95L.
- Dans les cellules transfectées avec le siRNA contrôle, CD95L induit l'activation des caspases et une perte de viabilité cellulaire.
- Cette expérience indique que la caspase-9 ne joue aucun rôle dans la signalisation apoptotique de CD95.
- Cette expérience montre que la caspase-3 active la caspase-9 dans la signalisation de CD95.

QCM11 : Des chercheurs travaillent sur des tissus de glandes mammaires de souris, pré-pubères ou post-pubères. Leur objectif est de déterminer si, à partir de la puberté, les taux élevés d'œstrogènes et/ou d'Insulin Growth Factor (IGF-1) modifient l'expression du récepteur des œstrogènes α (ER α). Dans la figure de gauche, ils analysent par western-blot l'expression de ER α soit dans des souris normales (WT) soit dans des souris transgéniques qui surexpriment IGF-1 (Tg). La figure de droite correspond à la quantification du même western-blot.



- A. L'expression de ER α est diminuée par la surexpression de IGF-1 chez les souris pré-pubères.
- B. L'expression de ER α est diminuée par la surexpression de IGF-1 chez les souris post-pubères.
- C. L'expression de ER α est diminuée chez les souris normales pré-pubères par rapport aux souris normales post-pubères.
- D. L'expression de ER α est augmentée chez les souris transgéniques pré-pubères par rapport aux souris transgéniques post-pubères.
- E. ER α est particulièrement diminuée si la puberté est associée à une surexpression de IGF-1.

QCM 15 : Un groupe de chercheur vient de breveter le plasmide suivant :



- A. Ce plasmide peut être utilisé pour produire la protéine smurf dans des bactéries.
- B. Ce plasmide est formé d'ADN simple brin circulaire.
- C. Ce plasmide peut être utilisé pour exprimer la protéine smurf dans des cellules humaines modifiées *in vivo* en utilisant un « canon à particule » (gene gun).
- D. Ce plasmide peut être utilisé pour obtenir après transfection par des méthodes chimiques des cellules humaines résistantes à la généticine *in vitro*.
- E. Ce plasmide peut être transfecté dans des cellules humaines *in vivo* en utilisant l'électroporation.

Correction

QCM 3 - AE

- A. (VRAI) Un gel filtration permet de séparer 2 molécules de poids moléculaire différents.
- B. La colonne utilisée pour l'étape de chromatographie échangeuse d'anions contient une résine chargée positivement pour retenir les anions.
- C. Les 2 protéines n'ont pas la même absorbance et se situent sur un même pic.
- D. Les deux étapes de précipitation permettent d'éliminer la caséine et la bêta-lactoglobuline (purification de l'extrait).
- E. (VRAI) C'est le principe de l'immunisation.

QCM 4 - AC

- A. (VRAI) Comme en témoigne le WB : anti-protéine M réalisé sur les extraits de cerveau.
- B. La protéine M se lie avec la protéine B, c'est pour cela que la protéine M n'est pas révélée par l'anti-protéine M en absence de protéine B (contrairement aux 2 autres colonnes).
- D. C'est la liaison entre les billes et l'étiquette GST qui fait intervenir du glutathion.
- E. Le domaine C-terminal de la protéine B n'est pas impliqué dans la liaison avec la protéine M car même si on utilise la protéine B entière ou sa forme tronquée en C-terminal le WB anti-protéine M révèle que dans les deux cas la liaison se fait avec la protéine M. À la révélation du GST-pull Down, les protéines ne sont pas au même endroit dans le gel car la protéine B est clivée.

QCM 5 - BD

- A. L'étude des **TCD8 spécifiques du mélanome** nécessite l'utilisation de tétramères présentant un peptide Melan-A.
- B. (VRAI) Les molécules tueuses sont situées dans le cytoplasme des lymphocytes TCD8 détectés.
- C. Les TCD8 spécifiques du virus EBV expriment moins de perforine que les TCD8 spécifiques de Melan-A.
- D. (VRAI) Cf lignes 2 et 3 du tableau de droite.
- E. ELISPOT permet de quantifier le nombre de cellules sécrétrices de cytokines ou le nombre de plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Pour évaluer la quantité de cytokines on utilise l'ELISA.

QCM 7 - ABDE

- A. (VRAI) En absence de TNF, il y a moins d'Ig donc moins de réponse acquise humorale.
- B. (VRAI) Fan est une molécule adaptatrice de TNF-R1 - en son absence il n'y a pas de signalisation par TNF-R1 et la réponse acquise humorale est moins importante, donc la signalisation TNF-R1 est impliquée.
- C. Comparativement aux souris contrôles, les Ig totales anti-SAB sont diminuées chez les souris Fan -/- (on ne peut pas dire avec certitude si les IgE anti-SAB sont diminuées).
- D. (VRAI) La réponse est statistiquement plus importante chez les Fan -/- que TNF -/- à 13 jours.
- E. (VRAI) L'ELISA permet de mesurer les libérations humorales des cellules.

QCM 8 - ACD

- A. (VRAI) Sinon il n'y aurait qu'une seule bande au Southern Blot.
- B. La souris 3 est homozygote sauvage.
- C. (VRAI) Car le TNF n'est pas détecté en présence d'Ac anti-TNF.
- D. (VRAI) Il n'y a qu'une bande de 3 kb (figure B) caractéristique de l'allèle sauvage (figure A).
- E. Les résultats sont cohérents.

QCM 9 - BC

- A. Le siRNA dirigé contre l'ARNm codant la caspase-9 est spécifique, mais l'absence de caspase-9 empêche l'activation de caspase-3.
- C. (VRAI) La viabilité cellulaire est d'environ 20% (cf Figure B).
- D. La caspase 9 joue un rôle dans la signalisation apoptotique de CD95 (viabilité cellulaire modifiée).
- E. La caspase 9 (caspase initiateur) active la caspase 3 (caspase effectrice).

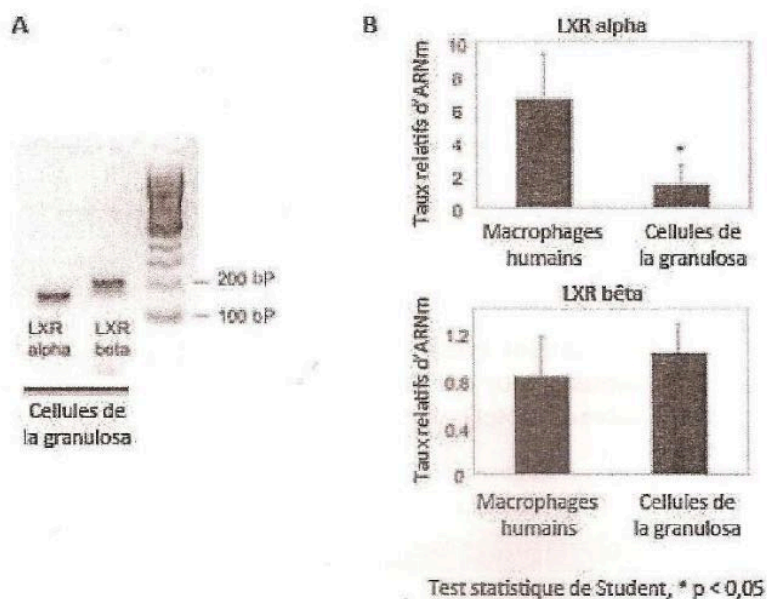
QCM 11 - BDE

- A. L'expression de ER α est augmentée (car le ratio ER α /GAPDH augmente) par la surexpression de IGF-1 chez les souris prépubères.
- B. (VRAI) Les Tg post-pubères expriment moins ER α .
- C. L'expression de ER α est augmentée chez les souris normales prépubères par rapport aux souris normales post-pubères.
- D. (VRAI) Les Tg prépubères ont un ratio d'environ 1,1 or les post-pubères ont un ratio de 0,3.
- E. (VRAI) Le fort taux d'IGF-1 en pré-puberté diminue le taux d'ER α par la suite.

QCM 15 - ADE

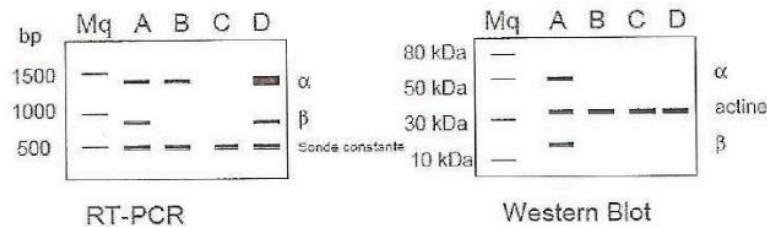
- A. (VRAI) Le promoteur de la séquence codant pour Smurf est procaryote et l'ADNc est inséré dans le bon sens de lecture par rapport au promoteur, il y a également une séquence de terminaison.
- B. Un plasmide est formé d'ADN double brin circulaire.
- C. Ce plasmide ne peut pas être utilisé pour exprimer la protéine smurf dans des cellules eucaryotes (cellules humaines) car le promoteur précédant l'ADNc codant smurf est un promoteur procaryote.
- D. (VRAI) Le promoteur de la séquence codante pour la résistance à la généticine est eucaryote (exprimée chez l'Homme) et l'ADNc est inséré dans le bon sens de lecture par rapport au promoteur, il y a également une séquence de terminaison.
- E. (VRAI) La transfection de cellules humaines (eucaryotes) peut notamment se faire par électroporation.

QCM 1 : Des chercheurs étudient l'importance des récepteurs nucléaires LXR (« Liver X Receptors » pour « récepteurs X hépatiques ») dans les cellules de la granulosa humaine. Ils ont analysé, par RT-PCR, l'expression des 2 isoformes du récepteur, LXR alpha et LXR bêta, dans des cellules de granulosa humaine (figure A). Sur la figure B, sont représentés les résultats comparant les taux relatifs d'ARNm codant les LXR alpha (graphe du haut) et LXR bêta (graphe du bas), analysés par RT-PCR quantitative dans des macrophages humains et dans les mêmes cellules de granulosa.



- A. Les deux isoformes des récepteurs LXR sont exprimées dans les cellules de la granulosa humaine.
- B. La figure A indique que le fragment amplifié d'ADNc du récepteur LXR alpha est plus grand que celui du récepteur LXR bêta.
- C. Dans les cellules de la granulosa, le taux d'ARNm de LXR alpha est significativement inférieur au taux présent dans les macrophages humains.
- D. Le taux d'ARNm de LXR bêta est significativement supérieur dans les cellules de la granulosa au taux présent dans les macrophages humains.
- E. Dans les macrophages, les taux d'ARNm de LXR alpha et LXR bêta sont sensiblement identiques.

QCM 2 : Des chercheurs veulent créer des cellules pluripotentes à partir de cellules adultes. Pour cela ils vont transfecter des cellules adultes humaines (4 types cellulaires différents A, B, C, D) avec un vecteur véhiculant les gènes codant les facteurs de transcription α et β . Après 48 heures de transfection des cellules, les chercheurs ont évalué l'expression des deux gènes par RT-PCR puis Western Blot. Les résultats sont présentés ci dessous :



- A. Un gène qui est transcrit est nécessairement traduit.
- B. Les deux gènes s'expriment au même taux dans les 4 types cellulaires utilisés.
- C. Les cellules A, B et D ont été transfectées efficacement
- D. En utilisant un vecteur viral intégratif, les chercheurs devraient obtenir le même résultat sur un Western blot réalisé 2 mois post modification génique.
- E. L'électroporation a pu être utilisée dans ces expériences.

QCM 3 : Des chercheurs veulent créer un lapin de compagnie transgénique avec des oreilles rouges fluorescentes. Pour cela ils transfectent des ovocytes fécondés de lapins avec la construction suivante. HcRed est un ADNc codant pour une protéine rouge fluorescente :

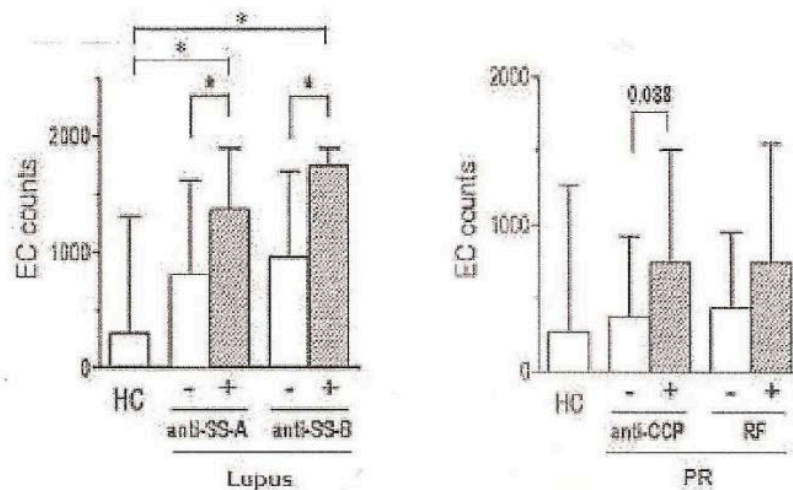


- A. Le promoteur 1 est un promoteur eucaryote constitutif.
- B. L'ADNc codant une résistance à un antibiotique eucaryote est nécessaire pour obtenir un lapin transgénique par recombinaison homologue.
- C. Les deux gènes seront tous les deux présents dans le génome de toutes les cellules du lapin transgénique.
- D. Le lapin transgénique obtenu pourra donner naissance à d'autres lapins transgéniques.
- E. Le promoteur 2 n'est pas nécessaire pour obtenir le lapin par transgénèse additive.

QCM 8. Des chercheurs souhaitent préparer une solution d'anticorps polyclonaux dirigés contre un antigène X d'intérêt thérapeutique. X est une protéine isolée à partir d'une bactérie pathogène. Des lapins sont immunisés par X en présence d'adjuvant. Après prélèvement du sang total, les sérums sont isolés et passés sur une colonne d'affinité utilisant la protéine A. L'éluat obtenu (éluat 1) est ensuite passé sur une colonne d'affinité couplée à l'antigène X, ce qui permet d'obtenir un second éluat (éluat 2). Concernant ce protocole :

- A. L'éluat 1 contient majoritairement des molécules possédant un fragment Fc.
- B. L'éluat 2 contient un mélange équimoléculaire d' IgG , d' IgM et d'IgE spécifiques de X.
- C. L'éluat 1 contient des anticorps constitués à plus de 95% d'Ig anti-X.
- D. La spécificité de reconnaissance de l'éluat 2 peut être évaluée en confectionnant un test ELISA, avec l'antigène X immobilisé et un antisérum de détection anti-IgG de lapin marqué par une molécule chromogène (peroxydase ou phosphatase alcaline).
- E. C'est la réaction antigène-anticorps qui permet la fixation des Ig sur la colonne utilisant la protéine A.

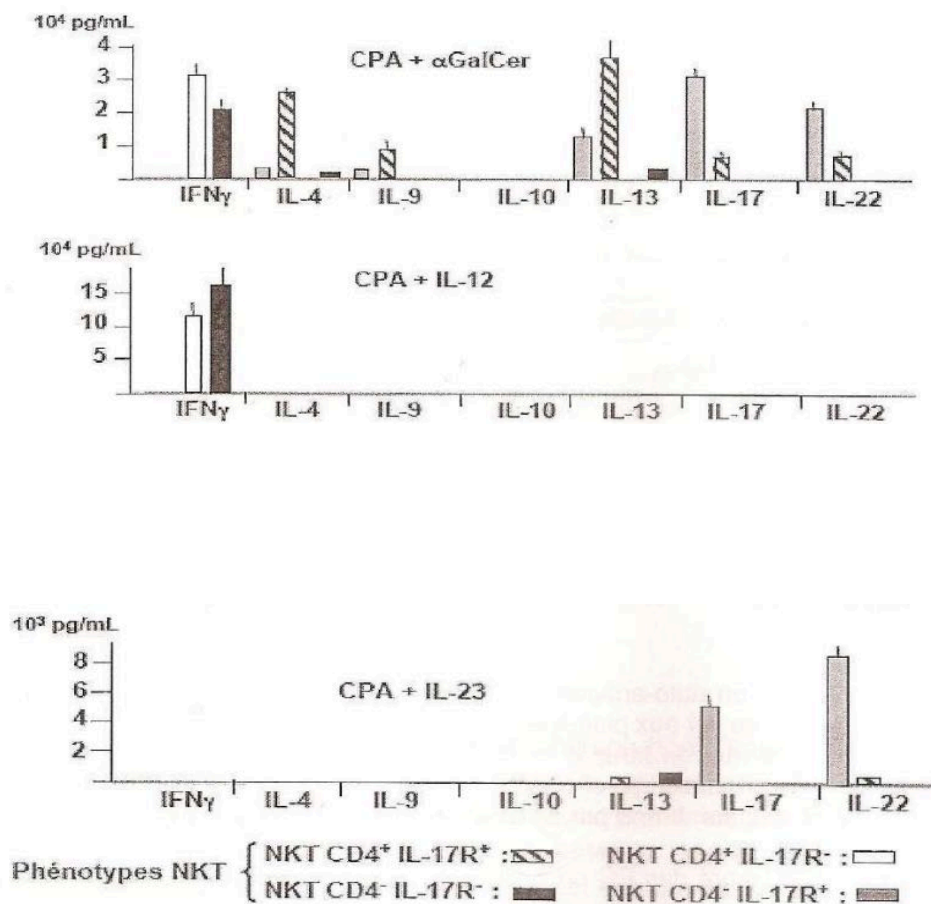
QCM 9. Des chercheurs travaillant dans le domaine des maladies auto-immunes (MAI) étudient les Cellules Endothéliales matures Circulantes (EC), pour savoir si elles peuvent servir de marqueur prédictif de gravité dans le lupus et la Polyarthrite Rhumatoïde (PR). Les EC sont présentes en faible concentration dans le sang circulant. Elles expriment à leur surface des marqueurs endothéliaux comme CD31, CD144 et CD146 et sont négatives pour les marqueurs leucocytaires comme CD45. A partir de prélèvements de sang circulant, une évaluation du nombre (counts) des EC et de la présence (+) de certains auto-anticorps a été réalisée. La présence d'auto-anticorps dans le sérum (anti-SSA ou anti-SSB pour le Lupus ; anti-CCP ou RF pour la PR) est considérée comme un facteur de gravité de la maladie. Les résultats suivants ont été obtenus chez des patients atteints de l'une ou l'autre des maladies.



* $P < 0,05$; HC : sujets contrôles sains.

- Sachant que SS-A est un auto-antigène protéique présent dans les noyaux des cellules, les anti-SS-A peuvent se lier aux plaquettes.
- Chez les patients souffrant de MAI, le nombre d'EC est significativement augmenté chez ceux présentant des auto-anticorps circulants.
- Les EC peuvent être dénombrées par cytométrie en tant que cellules CD31+, CD144+ et CD45+
- L'augmentation du nombre des EC peut être considérée comme un marqueur de gravité du lupus.
- A l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD146, il est possible d'isoler une population d'EC.

QCM 10. Des chercheurs évaluent la production de cytokines par les lymphocytes NKT. Ces lymphocytes existent sous 4 phénotypes, caractérisés par l'expression ou non à leur surface, de la molécule CD4 (NKT CD4⁺ ou NKT CD4⁻) et du récepteur pour IL-17 (NKT IL-17R⁺ ou NKT IL-17R⁻). Ces lymphocytes expriment un TCR invariant, pouvant reconnaître, en présence de cellules présentatrices d'antigène (CPA), différents épitopes T de nature lipidique présentés par des molécules du CMH. L' α Galactosyl-Ceramide (a GalCer) est un exemple de ces épitopes. Afin d'étudier la fonction sécrétrice des 4 populations de NKT, ces lymphocytes ont été cultivés en présence de CPA + a GalCer ou de CPA + cytokines activatrices des NKT (IL-12 ou IL-23). Après 48 h de culture, la production de différentes cytokines est évaluée dans le surnageant de culture. La présence de cytokines (IFN γ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22) est due à une activation des cellules NKT.



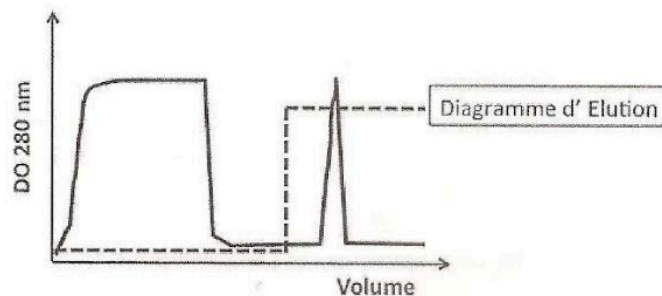
Sachant que sans CPA les NKT ne sont pas activés, les résultats montrent que :

- Les NKT exprimant le récepteur d'IL-17 (IL-17R⁺) sécrètent de l'IFN γ lorsqu'ils sont activés par α GalCer ou IL-12.
- L'IL-23 active la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 par les NKT CD4⁻.
- L' α GalCer active toutes les sous-populations de NKT.
- L'IL-12 peut induire la sécrétion IFN γ par les NKT CD4⁺.
- L'expression de CD4 à la surface des NKT est nécessaire à la sécrétion d'IFN γ .

QCM 11. Concernant les résultats présentés ci-dessus (QCM 10) :

- A. Ils ont pu être obtenus par technique ELISA.
- B. Ils ont pu être obtenus par cytométrie en flux.
- C. Les cellules NKT ont pu être isolées par ELISPOT.
- D. Les différentes populations de NKT ont pu être isolées par cytométrie en flux.
- E. La spécificité de reconnaissance des NKT pour l'aGalCer peut être étudiée par la technique des tétramères.

QCM12 : Une protéine possédant une étiquette composée d'un enchaînement de 6 histidines est purifiée à partir d'un extrait brut bactérien, par une chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel. Le chromatogramme suivant est obtenu lors de la purification :



- A. Le plateau observé sur le chromatogramme correspond à la charge de l'extrait brut sur la colonne.
- B. Les interactions entre l'étiquette histidine et le nickel sont des interactions irréversibles.
- C. L'étape d'élution de la protéine se fait progressivement par passage à travers de la colonne d'un gradient de concentration d'imidazole.
- D. La présence de « l'étiquette histidine » permet de repérer la protéine dans l'extrait brut à l'aide d'un anticorps anti-histidine par la technique du western blot.
- E. Dans cette expérience, la présence d'un pic unique montre la présence d'une protéine sous forme monomérique.

QCM 13 : Une société de biotechnologie souhaite purifier la Taq polymérase à partir d'une nouvelle souche de bactérie thermophile. Cette enzyme monomérique possède la propriété de conserver sa forme native après chauffage à 75°C et présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes : masse moléculaire de 90 kDa et point isoélectrique de 6,03.

- A. Lors de l'extraction, le chauffage à 75°C de l'extra it brut permet de précipiter une partie des protéines de l'extrait bactérien.
- B. Si le tampon de lyse possède un pH de 8, la Taq polymérase peut être purifiée sur une colonne échangeuse de cation.
- C. La mesure de l'activité Taq polymérase permet de calculer l'activité spécifique des différentes fractions purifiées.
- D. Si une chromatographie d'exclusion est réalisée, le volume d'élution de la Taq polymérase sera compris entre le volume d'élution de la lactate déshydrogénase (140 kDa) et le volume d'élution de l'albumine (66 kDa).
- E. Si la Taq polymérase est correctement purifiée, une bande unique correspondant au marqueur 90 kDa sera visible après analyse de la fraction purifiée par électrophorèse SDS-PAGE en présence de β -mercaptoéthanol.

Correction

QCM 1 - AC

- B. La figure A indique que le fragment amplifié d'ADNc du récepteur LXR α est plus court que celui du récepteur LXR β .
- D. Pas significativement car absence du symbole *.
- E. Dans les macrophages, le taux d'ARNm de LXR α (5) est supérieur au taux de LXR β (0,8) : attention aux échelles !!

QCM 2 - CDE

- A. Un gène peut être transcrit sans être forcément traduit.
- B. Les deux gènes ne s'expriment pas dans toutes les cellules (western blot).
- C. (VRAI) Les cellules A, B et D ont été transfectées efficacement comme en témoigne la RT-PCR mais les facteurs de transcription alpha et bêta ne s'expriment que dans les cellules A comme en témoigne le Western Blot.

QCM 3 - BCDE

- A. La promoteur 1 est un promoteur eucaryote qui n'est pas constitutif (le gène HcRed s'exprime seulement au niveau des oreilles et non pas au niveau de toutes les cellules).
- E. (VRAI) En effet, la sélection par résistance à un antibiotique ne peut pas se faire sur un ovocyte fécondé dans le cas d'une transgénèse additive.

QCM 8 - AD

- A. (VRAI) Protéine A permet la fixation de plusieurs isotypes d'anticorps (mais très majoritairement des IgG) : elle présente une forte affinité pour une séquence peptidique présente dans le domaine constant des chaînes Hg (c'est à dire dans le domaine Fc des chaînes Hg).
- B. L'éluat 2 contient bien un mélange d'Ig spécifiques de X mais pas équimolaires (car l'éluat 1 contenait très majoritairement des IgG).
- C. L'éluat 2 contient des anticorps constitués à plus de 95% d'Ig anti-X.
- E. La protéine A n'est pas un anticorps (elle fixe les fragments Fc des anticorps) : la réaction antigène-anticorps se fait quant à elle grâce au fragment Fab d'un anticorps.

QCM 9 - DE

- A. L'auto-antigène protéique SS-A n'est pas présent dans les plaquettes car elles sont dépourvues de noyaux (cellules anucléées).
- B. (VRAI) Pour le lupus mais absence de conclusion possible pour la PR (résultats non significatifs).
- C. Les EC sont CD45-.

QCM 10 - C

- A. Les NKT IL-17R+ ne sécrètent pas d'INF γ (peu importe la cytokine responsable de leur activation).
- B. L'IL-23 active la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 seulement pour les lymphocytes NKT CD4- IL-17R+ mais pas pour les lymphocytes NKT CD4- IL-17R-.
- D. L'IL-17 peut induire la sécrétion d'INF γ par lymphocytes NKT IL-17R-.
- E. Les lymphocytes NKT CD4- IL-17R- sécrètent de l'INF γ .

QCM 11 - ABDE

- C. La technique ELISPOT ne permet pas d'isoler les cellules mais permet de quantifier le nombre de cellules NK capables de produire des cytokines.

QCM 12 - AD

B. Ce sont des interactions réversibles.

C. On procède avec une élution par palier, c'est à dire qu'on 1 seule solution d'élution (à la différence d'une élution par gradient).

E. Aucun rapport.

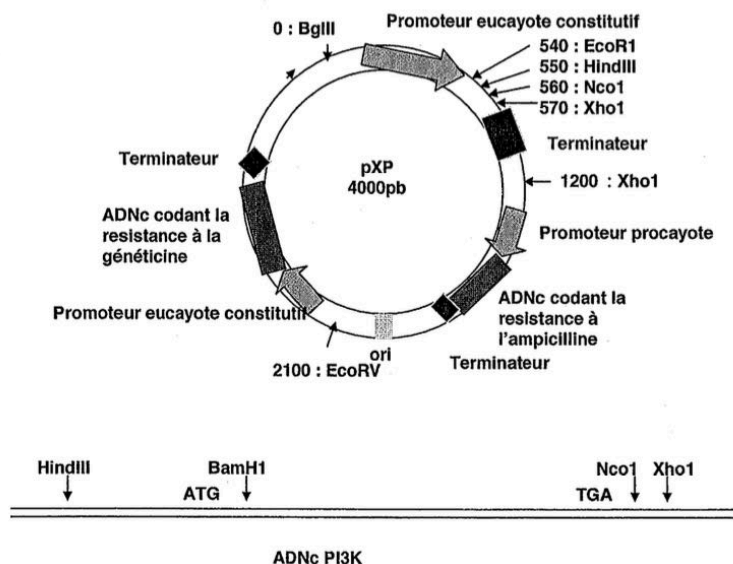
QCM 13 - ACDE

B. Si la tampon de lyse possède un pH de 8 ($\text{pH} > \text{pI}$), la Taq polymérase sera chargée négativement et peut être purifiée sur une colonne échangeuse d'anions.

Maraîchers 2013-2014

Indiquez le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes.

QCM1 - Les chercheurs désirent exprimer l'ADN complémentaire (ADNc) codant la PI3K humaine dans des cellules de mammifères. Pour cela, ils clonent l'ADNc de la PI3K humaine dans le plasmide pXP dont les cartographies sont présentées ci-dessous pour générer le plasmide recombinant pXP-PI3K : (pb: paires de bases)

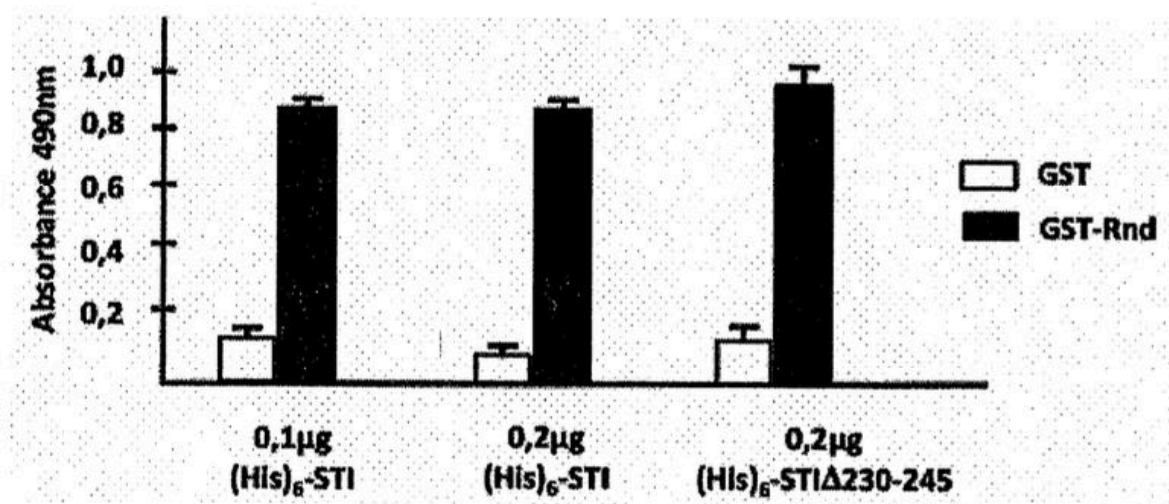


- A. L'ADNc peut être inséré dans le plasmide après digestions enzymatiques du vecteur et de l'ADNc par les enzymes HindIII et Nco1.
- B. La digestion du plasmide pXP par Xho1 donne un fragment de 1200 pb.
- C. L'ADNc peut être inséré dans le plasmide après digestions enzymatiques du vecteur et de l'ADNc par les enzymes Xho1 et BamH1.
- D. Pour amplifier le plasmide recombinant, les bactéries transformées par le produit de ligation peuvent être sélectionnées grâce à la généticine.
- E. Les bactéries transformées par pXP-PI3K expriment la PI3K humaine.

QCM 2 - Le plasmide construit précédemment (pXP-PI3K) est utilisé pour générer une souris transgénique et pour faire de la thérapie génique de pathologies cutanées :

- A. Après transfection de pXP-PI3K dans le noyau d'un ovocyte fécondé murin, des souriceaux transgéniques expriment la PI3K humaine dans la glande mammaire.
- B. Les hépatocytes de la souris transgénique contiennent l'ADNc codant la PI3K humaine.
- C. Le plasmide pXP-PI3K peut être transfecté dans des cellules eucaryotes par électroporation *in vivo*.
- D. Les cellules humaines génétiquement modifiées *ex vivo* peuvent être sélectionnées par l'ampicilline.
- E. Le plasmide peut être transfecté dans des cellules humaines *ex vivo* par utilisation de vecteurs synthétiques.

QCM3 - Les protéines recombinantes étiquetées GST-Rnd et (His)₆-STI sont produites et purifiées. Afin d'étudier l'interaction entre ces deux protéines, 1 micro-gramme de GST ou 1 micro-gramme de GST-Rnd est immobilisé dans différents puits. Les puits sont incubés avec des concentrations variables de (His)₆-STI ou une forme tronquée de (His)₆-STI pour les acides aminés 230 à 245 ((His)₆-STI Δ 230-245). Après deux lavages, la présence de la protéine STI (forme pleine taille ou tronquée) est révélée par la technique ELISA, évaluée par la mesure de l'absorbance à 490 nm :



- A. Une fraction de (His)₆-STI se lie aux puits indépendamment de son interaction avec Rnd.
- B. Ces résultats montrent une interaction directe entre STI et Rnd.
- C. Ces résultats montrent que l'interaction entre STI et Rnd est dose dépendante.
- D. Ces résultats montrent que les acides aminés 230 à 245 de STI favorisent l'interaction de STI avec Rnd.
- E. L'interaction entre Rnd et STI peut être confirmée par co-immunoprécipitation des deux protéines contenues dans un extrait protéique à l'aide d'anticorps anti-STI.

QCM 4 - Différentes méthodes de purification sont appliquées sur une solution à pH=7 contenant un mélange en concentration équivalente (en mg/ml) de 3 protéines A, B et C. Les caractéristiques des 3 protéines sont résumées dans le tableau suivant :

Protéine	Masse moléculaire	pHi	Autres Caractéristiques
A	100 000 Daltons	8	Formée de 2 sous-unités de 50 kDa Protéine impliquée dans la mort cellulaire
B	50 000 Daltons	3	Monomère Protéine du cytosquelette
C	50 000 Daltons	10	Monomère Facteur de transcription

- A. Une chromatographie d'exclusion peut permettre de séparer les 3 protéines.
- B. Dans une colonne échangeuse de cation, la protéine C est éluée avant la protéine A si la force ionique de l'éluant est augmentée progressivement.
- C. En conditions dénaturantes en présence d'agent réducteur, une seule bande est observée si le mélange est analysé après migration sur gel SDS-PAGE.
- D. Une chromatographie d'affinité réalisée sur une colonne composée d'oligonucléotides peut permettre de purifier la protéine C.
- E. Sachant que la purification est réalisée à partir de 10 mL de mélange dosé à 3 mg/mL de protéine, et que la fraction purifiée de A obtenue est de 1 mg, le rendement est de 10%.

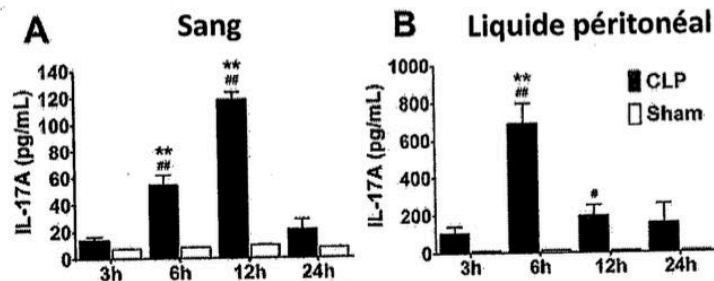
Le QCM 5 est en grande partie hors programme mais a été laissé car certains items sont intéressants pour le programme de PASS.

QCM 5 - Des chercheurs souhaitent produire du TNF recombinant de souris chez la bactérie *E. Coli*. Dans ce but, ils clonent l'ADN complémentaire (ADNc) codant le TNF (ou Tumor necrosis factor) dans un plasmide d'expression procaryote. Ce plasmide permet l'expression de la protéine d'intérêt avec une étiquette Histidine en C-terminal :

- A. L'ADNc du TNF doit être cloné en 3' de la séquence codant l'étiquette Histidine.
- B. Le codon stop présent sur l'ADNc du TNF doit être supprimé pour permettre l'expression de la protéine étiquetée.
- C. La purification du TNF recombinant peut se faire sur colonne de Nickel.
- D. La quantité de TNF recombinant purifié peut être dosée par technique ELISA avec un anticorps de capture dirigé contre l'étiquette histidine et un anticorps de révélation dirigé contre le TNF.
- E. L'activité biologique du TNF recombinant peut être évaluée chez des souris développant des fibrosarcomes cutanés.

QCM 13 - Des chercheurs ont évalué le rôle de l'IL17A dans un modèle de choc septique chez la souris après ligature et perforation du caecum (CLP= Caecal Ligation and Puncture). Dans une première expérience, ils ont mesuré la concentration d'IL17A dans le sang et le liquide péritonéal de souris contrôles (sham) ou de souris développant un choc septique (CLP) aux temps indiqués. #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$: pour un temps donné, les différences sont statistiquement significatives par rapport au groupe de souris contrôles (sham);

****:** $p < 0,01$: Les différences sont statistiquement significatives par rapport au temps 3h :



- A. Cette expérience indique que les taux d'IL-17A augmentent de façon transitoire dans le liquide péritonéal et dans le sang des animaux développant un choc septique.
- B. Six heures après le début du choc septique, la concentration d'IL-17A est environ 10 fois plus importante dans le liquide péritonéal que dans le sang.
- C. Cette expérience suggère que la production d'IL-17A est majoritaire dans le péritoine.
- D. Les cinétiques indiquent que la production d'IL-17A débute dans le sang.
- E. Vingt-quatre heures après le début du choc septique, les taux sanguins d'IL-17A sont significativement supérieurs à ceux mesurés dans le groupe de souris contrôles.

Correction

QCM 1 - A

A. (VRAI) Ces 2 enzymes de restrictions ne clivent qu'à un seul endroit :

- Dans le plasmide entre le promoteur et le terminateur
- Dans l'ADNc et c'est en dehors des séquences codant pour la protéine Ce qui va d'ailleurs permettre une transfection orientée.

B. La digestion du plasmide pXP par Xho1 donne un fragment de 630 pb (nombre de paires de base entre les deux sites de restriction pour Xho1) et un fragment de 3570 pb.

C. Le site de restriction de BamH1 de l'ADNc est situé après le codon ATG et ne l'inclura donc pas dans la construction finale (synthèse de la PI3K impossible). De plus, le vecteur ne contient pas de site de restriction pour BamH1.

D. L'ADNc codant la résistance à la généticine est précédé d'un promoteur eucaryote or on s'intéresse à des cellules procaryotes (bactéries) dans cet item.

E. Les cellules de mammifères transfectées par pXP-PI3K expriment la PI3K humaine (le promoteur de l'ADNc codant la PI3K est un promoteur eucaryote donc expression de la PI3K chez les bactéries).

QCM 2 - ABCE

A. (VRAI) Expriment la PI3K humaine dans la glande mammaire mais également dans toutes les autres cellules car le promoteur eucaryote précédant l'ADNc codant la PI3K humaine est constitutif.

B. (VRAI) Toutes les cellules de la souris transgénique y compris les hépatocytes portent le transgène (ADNc codant la PI3K humaine).

C. (VRAI) C'est un type de transfection électrique possible.

D. L'ADNc codant la résistance à l'ampicilline est précédée d'un promoteur procaryote or on s'intéresse à des cellules eucaryotes (cellules humaines).

E. (VRAI) Attention, c'est possible seulement chez l'eucaryote, les transfections synthétiques ne sont pas faites chez les procaryotes, attention aux pièges !!

QCM 3 - ABE

A. (VRAI) En effet, on observe que même seul en présence de GST (sans Rnd), une petite fraction de la (His)6-STI se lie aux puits, car l'absorbance n'est pas nulle.

B. (VRAI) En effet une plus grande fraction de (His)6-STI reste liée aux puits en présence de Rnd (interaction directe car on utilise des protéines recombinantes purifiées et non pas un extrait cellulaire pouvant contenir plusieurs partenaires d'interactions potentiels).

C. L'interaction entre STI et Rnd est la même quelle que soit la dose (à 0,1 ou 0,2 µg).

D. Ces résultats montrent que les acides aminés 230 à 245 de STI défavorisent l'interaction de STI avec Rnd. En effet, en l'absence de ces acides aminés, c'est-à-dire avec la forme tronquée de (His)6-STI, on constate que l'interaction avec la Rnd est un peu plus forte (car la barre est plus haute).

E. (VRAI) C'est une façon d'étudier 2 partenaires enzymatiques (cf le cours sur la purification des protéines).

QCM 4 - CDE

- A. Les protéines B et C ont la même masse moléculaire et ne pourront donc pas être séparées par une chromatographie d'exclusion, mais la protéine A sera éluée avant les protéines B et C.
- B. Dans une colonne échangeuse de cations, la protéine C est éluée après la protéine A si la force ionique de l'éluant est augmentée progressivement (car son pHi est plus élevé).
- C. (VRAI) Une seule bande observée à 50 kDa, qui représente la masse moléculaire des protéines B et C et la masse moléculaire de chacune des 2 sous-unités de la protéine A qui auront été préalablement séparées à cause des conditions dénaturantes et de la présence d'agents réducteurs (SDS).
- D. (VRAI) La protéine C étant un facteur de transcription, elle pourra être retenue par affinité sur une colonne composée d'oligonucléotides.
- E. (VRAI) Les 10 mL de mélange contiennent 30 mg de protéines (car la concentration est de 3 mg/mL) et donc 10 mg de chacune des 3 protéines car celles-ci sont retrouvées en concentrations équivalentes. Si la fraction purifiée de A obtenue est de 1 mg, cela correspond à 10% de la quantité de protéines A présentes au départ (10 mg) et donc le rendement est de 10%.

QCM 5 - (B)CD(E)

- A. L'ADNc du TNF doit être cloné en 5' de la séquence codant l'étiquette Histidine (car celle-ci est présente en C-terminal). **(Hors programme)**
- B. (VRAI) Sinon la traduction s'arrête avant la synthèse de l'étiquette, car elle est en 3' de la séquence d'intérêt. **(Hors programme)**
- C. En chromatographie d'affinité, l'Histidine se fixe sur le nickel, l'élution se fait avec de l'imidazole.
- D. On décrit ici le fonctionnement de l'ELISA.
- E. (VRAI) Le TNF induit la nécrose des tissus tumoraux. **(hors programme)**

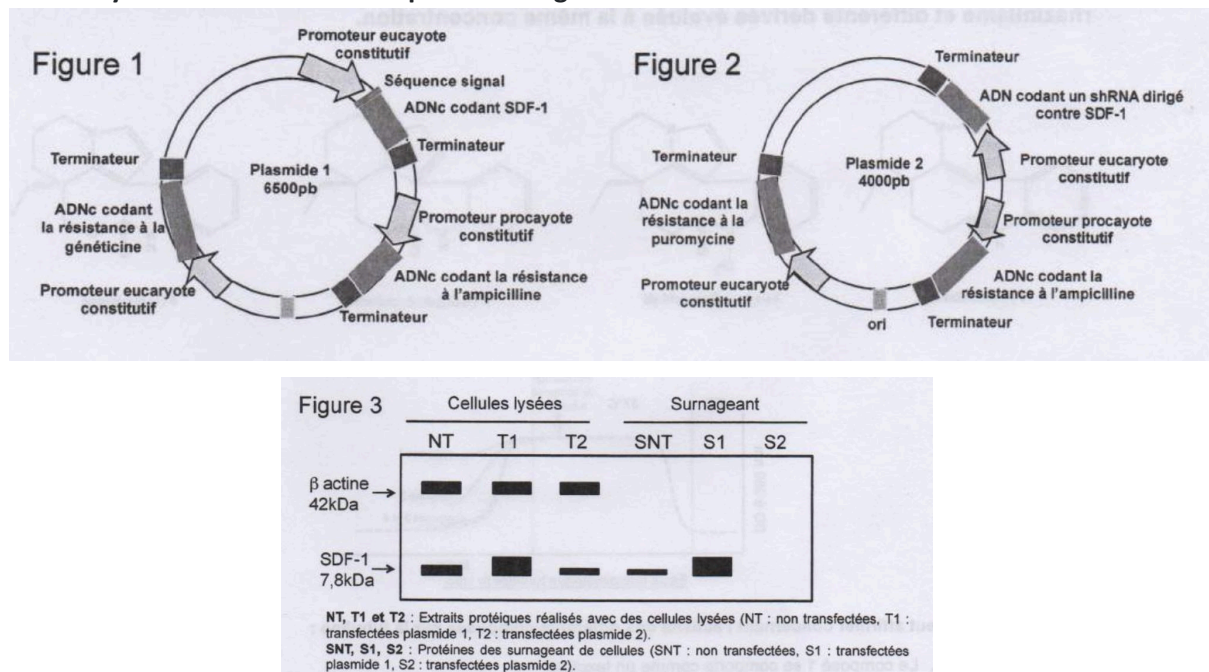
QCM 6 - CDE

- A. Ce sont des modèles génétiquement modifiés, les modèles négatifs sont des modèles résistants aux maladies étudiées.
- B. Ce sont des modèles génétiquement modifiés, les modèles négatifs sont des modèles dont la maladie n'a pas d'équivalent chez l'homme, or Alzheimer est une maladie humaine.
- C. (VRAI) Vrai car on voit au niveau macroscopique les effets du vaccin (moins de pertes de mémoire), mais l'analyse des cellules permettrait de voir l'effet moléculaire sur les plaques d'amyloïde.
- D. (VRAI) Les environnements des essais cliniques sont standardisés afin d'éviter les biais.
- E. (VRAI) Les souris transgéniques vaccinées font moins d'erreurs (donc ont une meilleure mémoire) que les transgéniques non vaccinées.

QCM 13 - ABC

- A. Dans le sang, le taux augmente jusqu'à 12h et 6h dans le liquide péritonéal, puis il rediminue.
- B. A 6h, le taux d'IL-17A est d'environ 50-60 pg/mL, il est de 700-800 pg/mL dans le liquide péritonéal.
- C. Cf correction de l'item B.
- D. Les cinétiques ne permettent pas de savoir si la production d'IL-17A débute dans le sang ou dans le liquide péritonéal, car les cytokines pourraient être produites quelque part mais s'accumuler ailleurs.
- E. 24 heures après le début du choc septique, les taux sanguins d'IL-17A ne sont pas significativement supérieurs à ceux mesurés dans le groupe de souris contrôles (car absence du symbole # ou ##).

QCM 3 - Des chercheurs ont modifié génétiquement des cellules eucaryotes avec soit le plasmide 1 (figure 1), soit le plasmide 2 (figure 2). Ils ont ensuite analysé l'expression de SDF-1 par Western Blot sur les protéines du surnageant de culture des cellules ou sur des extraits protéiques des cellules lysées. Les résultats sont présentés Figure 3 :

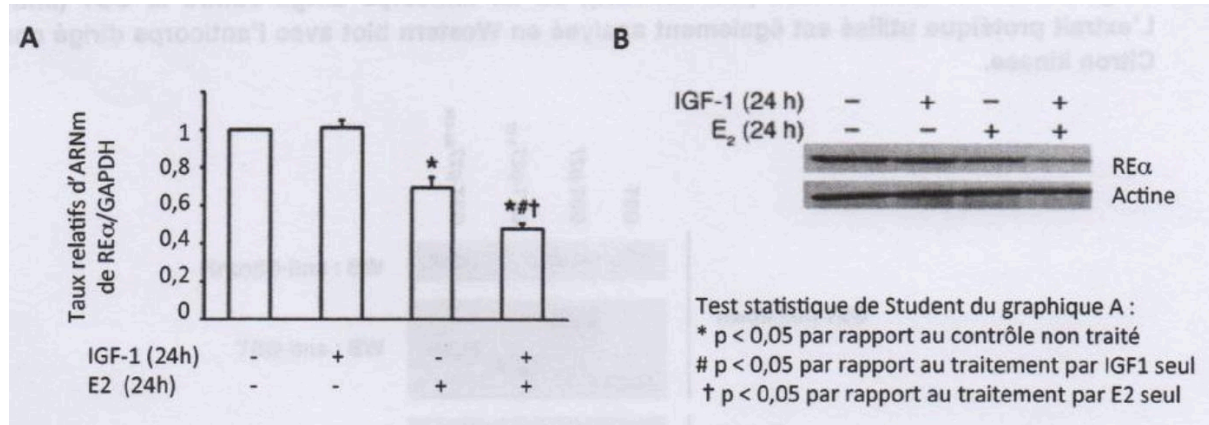


- La séquence signal présente sur le plasmide 1 sert à faire exprimer la protéine SDF-1 dans le noyau des cellules.
- Les cellules eucaryotes transfectées ont été sélectionnées grâce à la résistance à la puromycine quel que soit le plasmide utilisé (1 ou 2).
- Les cellules procaryotes transformées pour produire les plasmides ont été sélectionnées grâce à la résistance à l'ampicilline quel que soit le plasmide utilisé (1 ou 2).
- Le plasmide 2 code pour un shRNA qui inhibe l'expression de SDF-1 dans les cellules eucaryotes transfectées et sélectionnées.
- Cette expérience suggère que les cellules transfectées avec le plasmide 1 expriment plus de SDF-1 dans leur surnageant que les cellules non transfectées.

QCM 4 - Le plasmide 2 représenté QCM 3 figure 2 a été utilisé pour modifier génétiquement des fibroblastes humains (CSM) et analyser les conséquences biologiques de la déplétion de la synthèse de SDF-1. Les CSM ont été dans un deuxième temps, injectées à un animal :

- Les CSM transfectées sont sélectionnées par la résistance acquise à l'ampicilline.
- Les CSM expriment le shRNA même après leur injection dans l'animal.
- On peut considérer que les animaux qui sont injectés avec les CSM reçoivent un traitement de thérapie génique ex vivo.
- Les animaux transmettront la modification génique à leur descendance.
- Les chercheurs peuvent transfecter les CSM avec l'ADN codant une protéine fluorescente verte (GFP) et analyser le devenir des cellules génétiquement modifiées dans les animaux vivants et anesthésiés sous une caméra à fluorescence.

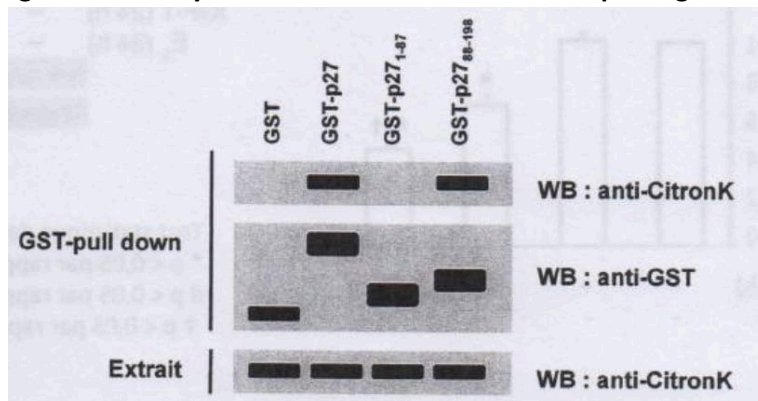
QCM 5 - Des chercheurs étudient l'expression du récepteur des œstrogènes, RE alpha (RE α), dans les cellules MCF-7, cellules d'adénocarcinome mammaire humain. Ils souhaitent déterminer si l'association de l'oestradiol (E2) et d'un facteur de croissance proche de l'insuline, l'IGF-1 (Insulin Growth Factor), module l'expression du RE α . Pour vérifier leur hypothèse, ils utilisent des cellules MCF-7 traitées ou non pendant 24h par l'IGF-1 et/ou E2. Les ARNm des cellules sont ensuite extraits puis analysés par RT-PCR quantitative (figure A) et parallèlement, un Western- blot permet l'analyse de l'expression protéique du RE α (figure B).



Indiquez le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes, dans les conditions d'expérience :

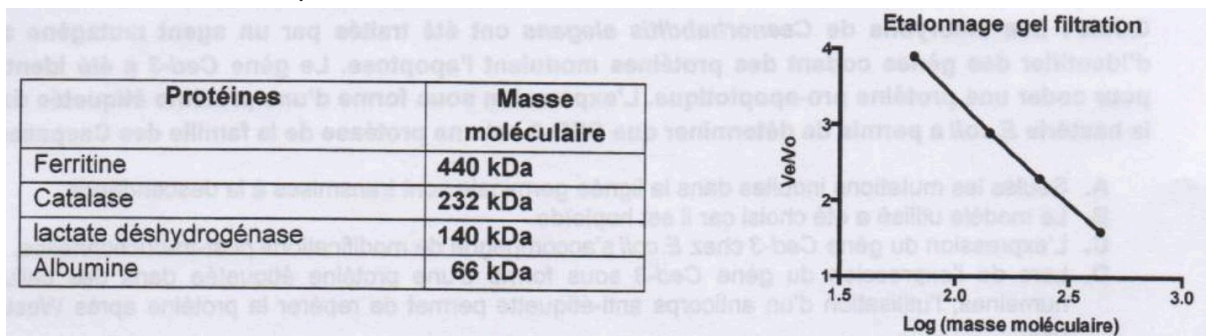
- A. L'IGF-1 seul, comme E2 seul, inhibe de façon statistiquement significative le taux d'ARNm du RE α par rapport à la condition contrôle.
- B. Par rapport au contrôle non traité, l'expression protéique du RE α est diminuée en présence de l'association IGF-1 et E2, alors que l'expression de la protéine constitutive (actine) est stable.
- C. Ces résultats montrent que IGF-1 est un ligand du RE α .
- D. L'association E2 et IGF-1 inhibe de façon statistiquement significative le taux d'ARNm du RE α par rapport au contrôle non traité.
- E. Le traitement par IGF-1 permet d'augmenter l'effet inhibiteur de E2 sur l'expression de RE α , tant au niveau de son ARNm qu'au niveau protéique.

QCM7 - Afin d'étudier les domaines N-terminal et C-terminal de la protéine p27 (198 acides aminés), des expériences de GST-pull down sont réalisées. Pour cela, quatre constructions ont été réalisées pour produire, soit la GST, soit la protéine p27 étiquetée GST, soit la portion de p27 correspondant aux acides aminés 1 à 87 en fusion avec la GST, soit la portion de p27 correspondant aux acides aminés 88 à 198 en fusion avec la GST. Les protéines purifiées sont ensuite incubées avec des billes liant les protéines GST et avec un extrait protéique. Après lavage, les complexes formés sur les billes sont analysés en Western blot grâce à un anticorps dirigé contre la Citron kinase (anti-CitronK), ou un anticorps dirigé contre la GST (anti-GST). L'extrait protéique utilisé est également analysé en Western blot avec l'anticorps dirigé contre la Citron kinase.



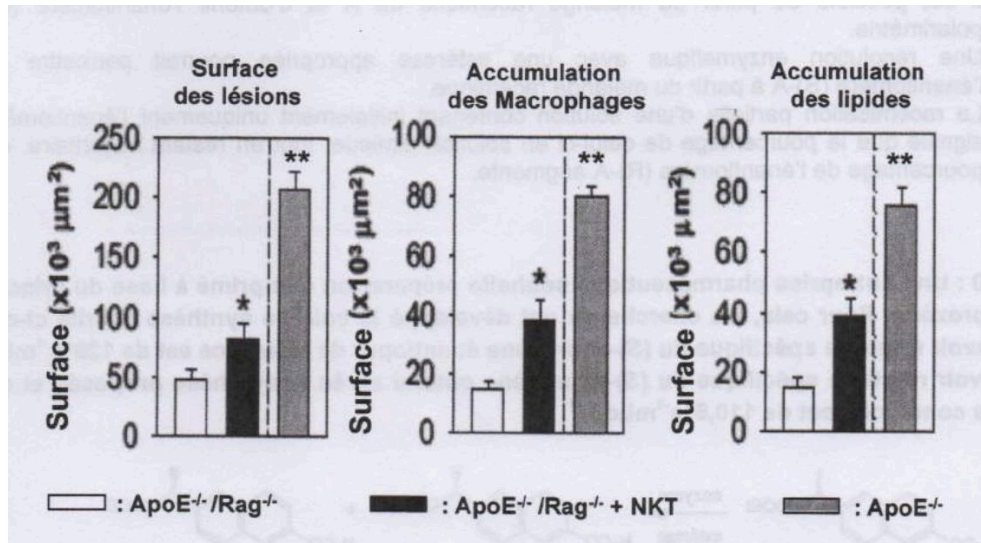
- Cette expérience montre que la Citron Kinase interagit avec p27.
- Cette expérience montre que la Citron kinase interagit avec la GST.
- Cette expérience montre que seule la partie N-terminale de la Citron Kinase interagit avec p27.
- Cette expérience indique que le domaine d'interaction entre p27 et Citron Kinase est situé entre les acides aminés 88 et 198 de p27.
- L'interaction entre les billes et les protéines GST implique du glutathion.

QCM 8 - Une colonne de chromatographie d'exclusion a été étalonnée avec le mélange de protéines présentées dans le tableau ci-dessous. Le volume mort (V_0) de la colonne de gel filtration (mesuré avec une solution de bleu dextran) correspond à un volume de 10 mL. Après mesure des volumes d'élution (V_e) obtenus pour les différentes protéines, le graphe d'étalonnage de la colonne a été tracé, et vous est donné ci-dessous.



- La ferritine est la protéine qui a le volume d'élution le plus grand.
- L'albumine a un volume d'élution proche de 40 mL.
- Une protéine monomérique de masse moléculaire de 150 kDa aura un V_e/V_0 supérieur à 3.
- Cette colonne permettra de séparer les IgG(s) et les IgM(s) présentes dans le sérum d'un animal immunisé.
- Ce type de chromatographie utilise un support portant des charges positives permettant des interactions ioniques.

QCM 11 - Des chercheurs souhaitent évaluer le rôle des lymphocytes NKT dans la genèse des lésions (des plaques) d'athérosclérose dans la paroi des vaisseaux. Ils ont utilisé des souris ApoE^{-/-} qui ont un système immunitaire normal et qui développent de l'athérosclérose sous régime gras. Ces souris ont été croisées avec des souris Rag^{-/-} génétiquement déficientes en lymphocytes B, T et NKT, afin d'obtenir des souris ApoE^{-/-} Rag^{-/-} dépourvues de ces populations lymphocytaires. Des souris ApoE^{-/-} Rag^{-/-} ou ApoE^{-/-} ont été soumises à un régime gras, et les souris ApoE^{-/-}/Rag^{-/-} ont reçu, ou non, une injection de lymphocytes NKT provenant de souris sauvages. Après le sacrifice des souris, trois paramètres caractérisant la surface des plaques d'athérosclérose ont été mesurés : la surface totale des lésions, la surface lésionnelle contenant des macrophages, la surface d'accumulation des lipides. * et ** = Différences statistiquement significatives par rapport aux souris ApoE^{-/-} Rag^{-/-} non injectées par les NKT.



- A. Les lymphocytes B et/ou T n'ont pas d'influence sur le développement des lésions d'athérosclérose.
- B. Les lymphocytes T diminuent la surface des lésions d'athérosclérose.
- C. Les NKT participent au développement des plaques d'athérosclérose.
- D. Les NKT ont besoin des lymphocytes B pour l'accumulation des lipides dans les plaques d'athérosclérose.
- E. Les lymphocytes NKT n'interviennent pas dans l'accumulation des macrophages au niveau de la Clube plaque d'athérosclérose.

QCM 13 - Des souris immunisées, ou non (Excipient) avec du collagène de type II, sont injectées avec un récepteur soluble de l'IL6 (IL6R). L'incidence et la sévérité (nombre de pattes atteintes et score) de l'arthrite articulaire sont évaluées. Les résultats sont résumés dans le tableau ci- dessous:

Injection	Souris avec arthrite/ souris injectées	Incidence %	Nombre de pattes atteintes/souris	Score
Excipient	0/15	0	0	0
Collagène II	9/14	64	3	9
Collagène II + IL6R	6/33	18	1	3

- A. Dans ce protocole expérimental, l'injection de collagène s'accompagne d'une inflammation des articulations conduisant à l'activation de lymphocytes.
- B. Cette expérience indique que l'injection du récepteur soluble de l'IL6 (IL6R) favorise l'arthrite articulaire.
- C. Cette expérience suggère un rôle pro-inflammatoire de l'IL6 favorisant l'arthrite articulaire consécutive à l'injection de collagène.
- D. Cette expérience suggère une interaction directe entre le récepteur soluble de l'IL6 (IL6R) et le collagène de type II.
- E. Suite à l'injection de collagène de type II, 36% de souris ne développent pas d'arthrite articulaire.

Correction

QCM 3 - CDE

- A. Cela ne nous donne pas d'information sur la localisation cytoplasmique de SDF-1. Cependant, on remarque que cette protéine est sécrétée et que la transfection avec le plasmide 1 augmente cette sécrétion.
- B. Le plasmide 1 ne contenant pas ce gène de résistance, les cellules transfectées par le plasmide 1 seraient détruites.
- C. (VRAI) Les deux plasmides contiennent tous deux le gène de résistance à l'ampicilline et ont bien un promoteur procaryote. Cet antibio sera donc utilisable.
- D. (VRAI) En effet, le promoteur eucaryote permettra l'expression d'ARN interférent, et le Western Blot permet de confirmer cette inhibition ; la bande en T2 étant plus fine qu'en NT.
- E. (VRAI) Là aussi, la comparaison des tailles des bandes en SNT et T1 signe une augmentation de la sécrétion pour les cellules transfectées.

QCM 4 - BCE

- A. Les CSM sont des eucaryotes, ils n'exprimeront pas le gène de résistance à l'ampicilline puisque le promoteur est procaryote. Il faudra donc utiliser la puromycine.
- B. (VRAI) Les CSM qui sont injectés à l'animal ont intégré le transgène. Tant qu'ils seront viables, ils exprimeront le transgène. De plus, le transgène est sous la dépendance d'un promoteur eucaryote constitutif, c'est-à-dire que le gène pourra s'exprimer chez toutes les cellules eucaryotes.
- C. (VRAI) La thérapie génique ex vivo, consiste à modifier des cellules à l'extérieur du corps et à les réinjecter dans un individu. C'est exactement la démarche ici.
- D. Il s'agit de l'injection de cellules somatiques. Le transgène restera dans ces cellules et ne sera en aucun cas transmis à la descendance. Il aurait fallu modifier des cellules germinales pour qu'il y ait transmission (par exemple : la transgénèse additive).

QCM 5 - BDE

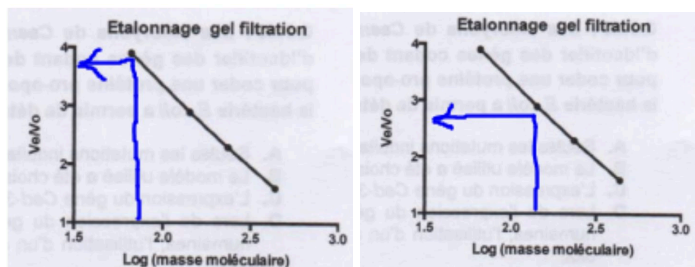
- A. D'après la figure A, E2 seul inhibe de façon significative (présence de *) mais pas IGF-1 seul (pas de * au-dessus de sa colonne) . Attention aux petits symboles représentant la p-value !
- B. (VRAI) En effet, c'est la figure B qui le montre avec les traits les plus à droite ou il y a les 2 + en
- C. Ces expériences ne permettent pas de conclure ceci.
- D. (VRAI) D'après la figure A. Attention là aussi aux symboles.
- E. (VRAI) En effet, dans les deux figures, l'effet de l'E2 semble potentialisé par la présence d'IGF-1 tant sur le taux d'ARNm qu'au niveau de l'expression protéique.

QCM 7 - ADE

- A. (VRAI) Le GST-pull down montre bien que les billes liant le GST ont aussi lié la Citron Kinase (CK) puisqu'il y a une bande avec les anti-CitronK à la ligne de la GST-p27.
- B. Il n'y a pas de bande à la ligne de la GST avec les anti-CK donc pas d'interaction entre GST et la CK.
- C. La partie N-terminale correspond à la protéine GST-p27(1-87), or pas de bande avec les anti-CK donc pas d'interaction. C'est la partie C term de la protéine GST (88 - 198) qui interagit avec la citron Kinase.
- D. (VRAI) La protéine GST-p27(88-129) interagit avec la CK puisqu'il y a une bande.
- E. (VRAI) En effet GST signifie glutathion S-transférase et implique donc du glutathion.

QCM 8 - BD

- A. C'est une chromatographie d'exclusion, les grosses protéines ne rentreront pas dans toutes les petites aspérités et seront donc éluées en premier. La ferritine a le volume d'élué le plus petit.
- B. (VRAI) On part du poids moléculaire de l'albumine, 66 kDa donc on a un $\text{Log}(66) \approx 1,8$ parce qu'on se rappelle que $\text{Log}(100)=2$! De là, on reporte sur le schéma et on trouve $V_e/V_0 \approx 4$ (Je vous ai fait un petit schéma ci-contre). On nous donne V_0 donc ensuite petite équation et on tombe sur V_e qui est grosso modo égal à 40 ml.



Autre réflexion de correction : On remarque que plus la masse moléculaire est importante, plus la courbe descend ce qui signifie que le plus le volume d'élué est bas (car $V_e = \text{Volume élué} / V_0 = \text{volume mort}$, donc V_0 est ici une constante, seul V_e varie donc si la courbe diminue, cela veut forcément dire que V_e diminue). Donc plus le volume d'élué est petit, plus la protéine est grosse. A partir de là, je regarde le tableau avec les différents poids moléculaire des protéines et je les classe chacune sur un point de la courbe. Le point le plus haut sera donc l'albumine, puis la lactate, la catalase et la ferritine en dernier. Ensuite, par rapport au calcul de 40mL, je le "devine" en sachant que $V_0 = 10\text{mL}$, on sait que $V_e/V_0 = 4$ (pour deviner la valeur de V_e à 4) $\Rightarrow V_e/10 = 4$ fait de tête 40 ! (on peut se dire pour simplifier que $10 = 1$ sans oublier de rajouter la dizaine apres.. , donc ça fait $V_e/1 = 4$, ça semble plus facile ! puis on rajoute les x10 qu'on a enlevé pour simplifier 10 en 1 !). Comme V_0 est en mL, je suppose que V_e aussi ! On sait également grâce aux points sur la courbe que le point le plus haut correspond à l'albumine. On peut donc conclure que l'albumine a un V_e de 40 mL.

C. C'est un peu la même démarche. Un poids moléculaire de 150 kDa fera un Log plus grand que $\text{Log}(100)$ donc on se place après 2 en abscisse ce qui donne un V_e/V_0 inférieur à 3.

OU autre réflexion : on sait qu'une protéine qui aura un PM de 150 kDa sera entre la lactate et la catalase sur la courbe. On regarde ce que à quoi ça correspond sur V_e/v_0 et on voit que c'est à peu près inférieur à 3.

- D. (VRAI) Une chromatographie d'exclusion est assez fine, elle permettra bien de séparer les IgG (150 kDa) des IgM (1000 kDa) selon leur poids moléculaire.
- E. La proposition évoque une chromatographie échangeuse d'ions. La chromatographie d'exclusion utilise des billes poreuses apolaires. Pour le coup c'est la taille qui compte.

QCM 11 - C

- A. On voit que les souris génétiquement déficientes en LB, LT et LNKT développent moins d'athérosclérose que les souris non déficientes : les LB et LT ont donc de l'influence sur les lésions.
- B. Voir le 1er schéma, la surface des lésions est augmentée avec les LB et LT.
- C. (VRAI) En rajoutant les NKT, les plaques d'athérosclérose augmentent (ApoE^{-/-}, Rag^{-/-} + NKT)
- D. En effet, dans les colonnes noires il n'y a pas de LB ni T et pourtant en rajoutant des NKT il y a accumulation de lipides dans les plaques (dernier schéma)
- E. Schéma du milieu, les NKT ajoutés aux cellules ApoE^{-/-}, Rag^{-/-} entraîne une augmentation de l'accumulation des macrophages par rapport à la colonne blanche représentant les mêmes cellules sans NKT.

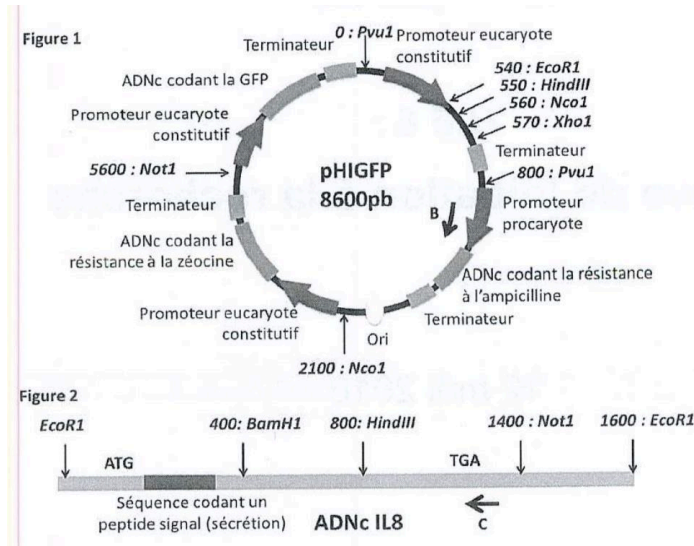
QCM 13 - ACE

- A. (VRAI) Injection de Collagène II → le score d'arthrite augmente.
- B. Entre injection collagène seule et injection coll II + IL6R il y a une diminution du score d'arthrite, on peut donc dire que l'injection du récepteur soluble de l'IL6 diminue l'arthrite articulaire.
- D. Il n'y a pas de notion d'interaction entre l'IL6R et le collagène II dans cette expérience.
- E. (VRAI) 100% - 64% (qui développent) = 36% (qui ne développent pas d'arthrite).

Maraîchers 2015-2016

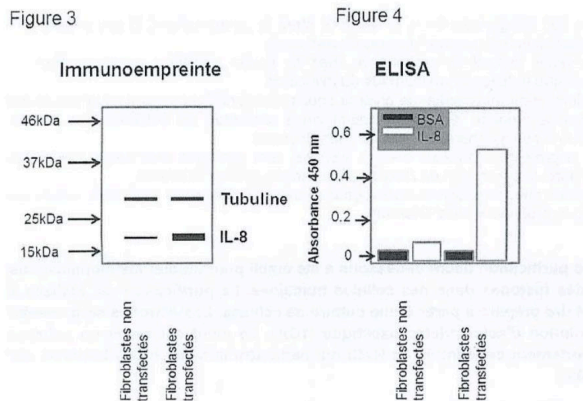
QCM 2 - Les chercheurs veulent montrer que l'interleukine 8 (IL-8) est pro tumorale. Pour cela, ils ont besoin de cellules génétiquement modifiées capables de produire et sécréter de l'IL-8. Ils vont donc construire un plasmide exprimant l'ADNc de l'IL-8 et le transfecter dans des fibroblastes humains.

Pour construire le plasmide recombinant ils coupent le plasmide pHIGFP (figure 1) par *EcoR1* et y insèrent l'ADNc (Figure 2).



- A. La stratégie de clonage proposée est dite non orientée.
- B. Un ADNc correspond à la séquence entre le codon d'initiation de la traduction et le codon stop.
- C. L'orientation de l'ADNc IL-8 dans le plasmide réalisé pourra être vérifiée par une digestion par *HindIII*.
- D. Les cellules humaines génétiquement modifiées peuvent être sélectionnées par la zéocine.
- E. La séquence codant un peptide signal sert à la localisation nucléaire de l'IL-8.

QCM3. Les fibroblastes génétiquement modifiés précédemment sont mis en culture. Le surnageant de culture est prélevé. Les chercheurs ont aussi extrait les protéines des cellules. Les chercheurs ont évalué la présence d'IL-8 dans les extraits protéiques et dans le surnageant par respectivement une immunoempreinte (Western Blot) (figure 3) et un test ELISA spécifique de l'IL-8 ou de la BSA (albumine bovine sérique) (figure 4).



- A. L'immunoempreinte et l'ELISA sont deux techniques nécessitant l'utilisation d'anticorps.
- B. Les fibroblastes non transfectés expriment l'IL-8.
- C. L'IL-8 est séquestrée à l'intérieur des cellules génétiquement modifiées.
- D. Les cellules génétiquement modifiées expriment la tubuline.
- E. Les cellules génétiquement modifiées en culture peuvent être repérées par microscopie à fluorescence.

QCM 4 - A partir du plasmide construit QCM 2, les chercheurs ont isolé la construction correspondant à l'IL-8 par digestion enzymatique. Ils ont utilisé ce fragment d'ADN afin de réaliser la transgénèse additive chez des souris.

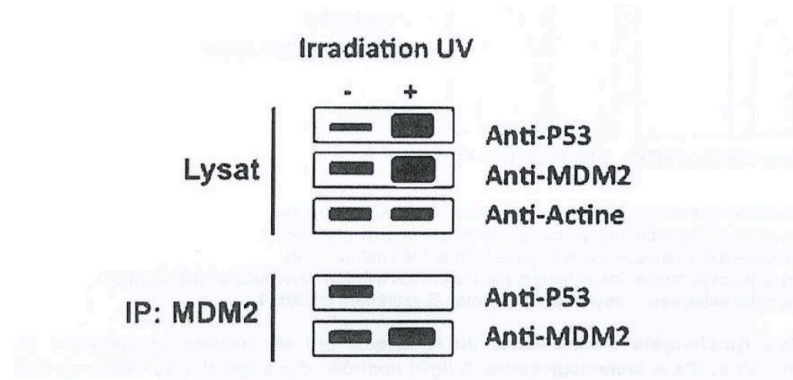
- A. Une digestion Pvu1 a pu être réalisée pour isoler la construction codant l'IL-8.
- B. Pour réaliser de la transgénèse additive, les chercheurs ont dû utiliser des blastocystes.
- C. Les souriceaux ont pu être testés pour savoir s'ils sont transgéniques par PCR en utilisant les amorces B et C placées sur les figures 1 et 2 du QCM 2.
- D. Tous les souriceaux transgéniques peuvent exprimer l'IL-8 dans les cellules de leurs queues.
- E. Tous les souriceaux transgéniques peuvent sécréter l'IL-8 dans leur sang.

QCM 7 - Vous désirez purifier à partir d'un lysat bactérien, une protéine recombinante étiquetée GST qui a les caractéristiques physico-chimiques suivantes (Masse moléculaire: 60 kDa; pI: 4,5).

- A. Cette protéine peut être purifiée par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes.
- B. Si le tampon de purification utilisé a un pH de 8, la protéine pourra être fixée sur une colonne échangeuse d'anions.
- C. Si la protéine existe sous forme de monomère et de trimère dans l'extrait total, l'utilisation d'une chromatographie d'exclusion permettra de séparer les deux formes de cette protéine.
- D. La purification de la protéine sur une colonne d'affinité réalisée avec une matrice de glutathion met en jeu des liaisons covalentes entre la matrice et la GST.
- E. Une étape de chromatographie d'affinité sur une colonne couplée avec des anticorps anti-GST peut être réalisée pour purifier cette protéine.

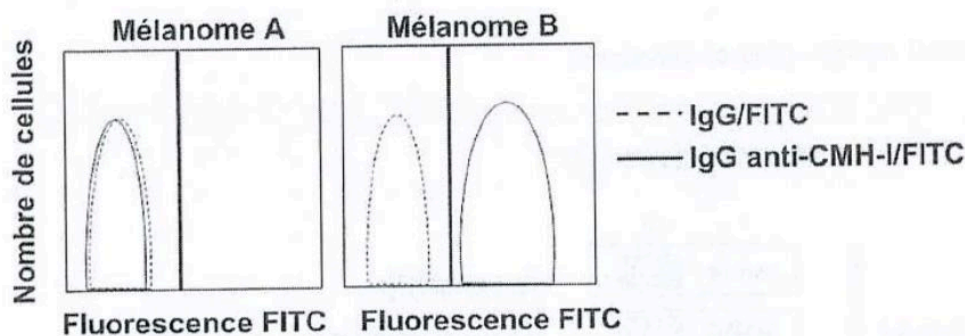
QCM 8 - L'interaction de la protéine P53 avec MDM2 est étudiée dans des cellules irradiées (+) ou non (-) par les UVs. Pour cela, une immunoprécipitation avec des anticorps anti-MDM2 et des billes de sépharose sur lesquelles des protéines A ont été couplées, a été réalisée sur les lysats cellulaires. Les lysats et les immunoprécipitats ont été déposés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis un western blot a été réalisé à l'aide d'anticorps anti-P53, anti-MDM2 et anti-Actine.

Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :



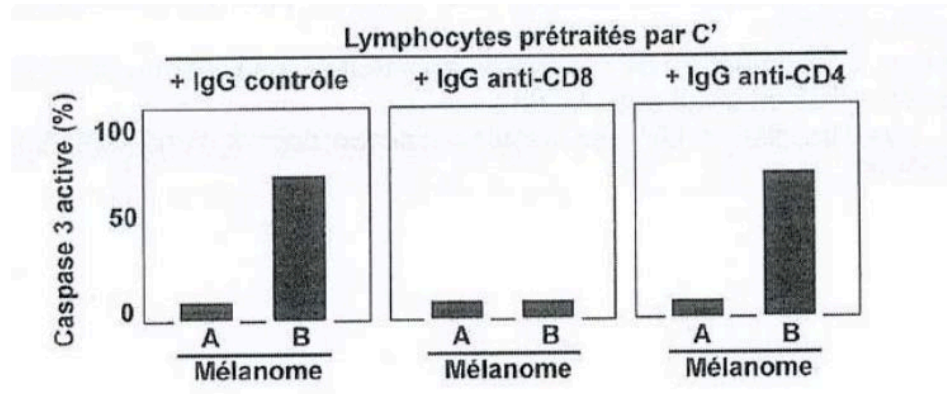
- A. L'analyse de MDM2 dans les lysats permet de vérifier qu'une même quantité de protéine a été déposée dans les deux conditions expérimentales.
- B. Cette expérience met en évidence que l'irradiation des cellules par les UV induit une augmentation de l'expression de P53.
- C. Lors de l'immunoprécipitation, le fragment Fc de l'anticorps anti-MDM2 est reconnu par P53.
- D. Dans les cellules non irradiées, P53 interagit avec MDM2.
- E. Cette expérience montre que l'irradiation UV des cellules s'accompagne d'une inhibition de l'interaction entre P53 et MDM2.

QCM 9 - Des cellules de mélanome A et B ont été incubées en présence d'un anticorps monoclonal contrôle IgG1 de souris (IgG/FITC) ou d'un anticorps monoclonal IgG1 produit chez des souris de même fond génétique (souche consanguine H2) et dirigé contre les antigènes du CMH-I (IgG anti-CMH-I/FITC). Les deux anticorps sont couplés au FITC, un fluorochrome vert. Les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux:



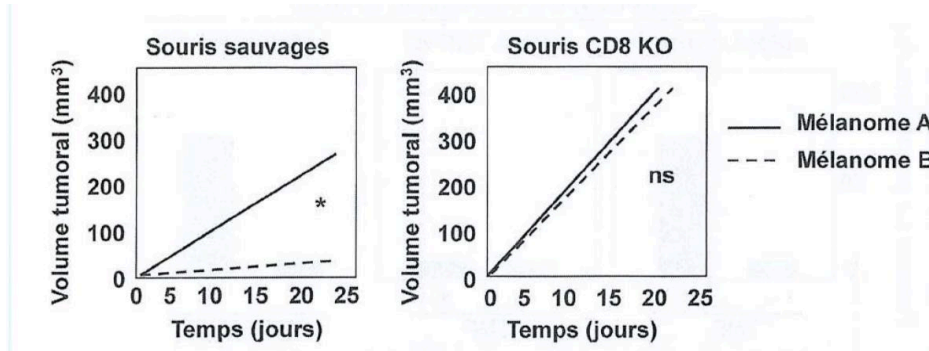
- A. Dans cette expérience, les anticorps utilisés ont le même isotype.
- B. Dans cette expérience, les anticorps utilisés ont le même paratope.
- C. Dans cette expérience, les anticorps utilisés ont les mêmes Fab.
- D. Dans cette expérience, les anticorps utilisés ont les mêmes déterminants allotypiques.
- E. Dans cette expérience, seuls les mélanomes B expriment le CMH-I.

QCM 10 - Des lymphocytes T spécifiques du mélanome ont été incubés en présence de complément (C') et d'une immunoglobuline G (IgG) contrôle, d'une IgG dirigée contre le CD8 (IgG anti-CD8) ou d'une IgG dirigée contre le CD4 (IgG anti-CD4). Après lavage, les lymphocytes ont été ensuite co-cultivés en présence des cellules de mélanome A et B pendant 4 heures. Le pourcentage de cellules de mélanome ayant une activation de la caspase-3 a été déterminé par cytométrie en flux :



- A. Dans cette expérience, les cellules de mélanome B sont sensibles à l'apoptose induite par les lymphocytes T.
- B. L'incubation des lymphocytes en présence d'IgG anti-CD8 et de complément s'accompagne de la mort des lymphocytes T exprimant CD8.
- C. Dans cette expérience, les cellules de mélanome B meurent en réponse à l'IgG anti-CD4.
- D. Cette expérience illustre que les lymphocytes T exprimant le CD8 sont capables de tuer les cellules de mélanome B.
- E. Cette expérience illustre que les lymphocytes T exprimant le CD8 n'activent pas la caspase 3 dans les cellules de mélanome A.

QCM 11 - Des cellules de mélanome A (trait plein) ou de mélanome B (trait en pointillés) ont été injectées chez des souris sauvages (Figure de gauche) ou des souris déficientes en lymphocytes T CD8 (Souris CD8 KO; Figure de droite). La croissance tumorale a été évaluée par mesure du volume tumoral aux jours indiqués. (* indique des différences significatives; ns indique que les différences ne sont pas significatives) :



- A. Dans cette expérience, la croissance tumorale des cellules de mélanome B est augmentée chez les souris CD8 KO en comparaison aux souris sauvages.
- B. Dans cette expérience, chez les souris sauvages, la croissance tumorale des cellules de mélanome B est significativement réduite en comparaison aux cellules de mélanome A.
- C. Cette expérience suggère que le CD8 favorise la croissance tumorale des cellules de mélanome A.
- D. Cette expérience suggère que les lymphocytes T exprimant le CD8 inhibent la croissance tumorale des cellules de mélanome B.
- E. Les différences de croissance tumorale chez les souris sauvages pourraient être liées à une différence de sensibilité des cellules de mélanome A et B vis-à-vis des lymphocytes T exprimant le CD8.

Correction

QCM 2 - AD

- A. (VRAI) On parle de clonage non orienté quand on digère un vecteur (plasmide) et un ADNc avec une seule et même enzyme de restriction. Les extrémités seront toutes compatibles, et l'ADNc pourra alors s'insérer dans les deux sens: on pourra donc avoir un vecteur vide (qui n'a pas inséré l'ADNc), un vecteur sens (avec l'ADNc dans le sens du promoteur), ou un vecteur antisens (avec l'ADNc dans le sens inverse).
- B. Il comprend aussi ce qu'il y a avant et ce qu'il y a après.
- C. Non car le site de clivage par HindIII est situé exactement au milieu de l'ADNc. Donc après clivage, la taille des segments obtenus sera la même, quelque soit l'orientation de l'ADNc dans le plasmide.
- D. Oui car l'ADNc codant la résistance à la zéocine est précédé d'un promoteur eucaryote.
- E. Non, l'interleukine n'est jamais retrouvée dans le noyau : son ARNm est exporté dans le cytoplasme où il va y avoir traduction, et l'interleukine va finalement être sécrétée par la cellule (en extracellulaire donc).

QCM 3 - ABDE

A. (VRAI) L'immunoempreinte (= western blot) consiste à faire premièrement une séparation des protéines selon leur poids moléculaire (grâce à une SDS - Page) puis à déposer ces protéines sur un filtre. Des Ac (primaire, puis secondaire) seront ensuite ajoutés sur le filtre et iront reconnaître les protéines d'intérêt. Cela permet donc de connaître le poids moléculaire d'une protéine et de la détecter grâce à des Ac. L'Elisa permet un dosage spécifique d'AC ou d'Ag grâce à l'incubation d'AC et/ou d'Ag.

B. (VRAI) On observe bien une marque, qui est certes en plus petite quantité mais néanmoins présente !

C. La technique ELISA se base sur la détection d'Ag ou d'AC qui sont sécrétés, c'est à dire libérés à l'extérieur de la cellule. Ainsi on remarque sur la figure 4 des pics correspondant à l'IL8, qui est d'ailleurs encore plus haut chez les cellules transfectées DONC on peut conclure que les cellules transfectées sécrètent de l'IL8.

D. (VRAI) On remarque la présence du trait (cf Immunoempreinte = Western Blot), et en même quantité que celles non modifiées.

E. (VRAI) Car comme on constate sur la figure du QCM précédent, le plasmide transfecté contient un ADNc codant la GFP précédé d'un promoteur eucaryote. La GFP sera donc exprimée par ces fibroblastes (organisme eucaryote) en culture, et visible en microscopie à fluorescence.

QCM 4 - ADE

A. (VRAI) Car il y a au niveau du plasmide deux sites de clivage par Pvu1, situés de part et d'autre du plasmide : un juste avant le promoteur, un juste après le terminateur. On peut donc récupérer l'entièreté de l'ADNc de IL8 grâce à cette enzyme.

B., car la transgénèse additive a lieu sur un ovules fécondés, c'est-à-dire avant la fusion des noyaux mâles et femelles. Les blastocytes sont des cellules qui apparaissent chez le zygote (organisme qui naît à partir de la fusion des noyaux mâle et femelle).

C., l'amorce B est trop en aval (après)de la séquence, elle ne peut donc pas la lire. L'amorce C part du milieu de la séquence, ce n'est donc pas possible non plus.

D et E.Vrai, le promoteur codant l'ADN de IL8 est un promoteur eucaryote constitutif, ce qui signifie que toute les cellules pourront exprimer l'IL8 ainsi que la sécréter car l'étiquette de sécrétion est collée à la séquence codante et elles sont toutes 2 soumises au même promoteur.

QCM 7 - BCE

A., car L'électrophorèse ne permet pas la purification mais seulement de séparer les protéines par taille. La purification peut notamment se faire par une chromatographie.

B. (VRAI) Car la colonne échangeuse d'anions retient les anions. A pH = 8 > pI prot = 4,5 donc la protéine est chargée négativement. Une colonne échangeuse d'anion veut dire que la résine est positive donc la protéine pourra se fixer.

C. (VRAI) Le trimère étant plus gros sortira plus rapidement que le monomère qui sortira après. Le monomère a donc un volume d'élution beaucoup plus important que le trimère.

D., ce sont des liaisons faibles, réversibles et spécifiques. Ce ne sont pas des liaisons covalentes sinon on ne pourrait pas les décrocher.

E. (VRAI) Si on met fixe dans la colonne des AC anti-GST, lorsque les protéines étiquetées GST passeront , elles seront captées par ces Ac.

QCM 8 - BDE

A. Car, on remarque que les traits montrant la quantité de MDM2 dans le lysat et dans l'IP n'est pas la même. La bande avec irradiation possède un taux plus élevé de MDM2 car elle est plus épaisse. Par contre, l'actine est un bon témoin car ses quantités ne bougent pas, c'est donc elle qu'il faut regarder.

B. (VRAI) En comparant les lysats avec et sans irradiation dans la ligne avec « anti-P53 » on observe que la bande est plus épaisse avec irradiation donc que les UV induisent une augmentation de l'expression de P53.

C., lors de l'immunoprécipitation, le fragment Fab de l'anticorps anti-MDM2 reconnaît la protéine MDM2 qui sera ou non accrochée à la protéine p53.

D. (VRAI) En observant dans les immunoprécipitats des cellules non irradiées, on note la présence à la fois de la protéine p53 et de la protéine MDM2 par présence de bandes dans les deux lignes. Les deux protéines interagissent donc entre elles.

E. (VRAI) Dans les immunoprécipitats des cellules irradiées on note la disparition de la bande pour la protéine p53 elle n'interagit donc plus avec la protéine MDM2.

QCM 9 - ADE

A. (VRAI) En effet d'après le texte les deux AC utilisés proviennent de la souris donc de la même espèce ce qui correspond à l'isotypie.

B. Le paratope correspond à la partie de l'AC qui reconnaît l'épitope. Les deux AC utilisés ne reconnaissent pas la même chose, l'un est contrôle et l'autre dirigé contre le CMH- 1 donc les deux AC n'ont pas le même paratope.

C. Le fragment Fab contient le paratope qui reconnaît l'épitope ; comme pour la question précédente les deux AC ne reconnaissent pas la même chose donc ils n'ont pas le même fragment Fab.

D. (VRAI) D'après le texte, les souris utilisées pour produire les deux AC différents possèdent le même fond génétique donc les deux AC utilisés ont le même déterminant allotypique. (HP selon moi)

E. (VRAI) D'après la cytométrie du mélanome B, l'IgG anti CMH-1 est présent ce qui n'est pas le cas pour le mélanome B. Cet IgG reconnaît spécifiquement le CMH-1 donc seuls les mélanomes B expriment le CMH-1

QCM 10 - ABDE

A. (VRAI) En observant la première colonne (IgG contrôle) correspondant à l'absence d'inhibition de la population lymphocytaire, le mélanome B exprime d'avantage la caspase 3 active ce qui est un signe d'apoptose donc les cellules sont sensibles à l'apoptose induite par les lymphocytes T.

B. (VRAI) Les IgG anti-CD8 ciblent spécifiquement les lymphocytes T exprimant le CD8. L'ajout de complément entraîne une destruction et la mort des lymphocytes T par les IgG.

C. En observant les colonnes avec ajout d'IgG contrôle et IgG anti-CD4, on observe des résultats similaires donc on ne peut pas conclure que l'IgG anti-CD4 induit la mort des cellules de mélanome puisque même en son absence les cellules de mélanome B meurent. D. (VRAI) On observe qu'en présence d'IgG anti-CD8 (ce qui fait disparaître les LT CD8) les caspases ne sont pas activées donc l'apoptose ne se fait pas alors qu'en présence d'IgG contrôle (présence de LT CD8) les caspases sont activées pour le mélanome B donc les LT CD8 sont capables de tuer les cellules de mélanome B.

E. (VRAI) Comme la question précédente, la caspase 3 n'est pas d'avantage activée pour l'IgG contrôle (présence de LT CD8) que pour l'IgG anti-CD8 (absence de LT CD8) pour le mélanome A donc on peut conclure que les LT CD8 n'activent pas la caspase 3 dans les cellules de mélanome A.

QCM 11 - ABDE

- A. (VRAI) En comparant les deux traits en pointillés on observe que le mélanome B a une croissance augmentée chez les souris CDK8 KO (tableau de droite) par rapport aux souris sauvages (tableau de gauche).
- B. (VRAI) En regardant le tableau de gauche uniquement (souris sauvages), le mélanome A possède une croissance tumorale significativement supérieure à celle du mélanome B d'où le symbole « * ».
- C. C'est le contraire, en absence de CD8 la croissance tumorale est plus importante donc le CD8 inhibe la croissance tumorale des cellules de mélanome A.
- D. (VRAI) En comparant les deux schémas, le mélanome B se développe moins bien chez les cellules sauvages donc qui possèdent un lymphocyte T exprimant le CD8.
- E. (VRAI) C'est une hypothèse, les deux mélanomes ne croient pas à la même vitesse chez les souris sauvages ce qui pourrait être lié à une différente sensibilité.

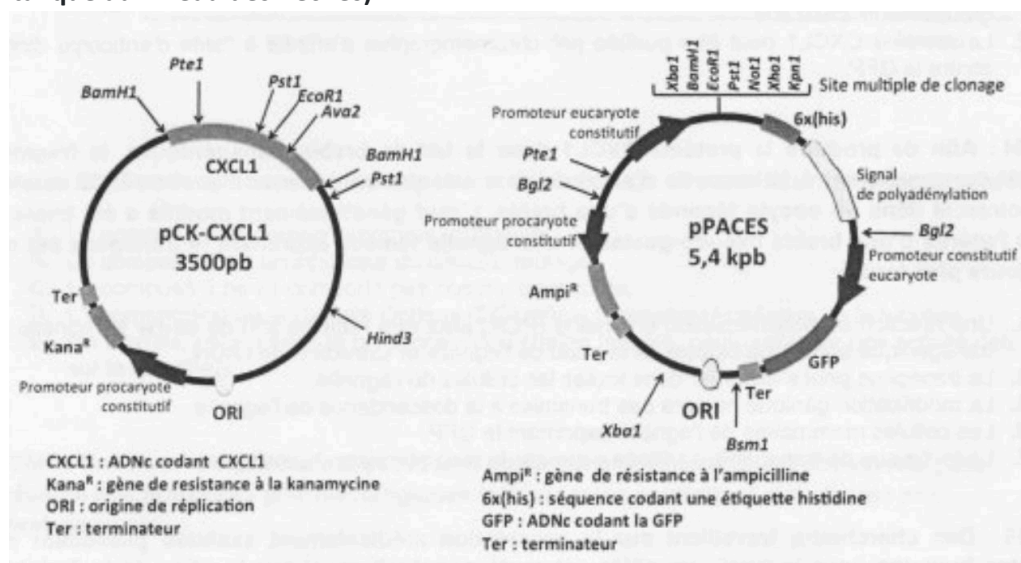
QCMs 13/14/15 : HP

Maraîchers 2016-2017

Les QCM 1 à 4 portent sur la chimiokine CXCL1.

Afin d'étudier la chimiokine CXCL1, un vecteur d'expression a été construit à partir des deux vecteurs dont les cartes sont présentées ci-dessous. Pour cela, les deux vecteurs ont été digérés par l'enzyme de restriction BamH1. Le vecteur pPACES linéarisé et le fragment correspondant à l'ADNC complet de CXCL1 ont été ensuite purifiés et incubés avec une ligase. Le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries. Le vecteur recombinant permettant l'expression de CXCL1 est sélectionné sur un milieu de culture spécifique. Il est à noter que l'ADNc de CXCL1 contient une séquence codant une séquence signal permettant la sécrétion de CXCL1 dans le milieu de culture des cellules eucaryotes qui l'expriment.

Cartes des vecteurs utilisés pour le clonage de CXCL1 (les sites de restriction sont indiqués en italique au niveau des flèches)



QCM 1 - A propos de la stratégie de clonage de la totalité de l'ADNC codant CXCL1 :

- A. Afin de réaliser un clonage orienté, les enzymes BamH1 et Pst1 peuvent être utilisées.
- B. La sélection des vecteurs recombinants permettant l'expression de CXCL1 est effectuée sur un milieu contenant de l'ampicilline et de la kanamycine.
- C. Le sens d'insertion de CXCL1 dans le vecteur peut être déterminé par une digestion à l'aide de l'enzyme Pte1.
- D. Afin de pouvoir exprimer CXCL1 avec une étiquette histidine, le cadre de lecture de l'ADNc doit être en phase avec la séquence codant l'étiquette histidine.
- E. CXCL1 est produite et sécrétée par les bactéries qui l'expriment.

QCM 2 - Après vérification de sa séquence, le vecteur recombinant permettant l'expression de CXCL1 est transfecté dans des cellules eucaryotes :

- A. Pour être génétiquement modifiées, les cellules peuvent être transfectées à l'aide d'une solution de phosphate de calcium.
- B. Le vecteur recombinant permet l'obtention de l'ARN messager de CXCL1 possédant une queue polyA.
- C. Les cellules transfectées sont résistantes à l'ampicilline.
- D. Les cellules transfectées expriment la GFP.
- E. Les cellules exprimant la GFP peuvent être triées par cytométrie en flux.

QCM 3 - A propos de la protéine CXCL1 étiquetée 6(his) produite par les cellules transfectées :

- A. La protéine CXCL1 étiquetée 6(his) peut être purifiée à partir du surnageant de culture des cellules transfectées.
- B. La quantité de CXCL1 produite par les cellules transfectées peut être déterminée en analysant par ELISA le milieu de culture.
- C. La protéine CXCL1 peut être purifiée par une chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps dirigés contre l'étiquette 6(his).
- D. La protéine CXCL1 peut être purifiée par chromatographie d'affinité sur support greffé par des groupements imidazole.
- E. La protéine CXCL1 peut être purifiée par chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps dirigés contre la GFP.

QCM 4 - Afin de produire la protéine CXCL1 dans le lait de brebis transgéniques, le fragment d'ADN correspondant à la cassette d'expression a été obtenu par une digestion Bgl2 et a été micro injecté dans un ovocyte fécondé d'une brebis. L'œuf génétiquement modifié a été implanté dans l'utérus d'une brebis pseudo-gestante. Une agnelle femelle exprimant le transgène est née 152 jours plus tard :

- A. Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) peut être réalisée afin de savoir si l'agnelle est transgénique après une biopsie de la peau de l'agnelle et extraction de l'ADN.
- B. Le transgène peut s'exprimer dans toutes les cellules de l'agnelle.
- C. La modification génique ne sera pas transmise à la descendance de l'agnelle.
- D. Les cellules mammaires de l'agnelle expriment la GFP.
- E. La technique de transgénèse utilisée s'appelle la recombinaison homologue.

QCM 5 - Des chercheurs travaillant sur la procréation médicalement assistée possèdent des zygotes humains pour lesquels un allèle est muté ponctuellement sur le gène de la B-globine (341-42), causant la B-thalassémie. Ils veulent modifier le génome de ces zygotes par la stratégie CRISPR/Cas9 afin d'obtenir des embryons dépourvus de la mutation :

- A. Dans cette stratégie, l'ARN guide utilisé doit porter une séquence s'appariant de façon complémentaire et antiparallèle à l'ADN du gène de la B-globine et une séquence liant la Cas9.
- B. Le système CRISPR/Cas9 repose sur la reconnaissance directe par la protéine Cas9 de l'ADN cible.
- C. Pour obtenir ces embryons, les chercheurs doivent transfecter les zygotes avec un plasmide contenant un ADN codant la Cas9 en fusion avec un signal de localisation nucléaire; un plasmide contenant un ARN guide qui reconnaît une séquence du gène de la B-globine à proximité de la mutation 341-42; un plasmide contenant un ADN donneur qui porte la séquence sauvage du gène de la B-globine.
- D. La séquence PAM indique à la protéine Cas9 que l'ADN cible doit être clivé 3 nucléotides plus loin.
- E. La recombinaison homologue est nécessaire à l'obtention des embryons sans mutation.

Correction

QCM 1 - CD

- A. Si on utilise BamH1 et PST1 l'ADNc codant CXCL1 ne sera pas cloné en totalité puisque l'on retrouve deux sites de restrictions de PST1 dont l'un au milieu de l'ADNc que l'on souhaite cloner.
- B. Les vecteurs recombinants sont résistants à l'ampicilline mais pas à la kanamycine (car pas exprimés dans le vecteur) . Sur un milieu contenant de l'ampicilline et de la kanamycine, tous les vecteurs recombinants seraient détruits.
- C. (VRAI) On peut déterminer le sens d'insertion de CXCL1 dans le vecteur recombinant par PTE1 - si c'est un plasmide qui n'a pas incorporé de fragment on aura une bande à 5,4 kpb. S'il a incorporé le fragment on aura donc 2 bandes car un site de restriction est présent dans l'ADNc incorporé. De plus, PTE1 dans l'ADNc est situé plus près d'une extrémité que de l'autre, ce qui signifie que si l'ADNc est clivé par Pte1 on aurait 2 bandes de tailles bien distinctes. On remarque aussi que PTE1 est présent sur le plasmide pPACES, on a donc 2 PTE1 sur le plasmide recombinant. Selon le sens d'insertion de l'ADNc, les bandes pourront avoir 4 tailles différentes. .S'il a incorporé le fragment on aura donc 2 bandes :
- Soit dans le sens A où on aura une bande de taille x et une bande de taille y.
- Soit dans le sens B dans ce cas le site de clivage entre les 2 PTE1 n'est plus à la même distance on se retrouve avec une bande de taille z et une bande de taille k.
- D. (VRAI) Vu que l'insertion de l'ADNc se fait juste avant la séquence codant l'histidine, les deux cadres de lecture doivent être en phase pour que les deux puissent s'exprimer correctement et être transcrit ensemble.
- E. La sécrétion de CXCL1 ne se fait que dans le milieu de culture des cellules eucaryotes qui l'expriment.

QCM 2 - ABDE

- A. Hors programme
- B. HP
- C. Seules les cellules procaryotes résistantes à l'ampicilline.

QCM 3 - ABC

- D. Les groupements imidazole ressemblent à l'étiquette 6(His) et sont utilisés pour rompre les liaisons Ac-6(his) par compétition quand on souhaite récupérer la protéine d'intérêt de sur la colonne.
- E. La GFP est située après un autre promoteur que le gène codant pour CXCL1 elle est donc indépendante de la protéine CXCL1 et ne peut être utilisée pour la purification.

QCM 4 - AB

- A. (VRAI) On prélève sur la peau mais on aurait également pu prélever ailleurs car toutes les cellules de l'organisme de cette agnelle possèdent le transgène . Or toute ne l'exprimeront pas, cela dépend du promoteur (si il est constitutif, spécifique ?) , de la localisation du transgène (car il s'insère de manière aléatoire, il peut donc se retrouver dans de l'euchromatine comme dans de l'hétérochromatine et donc ne pas être exprimé).
- C. Les gamètes aussi présentent la transgénèse, et le transmettront à la génération suivante. Le transgène a été inséré dans le génome, il fait donc partie du génome à part entière maintenant.
- D. La cassette d'expression a été obtenu par digestion Bgl2, or entre les deux sites de coupures est situé la séquence codant pour la GFP, celle-ci est donc absente du produit final de digestion
- E. La transgénèse additive s'effectue chez des œufs fécondés, tandis que la recombinaison homologue est réalisée sur des blastocytes. De plus, on ajoute du matériel génétique lors de la transgénèse additive qui s'intégrera dans n'importe quelle partie du génome, alors que dans la recombinaison homologue, on peut le placer au locus voulu de l'ADN.

QCM 5 - ACDE

B. Ce système repose sur une reconnaissance indirecte par l'intermédiaire d'un ARN guide qui est nommé CRISPR. Cas9 étant une endonucléase qui crée une cassure double brin de l'ADN sur un gène cible seulement s'il y a un ARN guide (CRISPR) . De plus, on ne peut pas parler de reconnaissance directe avec l'ADN puisque ce dernier est clivé, modifié.

C et D. Hors programme.

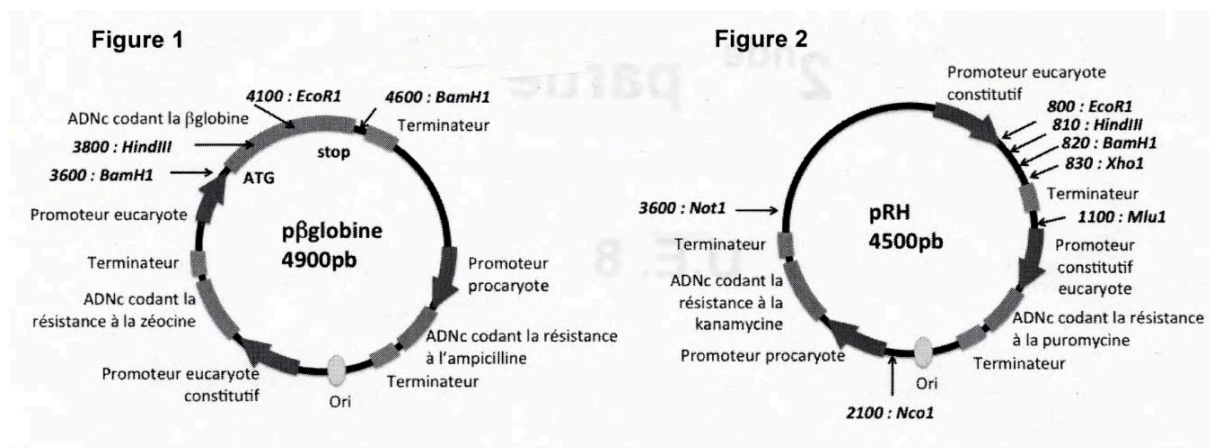
E. La recombinaison homologue va permettre la réparation fidèle des cassures doubles brins de l'ADN engendrées par Cas9, elle est donc nécessaire afin d'obtenir des embryons dépourvus de mutation.

Maraîchers 2017-2018

Les QCM 1 à 3 concernent la même expérience.

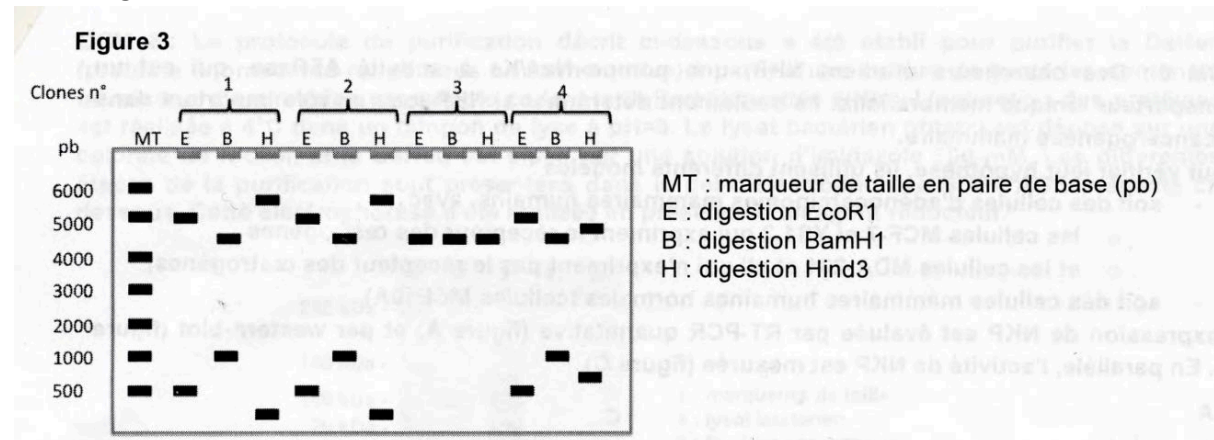
QCM 1 - Des chercheurs veulent construire un modèle de souris transgéniques par recombinaison homologue. Ils désirent introduire un défaut génétique sur le gène codant la β globine, une protéine cytosolique. Pour cela, ils doivent réaliser une construction génique comprenant à la fois l'ADNc codant la β globine mutée et l'ADNc codant la résistance à la puromycine. Ces deux ADNc sont sous la dépendance d'un promoteur constitutif eucaryote.

En figure 1 le plasmide de départ contenant l'ADNc codant la β globine mutée et en figure 2 le plasmide receveur. Le clonage se fait par BamH1.



- A. Les bactéries transformées par le plasmide recombinant doivent être sélectionnées pour leur résistance à la kanamycine .
- B. Par cette stratégie, les chercheurs réalisent un clonage orienté.
- C. Le plasmide recombinant obtenu a une taille de 6600 pb (paires de nucléotides).
- D. Les bactéries transformées par le plasmide recombinant expriment la β globine.
- E. Les cellules eucaryotes qui seront transfectées avec le plasmide recombinant pourront être sélectionnées par leur résistance à la zéocine.

QCM 2 - 4 clones bactériens ont été sélectionnés pour leur résistance à l'antibiotique. Pour chaque clone, une culture bactérienne a été réalisée. Le lendemain, l'ADN plasmidique a été extrait. Un échantillon de chaque ADN plasmidique a été digéré soit par EcoR1, soit par BamH1, soit par Hind3 et le produit de digestion a été analysé sur gel d'électrophorèse. Les résultats du gel sont présentés dans la figure 3.



- A. L'identification des plasmides ayant intégré un insert peut se faire en utilisant l'enzyme de restriction BamH1.
- B. L'identification des plasmides recombinants avec l'insert orienté correctement par rapport au promoteur peut se faire grâce à une digestion par l'enzyme de restriction EcoR1.
- C. Le plasmide du clone n°4 permet la transcription de l'ADNc cloné à partir de son promoteur.
- D. Les cellules eucaryotes transfectées avec le plasmide du clone n°2 synthétisent de la β globine recombinante.
- E. La β globine produite par les cellules eucaryotes peut être purifiée à partir du surnageant de culture.

QCM 3 - Afin de réaliser leur animal transgénique qui présente le gène β globine muté, la construction plasmidique correcte est transfectée dans des cellules ES de la souris.

- A. Par ce protocole, les chercheurs réalisent de la transgénèse additive.
- B. Les cellules ES transfectées peuvent être sélectionnées pour leur résistance à la puromycine.
- C. Les souriceaux transgéniques peuvent être sélectionnés pour leur résistance à la puromycine, ajoutée dans l'eau de boisson des souris gestantes.
- D. Les souriceaux obtenus à la première génération expriment la β globine exclusivement dans leur glande mammaire.
- E. Les souriceaux de la première génération portent tous des cellules génétiquement modifiées mais en nombre variable.

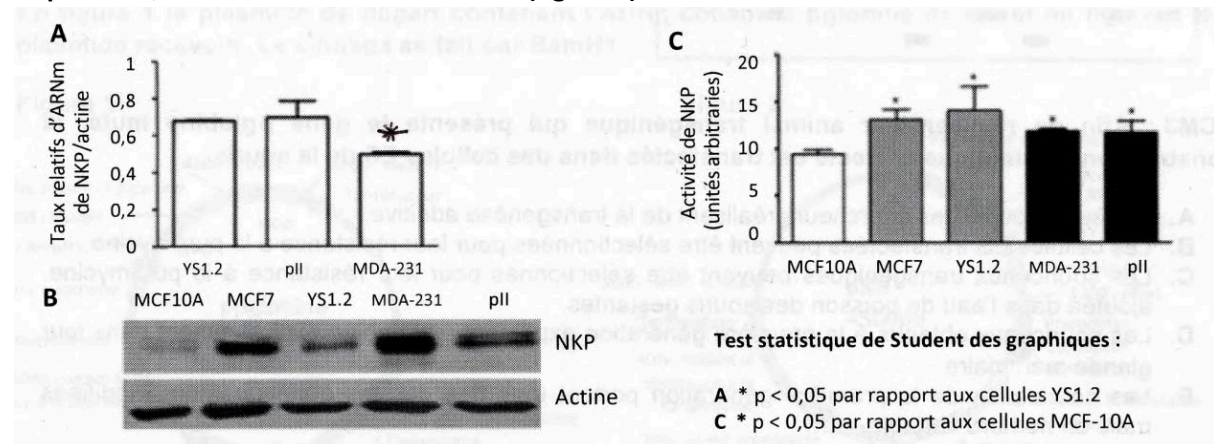
QCM 4 - Des chercheurs ont décidé d'obtenir grâce au système CRISPR/Cas9 des souris transgéniques qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène Rnd1, un gène exprimé dans le cerveau et le foie des mammifères.

- A. Pour obtenir ces souris transgéniques, un des éléments nécessaires est un plasmide comportant l'ADN codant pour la GFP entouré de zones d'homologie pour le promoteur du gène Rnd1 et de l'ADN génomique codant RND1.
- B. Afin d'obtenir des souris transgéniques dont tout le génome est modifié, la transfection de tous les éléments nécessaires au système CRISPR/Cas9 est réalisée dans des cellules ES.
- C. La recombinaison homologue nécessaire à l'obtention de ces souris transgéniques, fait intervenir le complexe protéique MRN, le complexe protéique BRCA2/RAD51, les ADN polymérases δ et ϵ et des résolvases.
- D. Lors de la création de ces souris transgéniques, une cassure double brin est générée par Cas9 au niveau de l'ADN génomique codant RND1, en dehors du promoteur.
- E. Ces souris transgéniques ont la peau verte.

QCM 6 - Des chercheurs étudient NKP, une pompe Na⁺/K⁺ à activité ATPase, qui est un transporteur ionique membranaire. Ils souhaitent déterminer si NKP joue un rôle important dans la cancérogenèse mammaire. Pour vérifier leur hypothèse, ils utilisent différents modèles :

- soit des cellules d'adénocarcinomes mammaires humains, avec :
 - les cellules MCF-7 et YS1.2 qui expriment le récepteur des œstrogènes
 - et les cellules MDA-231 et pII qui n'expriment pas le récepteur des œstrogènes,
- soit des cellules mammaires humaines normales (cellules MCF10A).

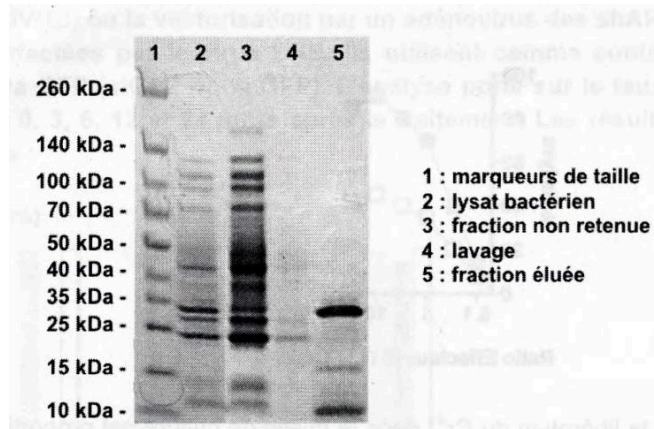
L'expression de NKP est évaluée par RT-PCR quantitative (figure A) et par western-blot (figure B). En parallèle, l'activité de NKP est mesurée (figure C).



Indiquez le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes, dans les conditions d'expérience :

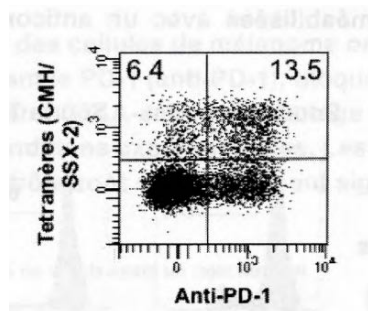
- A. Le taux d'ARNm de NKP est diminué de façon statistiquement significative dans les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains qui n'expriment pas le récepteur des œstrogènes par rapport à celles qui l'expriment.
- B. Les cellules mammaires humaines normales expriment moins de protéine NKP que les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains.
- C. Les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains qui expriment le récepteur des œstrogènes expriment plus de protéine NKP que celles qui n'expriment pas ce récepteur nucléaire.
- D. L'activité de la protéine NKP est augmentée de façon statistiquement significative dans les cellules YS1.2 par rapport aux cellules MCF10A.
- E. Au vu de ces résultats, l'expression du récepteur des œstrogènes dans les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains détermine le rôle de NKP dans la cancérogenèse mammaire.

QCM 8 - Le protocole de purification décrit ci-dessous a été établi pour purifier la DsRed (protéine fluorescente rouge sous sa forme native) à partir d'une culture de bactéries contenant un vecteur d'expression procaryote codant la DsRed étiquetée 6(His). L'extraction des protéines est réalisée à 4°C dans un tampon de lyse à pH=8. Le lysat bactérien obtenu est déposé sur une colonne de Nickel, et la DsRed est éluée par une solution d'imidazole 500 mM. Les différentes étapes de la purification sont présentées dans le gel d'électrophorèse SDS-PAGE présenté ci- dessous. Cette électrophorèse a été réalisée en présence d'un agent réducteur.



- A. Les bactéries productrices utilisées pour purifier la DsRed émettent une fluorescence rouge.
- B. Les protéines exclues de la colonne ont un point isoélectrique supérieur à 8.
- C. La DsRed a une masse moléculaire d'environ 30 kDa.
- D. Ce protocole de purification permet d'obtenir une protéine pure à 100%.
- E. La DsRed purifiée peut être repérée sur le gel d'électrophorèse par une fluorescence rouge.

QCM 9 - SSX-2 est un antigène exprimé par certaines cellules tumorales humaines. Des lymphocytes T CD8 (CTL) obtenus à partir d'un échantillon tumoral ont été marqués avec des tétramères de CMH/SSX-2 fluorescents ainsi qu'avec un anticorps anti-PD-1 fluorescent et ont été analysés par cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci- dessous:



- A. Les tétramères de CMH/SSX-2 permettent de marquer le TCR de lymphocytes T CD8 spécifiques de SSX-2.
- B. Dans cette expérience, 6,4% des lymphocytes T CD8 sont spécifiques de SSX-2 mais n'expriment pas PD-1.
- C. Cette expérience montre que toutes les cellules T CD8 exprimant PD-1 sont spécifiques de SSX- 2.
- D. Les lymphocytes T spécifiques de SSX-2 chez ce patient sont détectables dans la tumeur mais ne peuvent pas l'être dans la circulation sanguine.
- E. La présence de lymphocytes T CD8 marqués par les tétramères de CMH/SSX-2 chez ce patient suggère que ses cellules tumorales expriment l'antigène SSX-2.

Correction

QCM 1 - A

On part de p β globine (4900 kb) et on utilise BamH1, on va donc cliver entre les bases 3600 et 4600 pour obtenir l'ADNc codant la β globine (1000 pb). PRH est lui ouvert au niveau de la base 820 pour pouvoir recevoir l'ADNc de la β globine ; attention on utilise une enzyme de restriction donc l'ADNc peut s'insérer dans les deux sens (5500 pb). L'ADNc de la β globine est inséré entre un promoteur eucaryote et un terminateur.

A. (VRAI) Le gène de résistance à la kanamycine est exprimé dans les cellules procaryotes ; attention les bactéries transformées sont résistantes à la kanamycine mais n'expriment pas la β globine car sous promoteur eucaryote.

B. Le clonage n'est pas orienté car on utilise une seule enzyme de restriction ; l'insert peut donc s'insérer dans les 2 sens.

C. Il est de 5500 pb.

D. Le promoteur du gène de la BGlobine est un promoteur eucaryote, le B globine ne peut donc s'exprimer que chez les eucaryotes et pas chez les bactéries (procaryote) .

E. PRH contenant l'ADNc de la β globine ne contient pas de gène de résistance à la zéocine (c'est le p β globine qui le contient).

QCM 2 - ACD

Les clones bactériens sont sélectionnés à l'aide de la kanamycine car le promoteur exprimant le gène de la kanamycine est procaryote ; mais attention, le clone n'exprimera pas l'ADNc pour la β globine. D'après le premier schéma est les enzymes de restrictions on peut construire le tableau suivant :

Enzyme de restriction	Sans insertion d'ADNc pour la β globine	Avec insertion d'ADNc pour la β globine	
		Dans le bon sens	Dans l'autre sens
EcoR1	1 site de restriction : • 1 fragment de 5500pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 520 pb • 1 fragment de 4980 pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 520pb • 1 fragment de 4980 pb
BamH1	1 site de restriction : • 1 fragment de 5500pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 1000 pb • 1 fragment de 4500 pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 1000 pb • 1 fragment de 4500 pb
Hind3	1 site de restriction : • 1 fragment de 5500pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 210 pb • 1 fragment de 5290 pb	2 sites de restrictions : • 1 fragment de 810 pb • 1 fragment de 4690 pb

On voit que :

- EcoR1 clive au milieu de l'ADNc de β globine : elle indique donc si l'insertion à fonctionnée mais elle n'indique pas le sens d'insertion.

- BamH1 clive aux extrémités de l'insert : elle indique donc si l'insertion a fonctionné mais elle n'indique pas le sens d'insertion.

- Hind3 indique si l'insertion à fonctionnée elle indique le sens d'insertion.

A. (VRAI) Sans plasmide on aurait un seul fragment.

B. EcoR1 ne permet de connaître l'orientation de l'insert (seul Hind3 le permet).

C. (VRAI) Les fragments obtenues avec les différentes enzymes de restrictions permettent de montrer que le l'insert est fixé et dans le bon sens, le plasmide 4 permet donc la transcription de la protéine souhaitée.

D. (VRAI) On voit avec la colonne H que les 2 fragments correspondent à l'orientation de l'insert dans le bon sens.

E. La protéine synthétisée est cytosolique ; elle n'est donc pas retrouvée dans le surnageant.

QCM 3 - BE

- A. La transgénèse additive se fait sur la cellule œuf.
- B. (VRAI) Le gène codant pour la puromycine possède un promoteur eucaryote constitutif.
- C. Les souris gestantes sont des chimères, c'est-à-dire qu'elles ont dans leur organisme leur ADN ainsi qu'un ADN différents (ceux des souriceaux transgéniques). Les souris gestantes n'expriment donc pas de résistance à la puromycine car elles n'ont pas ce gène. De même pour les souriceaux ayant intégré ce gène (contenu dans le plasmide transfecté) dans l'euchromatine . Le gène de résistance ne s'exprimera pas. Pour les souriceaux ayant intégré le plasmide dans de l'hétérochromatine, ils résistent sûrement à la puromycine.
- D. Le transgène est exprimé dans toutes les cellules portant le transgène, car le promoteur de l'ADNc de la Bglobine est un promoteur eucaryote constitutif.
- E. (VRAI) La transgénèse sur cellules ES induit la formation de chimères, toutes les cellules de l'individu n'ont pas toutes le transgène.

QCM 4 - A(C)D

- A. (VRAI) Le gène que l'on veut implanter doit avoir une forte homologie avec les zones en aval du promoteur d'intérêt.
- B. La transgénèse CRISPR/Cas9 se fait uniquement sur le zygote.
- C. Hors programme
- D. (VRAI) Cas 9 est une endonucléase qui coupe le double brin d'ADN.
- E. La GFP est exprimée dans les tissus où la Rnd1 était exprimée (cerveau et foie).

QCM 6 - BD

Si NKP joue un rôle important dans la cancérogénèse, alors les transferts de cations sont nécessaires à la survie des cellules cancéreuses.

Figure A : Les adénocarcinomes mammaires humains, avec des cellules MDA-231 n'exprimant pas le récepteur des œstrogènes ont statistiquement un taux d'ARNm de NKP/actine inférieur aux cellules YS1.2. Cette différence n'est pas démontrée entre les cellules pII et YS1.2.

Figure B : La première chose à vérifier dans un western-blot est qu'il y a bien autant d'actine dans tous les tests. On peut donc en déduire qu'il y a plus de protéines NKP dans les cellules MDA-231 puis MCF-7 puis pII puis YS1.2 et enfin MCF10A (qui correspond à des cellules saines. A première vue les cellules saines semblent exprimer que peu la protéine NKP

Figure C : On peut voir que l'activité de NKP dans les cellules d'adénocarcinome mammaires humains, l'activité de NKP est supérieure aux cellules MCF10A saines.

- A. Il y a une différence significative entre MDA-231 (n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes) et YS1.2 (exprimant le récepteur aux œstrogènes) mais pas entre YS1.2 et pII (n'exprime pas non plus le récepteur). Même s'il y avait une différence significative entre pII et YS1.2 on ne pourrait pas l'affirmer car on ne connaît pas le taux relatif d'ARNm de NKP/actine pour les cellules MCF-7 (qui expriment aussi le récepteur aux œstrogènes).
- B. (VRAI) On peut le voir sur la figure B (pas la C attention, la figure C rapporte l'activité pas l'expression du gène). La bande de NKP dans les cellules saines est très claire contrairement aux autres.
- C. Les cellules YS1.2 (exprimant le récepteur) expriment moins NKP que les cellules MDA-231 qui n'expriment pas le récepteur.
- D. (VRAI) On peut voir sur la figure C que l'activité des cellules YS1.2 est significativement supérieure à celle de MCF10A (on n'a démontré la supériorité d'activité que par rapport à la cellule saine).
- E. Avec l'ensemble des figures, on démontre l'augmentation d'expression et d'activité de NKP dans les cellules cancéreuses mais le récepteur aux œstrogènes ne semble pas influencer NKP.

QCM 8 - AC

- A. (VRAI) Les bactéries sont des procaryotes, elles peuvent donc exprimer le gène GFP car il est sous la commande d'un promoteur procaryote.
- B. On n'est pas ici sur une colonne échangeuse de cation, elle retient donc les protéines chargées positivement ($\text{pH} < \text{pI} \Rightarrow \text{protéine chargée} +$). Pour récupérer les protéines étiquetées His, il faudra réaliser une chromatographie d'affinité en fixant dans la colonne des ions métalliques qui attraperont les étiquettes d'His.
- C. (VRAI) On sait que la protéine GFP est étiquetée 6(His). On va donc la "capturer" avec une chromatographie d'affinité, en incorporant dans les parois de la colonne des ions métalliques (soit cobalt , soit nickel) . Ainsi, la protéine GFP sera gardée dans la colonne grâce à l'interaction entre l'étiquette 6(His) et les ions métalliques. Pour séparer ces 2 complexes, il faut ajouter de l'imidazole qui va alors faire tomber la protéine GFP dans solution éluée. C'est une des seules que l'on retrouve dans la fraction isolée et la plus importante, car elle était retenue aux ions métalliques (grâce à l'interaction 6(His) et ions nickel) jusqu'à ce que l'imidazole les sépare. Les autres protéines n'ont pas eu d'affinité avec des protéines de la colonne et sont donc directement tombées.
- D. Aucun protocole ne permet une pureté de 100% !!! En plus ici on voit clairement d'autres bandes dans la fraction éluée.
- E. La forme native est la forme conformée de la protéine, elle fluoresce dans le rouge. Or l'électrophorèse a été réalisée en présence d'un agent réducteur, donc seule la structure primaire de la chaîne protéique est maintenue.

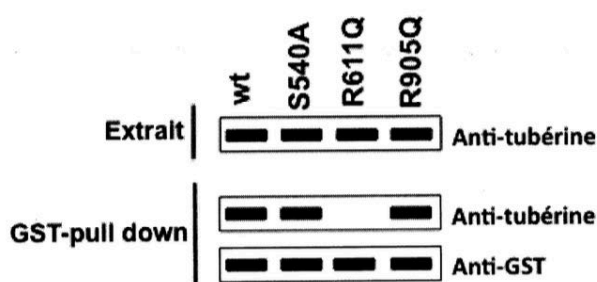
QCM 9 - ABE

- A. (VRAI) Le SSX2 du tétramère est reconnu par le TCR.
- B. (VRAI) Cadran supérieur gauche = positif au marquage du tétramère mais négatif à celui de PD1 -> le TCR reconnaît le SSX2. Il n'exprime pas PD1 sinon on aurait le marquage anti-PD1.
- C. La partie inférieure droite du cadran montre que certains lymphocytes expriment PD-1 mais sont négatifs au marquage du tétramère donc pas spécifiques du SSX2.
- D. La sélection de lymphocytes T spécifiques de SSX-2 par une tumeur va augmenter le taux de lymphocytes sélectionnés dans le tissu tumoral mais aussi dans le reste du corps (ex : le sang).
- E. (VRAI) Les tétramères sont les détecteurs spécifiques de TCR pour une protéine, ici SSX-2, les lymphocytes marqués par le tétramère seront donc spécifiques de SSX-2.

Maraîchers 2018-2019

Indiquer le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes.

QCM 1 - Afin de vérifier l'interaction entre la tubérine et la protéine 14-3-3, une expérience de GST-pull down a été réalisée avec des billes d'agarose glutathion liant la protéine 14-3-3 produite avec une étiquette GST (billes GST-14-3-3). Pour cela, les billes GST-14-3-3 sont incubées avec des extraits cellulaires surexprimant la tubérine sauvage (wt) ou des formes mutées de la tubérine (mutation S540A; R611Q; R905Q). Après lavage, les complexes formés sur les billes sont analysés en Western blot grâce à un anticorps dirigé contre la tubérine (anti-tubérine), ou un anticorps dirigé contre la GST (anti-GST). Les extraits protéiques utilisés sont également analysés en Western blot avec l'anticorps dirigé contre la tubérine. Les résultats de l'expérience sont présentés ci-dessous :



- A. Cette expérience montre que la GST est présente dans toutes les conditions.
- B. Cette expérience montre que la tubérine sauvage (wt) interagit directement ou indirectement avec la protéine 14-3-3.
- C. Cette expérience montre que la présence de la mutation R611Q empêche l'interaction directe ou indirecte entre la protéine 14-3-3 et la tubérine.
- D. Cette expérience montre que la tubérine (forme sauvage ou mutée) est exprimée dans les extraits cellulaires utilisés.
- E. Les complexes tubérine/protéine 14-3-3 peuvent être élués des billes d'agarose à l'aide d'une solution de glutathion.

QCM 2 - Un protocole de purification doit être établi pour séparer les protéines A, B et C qui ont été mélangées par erreur. Les informations concernant ces 3 protéines sont résumées dans le tableau ci-dessous:

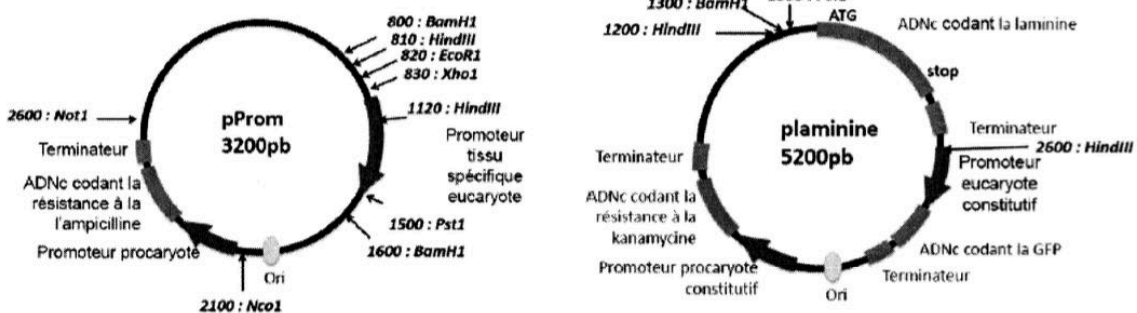
Protéine A	Protéine monomérique de masse moléculaire : 44 kDa ; Point isoélectrique : 8,9
Protéine B	Protéine monomérique de masse moléculaire : 90 kDa ; produite chez la bactérie en fusion avec une étiquette histidine. Point isoélectrique : 7,4
Protéine C	Protéine formée par deux polypeptides de 100 et 60 kDa reliés par un pont disulfure ; Point isoélectrique : 4

- A. Dans une purification par gel filtration, la protéine A a un volume d'élution plus faible que la protéine C.
- B. La protéine B peut être purifiée en utilisant des anticorps dirigés contre l'étiquette histidine.
- C. Si une chromatographie échangeuse d'anions est réalisée à pH=7, la protéine C est retrouvée dans la fraction non retenue.
- D. Si une chromatographie hydrophobe est réalisée, la protéine la plus hydrophobe est éluee en premier par une solution concentrée en NaCl.
- E. L'analyse du mélange des 3 protéines, en électrophorèse SDS-PAGE en présence d'agent réducteur, met en évidence 3 bandes repérables par des masses moléculaires différentes.

Les QCMs 3 et 4 sont liés :

QCM3 - Un chercheur désire soigner des patients atteints d'épidermolyse bulleuse en modifiant génétiquement leurs cellules de peau pour leur faire exprimer la laminine sous la dépendance d'un promoteur spécifique des cellules progénitrices de la peau.

La première étape est de cloner le gène de la laminine sous la dépendance du promoteur spécifique. Pour cela, il a choisi de digérer le plasmide pPROM (carte ci-dessous à gauche) contenant le promoteur par les enzymes BamH1 et Pst1. Il a ouvert le plasmide plaminine (carte ci-dessous à droite) par les mêmes enzymes. Il a ensuite utilisé la ligase afin d'insérer le promoteur dans le vecteur plaminine.

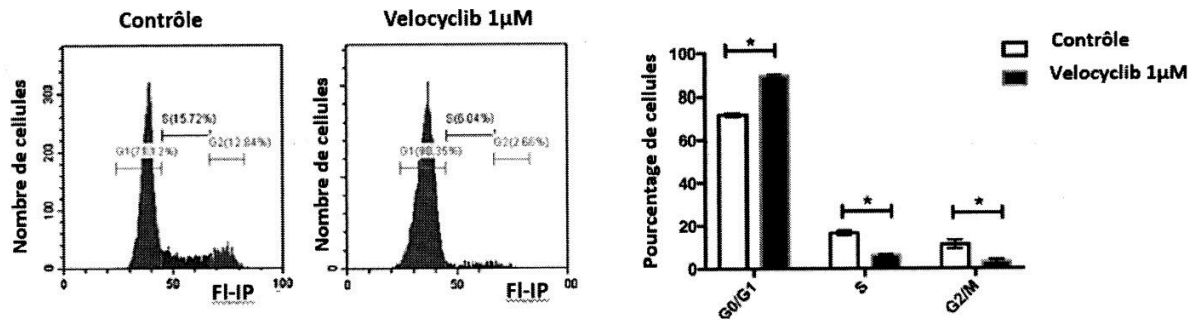


- A. Le chercheur a réalisé un clonage non orienté.
- B. Le chercheur aurait pu utiliser uniquement l'enzyme BamH1 pour réaliser le clonage.
- C. Le plasmide recombinant obtenu coupé par BamH1 libère un fragment unique de taille 5850 pb.
- D. Le plasmide recombinant obtenu coupé par HindIII libère trois fragments de taille 420, 1630 et 1650 pb.
- E. Le plasmide recombinant obtenu confère une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées.

QCM 4 - Le plasmide recombinant obtenu a été amplifié par transformation de bactéries puis purifié. Des cellules de différentes origines (progénitrices de peau, hépatocytes, cellules nerveuses) ont été transfectées par ce plasmide.

- A. Les 3 types de cellules peuvent contenir l'ADN codant la laminine dans leur génome après transfection.
- B. Les hépatocytes expriment l'ADN exogène codant la laminine.
- C. Ce protocole est un protocole de thérapie génique dit *in vivo*.
- D. Les cellules nerveuses transfectées sont résistantes à la puromycine.
- E. Une méthode physique comme l'électroporation peut être utilisée pour transfecter les cellules.

QCM. 5 - Des chercheurs caractérisent la spécificité du velocylib, une molécule capable d'inhiber les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK) in vitro. Ils souhaitent tester son effet sur une lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231. Pour cela ils traitent les cellules durant 48h en présence ou non de 1 micromole de velocylib, puis analysent par cytométrie en flux les cellules dont l'ADN a été marqué à l'iodure de propidium (intensité de fluorescence notée FI-IP). Les résultats expérimentaux sont présentés à gauche et leur analyse sur le graphique de droite. * $p < 0,05$.

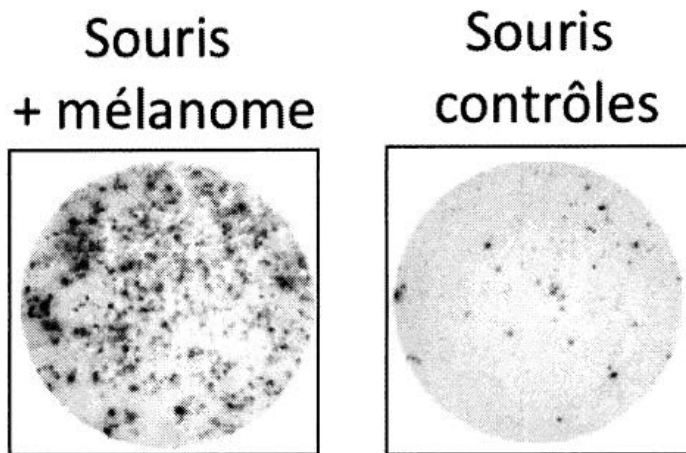


- Ces résultats indiquent que les cellules MDA-MB-231 ne répliquent que 15% de leur génome en absence de traitement.
- Cette expérience indique que le velocylib rend les cellules haploïdes.
- Le traitement des cellules au velocylib s'accompagne d'un blocage en phase G1 du cycle Cellulaire.
- Cette expérience suggère que le velocylib inhibe essentiellement le complexe CDK1-CyclineB à la transition G2/M.
- Une immunoprécipitation du complexe CDK/Cycline D suivie d'un test de phosphorylation in vitro permettrait de montrer l'effet inhibiteur sur la phosphorylation du velocylib.

QCM 6 - Des chercheurs veulent créer des souris transgéniques qui n'expriment pas la pacésine murine (souris « knock out » ou KO) par la stratégie CRISPR/Cas9.

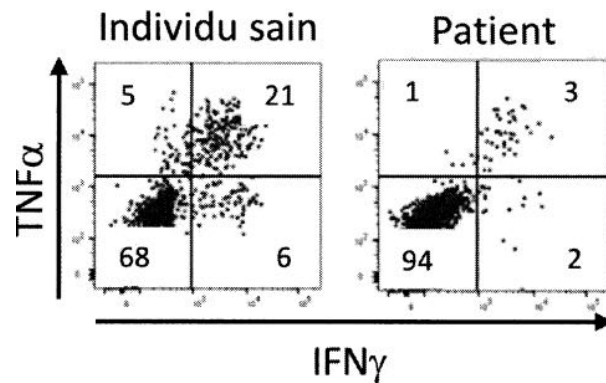
- Pour exprimer la Cas9 dans les cellules murines, un plasmide contenant l'ADNc de la Cas9 en fusion avec un signal de localisation membranaire, sous le contrôle d'un promoteur dépendant de l'ARN polymérase II, peut être utilisé.
- La recombinaison homologue est nécessaire à l'obtention de ces souris.
- La création de souris KO pour le gène de la pacésine est basée sur le fait que la recombinaison non homologue est une réparation infidèle.
- Pour obtenir des souris KO pour le gène de la pacésine, les chercheurs doivent transfecter les zygotes, entre autres, avec un plasmide contenant un ADN donneur qui porte la séquence sauvage du gène de la pacésine.
- Dans cette stratégie, pour obtenir des souris KO pour le gène de la pacésine sur les deux allèles, les zygotes peuvent être transfectés avec deux ARN guides différents ciblant chacun un des deux allèles.

QCM 9 - Des souris ont été injectées avec des cellules de mélanome (Souris + mélanome), ou non (Souris contrôles). Dix jours plus tard, les lymphocytes T CD8 ont été purifiés à partir des organes lymphoïdes secondaires et stimulés par des cellules présentatrices d'antigènes incubées en présence de cellules de mélanome. 24h après, l'activation des lymphocytes T CD8 a été évaluée par la technique ELISPOT pour détecter l'IFN γ .



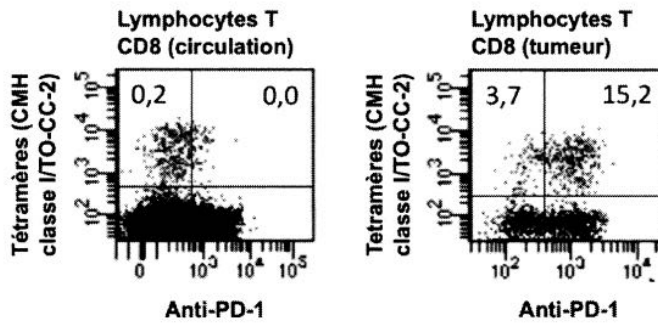
- A. Les lymphocytes T CD8 sont des cellules de la réponse adaptative du système immunitaire.
- B. Dans cette expérience, la technique ELISPOT repose sur l'utilisation d'un anticorps de capture et d'un anticorps de détection de l'IFN γ .
- C. Cette expérience permet de déterminer le nombre de lymphocytes T CD8 producteurs d'IFN γ après stimulation.
- D. Cette expérience permet de déterminer la concentration d'IFN γ produit dans le milieu de culture de lymphocytes T CD8.
- E. Cette expérience illustre une augmentation de la réponse immunitaire contre les cellules de mélanome impliquant des lymphocytes T CD8 producteurs d'IFN γ .

QCM 13 - Des lymphocytes du sang d'un individu sain et d'un patient atteint d'infection virale chronique ont été incubés en présence de PMA/ionomycine et de bréfeldine A pendant 4 heures. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD8 couplé à un fluorochrome rouge avant d'être fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps anti-IFN γ couplés à un fluorochrome vert et anti-TNF α couplés à un fluorochrome bleu. Les lymphocytes T CD8 ont été analysés par cytométrie en flux. Les valeurs représentent les pourcentages des cellules dans les différents quadrants.



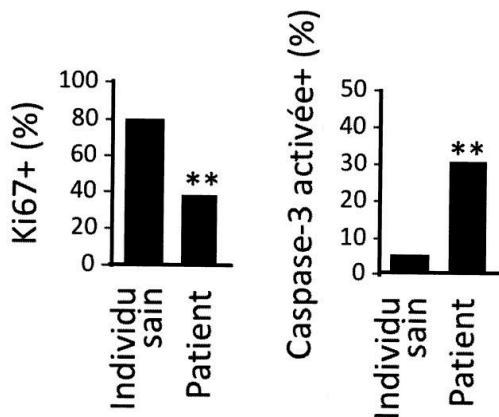
- A. Dans cette expérience, l'incubation des lymphocytes en présence de PMA/ionomycine permet l'activation polyclonale des lymphocytes T CD8.
- B. Dans cette expérience, la bréfeldine A bloque la sécrétion de l'IFN γ et du TNF α dans le milieu de culture.
- C. Dans cette expérience, 27% des lymphocytes T CD8 sont producteurs d'IFN γ chez l'individu sain.
- D. Dans cette expérience, 3% des lymphocytes T CD8 co-produisent du TNF α et de l'IFN γ chez le patient.
- E. Cette expérience illustre une activation moindre des lymphocytes T CD8 chez le patient.

QCM 14 - TO-CC-2 est un antigène tumoral exprimé par plusieurs types tumoraux humains. Chez un patient atteint de cancer, les lymphocytes T CD8 (CTL) ont été séparés à partir d'un prélèvement sanguin (circulation) et d'un échantillon tumoral (tumeur). Ces lymphocytes ont été marqués avec des tétramères fluorescents (dans le vert) de CMH de classe I porteurs d'un peptide de l'antigène TO-CC-2 ainsi qu'avec un anticorps anti-PD-1 fluorescent (dans le rouge) et ont été analysés par cytométrie en flux. Les résultats obtenus pour les 2 échantillons sont représentés dans la figure ci-dessous:



- A. Les lymphocytes T CD8 (CTL) marqués par ces tétramères sont spécifiques de l'antigène TO-CC-2. Tetramères (CMH classe I/TO-CC-2) Lymphocytes T CD8 (tumeur) 3,7 15,2 Anti-PD-1 10
- B. Cette expérience montre que les CTL spécifiques de l'antigène TO-CC-2 s'accumulent dans la tumeur.
- C. Cette expérience montre que tous les lymphocytes T CD8 spécifiques de TO-CC-2 au site tumoral expriment PD-1.
- D. Cette expérience suggère que la tumeur du patient exprime TO-CC-2.
- E. L'expression du récepteur co-inhibiteur PD-1 réduit la cytotoxicité des CTL vis-à-vis de la tumeur, si cette dernière exprime son ligand, PD-L1.

QCM 15 - Des lymphocytes du sang d'un individu sain et d'un patient atteint d'infection virale chronique ont été stimulés avec des anti-CD3 et anti-CD28 pendant 72 heures (stimulation polyclonale). Puis, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD8 couplé à un fluorochrome rouge avant d'être fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-Ki67 couplé à un fluorochrome vert et un anticorps anti-caspase-3 activée couplé à un fluorochrome bleu. Les lymphocytes T CD8 ont été analysés par cytométrie en flux. Les pourcentages de lymphocytes T CD8 exprimant Ki67 (figure de gauche) ou la caspase 3 activée (figure de droite) sont indiqués. Il est à noter que Ki67 est un marqueur de prolifération. (**, les différences sont statistiquement significatives).



- A. Dans cette expérience, 80% des lymphocytes T CD8 de l'individu sain prolifèrent.
- B. Dans cette expérience, 30% des lymphocytes T CD8 du patient présentent une activation de la signalisation apoptotique.
- C. La caspase-3 est une caspase initiateur de l'apoptose.
- D. Cette expérience montre qu'au moins 30% des lymphocytes T CD8 du patient co-expriment Ki67 et la caspase 3 active.
- E. Cette expérience ne permet pas d'évaluer la proportion de cellules qui meurent de nécrose.

Correction

QCM 1 - ABCDE

- A. (VRAI) On voit une bande dans toutes les conditions pour les Ac anti-GST.
- B. (VRAI) On voit une bande sur révélée par les Ac anti-tubérine en GST-pull down donc la tubérine est retenue par les billes GST-14-3-3.
- C. (VRAI) On n'a plus de bande en GST-pull down révélée par les Ac anti-tubérine pour la forme R611Q donc celle-ci n'a pas été retenue par l'expérience.
- D. (VRAI) Dans la partie extrait, on voit que toutes les formes sont révélées par les Ac anti-tubérine et sont donc bien présentes.
- E. (VRAI) La protéine 14-3-3 est retenue à l'aide de l'étiquette GST qui peut être dissociée par une solution de glutathion (cf cours).

QCM 2 - B

- A. Les purifications gel filtration font sortir les protéines de plus haut poids moléculaire en premier, or ici A est plus « petite » que C donc a un volume d'élution plus grand.
- B. (VRAI) En utilisant des Ac anti-his, on va dissocier la protéine B de son support car les Ac auront plus d'affinité pour la phase stationnaire que la protéine B.
- C. En échange d'anion on retient les protéines chargées négativement, or à pH = 7, la protéine C sera négative car son pHi (4) est plus faible que le pH.
- D. Les chromatographies hydrophobes retiennent les protéines hydrophobes, donc plus une protéine l'est, plus elle sera retenue par la colonne et plus elle sera éluée en dernière par le NaCl.
- E. En présence d'un agent réducteur, la protéine C va se dissocier en deux sous-unités de 60 et 100 kDa, auxquelles vont s'ajouter les bandes pour les protéines A (44 kDa) et B (90 kDa). Finalement, on aura 4 bandes distinctes pour cette électrophorèse.

QCM 3 - BC

- A. On a coupé par deux enzymes de restriction différentes, donc le clonage sera dit orienté car ne pourra se faire que dans un sens (on considère en paces que les enzymes ne sont pas des isocaudomères si ce n'est pas précisé).
- B. (VRAI) On trouve de part et d'autre du promoteur que l'on veut intégrer une séquence reconnue par BamH1, ainsi qu'un site de restriction pour cette enzyme sur le vecteur plaminine. Or si on utilise BAMH1, on sera sur un clonage non orienté, il y a donc une chance que le promoteur se retrouve dans le mauvais sens et ne transcrit alors pas le gène.
- C. (VRAI) En coupant par BamH1 et Pst1, on obtient un fragment de 700 pb que l'on ajoute au vecteur plaminine qui se voit réduit de 50 pb par digestion avec ces mêmes enzymes (fragment compris entre les deux sites de restriction qui est forcément clivé si le fragment contenant le promoteur est ajouté). On a donc $5200 + 700 - 50 = 5850$ pb. En clivant à un seul endroit sur le vecteur (car présence d'un seul site BamH1) on obtient un seul fragment qui sera donc de 5850 pb.
- D. A partir du même plasmide de 5850 pb, on remarque qu'on a 4 sites HindIII (2 initialement sur plaminine et 2 ajoutés par clonage du fragment contenant le promoteur). On obtiendra donc 4 fragments et non seulement 3. (De plus les tailles des fragments ne correspondent pas non plus car nous aurions des fragments de 110 kDa / 310 kDa / 1630 kDa / 3800 kDa).
- E. Le gène de résistance à l'ampicilline était présent sur le plasmide pProm mais pas sur plaminine qui n'aura donc pas cette résistance.

QCM 4 - AE

- A. (VRAI) Même si le promoteur est spécifique des cellules progénitrices de la peau, l'ADN peut très bien être présent dans le génome de toutes ces cellules.
- B. Le promoteur est spécifique des cellules progénitrices de la peau donc ne s'exprimera que dans celles-ci.
- C. On est sur de l'ex vivo car on modifie les cellules hors du corps du patient.
- D. Aucun gène de résistance pour la puromycine n'est présent sur les plasmides.

QCM 5 - C

- A. Les cellules qui se répliquent sont celles présentent en phase S et G2 donc ici 28% en absence de traitement.
- B. Les cellules haploïdes seraient visibles à gauche du pic G1, or ici il n'y a rien.
- C. (VRAI) Il y a significativement plus de cellules en phase G0/G1 en présence du Velocyclib 1μM.
- D. Cette expérience suggère plutôt que le Velocyclib inhibe le complexe CDK / Cycline D empêchant le passage en phase S des cellules.
- E. La phosphorylation des cyclines les rend inactives donc le Velocyclib n'a pas un effet inhibiteur mais augmente la phosphorylation.

QCM 6 - CE

- A. Hors programme selon moi (il ne faut pas de signal de localisation membranaire pour la Cas9.)
- B. On utilisera ici la recombinaison non homologue.
- C. (VRAI) La Cas 9 est une endonucléase qui va couper le brin d'ADN à un endroit précis (CRISPR est un petit ARN dont la séquence est complémentaire à cet endroit précis, CRISPR amène donc Cas 9 à l'endroit afin de couper le brin). Une fois le brin coupé, le système de réparation est la recombinaison non homologue qui laissera des modifications (mutations...) à l'origine de l'inactivation du gène.
- D. Hors programme selon moi (le gène donneur n'est pas présent dans les modèles KO par Cas9. On laisse l'ADN se réparer sans support pour le pousser à faire une réparation infidèle.).
- E. (VRAI) Comme ça les deux allèles seront coupées par la Cas9 et subiront la RNH.

QCM 9 - ABCE

- A. (VRAI) Cf cours
- B. (VRAI) Les deux anticorps sont nécessaires pour cette expérience cf cours
- C. (VRAI) Avec une ELISPOT on peut quantifier le nombre de points présents sur la culture qui correspondent aux lymphocytes T-CD8 produisant l'IFN γ
- D. Avec la technique ELISPOT on quantifie le nombre de cellules productrices. C'est en revanche la technique ELISA qui permet de doser la concentration d'IFN γ produit
- E. (VRAI) On note une forte augmentation du nombre de points sur la culture « Souris+mélanome » indiquant une augmentation du nombre de lymphocytes TCD8 producteurs d'IFN γ en réponse à la présence des cellules de mélanome.

QCM 13 - ABCDE

- A.Vrai: Voir cours, à titre indicatif PMA est un analogue de structure du DAG et la ionomycine s'insère la membrane plasmique agissant comme un canal calcique. Cela permet une entrée massive de calcium dans le cytosol et ainsi mime l'expression d'une PI-PLC et facilite l'expression de cytokines par les lymphocytes donc leur activation.
- B. (VRAI) La brefeldine A bloque le trafic vésiculaire entre réticulum endoplasmique et appareil de golgi. Ce qui permet de bloquer la sécrétion de ces cytokines.
- C. (VRAI) Les lymphocytes TCD8 producteurs d'IFN γ sont ceux à droite de la barre verticale donc $21+6=27\%$
- D. (VRAI) 3 % au-delà du seuil de positivité vertical et horizontal
- E. (VRAI) Le patient possède 94 % de ses lymphocytes TCD8 qui ne produisent ni IFN γ et TNF α alors que l'individu sain a 68 % de ses lymphocytes TCD8 inactivés

QCM 14 - ABDE

- A. (VRAI) Pour pouvoir être marqués les CTL doivent reconnaître l'antigène TO-CC-2 présenté par le CMH donc ils sont forcément spécifiques de cet antigène.
- B. (VRAI) On ne retrouve que 0.2 % de CTL spécifiques de l'antigène TO-CC-2 dans la circulation, alors qu'on en retrouve $3.7+15.2=18.9\%$ accumulés dans la tumeur
- C. On retrouve 3.7 % des CTL spécifiques de TO-CC2 sur le site tumoral qui n'expriment pas PD-1
- D. (VRAI) Oui on suppose cela puisqu'on note une accumulation des CTL spécifiques de TO-CC-2 au niveau de la tumeur
- E. (VRAI) Effectivement si la tumeur exprime PD-L1 celui-ci sera reconnu par son récepteur à la surface du CTL et inhibera l'action du CTL, donc réduira la cytotoxicité vis à vis de la cellule tumorale. C'est un « moyen de défense » de la cellule tumorale vis à vis des CTL.

QCM 15 - ABE

- A. (VRAI) On voit que 80 % des Lymphocytes TCD8 de l'individu sain expriment Ki67
- B. (VRAI) On voit que 30 % des lymphocytes TCD8 du patient ont leur caspase 3 activée donc la signalisation apoptotique activée
- C. C'est une caspase effectrice
- D. Ici aucune information ne nous permet de savoir le pourcentage de Lymphocytes TCD8 exprimant à la fois Ki67 et la caspase 3 active
- E. (VRAI) Ici rien ne nous permet d'évaluer la nécrose, puisque les caspases sont impliquées dans la mort par apoptose

Maraîchers 2019-2020

Indiquez le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes.

L'énoncé est à lire pour répondre aux QCM 1 à 4 mais les QCM sont indépendants.

Des chercheurs ont identifié une protéine du virus SARS COV2 (COV2) de 55 kDa, qui pourrait servir pour la vaccination contre le Covid-19. La séquence codante de cette protéine est disponible dans un plasmide (pCOV) sous la dépendance d'un promoteur eucaryote. Toutefois, les industriels veulent produire la protéine dans un système procaryote dont la séquence est présente dans le vecteur pPROM. Il est donc nécessaire de remplacer le promoteur eucaryote par un promoteur procaryote. Vous noterez que la séquence de la protéine COV2 comporte un tag histidine. Le vecteur obtenu sera appelé pCOV-PRO.



QCM 1 - Pour obtenir le vecteur pCOV-PRO, les plasmides pCOV et pPROM sont digérés par l'enzyme HindIII. Par la suite, les fragments d'ADN correspondant au promoteur procaryote issu de pPROM et au vecteur sans le promoteur eucaryote issu de pCOV sont purifiés et mis en présence dans un tube contenant tous les éléments nécessaires à une ligation. Des bactéries sont ensuite transformées par le produit de ligation. Les chercheurs souhaitent obtenir un plasmide contenant le promoteur procaryote correctement orienté en amont de la séquence codant COV2.

- A. Les bactéries transformées sont sélectionnées grâce à la résistance à l'ampicilline.
- B. Les bactéries ont pu être transformées par électroporation.
- C. Cette stratégie correspond à un clonage orienté.
- D. Le plasmide recombinant pCOV-PRO a une taille de 6300 pb.
- E. Le plasmide pCOV-PRO peut être utilisé pour produire COV2 chez les eucaryotes et chez les procaryotes.

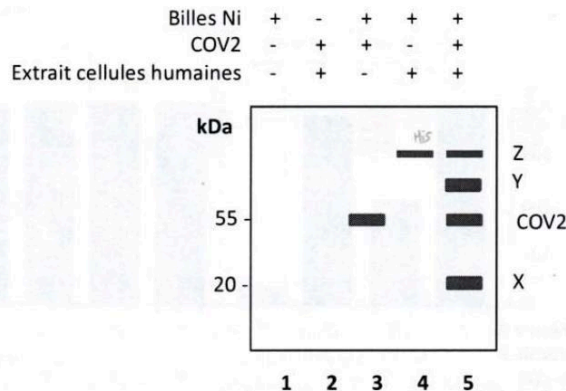
QCM 2 - Des clones bactériens ont été obtenus après transformation et sélection. Afin d'identifier si les clones correspondent bien à des bactéries transformées, les chercheurs ont extrait l'ADN plasmidique des bactéries. Cet ADN est digéré par différents enzymes de restriction. Les fragments obtenus sont analysés sur un gel d'électrophorèse comprenant une piste avec un marqueur de taille.

- A. Quel que soit le sens d'insertion du promoteur dans le plasmide pCOV, il peut y avoir transcription de l'ADNc de COV2.
- B. L'utilisation de l'enzyme Not1 permet d'évaluer la taille du plasmide.
- C. L'utilisation de l'enzyme HindIII permet d'identifier les plasmides contenant le promoteur procaryote.
- D. L'utilisation de l'enzyme HindIII permet d'évaluer le sens d'insertion du promoteur procaryote dans le plasmide pCOV-PRO.
- E. L'utilisation de l'enzyme Pst1 permet d'évaluer le sens d'insertion du promoteur procaryote dans le plasmide pCOV-PRO.

QCM 3 - La protéine COV2 est produite dans les bactéries recombinantes obtenues, et purifiée. Les caractéristiques biochimiques de la protéine COV2 sont les suivantes (masse moléculaire 55 kDa, pI= 4,5).

- A. La protéine COV2 peut être phosphorylée dans les bactéries recombinantes.
- B. La congélation d'un culot de bactéries exprimant la protéine COV2 dans un tampon de lyse permet d'obtenir un homogénat contenant la protéine COV2.
- C. La protéine COV2 peut être purifiée par une chromatographie d'affinité utilisant des anticorps dirigés contre la protéine COV2.
- D. La protéine COV2 peut être éluée de la colonne d'affinité par une solution concentrée de Glutathion réduit.
- E. La protéine COV2 peut être retenue sur une colonne échangeuse d'anions dans un tampon de purification à un pH=8.

QCM 4 - Afin d'étudier les protéines interagissant avec la protéine COV2, la protéine COV2 recombinante produite dans les bactéries est incubée avec des billes d'agarose recouverte de nickel. Ces billes sont ensuite incubées avec un extrait protéique obtenu à partir de cellules humaines exprimant entre autres, les protéines X, Y et Z. Après lavage, les complexes formés sur les billes sont analysés par une électrophorèse SDS en conditions dénaturantes (Piste 5). Différentes conditions contrôles sont également réalisées (Pistes 1 à 4 de l'électrophorèse). Les résultats de l'expérience sont présentés ci-dessous:



- Ces résultats montrent que la protéine COV2 recombinante est capable de se fixer sur les billes de nickel.
- Ces résultats indiquent que la protéine Z se lie aux billes de nickel.
- Ces résultats montrent que les protéines X, Y et Z interagissent avec COV2.
- Ces résultats confirment que la protéine COV2 a une masse moléculaire de 55 kDa.
- Cette expérience montre une interaction directe des protéines X et Y avec COV2.

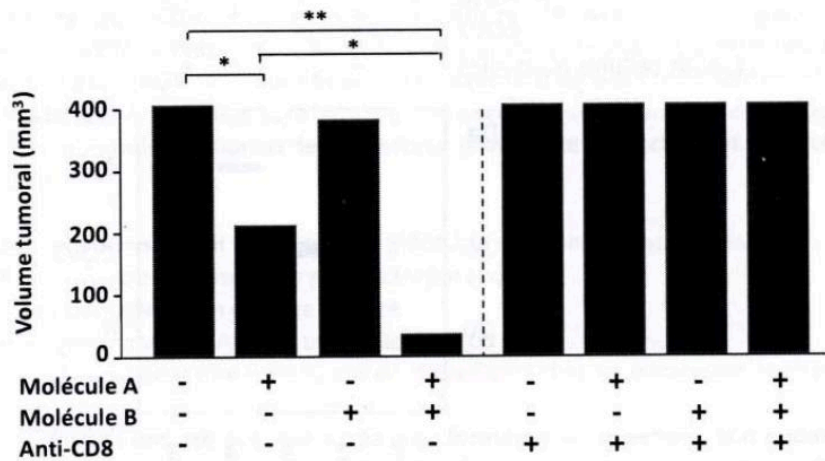
QCM 5 - Des chercheurs souhaitent étudier le rôle de la myostatine chez le lapin. Grâce au système CRISPR/Cas9, ils obtiennent des lapins transgéniques qui n'expriment plus le gène de la myostatine. Ce gène, porté par le chromosome 2, comporte 3 exons.

- Pour obtenir ces lapins transgéniques, les chercheurs ont pu transfecter des zygotes avec deux ARN guides de séquences différentes, chacun ciblant l'exon 1 du gène de la myostatine.
- Le croisement d'un lapin transgénique KO avec une lapine sauvage permet l'obtention de lapins hétérozygotes pour le gène de la myostatine.
- Dans cette stratégie, pour qu'une cassure double brin soit créée, l'ARN guide doit contenir une séquence s'hybridant de façon complémentaire et antiparallèle avec une séquence PAM.
- La recombinaison non homologe est nécessaire à l'obtention de ces lapins transgéniques.
- Les indels (insertions/délétions) créées par la recombinaison non homologe provoquent l'apparition de codons STOP prématurés.

L'énoncé est à lire pour répondre aux QCM 6 et 7 mais les QCMs sont indépendants.

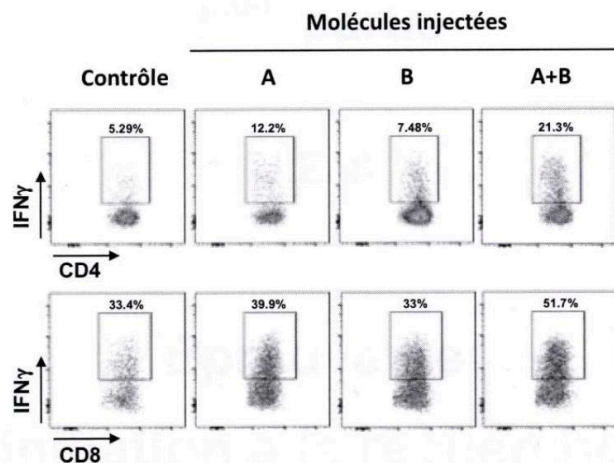
Dans le but de développer de nouvelles stratégies contre le mélanome, des chercheurs testent deux nouvelles molécules (A et B) chez des souris greffées avec des cellules de mélanome.

QCM 6 - Les souris ont été injectées (+), ou non (-), avec un anticorps (Anti-CD8) dirigé contre l'antigène CD8, exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques. Il est à noter que l'Anti-CD8 est activateur du complément. Puis, elles sont injectées (+), ou non (-), avec les molécules A et B. Trois semaines après la greffe des cellules de mélanome, les volumes tumoraux sont mesurés. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$):



- A. Chez des souris non injectées avec des anticorps Anti-CD8, les deux molécules A et B administrées seules réduisent significativement le volume tumoral.
- B. Chez des souris non injectées avec des anticorps Anti-CD8, la combinaison des deux molécules A et B s'accompagne d'un meilleur effet thérapeutique que la molécule A seule.
- C. Dans cette expérience, l'injection des anticorps Anti-CD8 permet d'éliminer les lymphocytes T cytotoxiques.
- D. Dans cette expérience, l'injection des anticorps Anti-CD8 a pour but de quantifier les lymphocytes T cytotoxiques.
- E. Cette expérience suggère que les effets anti-tumoraux de la molécule A, associée, ou non, à la molécule B, nécessitent les lymphocytes T CD8.

QCM 7 - Dans le but d'évaluer la réponse immunitaire chez les souris porteuses de mélanome, injectées (+), ou non (-), avec les molécules A et B, les chercheurs ont purifié les lymphocytes T douze jours après la greffe des cellules tumorales. Ils ont incubé les lymphocytes pendant 4 heures avec du PMA, de la ionomycine et de la bréfeldine A. Les lymphocytes T sont ensuite marqués avec des anticorps anti-CD4 et des anticorps anti-CD8 couplés à deux types de fluorochromes différents. Puis, les lymphocytes sont fixés et perméabilisés avant d'être incubés avec un anticorps anti-interféron gamma couplé à un troisième type de fluorochrome. Les lymphocytes sont ensuite analysés par cytométrie en flux. Les valeurs indiquent le pourcentage des cellules dans les rectangles dans les différentes conditions expérimentales:



- A. Cette expérience permet de quantifier la sécrétion de l'interféron gamma dans le milieu de culture des lymphocytes.
- B. Dans cette expérience, seuls les lymphocytes spécifiques des antigènes tumoraux sont analysés.
- C. Dans les différentes conditions expérimentales, la proportion des cellules exprimant l'interféron gamma est supérieure pour les lymphocytes T CD8 en comparaison aux lymphocytes T CD4.
- D. La molécule A augmente la proportion de lymphocytes T CD8 exprimant l'interféron gamma par rapport à la condition contrôle.
- E. Dans cette expérience, tandis que CD4 et CD8 sont marqués à la surface des lymphocytes, l'interféron gamma est marqué en intracellulaire.

Correction

QCM 1 - AB

A. Le vecteur pCOV-PRO contient un gène de résistance à l'ampicilline sous la dépendance d'un promoteur procaryote. Donc si des bactéries (organisme procaryote) sont transformées avec ce vecteur alors elles exprimeront le gène de la résistance à l'ampicilline. On pourra les sélectionner en introduisant de l'ampicilline dans le milieu.

B. Il existe plusieurs techniques pour transformer des bactéries : la méthode chimique, la méthode électrique et en utilisant un bactériophage. Chez l'organisme procaryote, la méthode électrique fait référence à l'électroporation (application d'un champ électrique sur une membrane cellulaire ayant pour but de la déstabiliser).

C. Pour un clonage orienté il aurait fallu utiliser deux enzymes de restrictions différentes. Effectivement si les enzymes de restrictions sont différentes elles vont orienter le sens dans lequel la cassette d'expression intégrera le plasmide. Ici, on utilise une seule enzyme de restriction HindIII donc la cassette d'expression pour aussi bien s'insérer dans un sens ou dans l'autre au sein du plasmide.

D. En digérant le plasmide pCOV par Hind on lui retire le promoteur eucaryote constitutif et toute la séquence entre les deux enzymes HindIII : soit $500-10 = 490\text{pb}$, donc le plasmide pCOV digéré ne fait plus que $5\,010\text{pb}$. À ces $5\,010\text{pb}$ on rajoute le promoteur procaryote qu'on a récupéré grâce à la digestion de pPROM par HindIII. On a donc digéré de ce plasmide $3100-2300 = 800\text{pb}$. Ces 800pb vont s'intégrer à la place du promoteur eucaryote au sein du plasmide pCOV pour former pCOV-PRO. pCOV-PRO aura donc une taille de $5\,010+800 = 5\,810\text{pb}$.

E. Au sein du plasmide pCOV-PRO le gène codant COV2 est sous la gouvernance d'un promoteur procaryote, donc la protéine COV2 ne sera produite que chez les procaryotes. Attention : c'est grâce au plasmide pCOV que la COV2 peut être exprimée chez les eucaryotes mais ce plasmide a été modifié.

QCM 2 - BC

A. Si le promoteur est inséré avec la flèche vers le gène cela indique que la transcription va s'initier et continuer dans ce sens là, si la flèche est insérée dans le sens inverse cela signifie que la transcription partira dans le mauvais sens et alors le gène ne pourra pas être transcrit. B. Le site de restriction pour NotI se trouve en position 4100 pb sur le plasmide, c'est l'unique site sur notre plasmide. La digestion par NotI va permettre de linéariser le plasmide, une fois devenu linéaire on va pouvoir le faire migrer dans un gel d'électrophorèse pour déterminer sa taille. (attention : si il n'est pas linéarisé au préalable, le plasmide ne passera pas dans le gel d'électrophorèse).

C. Effectivement en digérant le plasmide par HindIII on pourra identifier les plasmides ayant inséré le promoteur procaryote et ceux n'ayant pas inséré ce promoteur. Les plasmides (pPROM) avec le promoteur procaryote digérés par HindIII auront deux bandes de taille bien distinctes (une bande de 800pb entre les 2 enzymes HindIII et une bande avec le reste du plasmide donc de 2400 pb) si on les fait migrer sur un gel d'électrophorèse.

Tandis que les plasmides ayant gardé le promoteur eucaryote (pCOV) auront également deux bandes sur un gel d'électrophorèse, dont une de 490 pb (entre les 2 enzymes Hind III) et une de $5\,010$ (correspond au reste du plasmide) . Pour conclure, pour voir quel plasmide a intégré le promoteur eucaryote, il suffit de comparer la taille des bandes (nombre de pb) . Les plasmides ayant intégré le promoteur eucaryote auront une petite bande de 800 pb (correspond à la distance entre les deux enzymes hindIII entourant le promoteur procaryote) et soit une bande de 5010 pb (montrera le promoteur eucaryote s'est intégré dans le plasmide COV2) ou soit une bande de $2\,400\text{ pb}$ (montrera que le plasmide s'est réintégré dans le plasmide pPROM) .

D. Pour évaluer le sens d'insertion du promoteur procaryote il faudrait qu'un site de restriction se retrouve à la fois au sein de ce promoteur procaryote (sans être au milieu) et à la fois dans le plasmide pCOV. C'est le cas du site de restriction de BamH1. On va donc pouvoir comparer la taille des deux fragments obtenus dans le cas où le promoteur s'insère dans le bon sens avec les deux fragments obtenus quand il s'insère dans le mauvais sens pour déterminer le sens d'insertion.

E. Pst1 se trouve au milieu du promoteur procaryote. C'est à dire que lorsqu'on digère pPROM par HindIII on clive au niveau de 2 300pb et au niveau de 3100 pb, on obtient donc un fragment de 800pb. Pst1 se trouve à mi-chemin entre les deux extrémités, donc à 400 pb, que le promoteur procaryote s'insère dans le bon ou le mauvais sens la digestion par Pst1 ne nous informera en rien.

QCM 3 - BCE

A. Il n'existe pas de modifications post traductionnelles au sein des procaryotes, la phosphorylation étant une modification post traductionnelle, la protéine ne pourra pas être phosphorylée au sein d'une bactérie.

B. La technique de congélation/ décongélation permet de fragmenter les cellules et donc d'obtenir un homogénat.

C. C'est une chromatographie d'affinité, si la protéine COV2 passe dans la colonne et que des anticorps la reconnaissent alors ils permettront sa purification.

D. La solution de glutathion réduit permet d'éluer des protéines étiquetées GST fixées à une colonne de glutathion. Dans ce cas nous sommes en présence d'une protéine étiquetée (His)₆.

E. Lorsque $pH > pI$ (pI étant le point isoélectrique de la protéine d'intérêt), alors la protéine est chargée négativement. Une protéine chargée négativement va pouvoir être purifiée grâce à une colonne échangeuse d'anion.

QCM 4 - ABD

A. Totalement vrai, lorsqu'on met la protéine COV2 dans un milieu en présence de billes de Nickel et qu'on récupère les billes on remarque la présence de la protéine COV2 sur l'électrophorèse. Ce qui veut dire que le nickel et COV2 interagissent ensemble. De plus, on sait dans l'énoncé de départ que COV2 est étiquetée (His)₆ et cette étiquette à une forte affinité pour certains métaux comme le Nickel ou le Cobalt.

B. On observe grâce à l'électrophorèse une liaison directe entre la protéine Z et les billes de Nickel. Effectivement lorsqu'on met dans un même milieu les billes de Nickel et la protéine Z il se passe la même chose qu'avec COV2

C. Ces résultats montrent que X et Y interagissent avec COV2 mais pas Z. Effectivement on récupère X et Y dans l'électrophorèse que si on est en présence des billes de Nickel et de COV2 à la fois. Ce qui signifie que X et Y interagissent avec COV2 qui lui interagit avec les billes de Nickel donc les protéines X et Y seront retrouvées sur l'électrophorèse. Mais concernant la protéine Z elle interagit directement avec les billes de Nickel comme vu dans l'item précédent. Il n'y a donc aucune preuve de l'interaction entre les protéines Z et COV2 dans cette expérience.

D. L'électrophorèse permet une analyse qualitative des protéines mais elle a aussi pour rôle de déterminer ou de confirmer la masse moléculaire des protéines. On voit ici que COV2 migre bien à 55 kDa.

E. Rien ne nous le prouve ! Ça peut être aussi indirect.

QCM 5 - ABCDE

A. Les deux ARN guides vont cibler chacun une allèle différente sur les deux chromosomes, ils vont donc cibler chacun le gène sur ses deux allèles. Le gène sera inactivé de manière homozygote.

B- La lapine sauvage est homozygote saine pour cette mutation artificiellement produite par le KO et le lapin est KO homozygote aussi, donc un croisement entre ces deux lapins donnera quoi qu'il arrive un allèle muté (qui vient du lapin KO) et un allèle saine (qui vient de la lapine sauvage) pour le gène de la myostatine.

C. Le but de l'ARN (CRISPR) guide est de diriger la Cas9 vers une séquence à cliver, l'ARN guide reconnaîtra une séquence PAM, cela sera le signal pour la Cas9 de cliver, les deux brins, 3 nucléotides plus loin.

D. Nous allons cliver une séquence d'ADN qui engendrera une réparation, si on ajoute une séquence d'homologie il pourra y avoir alors recombinaison homologue formant un KI mais pour un KO on ne rajoutera pas de séquence d'homologie alors il y aura de forte chance que la réparation double brin soit une NHEJ, donc une réparation fautive qui inhibera l'expression du gène ciblé. La recombinaison non homologue est donc nécessaire à l'obtention d'un KO.

E. C'est quelque chose à savoir, les insertions et les délétions provoquent l'apparition de codons stop prématurés, notamment par un décalage du cadre de lecture.

QCM 6 - BCE

A. On voit sur le schéma que la molécule B ne réduit pas de manière significative le volume tumoral. Effectivement il n'y a pas de « * » pour comparer le volume sans molécules avec le volume suite à l'action de la molécule B. (pour les souris non injectées avec anti-CD8 on regarde la partie gauche de la figure).

B. On observe sur la partie gauche du schéma qu'il y a une différence significative du volume tumoral entre l'utilisation de la molécule A et le couplage des molécules A et B. La diminution significative du volume tumoral est une preuve de l'efficacité du traitement avec les molécules A et B.

C. Les anticorps Anti-CD8 vont cibler les lymphocytes CD8+ (cytotoxiques). Étant donné que ces lymphocytes sont activateurs du complément (c'est à dire qu'ils vont dégrader leurs cibles par le biais notamment de protéases) les lymphocytes CD8+ vont être dégradés et ils ne vont plus pouvoir avec leurs action de diminution du volume tumoral.

D. L'injection d'anticorps Anti-CD8 va entraîner la dégradation des lymphocytes cytotoxiques donc on ne pourra pas les quantifier.

E. Si on ajoute les anticorps Anti-CD8 la molécule A n'aura plus aucun effet sur la diminution du volume tumoral tandis que si les lymphocytes T CD8 sont toujours présent l'injection de la molécule A aura pour effet de diminuer le volume tumoral (l'effet anti-tumoral). Donc l'action de la molécule A dépend bien de la présence des lymphocytes T CD8 (cytotoxiques).

QCM 7 - CDE

- A. Dans cette expérience l'ajout du PMA, de la ionomycine et du brefeldine A a pour effet que les lymphocytes ne pourront pas sécréter leurs produits. Donc dans ce cas précis l'IFN gamma ne sera pas sécrété mais s'accumulera au sein de la cellule.
- B. Dans cette expérience on purifie tous les lymphocytes T puis dans la cytométrie on sélectionne tous les lymphocytes T CD4 et CD8, un bon nombre ne seront pas spécifiques des antigènes tumoraux. On peut le voir dans les conditions contrôles où peut de lymphocytes produiront de l'IFN gamma en réponse aux antigènes tumoraux.
- C. Effectivement, on voit que proportionnellement les lymphocytes T CD8 expriment beaucoup plus l'IFN gamma que les lymphocytes T CD4. Exemple dans les conditions contrôles, 5,29% des T CD4 expriment l'IFN gamma pour 33,4% des T CD8.
- D. On observe bien une augmentation des proportions de lymphocytes exprimant l'IFN gamma en présence de la molécule A dans les deux populations en comparaison aux conditions contrôles.
- E. CD4 et CD8 sont des glycoprotéines de surface et l'IFN gamma n'a pas pu être sécrété par les lymphocytes comme expliqué dans l'item A, ils seront donc bloqués puis marqués en intracellulaire.

Dans le cadre d'un programme de recherche sur le cancer du rein, vous entreprenez de produire des anticorps monoclonaux (ACm) de souris contre de nouveaux antigènes tumoraux. Vous disposez d'une lignée cellulaire humaine (CR) dérivée d'un cancer du rein et de tissu provenant de la même tumeur.

Vous avez immunisé une série de souris avec un extrait de protéines solubles de la lignée CR et vous mettez en œuvre la production d'ACm selon la technologie des hybridomes. Afin d'identifier tous les ACm reconnaissant un antigène exprimé par la lignée CR, vous allez associer plusieurs méthodes de criblage.

QCM 1 :

Parmi les propositions suivantes, la(les)quelle(s) de ces technique(s) vous semble(nt) utilisable(s)?

- A. Vous pouvez cribler les surnageants des hybridomes par immunocytochimie sur les cellules de la lignée CR avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase.
- B. Vous pouvez cribler les surnageants des hybridomes par dot-blot, à partir d'un extrait protéique des cellules de la lignée CR et préciser le poids moléculaire des antigènes reconnus.
- C. Vous pouvez cribler les surnageants des hybridomes à l'aide d'un ELISA-sandwich, en utilisant l'extrait protéique total de la lignée CR utilisé pour l'immunisation.
- D. Vous pouvez cribler les surnageants des hybridomes par cell-ELISA, en utilisant les cellules de la lignée CR.
- E. Vous pouvez cribler les surnageants des hybridomes par immunotransfert (immunoempreinte), à partir d'un extrait protéique des cellules de la lignée CR.

QCM 2 :

Vous avez sélectionné, par immunofluorescence indirecte sur les cellules de la lignée CR, 4 ACm (A, B, C, D) dont vous voulez analyser la réactivité en détail.

Sur des immunotransferts (immunoempreintes) réalisés à partir d'un extrait contenant les protéines solubles du tissu tumoral, l'ACm A reconnaît une bande de 100 kDa. L'ACm B reconnaît une bande de 70 kDa et une bande de 100 kDa. L'ACm C reconnaît une bande de 80 kDa. L'ACm D ne présente aucune réactivité.

En immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de tissu tumoral, vous observez un marquage avec les 4 ACm mais A, B et D marquent spécifiquement les cellules cancéreuses, alors que C marque les cellules cancéreuses et les cellules normales.

Parmi les propositions suivantes, la(les)quelle(s) sont compatibles avec vos résultats ?

- A. Les ACm A et B pourraient reconnaître deux épitopes différents sur la même protéine de 100 kDa.
- B. La protéine de 70 kDa pourrait résulter du clivage protéolytique de celle de 100 kDa, l'ACm B reconnaissant un épitope localisé sur la partie commune à ces deux protéines.
- C. La réactivité de l'ACm B avec la protéine de 70 kDa pourrait correspondre à une réactivité croisée avec une protéine différente de la protéine de 100 kDa mais porteuse du même épitope.
- D. La réactivité de l'ACm C avec les cellules normales témoigne d'une erreur expérimentale puisque l'ACm a été produit à partir de la lignée de cellules cancéreuses.
- E. L'épitope reconnu par D est un épitope séquentiel accessible sur la molécule-cible uniquement dans la conformation cellulaire ou tissulaire de celle-ci.

QCM 3 :

Vous souhaitez caractériser les antigènes reconnus par les ACm et spécifiquement exprimés par les cellules cancéreuses.

Pour la résolution de cet exercice, considérez qu'une protéine est pure lorsqu'elle ne donne qu'une bande en SDS-PAGE.

Parmi les propositions suivantes, la(les)quelle(s) vous paraît(aissent) exacte(s) ?

- A. A l'aide de l'ACm A, vous pouvez isoler sous forme pure la protéine de 100 kDa par chromatographie d'affinité, à partir d'un extrait contenant les protéines solubles du tissu tumoral.
- B. A l'aide de l'ACm B, vous pouvez isoler sous forme pure la protéine de 100 kDa par chromatographie d'affinité, à partir d'un extrait contenant les protéines solubles du tissu tumoral.
- C. Afin d'obtenir un antigène spécifique des cellules tumorales, vous devrez purifier l'antigène reconnu par C, à partir de la lignée cellulaire CR.
- D. L'ACm D peut être écarté d'emblée pour immunoprécipiter l'antigène qu'il reconnaît, à partir des protéines solubles du tissu tumoral.
- E. Si après séparation par électrophorèse bidimensionnelle d'un extrait protéique contenant les protéines solubles du tissu tumoral, vous analysez celui-ci par immunotransfert (immunoempreinte) à l'aide de l'ACm D, vous pourrez préciser le point isoélectrique de l'antigène qu'il reconnaît.

QCM 6 :

Des mutations de la protéine p16, un membre de la famille des CKI (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor), ont été observées dans des mélanomes. Une étude visant à déterminer les effets de ces mutations sur le cycle cellulaire a été réalisée. Des fibroblastes humains sont transfectés avec un vecteur vide ou avec un vecteur permettant l'expression de la forme sauvage (p16) ou mutante (p16mut). Les effets de l'expression de ces protéines sur la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire sont analysés 30 heures après transfection.

Que pouvez déduire des résultats obtenus ?

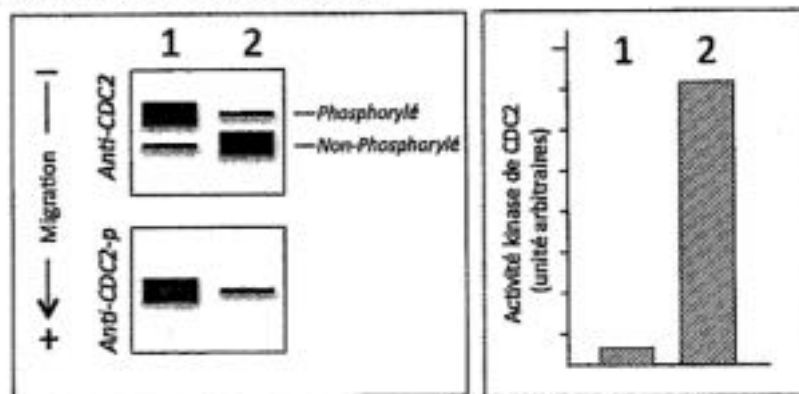
% de cellules	G1	S	G2	M
Vecteur vide	50	25	21	4
p16	94	2	4	0
p16mut	51	26	19	4

- A. L'expression de p16mut conduit à une accumulation des cellules en G1.
- B. Les formes sauvage et mutante de p16 sont responsables d'une inhibition de la progression dans le cycle cellulaire.
- C. L'expression de p16mut n'a pas d'effet sur le contrôle de la transition G1/S.
- D. Une répartition normale des cellules dans le cycle est observée après transfection de p16.
- E. L'augmentation du pourcentage de cellules en phase G2 lors de la transfection par p16mut indique que cette protéine est probablement inductrice de l'entrée en mitose.

QCM 7 :

Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules interphasiques. Une immunoprécipitation a été réalisée avec des anticorps contre CDC2. L'immunoprécipité a été soumis (2) ou non (1) à une incubation *in vitro* avec de la protéine CDC25 purifiée. L'image de gauche montre le résultat de l'immunoempreinte (western blot) réalisée sur les échantillons (1) et (2) avec deux anticorps, l'un dirigé contre CDC2 (panel du haut), ou l'autre dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de CDC2 (panel du bas). L'activité kinase de CDC2 associée à l'immunoprécipité est également mesurée (image de droite).

Que pouvez déduire des résultats présentés ?



- A. CDC25 est une phosphatase qui inactive CDC2.
- B. CDC25 phosphoryle CDC2 et inhibe ainsi son activité.
- C. La forme non-phosphorylée de CDC2 présente une mobilité électrophorétique retardée.
- D. L'incubation de l'immunoprécipité avec CDC25 entraîne la dégradation de CDC2.
- E. L'activité kinase de CDC2 est dépendante de sa déphosphorylation par CDC25.

QCM 12 :

L'EGF ou « Epidermal Growth Factor » est un facteur de croissance dont le récepteur (EGF-R) fait partie des récepteurs à activité tyrosine kinase. Des travaux de recherche ont montré que l'expression de l'EGF-R dans les cellules cancéreuses représente un facteur de mauvais pronostic. Des molécules susceptibles d'interagir avec l'EGF-R pour bloquer son action ont été développées. Trois de ces molécules (1 à 3) ont été testées expérimentalement. Aucune d'entre elles ne perturbe la liaison de l'EGF à son récepteur. Des cellules de type fibroblastique (COS) exprimant l'EGF-R sauvage ont été incubées pendant 10 minutes en présence de l'une de ces trois molécules (1, 2 ou 3) ou seulement du solvant dans lequel sont reprises ces molécules (C) puis stimulées ou non par 100 ng/ml d'EGF pendant 3 minutes. Des expériences d'immunoprécipitation (IP) suivie par une analyse en immunoempreinte (Western Blot = WB) ont ensuite été réalisées afin de suivre la phosphorylation de l'EGF-R (Figure 1A) ou de l'un de ses effecteurs, la phospholipase $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) (Figure 1B). Les immunoprécipitations et immunoempreintes ont été réalisées à l'aide d'anticorps anti-EGF-R, anti-PLC $\gamma 1$ ou anti-phosphotyrosine (P-Tyr) comme indiqué dans les figures. De plus, une technique appropriée a permis de quantifier le pourcentage de dimérisation de l'EGF-R (Figure 1C).

Rappels : L'EGF-R a une masse moléculaire (MM) de 170 kDa et la PLC $\gamma 1$ de 145 kDa.

Figure 1A

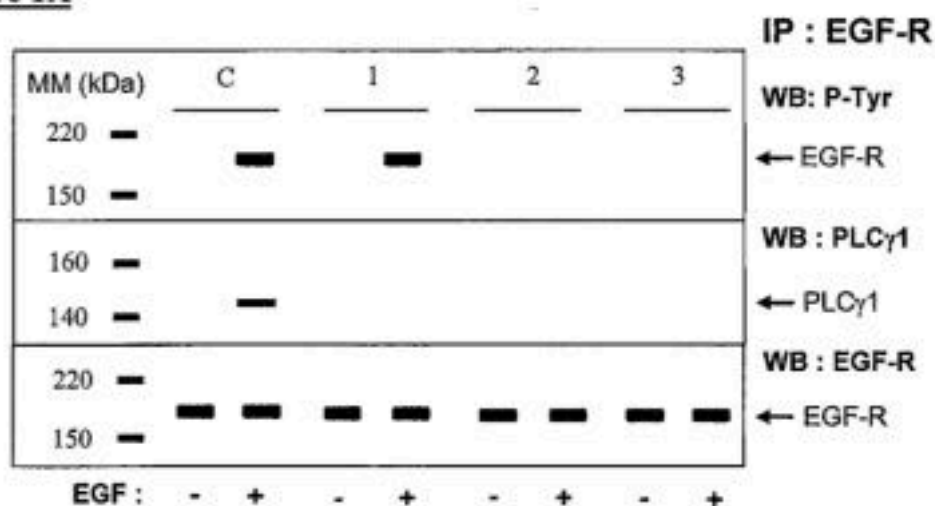


Figure 1B

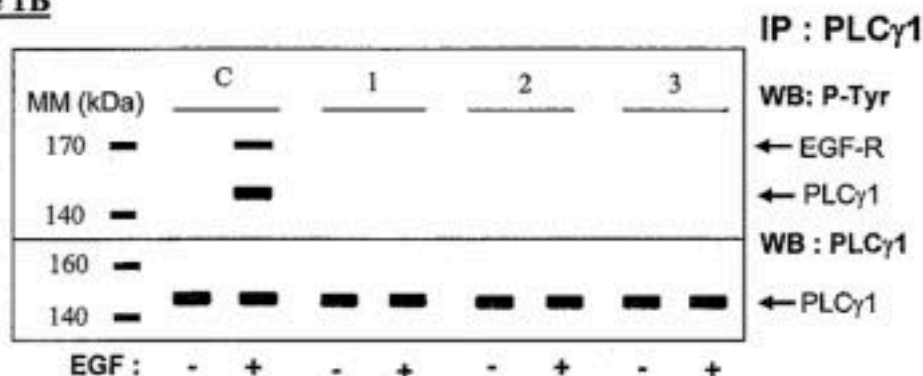
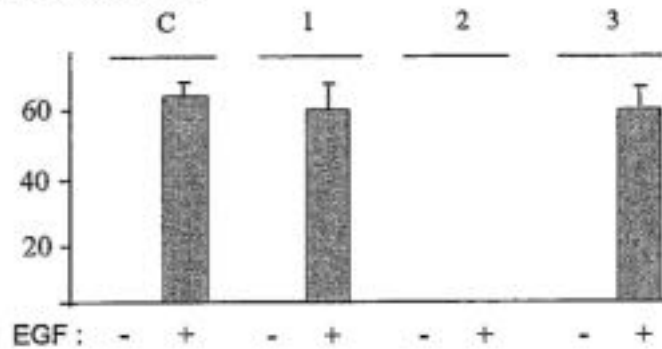


Figure 1C

% de dimères d'EGF-R



En considérant les données expérimentales de la Figure 1, quelles sont les propositions exactes ?

- A. L'activation de l'EGF-R par l'EGF entraîne la dimérisation du récepteur et sa phosphorylation sur tyrosine.
- B. La molécule 1 inhibe l'activité tyrosine kinase de l'EGF-R.
- C. La molécule 2 inhibe l'activation de l'EGF-R en empêchant sa dimérisation.
- D. La molécule 3 entraîne le clivage du domaine extracellulaire de l'EGF-R.
- E. La molécule 1 pourrait se lier avec une haute affinité sur la tyrosine phosphorylée impliquée dans le recrutement de la PLC γ 1 par l'EGF-R activé.

Correction

QCM 1 - ADE

- B. DOT BLOT est une technique qualitative (elle ne témoigne que de la présence ou de l'absence de la protéine).
- C. L'Elisa-sandwich est une technique permettant de cribler des antigènes, or on cherche à cibler un anticorps. Cela ne marchera donc pas, attention à ne pas confondre Ag et Ac.

QCM 2 - ABC

- D. Ça pourrait juste montrer que l'ACm C reconnaît une protéine présente sur les cellules normales et cancéreuses.
- E. C'est un **épitope conformationnel** qui est **accessible uniquement dans la conformation cellulaire ou tissulaire**, le **séquentiel sera accessible même après dénaturation**. Et l'immuno-empreinte est une technique dénaturante. Donc on ne retrouve pas l'épitope conformationnel.

QCM 3 - A

- B. L'ACm B reconnaît une protéine de 70 kDa et 100 kDa donc sur une chromatographie d'affinité on aura 2 bandes, une à 70 et une à 100 C. L'ACm C marque les cellules normales et cancéreuses, pas spécifiquement les cancéreuses donc inutile pour les séparer
D. L'épitope de l'ACm D est conformationnel c'est pour ça qu'il ne peut marquer dans ces conditions mais cela ne veut pas dire qu'on ne pourra pas l'utiliser dans d'autres conditions.
E. Non car l'ACm D ne marque pas de bande par immuno-empreinte (technique dénaturante, cf item 2E).

QCM 6 - C

- A. C'est plutôt p16 qui conduit à une accumulation de cellules en G1. B. Non le cycle continue, on voit par exemple pour p16 muté, des cellules en S, en mitose etc... Le cycle n'est pas arrêté.
D. Non, par rapport au vecteur vide, on voit qu'avec p16, on a 94% de cellules en G1 (contre 50% vecteur vide) ou encore 0% de cellules en mitose (contre 4% vecteur vide).
E. On ne voit pas d'augmentation du pourcentage de cellules en G2 (21% vecteur vide contre 19% p16 mutée).

QCM 7 - E

- A,B. On voit sur le graphique de droite qu'en présence de CDC25, l'activité de CDC2 est augmentée, on serait plutôt sur une protéine activatrice, non inhibitrice. C. En parlant de retard, on parle de la notion de temps, or dans nos graphiques, rien ne nous donne d'informations sur le temps, donc on ne peut pas savoir.
D. Non, puisque l'activité de CDC2 est augmentée quand il est soumis à une incubation avec CDC25.

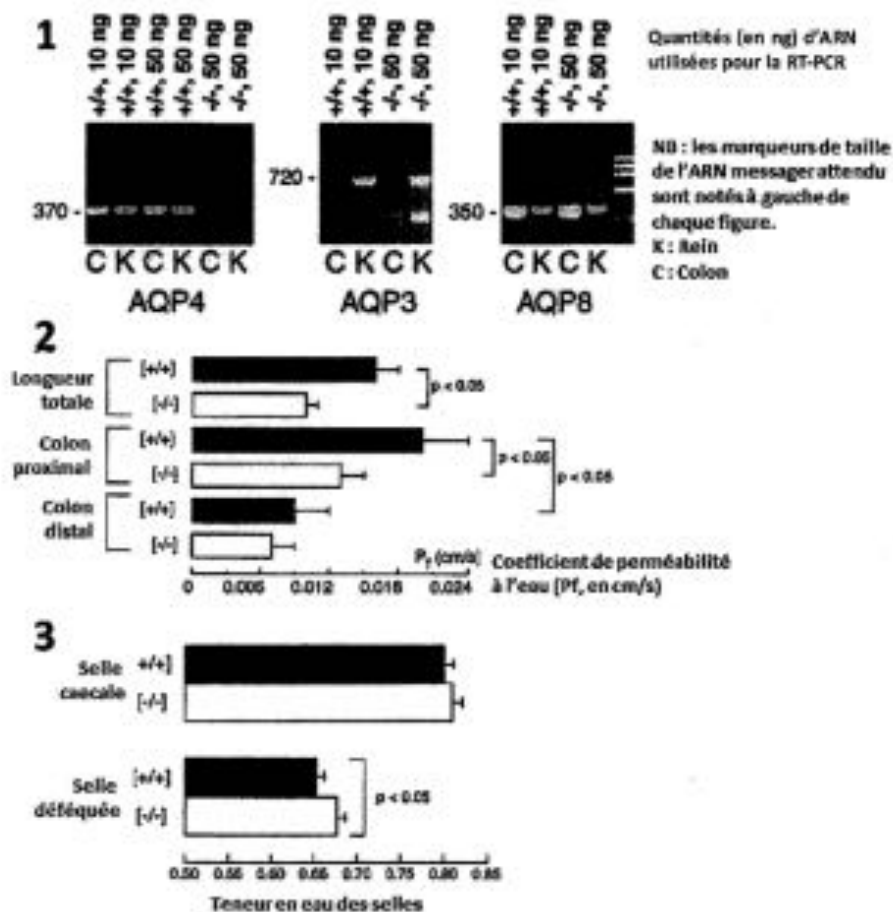
QCM 12 - ACE

- B. Non puisque sur la figure 1A on voit une bande à 170 kDa qui correspond à l'EGF R = il est toujours phosphorylé, actif
D. Sur la figure 1C, on voit qu'il y a autant de dimères pour la molécule 3 que pour le contrôle, le clivage entraînerait la dimérisation de EGF R s'il était effectué => **pas de dimérisation, pas de clivage**

Purpan 2013-2014

QCM 2 :

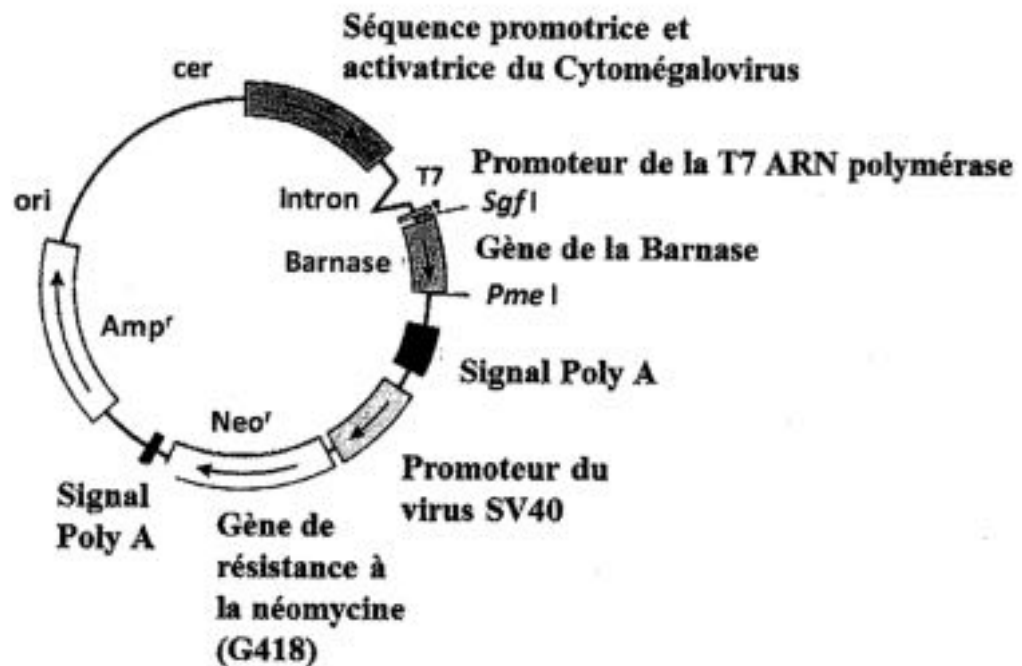
Le colon humain réabsorbe environ 2 litres de liquide par jour grâce à la perméabilité à l'eau de son épithélium. Des travaux d'immuno-localisation ont retrouvé une expression d'aquaporine 8 (AQP8) au pôle apical des cellules épithéliales coliques alors que les aquaporines 4 et 5 (AQP4 et AQP5) sont exprimées au pôle basolatéral des mêmes cellules. Il est décidé d'étudier la perméabilité colique à l'eau chez des souris invalidées pour l'AQP4 (AQP4^{-/-}). [1] L'expression de l'ARN messager d'AQP3, AQP4, AQP8 a été étudiée par RT-PCR dans le rein (K) et le colon (C) de souris exprimant AQP4 (notées : +/+) ou invalidées pour ce gène (notées : -/-) ; [2] Détermination du coefficient de perméabilité à l'eau (Pf) pour le colon en totalité et pour chaque segment, distal et proximal. [3] Contenu en eau des selles récupérées au niveau du caecum (juste avant l'entrée dans le colon) et après défécation. P < 0,05 : différence significative entre les valeurs des deux groupes désignés par le crochet.



A partir des présents résultats, il est exact que :

- L'analyse par RT-PCR de la figure 1 indique que les souris AQP4^{-/-} n'expriment pas l'ARN messager de l'AQP4 ni celui l'AQP8.
- L'analyse par RT-PCR de la figure 1 indique que les souris AQP4^{+/+} et AQP4^{-/-} n'expriment pas l'ARN messager de l'AQP3 dans le rein.
- D'après la figure 2, la perméabilité colique à l'eau du segment proximal est significativement diminuée chez les souris AQP4^{-/-} par rapport aux souris AQP4^{+/+}.
- D'après la figure 3, la teneur en eau des selles caecales des souris AQP4^{-/-} n'est pas significativement différente de celle des souris AQP4^{+/+}.
- Le fait que l'invalidation du gène AQP4 augmente significativement la teneur en eau des selles déféquées suggère que cette aquaporine contribue à la réabsorption de l'eau colique chez la souris.

Le vecteur plasmidique suivant est utilisé pour cloner la séquence codante d'un ADNc humain.



On vous rappelle par ailleurs la séquence du site de restriction *Pme* I :



Le principe de ce clonage repose sur l'insertion de l'ADNc après digestion du plasmide par les enzymes de restriction *Sgf*I et *Pme*I.

QCM 4 :

Le vecteur plasmidique ci-dessus, dans lequel a été clonée la séquence codante d'un ADNc humain, est utilisé pour produire la protéine recombinante correspondante.

- A. La protéine recombinante humaine sera produite dans des bactéries transformées par le plasmide.
- B. La protéine recombinante humaine sera produite dans des cellules de mammifères après transfection cellulaire.
- C. La protéine codée par le gène de résistance à la néomycine sera produite dans des cellules de mammifères après transfection cellulaire.

6

- D. Le traitement au G418 des cellules de mammifères transfectées permet la sélection des cellules ayant intégré l'ADN du plasmide dans l'ADN génomique.
- E. Ce vecteur permet de réaliser des transfections stables des cellules de mammifères.

Vous travaillez sur un modèle de maladie métabolique chez le lapin. Chez les animaux atteints, certaines cellules hépatiques expriment une protéine transmembranaire de la famille des protéines « E » : la protéine « E2 ».

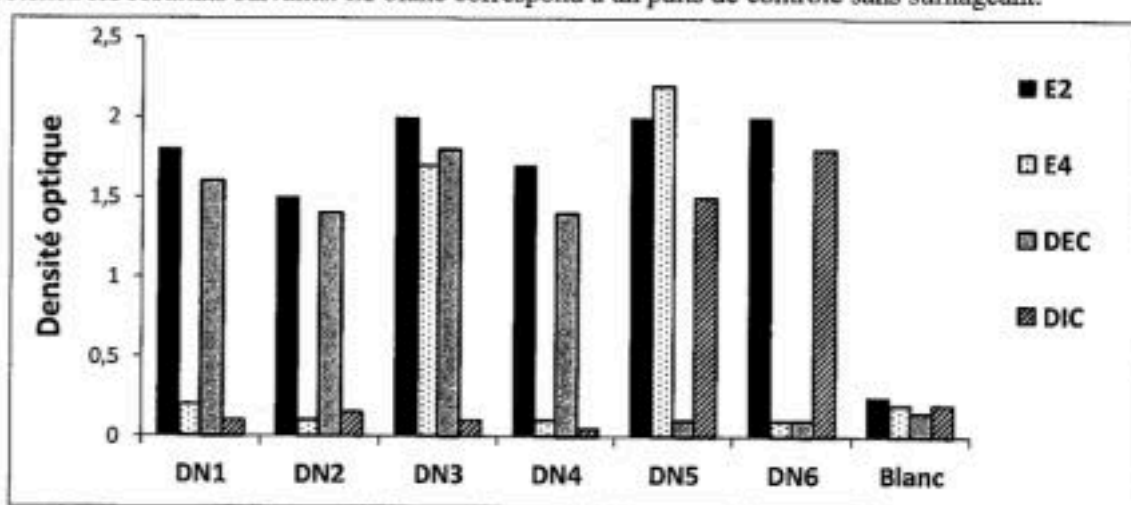
Vous souhaitez produire des anticorps monoclonaux de souris anti-E2 de lapin.

- Vous disposez de plusieurs formes recombinantes de E2 : une forme complète (E2) de 75 kDa ainsi que plusieurs formes tronquées correspondant aux domaines C-terminal extracellulaire (DEC) et N-terminal intracellulaire (DIC) de E2 de poids moléculaires respectifs de 50 et 25 kDa.

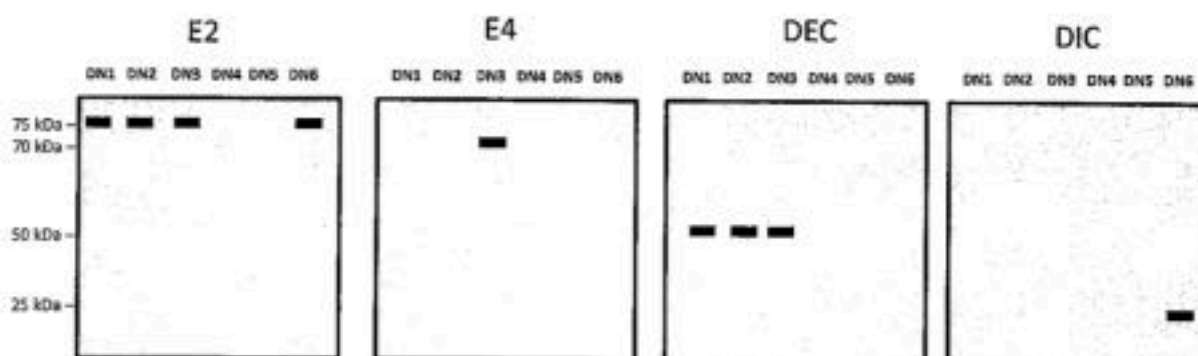
- Vous disposez aussi d'une forme recombinante d'un autre membre de la famille de E2 : la protéine de lapin « E4 » d'un poids moléculaire de 70 kDa.

QCM 5 :

Après immunisation de souris avec E2, vous avez obtenu 6 hybridomes DN1 à DN6, clonés plusieurs fois. Vous analysez la réactivité des surnageants de culture des hybridomes en ELISA indirect sur chacune des protéines recombinantes que vous possédez (E2, E4, DEC, DIC). Vous obtenez les résultats suivants. Le blanc correspond à un puits de contrôle sans surnageant.



Vous testez ensuite la réactivité des surnageants en immunoempreinte (Western blot), après électrophorèse en PAGE-SDS, sur les mêmes protéines recombinantes. Les résultats sont reportés sur la figure suivante.



Lesquelles de ces conclusions sont compatibles avec vos résultats :

- A. Vous pouvez affirmer que les anticorps DN1 et DN2 sont identiques.
- B. L'épitope reconnu par l'anticorps DN3, porté par le DEC de E2, est un épitope séquentiel commun à E2 et E4.
- C. L'anticorps DN3 n'est pas monoclonal.

8

- D. L'épitope reconnu par l'anticorps DN6 est porté par le DIC de E2.
- E. L'anticorps DN4, spécifique de E2, reconnaît un épitope conformationnel.

QCM 6 :

Vous cherchez si, chez les animaux malades, les cellules hépatiques qui expriment E2 à leur membrane, libèrent par clivage un fragment de E2 dans le milieu extracellulaire lorsque la cellule est soumise à divers stress. Vous souhaitez notamment mettre en évidence la présence du DEC de E2 dans le surnageant de cellules en culture soumises à divers stress.

Il est exact de dire que:

- A. Un test immunoenzymatique de type ELISA «sandwich» développé avec les anticorps DN1 et DN6 pour doser la molécule E2 entière, vous permettra de doser le DEC de E2 dans le milieu de culture.
- B. Vous pouvez réaliser une évaluation semi-quantitative du DEC de E2 dans le milieu de culture par immunoempreinte en utilisant l'anticorps DN1.
- C. Vous pouvez évaluer la capacité des cellules à libérer le DEC de E2 dans le surnageant de culture, par ELISpot, en utilisant les anticorps DN2 et DN4.
- D. Vous pouvez purifier le DEC, à partir des surnageants de culture, par chromatographie d'affinité avec l'anticorps DN4, puis doser sa concentration par le dosage des protéines totales dans la fraction d'élution.
- E. Vous pouvez réaliser une immunoprécipitation à partir des surnageants de culture avec l'anticorps DN4, puis réaliser une immunoempreinte avec l'anticorps DN2.

Correction

QCM 2 - CDE

- A. On voit que l'ARN AQP4 n'est pas présent pour les -/-, en revanche celui de l'AQP8 est présent (bande à 350).
- B. Si, on voit bien 2 bandes à 720 pour le rein (K) en présence (+/+) ou non (-/-) de l'AQP4.

QCM 4 - BCDE

- A. Non, la protéine est codée par un ADNc humain, les bactéries ne le produiront pas. **Bien penser à regarder si le promoteur est eucaryote ou procaryote dans ce genre d'items.**

QCM 5 - BDE

- A. Ils n'ont pas la même densité optique.
- C. Le but est justement de produire des Ac monoclonaux (cf énoncé)

QCM 6 - BCDE

- A. DN1 et DN6 reconnaissent tous les deux E2 entière mais DN6 ne reconnaît pas le DEC de E2 donc ne permettra pas de le doser.

Les QCM 3, 4 et 5 sont liées.

Le PSA (prostate specific antigen) est une glycoprotéine monomérique de 33 kDa, sécrétée par les cellules prostatiques et retrouvée dans le liquide séminal. C'est une protéase de la famille des kallikréines : la kallikréine 3 humaine. Sa concentration sérique augmente dans le cancer de la prostate.

Dans le sérum, le PSA circule sous une forme libre (PSA-libre), entière (33 kDa) ou clivée (28 kDa), et sous une forme liée de façon non covalente (PSA-lié) notamment à l' α 1-antichymotrypsine (ACT).

Les anticorps monoclonaux de souris (AC) anti-PSA, ref1 et ref2, sont utilisés pour doser par ELISA sandwich le PSA-total (PSA-libre + PSA-lié) sérique.

Afin de doser spécifiquement le PSA-libre, vous souhaitez produire de nouveaux AC anti-PSA. Vous avez purifié par chromatographie du PSA-libre à partir de sérums de patients atteints de cancer de la prostate. Vous immunisez des souris avec celui-ci et vous produisez des AC selon un protocole classique.

QCM 3 :

Vous voulez identifier les hybridomes sécréteurs d'AC anti-PSA ou reconnaissant des antigènes exprimés dans la prostate et donc potentiellement anti-PSA :

Parmi les propositions suivantes, la(les)quelle(s) est (sont) exacte(s) ?

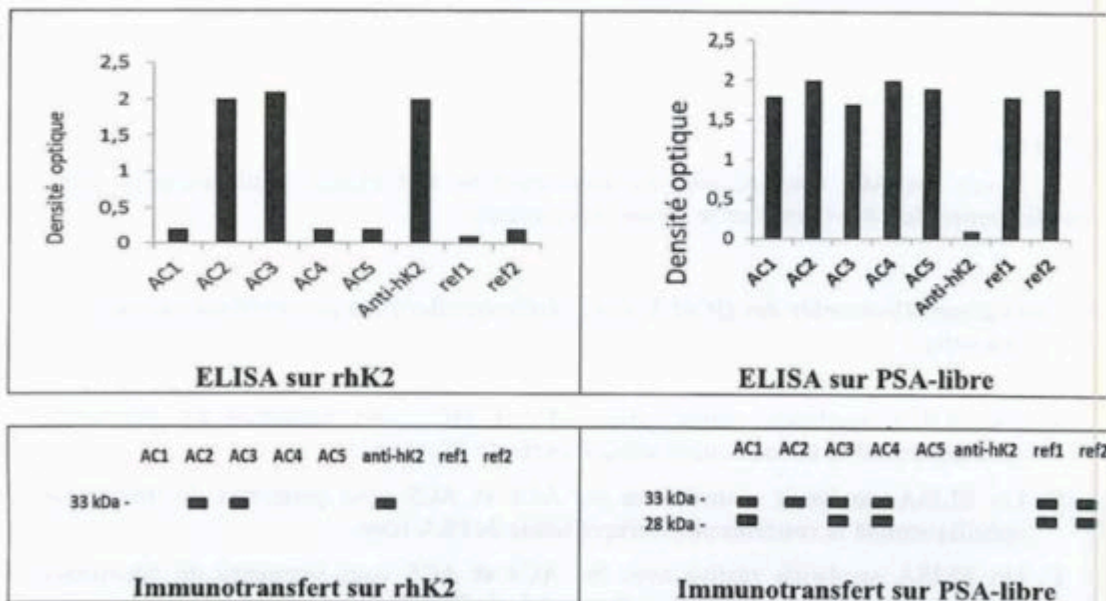
- A. A partir des surnageants de culture des hybridomes, vous pouvez vérifier que les AC reconnaissent bien des antigènes exprimés au niveau prostatique par une étude immunohistochimique sur des coupes de prostate.
- B. Pour identifier les AC anti-PSA qui reconnaissent un épitope séquentiel, vous pouvez cribler les surnageants de culture des hybridomes par immunotransfert (Western blot) après électrophorèse en PAGE-SDS du PSA qui a servi à immuniser les animaux.
- C. Vous pouvez évaluer le nombre d'hybridomes sécréteurs d'AC anti-PSA par ELISpot en utilisant le PSA qui a servi à immuniser les animaux.
- D. Vous pouvez trier les hybridomes sécréteurs d'AC anti-PSA par cytométrie en flux.
- E. Avec les AC anti-PSA qui reconnaissent un épitope séquentiel, vous vous attendez à observer 3 bandes en immunotransfert après électrophorèse du PSA qui a servi à immuniser les animaux en PAGE-SDS en conditions réductrices: une bande de 28 kDa, une bande de 33 kDa et une bande de plus haut poids moléculaire correspondant au PSA-lié.

QCM 4 :

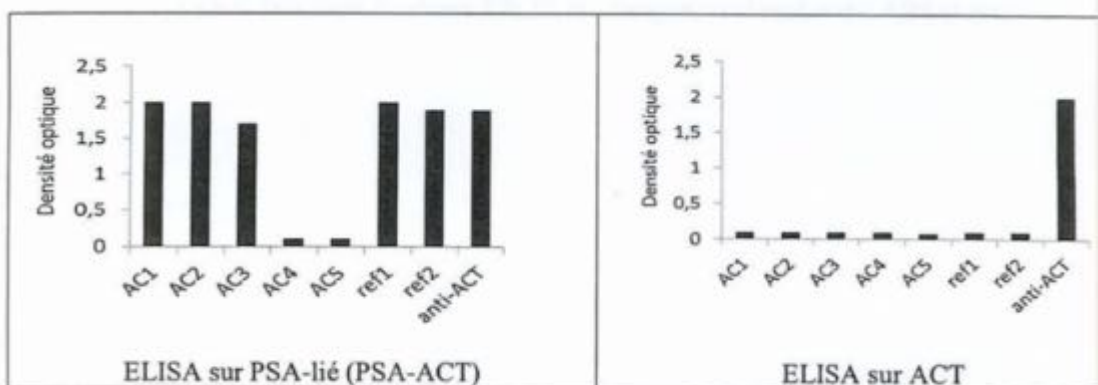
Vous avez identifié plusieurs hybridomes produisant des AC anti-PSA, que vous avez clonés plusieurs fois par dilution limite.

Vous vérifiez que vos AC ne reconnaissent pas, par réactivité croisée, la kalikréine 2 humaine (hK2), qui présente une forte homologie de séquence avec le PSA. Pour cela, vous testez vos AC parallèlement sur une hK2 recombinante (rhK2) de 33 kDa et sur le PSA-libre, en ELISA d'une part et d'autre part en immunotransfert après électrophorèse en PAGE-SDS en conditions réductrices.

Vous possédez un AC anti-hK2 parfaitement caractérisé que vous utilisez comme contrôle.



Vous étudiez aussi la réactivité de vos anticorps en ELISA sur le PSA-lié. Parallèlement, vous vérifiez l'absence de réactivité croisée de vos anticorps sur l'ACT. Vous possédez un AC anti-ACT parfaitement caractérisé que vous utilisez comme contrôle.



Parmi les interprétations suivantes des figures ci-dessus, la(les)quelle(s) est (sont) exacte(s) ?

- A. Les AC1, 4 et 5 reconnaissent des épitopes portés par le PSA-libre.
- B. Les AC2 et 3 reconnaissent des épitopes portés par au moins une forme de PSA-libre et par la rhK2.
- C. L'épitope reconnu par l'AC1 est accessible uniquement sur les formes natives de PSA.
- D. L'AC2 reconnaît un épitope conformationnel porté par la seule forme clivée du PSA-libre.
- E. L'AC5 reconnaît un épitope conformationnel.

QCM 5 :

Avec vos AC, vous décidez de développer un test ELISA sandwich pour doser spécifiquement le PSA-libre dans le sérum des patients.

En considérant l'ensemble des QCM 3, 4 et 5, la(les)quelle(s) des propositions suivantes est (sont) exacte(s) ?

- A. Un ELISA sandwich réalisé avec ref1 et ref2 vous permettra de déterminer spécifiquement la concentration sérique totale de PSA-libre.
- B. Un ELISA sandwich réalisé avec les AC1 et AC5 vous permettra de déterminer spécifiquement la concentration sérique totale de PSA-libre.
- C. Un ELISA sandwich réalisé avec les AC4 et AC5 vous permettra de déterminer spécifiquement la concentration sérique totale de PSA-libre.
- D. Un ELISA sandwich réalisé avec les AC2 et AC4 vous permettra de déterminer spécifiquement la concentration sérique totale de PSA-libre.
- E. Vous pouvez réaliser une immunoprécipitation du PSA-lié sérique avec l'anti-ACT et doser le PSA-libre dans le surnageant, en ELISA sandwich avec ref1 et ref2.

Les QCM 6 et 7 sont liées.

Le $\text{TNF}\alpha$ (tumor necrosis factor α) est une cytokine produite par différentes cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, capable de moduler les fonctions de ces cellules. Dans les expériences suivantes, on utilise des cellules en culture, représentatives des leucocytes polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sont activées par des petits peptides bactériens *N*-formylés, dont le FMLP (formylméthionyl-leucyl-phénylanine).

QCM 6 :

Dans une première série d'expériences, on a étudié la sécrétion de prostaglandine E_2 (PGE_2) par les cellules leucocytaires stimulées pendant 15 min avec le FMLP. Les cellules avaient été prétraitées (+ $\text{TNF}\alpha$) ou non prétraitées (- $\text{TNF}\alpha$) par du $\text{TNF}\alpha$ en concentration optimale, pendant 24 h. Les résultats expriment la concentration de PGE_2 dans le milieu (moyennes \pm écarts-types). Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives par rapport à la condition $[\text{FMLP}] = 0$. Les symboles \$ indiquent des différences statistiquement significatives par rapport à la condition (- $\text{TNF}\alpha$).

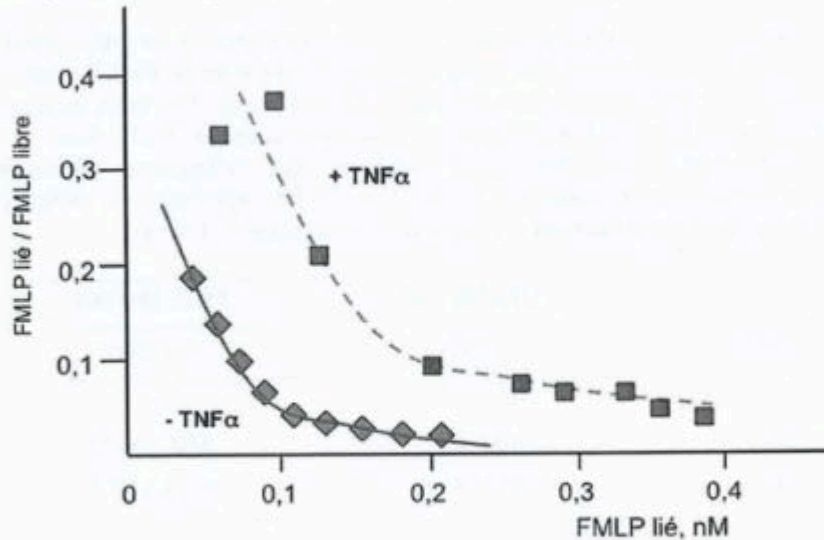
[FMLP]	PGE_2 (pg/ml)	
	- $\text{TNF}\alpha$	+ $\text{TNF}\alpha$
0	41 ± 12	39 ± 7
10 nM	$142 \pm 28^*$	$570 \pm 91^{*\$}$
1 μM	$152 \pm 31^*$	$582 \pm 112^{*\$}$

Par ailleurs, sur des cellules non prétraitées, lorsque le $\text{TNF}\alpha$ et le FMLP sont ajoutés ensemble pendant le temps de stimulation (15 min), les résultats de sécrétion de PGE_2 ne sont pas différents de ceux de la situation (- $\text{TNF}\alpha$).

- A. Par lui-même, le $\text{TNF}\alpha$ stimule la sécrétion de PGE_2 .
 - B. Par lui-même, le FMLP stimule la sécrétion de PGE_2 .
 - C. $\text{TNF}\alpha$ et FMLP ont un mécanisme d'action identique sur la sécrétion de PGE_2 .
 - D. Un prétraitement de 24 h par le $\text{TNF}\alpha$ rend les cellules plus sensibles à l'action du FMLP pour la sécrétion de PGE_2 .
- E. La concentration de FMLP nécessaire pour obtenir 50% d'effet maximal est voisine de 10^{-8} M.

QCM 7 :

Dans une autre expérience, on a étudié la liaison de FMLP radiomarqué ($[^3\text{H}]\text{FMLP}$) aux cellules, à 4°C , pendant 2 h. Les cellules avaient été prétraitées (+ $\text{TNF}\alpha$) ou non prétraitées (- $\text{TNF}\alpha$) par le $\text{TNF}\alpha$ pendant 24 h. Les expériences étaient conduites avec 10^6 cellules dans un volume de 0,1 ml. Après détermination de la liaison spécifique, les résultats en représentation de Scatchard sont illustrés dans la figure ci-dessous, pour les cellules non-prétraitées (- $\text{TNF}\alpha$, traits pleins) ou prétraitées (+ $\text{TNF}\alpha$, tirets).



- A. Le FMLP interagit avec deux types de récepteurs à la surface des cellules leucocytaires.
- B. Dans les cellules non-prétraitées par le $\text{TNF}\alpha$, la liaison maximale du FMLP est de 100 femtomoles / 10^6 cellules.
- C. Le K_d du récepteur de haute affinité pour le FMLP est de 3 nM.
- D. Le prétraitement des cellules par le $\text{TNF}\alpha$ augmente leur affinité pour le FMLP.
- E. Le prétraitement des cellules par le $\text{TNF}\alpha$ augmente le nombre de récepteurs au FMLP.

Les QCM 8 et 9 sont liées.

Dans le rein, la perméabilité à l'eau du segment terminal des néphrons est régulée par l'hormone anti-diurétique (ADH). Lorsque ce segment de néphron est exposé à de l'ADH, ses cellules épithéliales expriment l'aquaporine 2 au pôle apical et deviennent perméables à l'eau. Des travaux ont montré qu'il existe dans le même segment de néphron une expression d'aquaporine 4 (AQP4) et d'aquaporine 3 (AQP3). La fonction de ces aquaporines n'est pas connue mais elles pourraient contribuer à la perméabilité du pôle basal des cellules épithéliales du segment terminal des néphrons.

Pour étudier le rôle d'AQP4, des chercheurs ont généré des souris invalidées de façon homozygote pour le gène d'AQP4 (AQP-4 KO) et ont étudié l'expression rénale d'AQP1, 2, 3 et 4 et le fonctionnement des aquaporines *in vivo* dans des œufs de Xénopes et *ex vivo* dans des segments de néphron terminal de souris isolés et perfusés. Finalement ils ont mesuré la concentration osmotique des urines des souris non mutées ou invalidées pour AQP4, avant et après restriction hydrique.

QCM 8 :

Figure 1 : Western Blot effectué sur des extraits tissulaires de fragments de rein contenant, entre autres, les segments terminaux des néphrons, chez des souris non mutées (WT = Wild Type) ou mutées pour le gène d'AQP4 (notées KO) : (A) expression d'AQP4 ; (B) expression des aquaporines 1, 2 et 3 ; (C) coloration du gel par le bleu de Coomassie qui permet de confirmer que la même quantité de protéines a été déposée et migrée dans chaque puits.

Figure 2 : Perméabilité osmotique (notée Pf, correspond aux mouvements d'eau) d'œufs de Xénope préalablement injectés par des doses variables d'ARN recombinant (noté cRNA) d'AQP3 et AQP4, seuls ou associés.

Figure 1

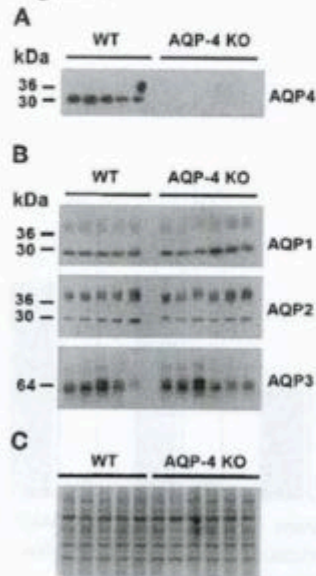
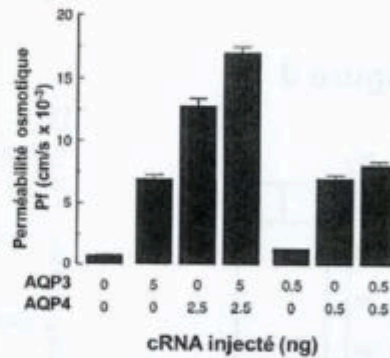


Figure 2



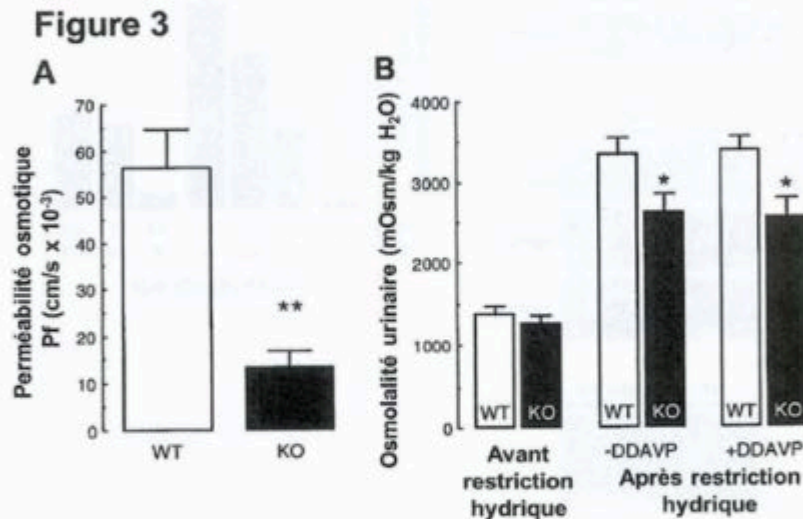
A partir de ces résultats, il est exact que :

- A. La figure 1 indique que, chez les souris AQP-4 KO, l'expression rénale d'AQP4 n'est plus détectable alors que les expressions d'AQP1, 2 et 3 ne sont pas sensiblement altérées.
- B. La figure 1 montre que chez les souris WT il existe une expression basolatérale d'AQP4 dans les cellules épithéliales du néphron terminal.
- C. Dans la figure 1B, la détection de deux bandes de poids moléculaire différent dans chaque piste de migration du Western blot et pour chaque aquaporine peut correspondre à la présence d'une forme native non glycosylée d'aquaporine et d'une forme glycosylée de poids moléculaire plus important.
- D. D'après la figure 2, l'injection de cRNA d'AQP3 n'augmente la perméabilité des ovocytes de Xénopes que lorsqu'elle est associée à une injection concomitante du cRNA d'AQP4.
- E. D'après la figure 2, en tenant compte des quantités de cRNA injectées et en considérant que leur traduction est totale pour chaque gène, l'expression d'AQP4 augmente plus la perméabilité osmotique dans les œufs de Xénope que l'AQP3.

QCM 9 :

Figure 3 : (A) Perméabilité osmotique de fragment isolés et perfusés (*ex vivo*) de segment terminal de néphron provenant de souris non mutées (WT) et de souris invalidées pour l'AQP4 (KO). (B) Concentration osmotique des urines chez des souris non mutées (WT) ou mutées pour l'AQP4 (KO), avant privation hydrique et après privation hydrique avec ou sans l'injection d'hormone antidiurétique de synthèse (DDAVP). La dose choisie de DDAVP administrée à la fin de la restriction hydrique permet d'atteindre la concentration urinaire maximale chez les souris. Plus l'osmolalité est importante et plus les urines sont concentrées, signifiant une réabsorption d'eau dans le segment terminal du néphron (*in vivo*).

* $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$ pour la comparaison avec le groupe non muté (WT).



A partir de ces résultats, il est exact que :

- A. La figure 3A indique que l'invalidation du gène de l'AQP4 diminue significativement la perméabilité osmotique du néphron terminal.
- B. D'après la figure 3B, l'administration de DDAVP chez les souris non mutées (WT) après restriction hydrique ne majore pas significativement la concentration osmotique des urines, suggérant qu'elle est déjà maximale.
- C. La figure 3B indique qu'avant restriction hydrique, les souris KO pour AQP4 ne sont plus capables de concentrer leurs urines.
- D. D'après la figure 3B, la moindre augmentation de la concentration osmotique des urines après restriction hydrique chez les souris KO pour AQP4 résulte d'un défaut d'ADH endogène.
- E. L'ensemble des résultats suggère que la capacité de concentration des urines chez les souris dépend en partie de l'expression d'AQP4 et ce de façon indépendante de l'action de l'ADH.

Les QCM 13 et 14 sont liés.

Le Palbociclib est un inhibiteur de protéine kinase. Il a reçu très récemment l'agrément des autorités de santé aux USA pour son utilisation dans le traitement de certains cancers du sein métastatiques. Les deux expériences présentées figures 1 et 2 illustrent les propriétés de ce composé sur des cellules cancéreuses humaines MCF-7 en culture.

Figure 1 - Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules MCF-7 en phase exponentielle de croissance. Une immunoprécipitation a été réalisée avec les anticorps indiqués, ou sans anticorps. Les immunoprécipitats ont été incubés en présence d'ATP, de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et d'une protéine substrat. Le composé Palbociclib a été ajouté ou non à la réaction. Le graphique ci-dessous montre le résultat de la quantification (unités arbitraires) de la radioactivité incorporée dans le substrat dans les différentes conditions.

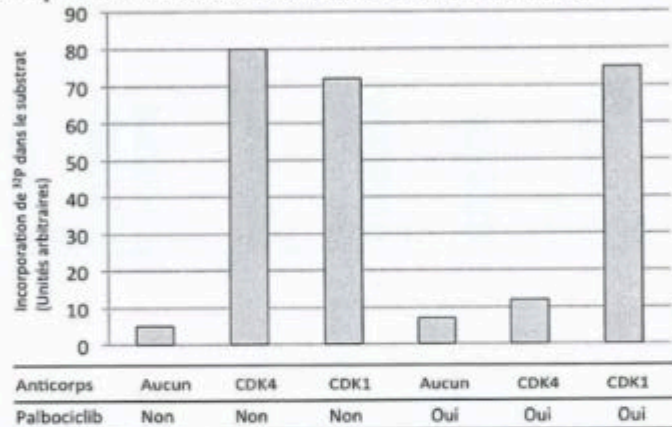
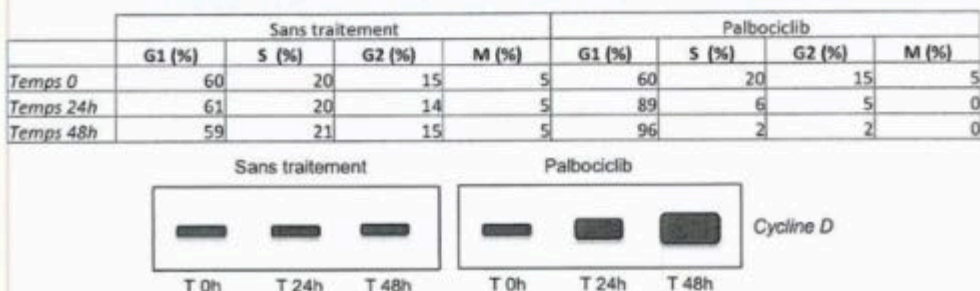


Figure 2 - Les cellules MCF-7 en culture ont été traitées pendant 0, 24 ou 48 heures avec le Palbociclib. La distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire a été analysée (tableau). Des extraits cellulaires ont également été préparés et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivie d'un transfert sur filtre de nitrocellulose. Un Western-blot a ensuite été réalisé en utilisant un anticorps dirigé contre la cycline D (Figure du dessous).



QCM 13 :

- Le Palbociclib est un inhibiteur de toutes les CDK.
- L'incorporation de ^{32}P dans le substrat en présence de Palbociclib indique que la protéine CDK4 est une phosphatase.
- La phosphorylation du substrat de CDK1 est inhibée par le Palbociclib.
- La phosphorylation du substrat par CDK1 aurait également lieu en absence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans la réaction.
- La phosphorylation du substrat observée en absence d'anticorps, en présence ou non de Palbociclib, représente le bruit de fond de l'expérience.

Correction

QCM 3 - ABC

D. La cytométrie en flux permet la détection de fluorescence, hors ici on ne dit pas qu'une protéine fluorescente a été utilisée pour identifier les hybridomes, l'Ac utilisé n'est pas fluorescent. Ainsi, une cytométrie en flux ne sera d'aucune utilité pour identifier ces hybridomes.

E. On s'attend à voir deux bandes : celles des formes libres : 33 KDa (entière) et 28 KDa (clivée). En effet, il est précisé que la forme de PSA liée est liée de façon non covalente. Hors, le SDS page est réalisé en conditions réductrices donc la PSA-liée verra sa liaison non covalente cassée, elle se trouvera alors sous forme libre : elle se mélangera à une des formes libre et la distinction entre celle qui était liée ou pas ne pourra pas être vue sur le SDS page.

QCM 4 - ABE

C. D'après les résultats de l'ELISA sur PSA-lié, on voit que la réactivité de l'AC 1 est largement augmentée (on le voit à l'augmentation de la DO). Ainsi l'épitope reconnu par AC1 est accessible sur la forme native de PSA mais aussi sa forme liée.

D. Si on regarde la figure de l'immunotransfert sur PSA libre, on s'aperçoit que l'AC 2 est activé pour la forme de PSA à 33 KDa, c'est la forme entière. Or, la forme clivée (28 KDa) n'admet aucun marquage de l'AC 2.

QCM 5 - BCE

A. D'après la figure de l'ELISA avec PSA-lié, ref 1 et ref 2 reconnaissent des épitopes de cette forme, or, on souhaite obtenir uniquement la forme libre de PSA.

D. L'AC 2 ne reconnaît pas d'épitopes sur la forme PSA-liée mais elle n'en reconnaît pas non plus sur la forme de PSA libre clivée, elle permet **uniquement** de récupérer la forme de PSA libre **entière**.

QCM 6 - BD

A. On voit quand la concentration de FMLP est de 0 : la quantité de PG2 est abaissée en présence de TNF-alpha par rapport à quand il n'y en a pas, il a plutôt un effet inhibiteur dans ces conditions (ça ne veut pas dire que c'est toujours valable, c'est le cas dans ces conditions précises.)

C. Cf. A On a vu que le TNF-alpha tout seul (sans FMLP) a plutôt un effet inhibiteur sur PG2 tandis que quand on ajoute de FMLP (sans TNF-alpha), la quantité de PG2 augmente de façon significative. L'effet du FMLP est plutôt activateur.

E. $10 \text{ nM} = 10^{-8} \text{ M}$, or ici on ne peut pas conclure que cette quantité de FMLP permet d'obtenir 50% de l'effet maximal. On voit que cette quantité de FMLP en présence ou non de TNF-alpha est totalement différente cette différence est significative. En présence du TNF-alpha la quantité de PG2 est d'environ 570 pg/ml, or sans TNF-alpha elle est d'environ 142 pg/ml ça ne représente de loin pas la moitié de 570. De plus, si on ajoute encore plus de FMLP, la quantité continue d'augmenter et on ne connaît pas exactement l'effet max. Dans tous les cas on ne peut pas faire de conclusion sur l'effet de FMLP car il a une puissance très différente en présence ou non de TNF-alpha. L'item est donc faux.

QCM 7 - AE

B. Attention aux unités : femtomoles = 10^{-15} moles, ici on parle les quantités sont en nM. On voit par ailleurs que la quantité maximale de FMLP lié détectable est située entre 0,2 et 0,3 nM.

C. Attention ! Le Kd est un coefficient il n'a donc pas d'unité, l'item est donc automatiquement faux.

D. Le TNF-alpha ne permet pas d'augmenter l'affinité des cellules pour le FMLP mais bien d'augmenter le nombre de récepteur au FMLP (cf E vraie) on le voit à la quantité de FMLP lié qui est augmentée, FMLP se lie à un récepteur.

QCM 8 - ACE

B. Le western blot ne nous donne aucune information sur la localisation de l'aquaporine 4 donc on peut pas conclure qu'elle est basolatérale chez les WT.

D. D'après la figure 2, on voit qu'il n'y a pas de corrélation entre l'injection de cRNA aux AQP4 et l'augmentation de la perméabilité de l'AQP3. Même quand la quantité de cRNA injectée chez les AQP4 est nulle, la perméabilité des AQP3 peut atteindre environ 7×10^{-3} cm/s.

QCM 9 - ABE

C. Il y a certes une différence significative entre les KO et les WT, or, l'osmolalité reste tout de même relativement élevée donc les urines sont quand même concentrées. D. Les souris KO ont une AQP4 qui n'est plus fonctionnelle c'est la raison de la diminution de l'osmolalité, ce n'est pas un défaut de production de l'ADH.

QCM 13 - DE

A. D'après la figure 1 - on voit que malgré la présence de palbociclib, l'activité de CDK1 reste augmentée donc cet anticorps ne bloque pas tous les CDK.

B. Hors programme.

C. La présence de Palbociclib augmente légèrement l'activité de CDK1, on dirait donc que la molécule active la phosphorylation et augmente donc l'activité de la CDK1.

Purpan 2016-2017

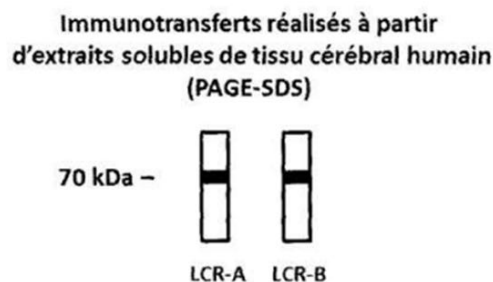
Les QCM 1, 2 et 3 sont liés :

L'encéphalite limbique est une maladie auto-immune du système nerveux central caractérisée par la présence d'auto-anticorps dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients.

Vous avez identifié deux patients A et B pour lesquels vous avez obtenu du LCR (respectivement LCR-A et LCR-B).

Vous cherchez à identifier la cible antigénique de ces auto-anticorps.

- En immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cerveau humain, vous obtenez un marquage cytoplasmique des cellules nerveuses, identique avec les deux LCR.
- En immunotransfert (Western blot) :



Vous purifiez les IgG totales de chacun des LCR puis avec celles-ci vous réalisez une immunoprécipitation à partir des extraits protéiques solubles de tissu cérébral humain. Vous analysez les immuno-précipités afin d'identifier les protéines constitutives. Vous identifiez dans les deux cas une protéine unique : AK5, protéine cytosolique de 70 kDa. fortement exprimée dans le cerveau.

QCM 1 -

- A. Ces résultats vous permettent d'affirmer que les auto-anticorps présents dans chacun des LCR-A et -B reconnaissent au moins un épitope séquentiel.
- B. Ces résultats vous permettent d'affirmer que les auto-anticorps présents dans le LCR-A reconnaissent les mêmes épitopes que ceux du LCR-B.
- C. Ces résultats vous permettent d'affirmer que les auto-anticorps présents dans chacun des LCR-A et -B reconnaissent au moins un épitope conformationnel sur l'AK5.
- D. Le point isoélectrique du ou des antigènes-cibles pourra être précisé après séparation bi-dimensionnelle d'un extrait protéique soluble de tissu cérébral et analyse de celui-ci par immunotransfert.
- E. Vous pouvez purifier le ou les antigènes-cibles par dot-blot à partir d'un extrait protéique total de cerveau.

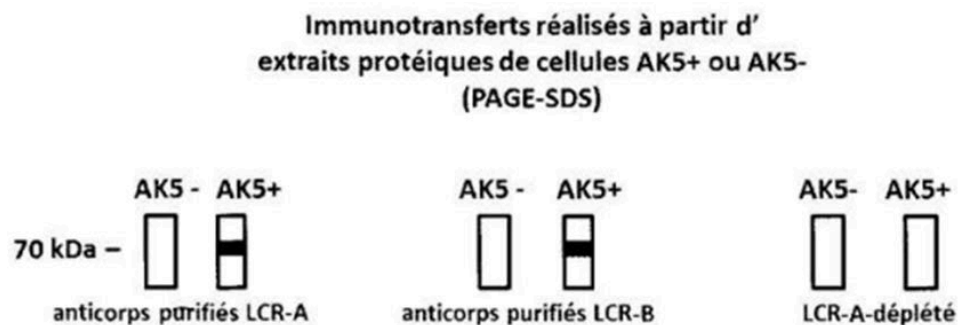
QCM 2 -

Vous voulez confirmer que l'AK5 est bien la cible antigénique cytosolique des auto-anticorps présents dans les LCR-A et -B.

Vous possédez un anticorps monoclonal de souris anti-AK5 humaine parfaitement caractérisé ainsi que tous les anticorps marqués ou non marqués nécessaires à vos expérimentations.

Par des techniques de biologie moléculaire, vous faites exprimer ou non (vecteur vide) AK5 par une lignée cellulaire C qui ne l'exprime pas spontanément (cellules C respectivement AK5+ et AK5-).

Vous possédez par ailleurs une AK5 recombinante humaine pure qui vous permet de purifier les auto-anticorps présents dans les 2 LCR par chromatographie d'affinité. Vous utilisez les anticorps ainsi purifiés mais aussi le LCR A non retenu par la colonne (LCR-A-déplété).



- A. L'AK5 est un antigène-cible des auto-anticorps présents dans le LCR-A.
- B. Par immuno-transfert réalisé avec la protéine recombinante, vous pouvez vérifier que les auto-anticorps présents dans le LCR des patients reconnaissent un(des) épitope(s) séquentiel(s) portés par AK5.
- C. En immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de cerveau, vous pourriez déterminer grâce à un double marquage que les cellules reconnues par les auto-anticorps présents dans les LCR et par l'anticorps monoclonal anti-AK5 sont les mêmes.
- D. Un ELISpot réalisé avec les cellules AK5+ et les deux LCR vous permettrait d'affirmer que les auto-anticorps reconnaissent la protéine AK5+.
- E. L'abolition, avec le LCR-A-déplété, du marquage préalablement observé en immunofluorescence indirecte sur les coupes de cerveau humain avec le LCR-A permettrait de confirmer que l'antigène-cible est bien AK5.

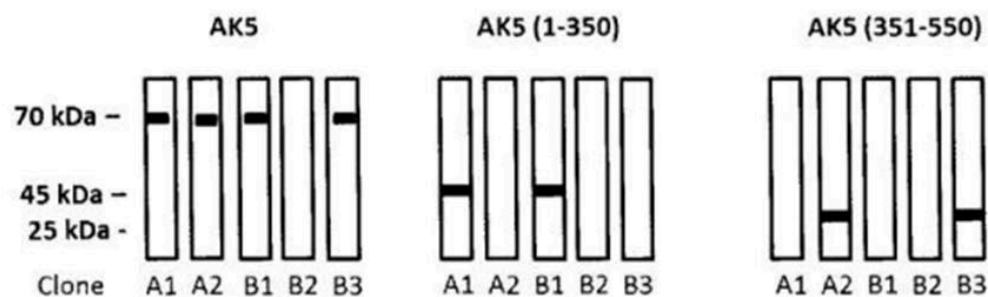
QCM 3 -

Vous cherchez à caractériser les épitopes reconnus par les auto-anticorps anti-AK5 présents chez chacun des patients. L'AK5 présente un domaine fonctionnel localisé sur la portion de la protéine qui s'étend de l'acide aminé (AA) 378 à l'AA 500.

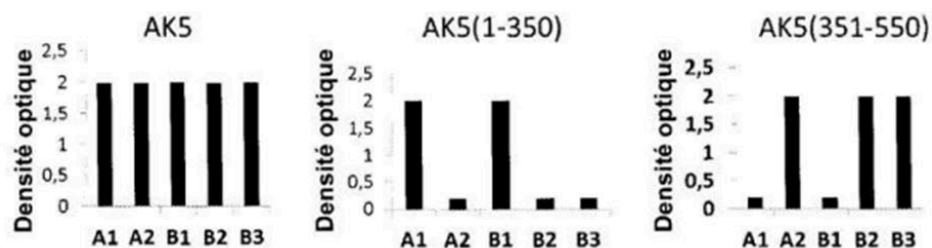
A partir de lymphocytes périphériques de vos deux patients, vous avez produit des auto-anticorps monoclonaux humains. Vous disposez de 2 clones d'hétéro-hybridomes issus du patient A (clones A1 et A2) et 3 clones issus du patient B (B1, B2 et B3), que vous testez sur AK5 et sur les portions NH2- et COOH-terminales de la protéine, respectivement AK5 (1-350) et AK5 (351-550).

Vous obtenez les résultats suivants:

- En immuno-transfert sur AK5 ou ses fragments :



- En ELISA indirect sur AK5 ou ses fragments :



Vos résultats vous permettent d'affirmer que :

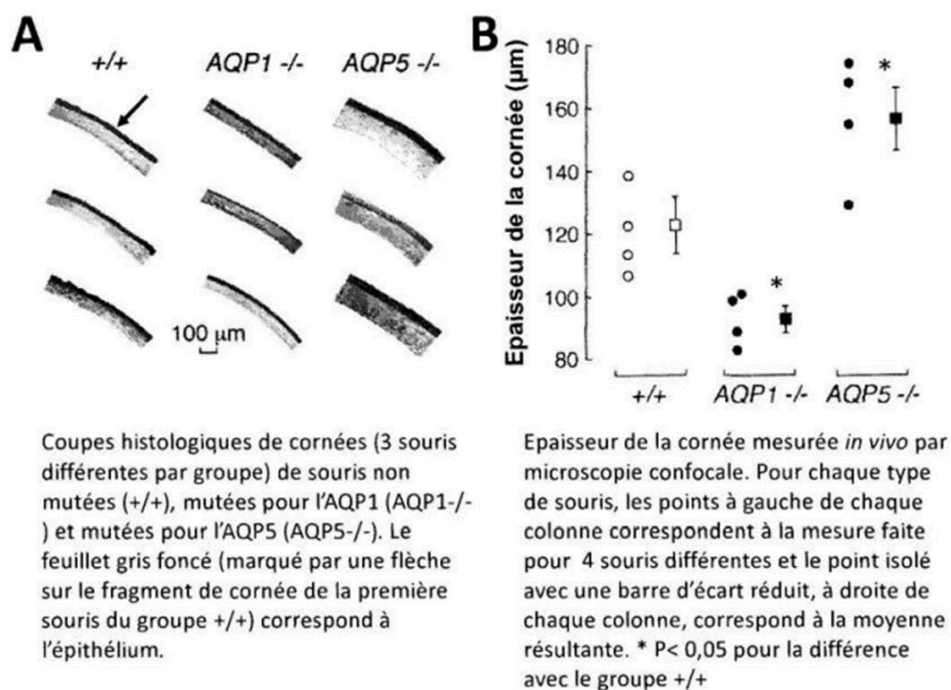
- Les 2 patients possèdent des lymphocytes capables de générer des auto-anticorps dirigés contre plusieurs épitopes portés par AK5.
- A1 et B1 reconnaissent le même épitope.
- B2 et B3 reconnaissent des épitopes différents.
- Le clone B2 reconnaît un épitope conformationnel sur AK5(1-350).
- Seul le clone B3 reconnaît le domaine fonctionnel de la protéine.

Les QCM 4 et 5 sont liés :

La cornée est la partie transparente du globe oculaire située en avant de l'œil. Elle est constituée d'un stroma bordé par une couche de cellules épithéliales à l'extérieur et par une monocouche de cellules endothéliales à l'intérieur (partie orientée vers l'humeur aqueuse). La transparence de la cornée dépend de son niveau d'hydratation et donc les flux d'eau au travers de la cornée jouent un rôle essentiel dans le maintien de cette transparence. Des travaux préliminaires ont montré que l'aquaporine 1 (AQP1) est exprimée à la surface membranaire des cellules endothéliales et que l'aquaporine 5 (AQP5) est exprimée à la surface membranaire des cellules épithéliales.

Les auteurs du présent travail ont étudié le rôle des aquaporines de la cornée en utilisant des souris invalidées de façon homozygote pour AQP1 (AQP1^{-/-}) ou pour AQP5 (AQP5^{-/-}).

Dans une première expérience (figure 1) ils ont déterminé l'épaisseur de cornées de souris non mutées (+/+) ou mutées : AQP1^{-/-} ou AQP5^{-/-}.



QCM 4 -

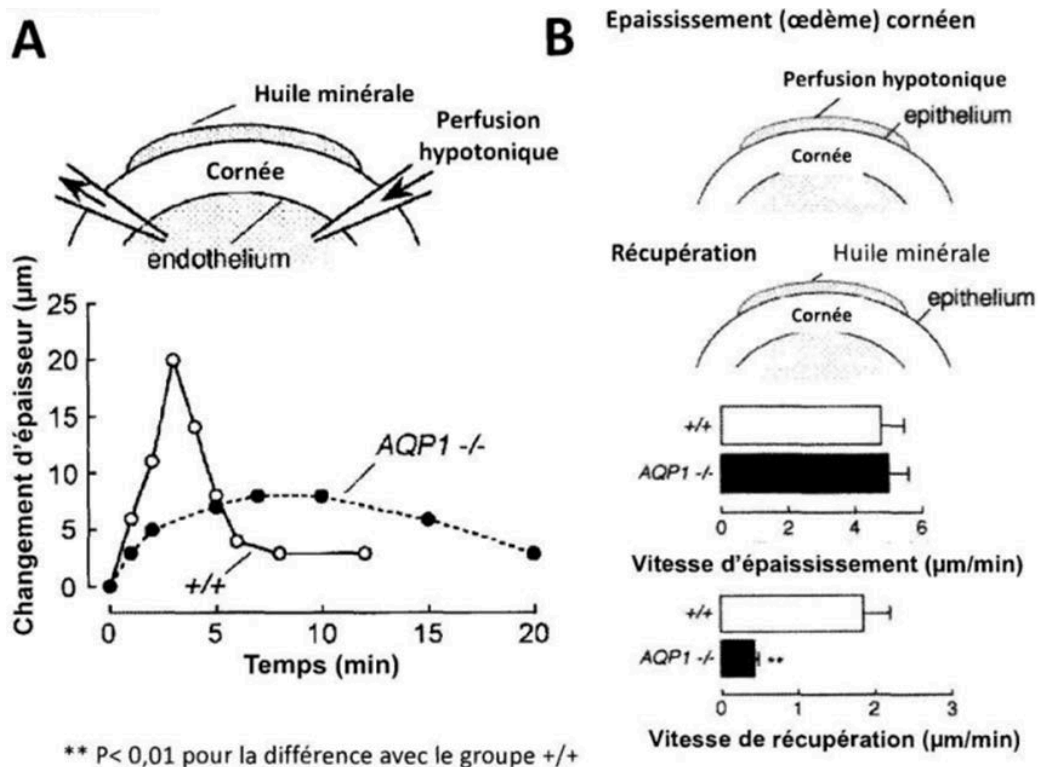
Dans ces conditions, il est exact que :

- Une étude immuno-histochimique avec les anticorps anti-AQP1 et anti-AQP5 adéquats pourrait permettre de préciser la localisation des aquaporines sur chaque face de la cornée.
- La réalisation d'un western blot ciblant l'expression des aquaporines d'intérêt sur des extraits de protéines de cornée permettrait de s'assurer que l'aquaporine correspondante n'est pas fonctionnelle.
- La figure 1A montre que les cornées des souris AQP1^{-/-} sont moins épaisses que celles des souris +/+ car elles ne comportent plus d'épithélium macroscopiquement identifiable.
- La figure 1B montre que l'absence de l'AQP5 est associée à une augmentation statistiquement significative de l'épaisseur cornéenne par rapport aux souris +/+.
- Connaissant le rôle physiologique des aquaporines, on peut envisager que les cornées des souris AQP1^{-/-} contiennent moins d'eau que celles des souris +/+.

Dans une seconde série d'expériences les auteurs ont déterminé l'impact sur l'épaisseur cornéenne des mouvements d'eau générés par l'exposition de la cornée *in vivo* à une perfusion hypotonique (Pression osmotique : 100 mmol/kg).

Figure 2A : œil perfusé au niveau de la face interne (endothéliale) de la cornée chez des souris AQP1-/- alors qu'une goutte d'huile minérale déposée sur la face épithéliale empêche la sortie d'eau de ce côté.

Figure 2B : solution hypotonique déposée sur la face extérieure de la cornée chez des souris AQP1-/. A la phase de récupération une goutte d'huile minérale déposée sur la face épithéliale empêche la sortie d'eau de ce côté. La vitesse de récupération correspond à la vitesse de diminution d'épaisseur de la cornée.



QCM 5 -

- D'après la figure 2A, la vitesse d'épaississement de la cornée chez les souris AQP1 -/- paraît moins grande que chez les souris contrôles +/+.
- La figure 2A indique qu'après 7 à 8 minutes, le changement d'épaisseur de la corée chez les souris AQP1 -/- apparaît plus important que chez les souris contrôles +/+.
- Les résultats de la figure 2B montrent que l'épaisseur des cornées des souris AQP1-/- est plus importante que celle des souris +/+ pendant qu'on les expose à une solution hypotonique déposée sur la face épithéliale.
- Dans les conditions expérimentales de la figure 2B, le mouvement d'eau induit par la solution hypotonique se fait de la surface épithéliale pour l'entrée dans la cornée vers la surface endothéliale pour la sortie lors de la phase de récupération.
- Les résultats de la figure 2B montrent que l'eau accumulée lors de l'exposition de la cornée à la solution hypotonique est moins vite éliminée en l'absence d'expression d'AQP1 sur la face endothéliale.

QCM 7 -

La sécrétine est un peptide impliqué en particulier dans la régulation d'un certain nombre de sécrétions du tube digestif. Elle est l'agoniste d'un récepteur à 7 segments transmembranaires, dont on a étudié le couplage à différentes protéines G hétérotrimériques.

Pour cela, on dispose d'un ADNc codant le récepteur sauvage de sécrétine. Un autre ADNc a fait l'objet d'une mutation remplaçant une arginine par une alanine dans la première boucle intracellulaire du récepteur. Les deux ADNc sont intégrés dans un vecteur d'expression en cellules eucaryotes. Les études sont réalisées sur des cellules eucaryotes n'exprimant pas le récepteur de sécrétine et transfectées par l'un ou l'autre de ces vecteurs.

Dans la première expérience (Figure 1), on étudie la liaison de sécrétine marquée radioactivement à l'iode 125 en présence de concentrations croissantes de sécrétine froide.

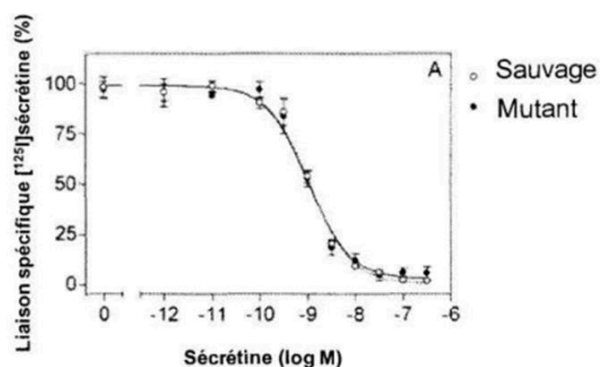


Figure 1

Dans la deuxième expérience (Figure 2) on mesure la quantité d'AMPC présente dans des cellules incubées en présence de concentrations croissantes de sécrétine.

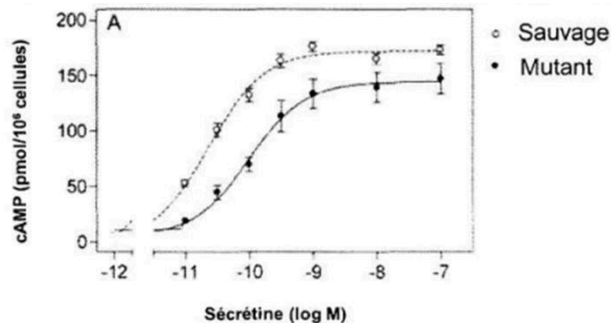


Figure 2

Dans la troisième expérience (Figure 3), on réalise une mesure instantanée de la concentration en Ca^{2+} dans le cytoplasme ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), lors de l'incubation des cellules en présence de concentrations croissantes de sécrétine. Cette technique est une mesure indirecte de la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) par les cellules.

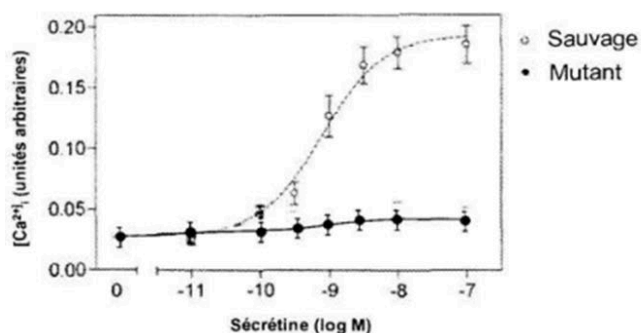


Figure 3

- A. Le récepteur sauvage de sécrétine peut se coupler à deux types de protéines G hétérotrimériques, Gs et Gq.
- B. Le récepteur sauvage de sécrétine ne peut se coupler qu'à la protéine Gs.
- C. La mutation étudiée abolit la liaison de la sécrétine à son récepteur.
- D. La mutation étudiée abolit le couplage du récepteur de la sécrétine à la protéine Gs.
- E. Le récepteur portant la mutation étudiée ne peut plus activer la phospholipase C par l'intermédiaire de la protéine Gq.

Les QCM 10 et 11 sont liés :

Le PDGF ou « platelet-derived growth factor » est un facteur de croissance, dont une forme majeure est le PDGF-AA. Ce dernier interagit avec son récepteur (PDGFR α) qui fait partie des récepteurs à activité tyrosine kinase. Des cellules n'exprimant pas le PDGFR α ont été transfectées de façon stable par un ADNc codant le PDGFR α sauvage (WT).

Ces cellules ont été incubées en absence ou en présence de PDGF-AA (+/- PDGF) pendant 10 minutes, à 37°C, puis les cellules ont été lysées et soumises à une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre le PDGFR α . Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse en SDS-PAGE, puis analysées en Western-blot à l'aide d'anticorps spécifiques (**figure 1**) : un anticorps anti-PDGFR α (pistes 1, 2), un anticorps anti-tyrosines phosphorylées (piste 3, 4), ou un anticorps anti-PI3K (piste 5, 6).

Deux autres lignées cellulaires ont été obtenues par transfection stable d'ADNc : une lignée surexprimant le PDGFR α muté sur la tyrosine 751, remplacée par une phénylalanine (Y751F), une lignée surexprimant le PDGFR α muté sur la tyrosine 1021, remplacée par une phénylalanine (Y1021F). Des analyses contrôles ont montré que la quantité de PDGFR α était comparable entre les lignées cellulaires exprimant ces différentes formes de PDGFR α . Ces cellules ont été mises en présence de PDGF-AA radiomarqué à l'iode 125, pendant 60 minutes à 4°C. Les données de liaison spécifique sont présentées à la **figure 2**.

Dans une autre série d'expériences, ces cellules ont été incubées à 37°C pendant 10 min, soumises à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-PDGFR α , les protéines immunoprécipitées étant ensuite analysées par Western-blot en utilisant un anticorps anti-PI3K (**figure 3**).

Enfin, une fraction identique de chaque immunoprécipitat a été analysée pour son activité PI3K, en réalisant une incubation de 30 min en présence de phosphatidylinositol (PI) et de [γ^{32}]ATP : le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) formé était ensuite séparé par chromatographie de partage et sa radioactivité comptée (**figure 4**).

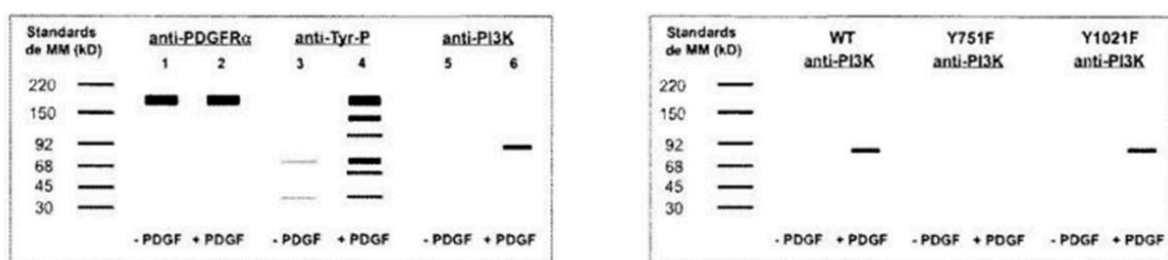


Figure 1 et Figure 3 : analyse en Western-blot après immunoprécipitation

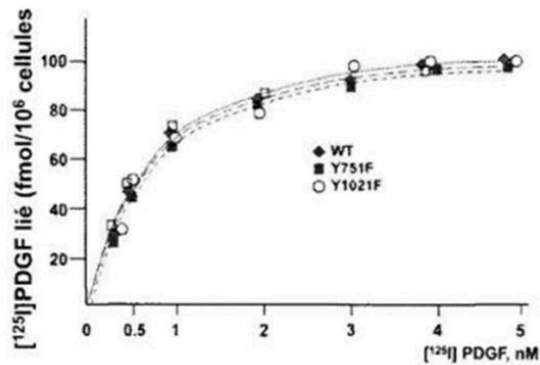


Figure 2 : liaison spécifique du [¹²⁵I] PDGF

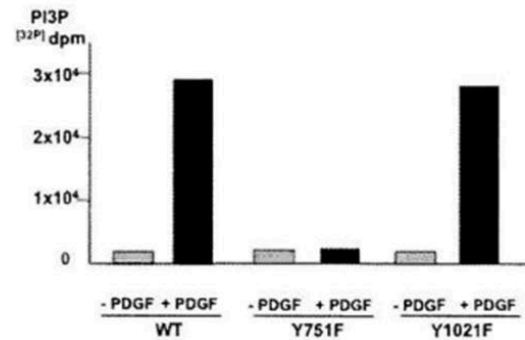


Figure 4 : mesure de l'activité PI 3-kinase

QCM 10 :

- A. Le Kd du PDGFR α pour le PDGF est voisin de 0,5 nM.
- B. (HP?) Le nombre de récepteurs PDGFR α à la surface des cellules WT est voisin de 60 000 par cellule.
- C. La mutation Y751F diminue l'affinité du PDGFR α pour le PDGF.
- D. L'incubation en présence de PDGF, 10 min à 37°C, entraîne une forte diminution du contenu cellulaire en PDGFR α .
- E. Après activation par le PDGF, le récepteur PDGFR α comporte des tyrosines phosphorylées.

QCM 11 :

- A. (HP?) Au cours de l'activation par le PDGF, le récepteur PDGFR α phosphoryle la PI3K sur des résidus tyrosine.
- B. Au cours de l'activation par le PDGF, le PDGFR α s'associe physiquement avec la PI3K.
- C. Le résidu tyrosine 1021 du PDGFR α est le site principal de recrutement de la PI3K.
- D. La mutation Y751F du PDGFR α entraîne son association à une PI3K catalytiquement inactive.
- E. Au cours de la mesure de l'activité enzymatique de la PI3K, un des produits formés est le [³²P]ADP.

QCM 12 :

Des cellules cancéreuses issues d'un patient (P) présentent une activation aberrante du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou EGF-R. Pour étudier cette anomalie des chercheurs ont utilisé ces cellules cancéreuses et, comme contrôle, des cellules normales exprimant le même nombre d'EGF-R (C). Les cellules P et C ont été stimulées avec 100 ng/ml d'EGF pendant 5 et 30 minutes.

Des expériences d'immunoprécipitation (IP) de l'EGF-R suivies par une analyse de ces immunoprécipitats en immunoempreinte (Western Blot = WB) ont été réalisées (**Figure 1A**). Les immunoempreintes ont été réalisées à l'aide d'anticorps anti-EGF-R, anti-PI3K ou anti-phosphotyrosine (P-Tyr) comme indiqué dans la figure.

De plus, une technique appropriée a permis de localiser l'EGF-R à la membrane plasmique en surface des cellules (MP), dans les endosomes précoces (EP) ou dans les lysosomes (L) après que les cellules aient été stimulées ou non par 100 ng/ml d'EGF pendant 30 minutes (**Figure 1B**).

Rappels : L'EGF-R a une masse moléculaire (MM) de 170 kDa et la PI3K de 85 kDa.

Figure 1A

5 min 30 min

IP : EGF-R

WB: P-Tyr

← EGF-R

WB : PI3K

← PI3K

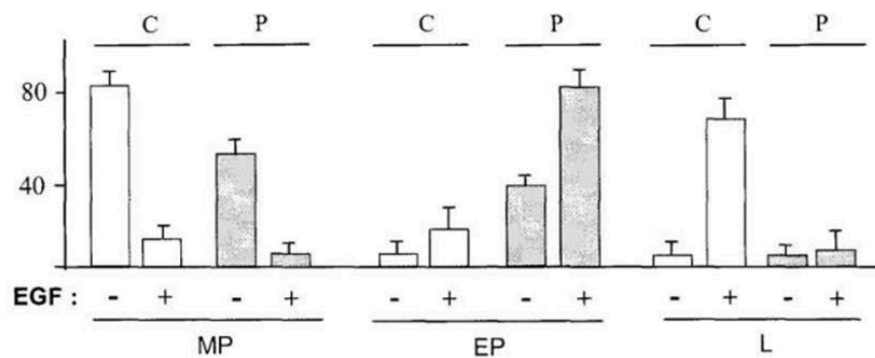
WB : EGF-R

← EGF-R

EGF : - + - + - + - +

MM (kDa)	5 min				30 min			
	C		P		C		P	
220								
150								
100								
80								
220								
150								

% d'EGF-R



- A. Les cellules P présentent une activation constitutive de l'EGF-R.
- B. Dans les cellules C, une stimulation de 30 minutes à l'EGF entraîne la dégradation de l'EGF-R dans les endosomes précoces.
- C. Les cellules P présentent une accélération de la dégradation de l'EGF-R lorsqu'il est activé.
- D. Les résultats sont compatibles avec une activation soutenue de l'EGF-R dans les endosomes précoces des cellules P.
- E. Les résultats montrent que la PI3K se dissocie de l'EGF-R dans les endosomes des cellules P.

QCM 13 -

Des chercheurs ont découvert l'existence de deux récepteurs de l'adénosine diphosphate (ADP) à la surface des plaquettes sanguines, dénommés P2Y1 et P2Y12. Afin de les caractériser, ils ont isolé des plaquettes sanguines de deux donneurs sains n'ayant pris aucun médicament (D1 et D2) et d'un patient présentant des saignements (P).

Ces plaquettes ont été stimulées par 5 μM d'ADP pendant 5 minutes en absence ou en présence d'un antagoniste du récepteur P2Y1 (Anti-P2Y1) ou d'un antagoniste du récepteur P2Y12 (Anti-P2Y12).

Les résultats de l'agrégation plaquettaire mesurée à l'aide d'un agrégomètre sont exprimés en pourcentage d'agrégation (**Figure 1**) et la production d'inositol triphosphate (IP3) a été quantifiée (**Figure 2A**).

Les plaquettes isolées ont ensuite été pré-stimulées avec de la prostacycline puis stimulées par 5 μM d'ADP pendant 5 minutes en présence ou non des antagonistes des récepteurs P2Y1 et P2Y12. Le taux d'AMPC intracellulaire a alors été mesuré (**Figure 2B**).

Figure 1

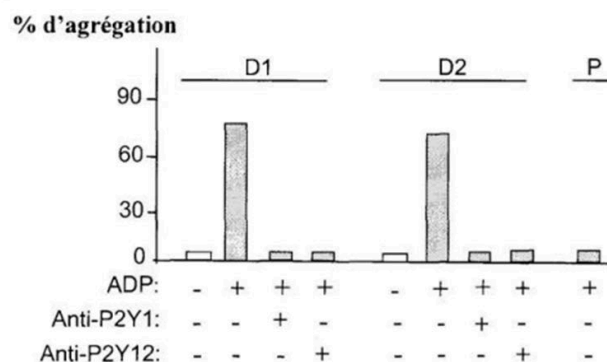


Figure 2A

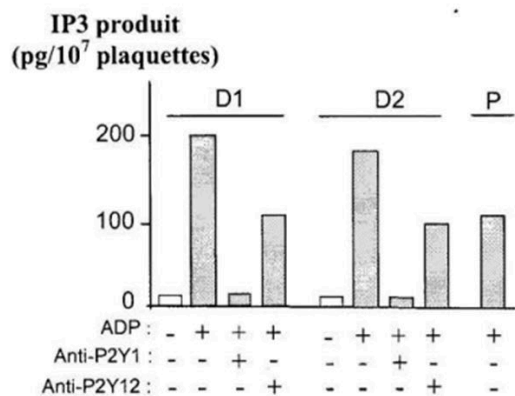
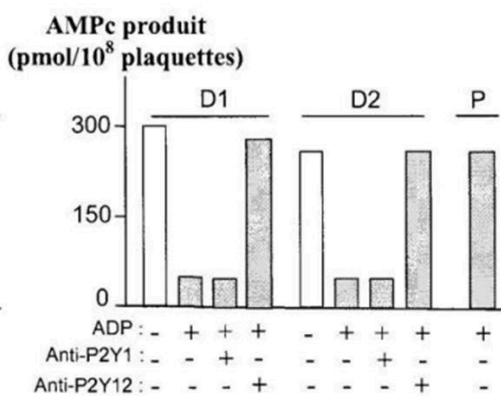


Figure 2B



En considérant vos connaissances et les données expérimentales des Figures 1 et 2, quelles sont les propositions exactes ?

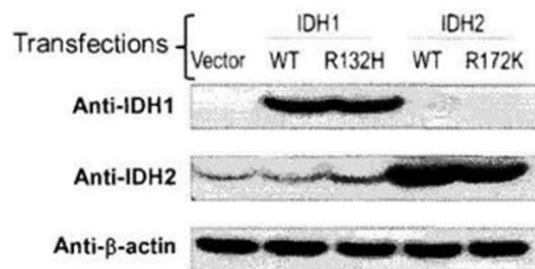
- Le récepteur P2Y1 de l'ADP n'est pas indispensable à l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.
- Les résultats obtenus sont compatibles avec un couplage du récepteur P2Y1 à la protéine G hétérotrimérique Gq.
- Le récepteur P2Y12 est indispensable à la production maximale d'IP3 induite par l'ADP.
- Le récepteur P2Y1 de l'ADP est couplé à la protéine G hétérotrimérique Gs.
- Le patient pourrait avoir une mutation perte de fonction du récepteur P2Y1 de l'ADP.

Les QCM 14 et 15 sont liés :

QCM 14 :

Deux mutations ponctuelles dans les gènes IDH1 et IDH2 codant pour une enzyme du cycle de Krebs, l'isocitrate déshydrogénase, sont testées dans des cellules NIH3T3. Celles-ci sont transfectées par des plasmides contenant soit les ADN complémentaires des gènes IDH1 et IDH2 sauvages (WT) soit leurs équivalents mutés, entraînant la transformation de résidus arginine en histidine (IDH1 R132H) ou lysine (IDH2 R172K).

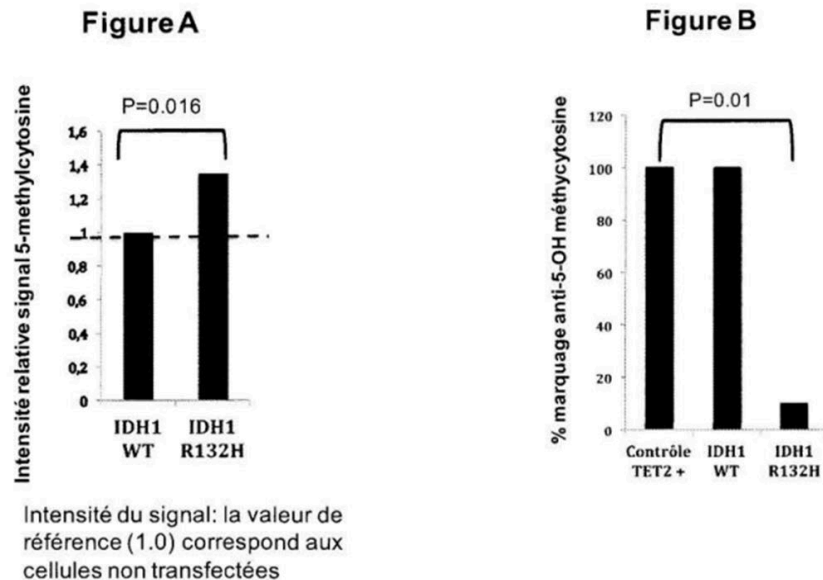
Les lysats des cellules précédemment transfectées par le plasmide seul (vector) ou les plasmides avec IDH sauvages ou mutés sont testés par Western Blot vis à vis des anticorps anti-IDH1 ou anti-IDH2 et comparés à la quantité de bêta-actine cellulaire (β -actin).



- A. L'anticorps anti-IDH1 est spécifique de la forme sauvage d'IDH1.
- B. L'anticorps anti-IDH2 reconnaît les formes IDH1 et IDH2.
- C. L'anticorps anti-IDH1 est dirigé contre un épitope conformationnel au niveau de l'arginine 132.
- D. Une forme d'IDH2 est exprimée naturellement dans les cellules NIH3T3.
- E. L'anticorps anti-IDH1 peut être utilisé pour rechercher IDH1 dans des fractions subcellulaires.

QCM 15 :

L'effet de la mutation R132H de l'enzyme IDH1 est testé sur l'activité d'une dioxygénase TET2 permettant l'hydroxy-méthylation des cytosines de l'ADN conduisant à l'hypométhylation. Un anticorps dirigé contre les résidus méthyl-cytosine est utilisé sur des lysats de cellules NIH3T3 transfectées par les plasmides IDH1 sauvage ou muté (**Figure A**). D'autres cellules sont transfectées par IDH1 sauvage ou mutée et leur activité TET2 est appréciée par leur capacité à réaliser l'hydroxy-méthylation des cytosines (anticorps anti-5-OH-méthylcytosine, **Figure B**).
 $p < 0.05$ = significatif.



- A. La transfection des cellules par IDH1 sauvage induit une hyper-méthylation des cytosines.
- B. La mutation IDH1 R132H a un impact sur l'activité transcriptionnelle.
- C. La dioxygénase TET2 est inhibée quand IDH1 est mutée.
- D. L'enzyme TET2 est localisée dans le réticulum endoplasmique.
- E. L'activité TET2 est stimulée par la surexpression d'IDH1 sauvage.

Correction

QCM 1 - AD

- A. (VRAI) Les épitopes séquentiels sont accessibles après dénaturation de la protéine d'intérêt (car ils sont portés par sa séquence primaire). Ici, les Ac de 70 kDa sont détectés après un immunotransfert, qui se fait en conditions dénaturantes du fait de l'utilisation de SDS. On peut donc affirmer que les auto-anticorps présents dans chacun des LCR A et B reconnaissent au moins un épitope séquentiel.
- B. Ces résultats permettent d'affirmer que les auto-anticorps présents dans les LCR A et B reconnaissent des épitopes de même taille mais rien ne nous permet de conclure que ce sont les mêmes épitopes.
- C. Le SDS-PAGE dénature les protéines. De ce fait, si les auto-anticorps reconnaissent un épitope conformationnel sur l'AK5, il n'y aurait pas de détection possible par l'immunotransfert réalisé ici.
- D. (VRAI) La technique d'immunotransfert bidimensionnel permet de déterminer le point isoélectrique des protéines d'intérêt.
- E. Le dot-blotting est réalisé en conditions non-dénaturantes, et les épitopes reconnus par les auto-anticorps des LCR sont séquentiels et détectés en conditions dénaturantes. On n'a aucun moyen de savoir ce qu'il en est en conditions non-dénaturantes, les épitopes séquentiels pourraient être cryptiques (caché en conditions non-dénaturantes) et non détectables en Dot-blot.

QCM 2 - ABCE

- A. (VRAI) L'antigène AK5 est détecté par les anticorps purifiés du LCR-A (bande à 70 kDa).
- B. (VRAI) Les épitopes séquentiels sont accessibles après dénaturation de la protéine d'intérêt, et l'immuno-transfert se réalise en conditions dénaturantes : les épitopes séquentiels apparaissent sur un immuno-transfert.
- C. (VRAI) Dans le cas de l'immunofluorescence indirecte, si la réaction est positive (Ac et Ag correspondants), il y a émission de fluorescence. Donc, si les deux fluorescences (une pour les cellules reconnues par les auto-anticorps présents dans les LCR et une pour les cellules reconnues par les anticorps monoclonal anti-AK5) sont localisées sur les mêmes endroits, on pourra déduire que ce sont les mêmes cellules pour les deux.
- D. La technique ELISpot permet de quantifier les cellules sécrétrices d'antigène dans un milieu. L'utiliser ici permettrait de quantifier le nombre de cellules AK5+.
- E. (VRAI) LCR-A déplété = LCR dépourvu d'anticorps. On a identifié à l'item C. Que les cellules reconnues par les auto-anticorps présents dans les LCR et les cellules reconnues par les anticorps monoclonal anti-AK5 étaient les mêmes. Si en utilisant un LCR sans aucun auto-anticorps, on n'a plus aucune fluorescence, on sait que c'était les auto-anticorps qui reconnaissaient AK5.

QCM 3 - AC

A. (VRAI) En immunotransfert on observe 2 bandes différentes pour le patient A et 2 bandes différentes pour le patient B qui correspondent à des épitopes différents, car situés sur des zones différentes de la protéine. Il en est de même en ELISA indirect, donc on peut conclure que les 2 patients possèdent des lymphocytes capables de générer des auto-anticorps dirigés contre plusieurs épitopes portés par AK5.

B. A1 et B1 reconnaissent des épitopes situés sur la même portion de la protéine AK5 (1-350) mais rien ne nous permet d'affirmer que ce sont les mêmes.

C. (VRAI) B2 et B3 reconnaissent des épitopes situés sur la portion 351-550 de la protéine AK5 (Cf. ELISA indirect). B3 reconnaît un épitope séquentiel car il est reconnu par les anticorps dans des conditions dénaturantes. Alors que B2 reconnaît un épitope conformationnel : il n'est reconnu que dans des conditions non-dénaturantes (Cf. Item D pour plus de détails). B2 et B3 reconnaissent donc des épitopes différents.

D. Les épitopes conformationnels ne sont plus accessibles après dénaturation de la protéine. Le clone B2 reconnaît donc bien un épitope conformationnel puisqu'il n'y a pas de détection après dénaturation de la protéine (Cf. Immunotransfert, bande absente pour B2). En revanche cet épitope est situé sur la portion 351-550 de la protéine et non sur la portion 1-350 (Cf. ELISA indirect, DO pour B2 entre 351-550 paires de base).

E. Le domaine fonctionnel de la protéine est localisé sur la portion 378-500, les clones qui détectent le domaine fonctionnel de la protéine sont donc ceux qui détectent les épitopes situés sur la portion 351-500 et il y en a deux : B2 et B3.

QCM 4 - ADE

B. Cela permettrait de s'assurer que l'expression (au niveau de la cornée) des AQP d'intérêt n'est plus détectable chez les souris -/-, mais aucunement de si les aquaporines sont fonctionnelles ou non : expression \neq fonction !

C. L'épithélium est le feuillet gris foncé (Cf. Légende), il est encore visible macroscopiquement sur les figures des souris AQP1 -/- même s'il a diminué de taille par rapport aux souris contrôles.

D. (VRAI) La figure 1B permet d'observer qu'il y a un épaississement statistiquement significatif ($p < 0,05$) chez les souris AQP5 -/- comparé aux souris +/-.

E. (VRAI) Les AQPs augmentent la perméabilité des membranes à l'eau. Donc si on retire un type d'aquaporine, les membranes des souris résultantes contiendront moins d'eau (car moins de passage).

QCM 5 - ABDE

A. (VRAI) Au bout de 3 min, la cornée des souris AQP1 +/- est à 20 μm d'épaisseur alors que celle des AQP1 -/- est à 5 μm .

B. (VRAI) Après 7-8 minutes, l'épaisseur de la cornée des AQP1 +/- se stabilise (après une diminution très importante) alors que celle des -/- continue de diminuer progressivement.

C. La figure 2B ne décrit pas de mesure d'épaisseur des cornées, mais des vitesses.

D. (VRAI) L'eau se déplace physiologiquement du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique (pour diluer et diminuer la pression), donc ici de l'extérieur de la cornée vers l'intérieur.

E. (VRAI) Puisque la vitesse de récupération correspond à la vitesse de diminution d'épaisseur de la cornée, une vitesse significativement moindre (celle des AQP1-/-) correspond à une solution hypotonique moins vite éliminée.

QCM 7 - AE

- A. (VRAI) *Rappel ICM* : Gs va stimuler la production d'AMPc et Gq va stimuler la production d'IP₃. D'après la figure 2, la liaison des molécules sauvages sur le récepteur provoque une augmentation d'AMPc : le RCPG est liable à Gs. D'après la figure 3, la liaison de la sécrétine sauvage provoque une augmentation de Ca²⁺ dans le cytoplasme (reflet de la production d'IP₃) : le RCPG est liable à Gq.
- B. Cf. Item A, il peut aussi se lier à Gq.
- C. D'après la figure 1, la liaison n'est pas inhibée si le récepteur est muté : même courbe pour les deux récepteurs. *Rappel ICM (Pharmacométrie)* : C'est une courbe de déplacement à l'équilibre, il y a compétition entre le ligand froid et le ligand radioactif sur le récepteur. La sécrétine froide prend la place de la sécrétine radioactive = diminution de la liaison en ligand radioactif.
- D. D'après la figure 2, la liaison de la sécrétine sur le récepteur muté induit une augmentation d'AMPc donc le RCPG se lie bien à Gs. *Rappel Enzymologie* : Par contre, la mutation diminue l'affinité de la sécrétine pour le récepteur (K_m plus grand avec le récepteur muté donc moins bonne affinité).
- E. (VRAI) D'après la figure 3, la mutation du récepteur n'induit plus d'augmentation de Ca²⁺ dans le cytoplasme.

QCM 10 - ABE

- A. (VRAI) *Rappel ICM (Pharmacométrie)* : Lecture de la figure 2 - Lorsque la liaison du PDGF radioactif (axe des ordonnées) est à 50% de la liaison à saturation (= 50 fmol/10⁶ cellules), la concentration en PDGF est d'environ 0.5 nM (axe des abscisses).
- B. (VRAI) A saturation, 100 fmol de PDGF sont liés à 10⁶ cellules. On considère que chaque récepteur est occupé et qu'il ne reçoit qu'un seul PDGF ; on a donc 100x 10⁻⁶ fmol/cellule, soit 1 x 10⁻¹⁹ mol/cellule. La quantité de récepteurs est exprimée en moles, on multiplie par 6 x 10²³ (constante d'Avogadro) pour avoir le nombre exact. On obtient 60 000 récepteurs par cellule.
- C. Les courbes de liaison ne sont pas modifiées entre les différentes lignées cellulaires. La mutation Y751F n'affecte pas la liaison entre PDGF et son récepteur (cf. Figure 2).
- D. Sur la figure 1, avec les deux premières colonnes, on voit à l'aide de l'immunoprécipitation que la quantité de PDGFRα est sensiblement la même que l'on ait ajouté du PDGF ou non (les bandes font la même épaisseur).
- E. (VRAI) Lecture de la figure 1 - En présence de PDGF, il y a une reconnaissance par les anticorps anti-tyrosines phosphorylées de protéines de l'immuno-précipitat : il y a des tyrosines phosphorylées dans cet immuno-précipitat. Par contre, en absence de PDGF, il n'y a pas de bandes sur l'immunotransfert = il n'y a pas de reconnaissance par les anticorps = il n'y a pas de tyrosines phosphorylées. C'est donc après activation par PDGF qu'on observe des tyrosines phosphorylées.

QCM 11 - B

- A. Le PDGFR alpha phosphoryle ses propres sous unités par un phénomène de cross-phosphorylation. La PI3K se lie aux Tyr-P par son domaine SH2.
- B. (VRAI) Après une immunoprécipitation par un Ac anti-PDGFRα, il y a réactivité sur le western blot avec l'Ac anti-PI3K pour les cellules incubées en présence de PDGF (Cf. Colonne 6 de la figure 1). Il y a donc une association entre PDGFRα et PI3K en présence de PDGF (sinon il n'aurait pas été retenu lors de l'immunoprécipitation).
- C. On voit sur la Figure 3 que la mutation sur Y1021F ne modifie pas la réactivité avec l'Ac anti-PI3K. Donc le résidu tyrosine 1021 ne peut pas être le site de recrutement principal, sinon avec sa mutation en phénylalanine, il n'y aurait plus eu d'association entre PDGFRα et PI3K en présence de PDGF.
- D. En effet, il n'y a pas d'activité PI3K (Cf. figure 4), mais c'est dû à une absence d'association entre PDGFRα et PI3K (Cf. figure 3).
- E. Le [γ³²]ATP a son phosphate radioactif en gamma, il le libère donc lors de la phosphorylation du PIP3. L'ADP formé n'est donc pas radioactif et ne possède pas le ³²P (la réaction est détaillée dans l'énoncé, dans le détail de la figure 4).

QCM 12 - AD

A. (VRAI) Lecture de la figure 1A : chez le contrôle, on observe une phosphorylation du récepteur en présence d'EGF, et une absence de phosphorylation en absence d'EGF (Cf. Première ligne, les deux premières colonnes). Par contre, chez le patient cancéreux, les récepteurs sont phosphorylés même en absence d'EGF, c'est-à-dire qu'ils sont activés avant la fixation du ligand = c'est une activation constitutive.

B. Lecture de la figure 1A : Au bout de 30 min, en présence d'EGF, l'expression des EGF-R est moindre qu'au bout de 5 min = il y a une diminution du nombre de récepteurs. Lecture de la figure 1B : en présence d'EGF, les EGF-R sont principalement situés dans les lysosomes pour les cellules contrôles. On sait que les lysosomes sont des organites permettant la dégradation de nombreuses protéines, donc il est très probable que les EGF-R soient dégradés dans les lysosomes (s'ils sont là, il ne sont pas dans les EP), ce qui expliquerait leur baisse en nombre.

C. Lecture de la figure 1A : Au bout de 30 min, l'EGF-R est moins présent chez le contrôle (Cf. Item B.) alors qu'il l'est toujours autant chez le patient cancéreux, il n'y a pas cette accélération de la dégradation chez le patient P.

D. (VRAI) Lecture de la figure 1A : Les EGF-R sont toujours actifs au bout de 30 min de stimulation (deux dernières colonnes = tyrosines phosphorylées et voie de PI3K). Lecture de la figure 1B : Les EGF-R des cellules P sont toujours retrouvés (entre 40 et 80% en fonction de la présence ou non d'EGF) dans les endosomes précoces.

E. Lecture de la figure 1A : la PI3K est toujours associée au EGF-R au bout de 30 min de stimulation chez les cellules P (deux dernières colonnes, deuxième ligne). Lecture de la figure 1B : Les EGF-R des cellules P sont principalement au niveau des EP (Cf. Item D). Donc si les EGF-R sont dans les EP mais qu'ils sont toujours liés aux PI3K, c'est qu'il n'y a pas dissociation dans les EP.

QCM 13 - BC

A. Lecture de la figure 1 - En présence d'anti-P2Y1 chez les patients sains, il n'y a pas d'agrégation, c'est que P2Y1 est nécessaire pour l'agrégation.

B. (VRAI) *Rappel ICM* : Gq va stimuler la production d'IP₃. Lecture de la figure 2A : En présence d'anti-P2Y1 chez les patients sains, il n'y a plus de production d'IP₃, P2Y1 est donc couplé à Gq car il permet la production d'IP₃.

C. (VRAI) Lecture de la figure 2A : En présence d'anti-P2Y12 chez les patients sains, la production d'IP₃, par rapport à la situation contrôle (uniquement avec de l'ADP), est diminuée de moitié environ. P2Y12 est donc indispensable à une production maximale d'IP₃.

D. *Rappel ICM* : Gs va stimuler la production d'AMPc. Lecture de la figure 2B : Si P2Y1 était couplé à Gs, on aurait un graphique similaire à celui de l'item B avec : production d'AMPc en présence d'ADP, puis inhibition de cette production en présence d'anti-P2Y1. Ce n'est pas le cas ici.

E. En utilisant les figures 2A et 2B, on remarque que les résultats obtenus chez le patient P (ADP+) sont similaires aux résultats obtenus chez les patients sains D1 et D2 (ADP+) en présence d'anti-P2Y12 (= production non maximale d'IP₃, production d'AMPc). Ça ressemble donc à une mutation perte de fonction de P2Y12 et non de P2Y1.

QCM 14 - DE

- A. On observe deux bandes sur la ligne anti-IDH1 - une pour le IDH1-WT et une pour le IDH1-R132H : l'anticorps anti-IDH1 reconnaît IDH1 que ce soit dans sa forme sauvage ou mutée R132H.
- B. On observe deux vraies bandes sur la ligne anti-IDH2 - une pour le IDH2-WT et une pour le ID21-R172K (donc que IDH2). Les autres "bandes" que l'on peut discerner sont trop fines par rapport au témoin (β -actine), elles ne sont donc pas significatives.
- C. Les épitopes conformationnels sont détruits en conditions dénaturantes, ils ne sont pas étudiables avec un Western-blot (dénaturant).
- D. (VRAI) ???
- E. (VRAI) L'anticorps anti-IDH1 reconnaît la forme sauvage d'IDH1 et sa forme mutée R132H.

QCM 15 - BC

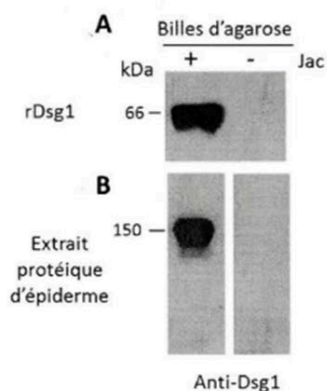
- A. Lecture de la figure A : L'intensité du signal (des 5 méthyl-cytosines) pour les cellules transfectées par l'IDH1-WT est égale à 1.0, c'est-à-dire à la valeur de référence des cellules non transfectées. Il n'y a donc pas d'hyper-méthylation induite par IDH1-WT.
- B. (VRAI) Lecture de la figure A : L'intensité du signal (des 5 méthyl-cytosines) pour les cellules transfectées par l'IDH1-R132H est plus élevée que celle du contrôle, il a donc une hyper-méthylation des cytosines. Par définition, les hypo-/hyper-méthylation influencent l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, il y a donc un impact sur l'activité transcriptionnelle.
- C. (VRAI) Lecture de la figure B : Comparativement aux cellules contrôles (TET2+), les cellules transfectées par IDH1 mutée ont un pourcentage de 5-OH-méthylcytosine (marquées par les anticorps) très bas. C'est-à-dire que l'activité enzymatique de la TET2 réalisant cette hydroxyméthylation est inhibée.
- D. Si l'enzyme agit sur la méthylation de l'ADN, elle sera plutôt située au niveau du noyau.
- E. Lecture de la figure B : Le marquage anti-5-OH-méthylcytosine est le même pour les cellules transfectées par IDH1-WT que pour les cellules contrôles. Il n'y a donc pas de stimulation de l'activité de TET2 par une surexpression d'IDH1-WT (on est déjà au maximum sans surexpression).

Purpan 2017-2018

Le pemphigus foliacé (PF) est une dermatose bulleuse auto-immune, maladie de la peau caractérisée par un décollement des couches superficielles de l'épiderme. On met en évidence dans le sérum des patients des auto-anticorps dirigés contre la desmoglérine I (Dsg1 ; 150 kDa), protéine desmosomale transmembranaire exprimée au niveau des kératinocytes les plus superficiels de l'épiderme. L'inhibition de l'interaction entre Dsg1 et auto-anticorps anti-Dsg1 pourrait constituer une option thérapeutique. Dans cette optique, des chercheurs se sont intéressés à la molécule Jac, susceptible d'interagir avec des radicaux sucrés portés par la Dsg1.

Ils ont produit une forme recombinante du domaine extracellulaire de la Dsg1 (rDsg1 ; 66 kDa) et ont testé la capacité de la molécule Jac à interagir avec ce domaine. Pour cela, la molécule Jac a été couplée à des billes d'agarose (+) et incubée soit avec la rDsg1 (Figure 1A), soit avec un extrait protéique d'épiderme humain (Figure 1B). Après centrifugation et lavages des billes, les molécules accrochées à la molécule Jac ont été libérées par chauffage et soumises à une électrophorèse en PAGE-SDS en conditions réductrices, suivie d'un immunotransfert utilisant un anticorps monoclonal anti-Dsg1 humaine. Comme contrôle, des billes d'agarose non revêtues de molécules Jac (-) ont été incubées avec les mêmes solutions.

Figure 1



QCM 1 -

- A. Vous pouvez affirmer que la molécule Jac interagit avec la Dsg1.
- B. Vous pouvez affirmer que la molécule Jac ne reconnaît de la Dsg1 que le domaine extracellulaire.
- C. L'anticorps monoclonal anti-Dsg1 reconnaît un épitope séquentiel du domaine extracellulaire de la Dsg1.
- D. Vous pouvez affirmer que la molécule Jac se fixe sur le même épitope que celui reconnu par l'anticorps anti-Dsg1.
- E. Vous pouvez affirmer que l'anti-Dsg1 pourrait être utilisé pour co-immunoprécipiter en conditions non dénaturantes et non réductrices, la rDsg1 liée à la molécule Jac.

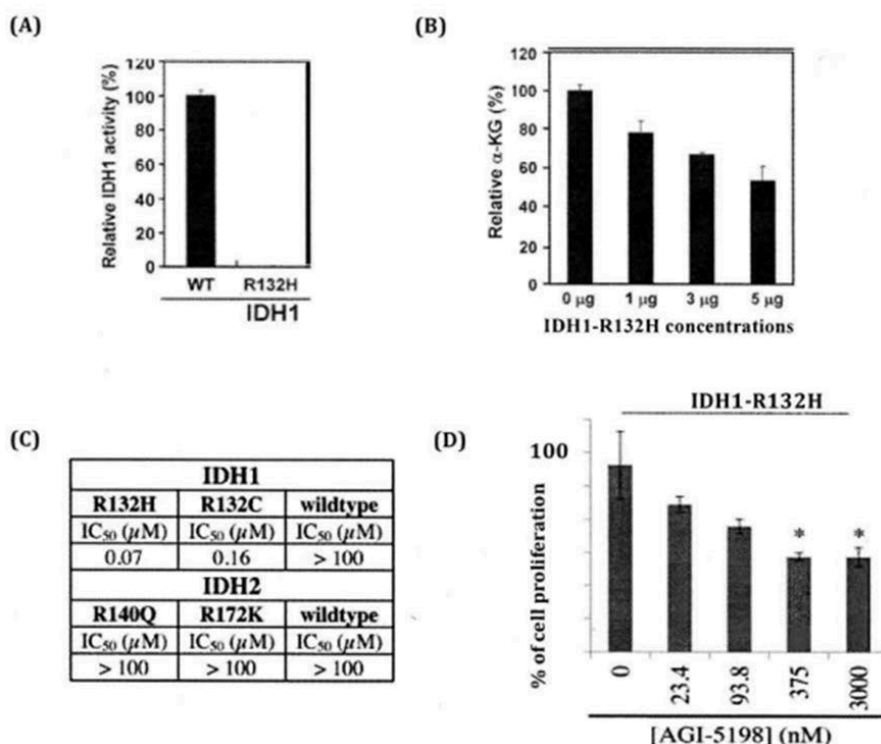
Les chercheurs ont montré sur cryocoupes de peau humaine et murine, que la molécule Jac était capable de se fixer à l'épiderme et, par immunofluorescence indirecte, que la pré-incubation de ces tissus avec la molécule Jac inhibait la liaison des auto-anticorps de patients à leur cible antigénique. Enfin, grâce à un modèle expérimental de PF dans lequel la maladie est induite chez la souris en injectant des auto-anticorps purifiés par chromatographie d'affinité à partir de sérums de patients en utilisant la rDsg1, les chercheurs ont montré que l'injection préalable de la molécule Jac protégeait les animaux du développement de la maladie.

QCM 2 -

- A. Il est très probable que la molécule Jac inhibe la liaison des auto-anticorps à l'épiderme en interagissant avec la Dsg1.
- B. Les auto-anticorps reconnaissent sur la molécule Jac les mêmes épitopes séquentiels et conformationnels que ceux portés par la Dsg1.
- C. L'inhibition de liaison des auto-anticorps des patients à la Dsg1 peut être due à l'inaccessibilité des épitopes reconnus par ces auto-anticorps, induite par la fixation de la molécule Jac.
- D. L'inhibition de liaison des auto-anticorps des patients à la Dsg1 peut être due à une modification de conformation des épitopes reconnus par ces auto-anticorps, induite par la fixation de la molécule Jac.
- E. La molécule Jac constitue une molécule-candidate pour le traitement du PF.

QCM 3 -

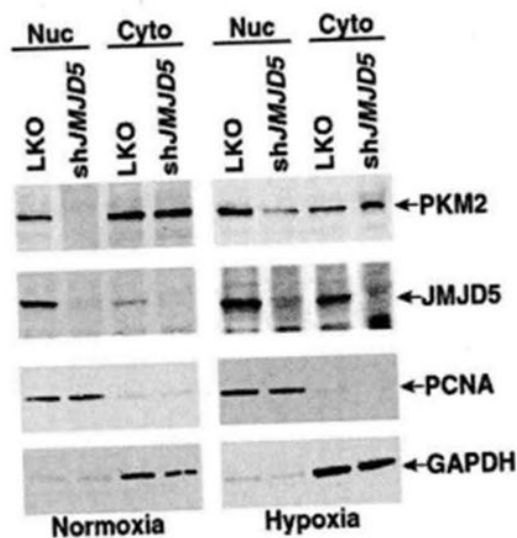
Les gènes *IDH1* et *IDH2* codent deux isotypes d'une enzyme du cycle de Krebs, l'isocitrate déshydrogénase, transformant l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -KG). La mutation R1321 de l'*IDH1*, transformant une arginine en histidine au niveau du résidu 132 est fréquemment associée au développement de tumeurs cérébrales ou gliomes. Les cellules gliales U-87MG sont transfectées par 20 μ g de plasmides contenant les ADN complémentaires du gène *IDH1* sauvage (WT ou wild type) ou son équivalent muté (*IDH1*-R132H) et l'activité *IDH1* est mesurée et rapportée à l'activité du plasmide sauvage (A). Dans un second temps, des concentrations croissantes du plasmide *IDH1*-R132H sont ajoutées aux cellules contenant 5 μ g de plasmide *IDH1* sauvage et le taux d' α -cétoglutarate est mesuré (B). Enfin, différentes concentrations d'un inhibiteur AGI-5198 sont testées sur 6 lignées gliales humaines présentant, à l'état constitutif, les gènes *IDH1* ou *IDH2* sous leurs formes sauvages (WT) ou mutées. **L'IC₅₀ indique la concentration d'AGI-5198 inhibant 50% de l'activité *IDH1* (C).** Dans une lignée *IDH1*-R132H, le pourcentage de cellules en prolifération est déterminé après 3 heures de traitement par des quantités croissantes d'AGI-5198 (D).



- Le variant *IDH1* R132H n'a aucun effet sur l'activité *IDH1*.
- Le variant *IDH1* R132H diminue de façon dose-dépendante la production d' α -cétoglutarate.
- In vitro, l'hétérozygote WT:R132H permet la production de près de 50% de l' α -cétoglutarate.
- (HP?) AGI-5198 est un inhibiteur de l'activité *IDH2*.
- La figure D suggère qu'à une concentration de 1500 nM, AGI-5198 a une action antiproliférative.

QCM 4 -

La protéine PKM2 (isoforme M2 de la pyruvate kinase) est une enzyme de la glycolyse. Cette enzyme multimérique peut présenter plusieurs structures quaternaires, dimérique dans le noyau et tétramérique dans le cytoplasme. L'enzyme JMJD5 est impliquée dans la compaction de la chromatine modulant le niveau de transcription des gènes. Des cellules MCF7 transfectées soit par un plasmide permettant l'inhibition de l'expression de JMJD5 (shJMJD5) soit par un plasmide vide contrôle (LKO) sont testées en conditions normoxiques ou hypoxiques. Les lysats cellulaires sont fractionnés (fraction cytoplasmique (cyt) et nucléaire (nuc)) et testés par Western-Blot après PAGE-SDS en utilisant des anticorps anti-PKM2, anti-JMJD5, anti-PCNA (Proliférating-cell nuclear antigen) anti-GAPDH (Glyceraldehyde-3 phosphate et deshydrogenase, enzyme de la glycolyse). Il est considéré que la quantité totale de protéine est identique dans toutes les conditions de ce Western-Blot.

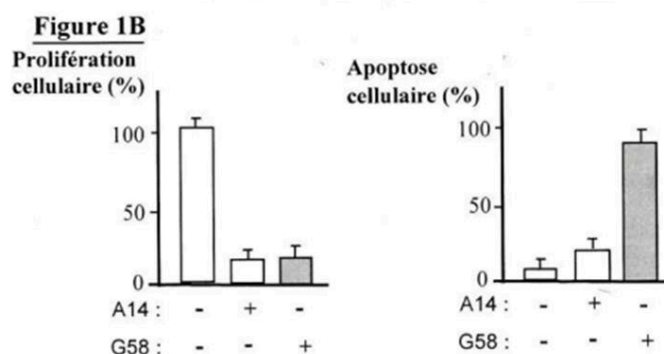
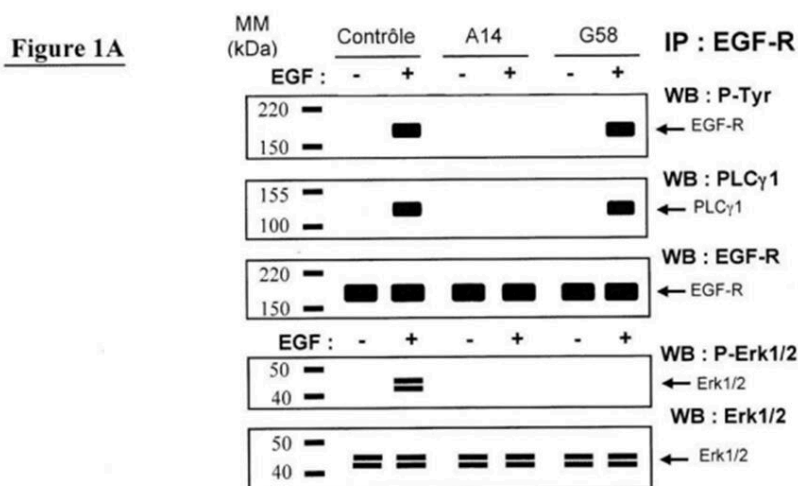


- A. L'anticorps anti-PKM2 reconnaît une seule des structures quaternaires de la PKM2.
- B. Les marqueurs PCNA et GAPDH valident la qualité du sous fractionnement cellulaire.
- C. L'isoforme PKM2 tétramérique est induite en condition hypoxique.
- D. La protéine JMJD5 est nécessaire à la localisation nucléaire de la PKM2 en condition normoxique.
- E. En condition hypoxique, la présence conjointe de JMJD5 et de PKM2 dans le noyau est compatible avec une régulation transcriptionnelle.

QCM 8 -

Une lignée de cellules cancéreuses de côlon (HT-29) exprimant le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou EGF-R a été utilisée pour tester l'effet de deux molécules (A14 et G58) au pouvoir anticancéreux potentiel. Les cellules HT-29 ont été stimulées avec 100 ng/ml d'EGF pendant 5 minutes en présence ou non des deux molécules, et des expériences d'immunoprécipitation (IP) de l'EGF-R suivies par une analyse de ces immunoprécipitats en immunoempreinte (Western Blot = WB) ont été réalisées (Figure 1A). Les immunoempreintes ont été réalisées à l'aide d'anticorps anti-EGF-R, anti-PLC γ 1 ou anti-phosphotyrosine (P-Tyr) comme indiqué dans la figure 1A. En parallèle, l'activation des MAP-kinases a été mesurée directement en analysant la phosphorylation des kinases Erk1/2 (P-Erk1/2) par immunoempreinte. De plus, l'effet de ces molécules sur la prolifération cellulaire induite par l'EGF et sur l'apoptose (mort programmée des cellules) a été étudié après 5 jours de traitement des cellules (Figure 1B).

Rappels : L'EGF-R a une masse moléculaire (MM) de 170 kDa, la PLC γ 1 de 145 kDa et les kinases Erk1/2 de 41 et 43 kDa.



- Les résultats sont compatibles avec une inactivation de la tyrosine kinase de l'EGF-R par la molécule A14.
- La molécule G58 inhibe la prolifération cellulaire en bloquant l'ensemble des voies d'activation en aval de l'EGF-R.
- Les résultats montrent que la PLC γ 1 est phosphorylée sur une tyrosine en réponse à l'EGF.
- Les résultats sont compatibles avec un effet inhibiteur de G58 sur les MAP-kinases et un effet anti-apoptotique de cette molécule.
- Les résultats démontrent que l'expression des MAP-kinases est indispensable à l'effet prolifératif de l'EGF.

QCM 9 -

Des plaquettes sanguines d'un donneur sain (D1) et de deux patients présentant des saignements (P1 et P2) ont été isolées afin d'être caractérisées. Ces plaquettes ont été stimulées par 6 $\mu\text{g/ml}$ de collagène pendant 5 minutes. Dans certaines conditions (Figure 1A et C) un antagoniste du récepteur P2Y₁₂ de l'adénosine diphosphate (ADP) appelé "Ticagrelor" a été ajouté lors de la stimulation des plaquettes. Les résultats de l'agrégation plaquettaire mesurée à l'aide d'un agrégomètre sont exprimés en pourcentage d'agrégation (Figure 1A). La sécrétion des granules denses qui contiennent ADP a été mesurée (Figure 1B) ainsi que la phosphorylation de la protéine AKT (Figure 1C). Dans une autre expérience, les plaquettes isolées ont été pré-stimulées avec de la prostacycline puis stimulées par 5 μM ADP pendant 5 minutes et le taux d'AMPc intraplaquettaire a été mesuré (Figure 1D).

Figure 1A

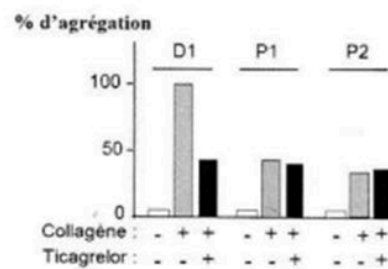


Figure 1B

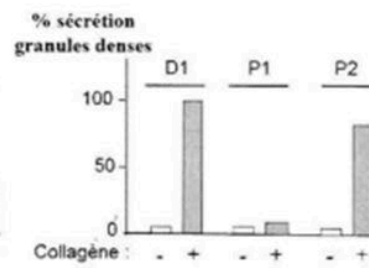


Figure 1C

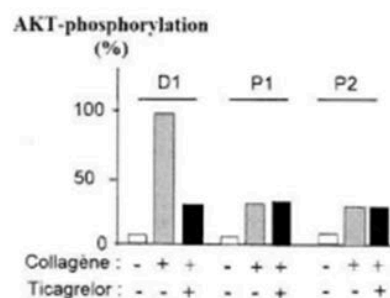
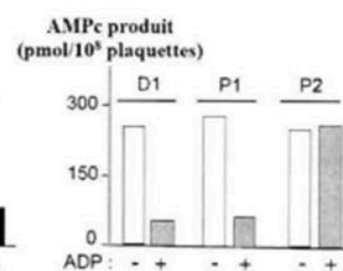


Figure 1D



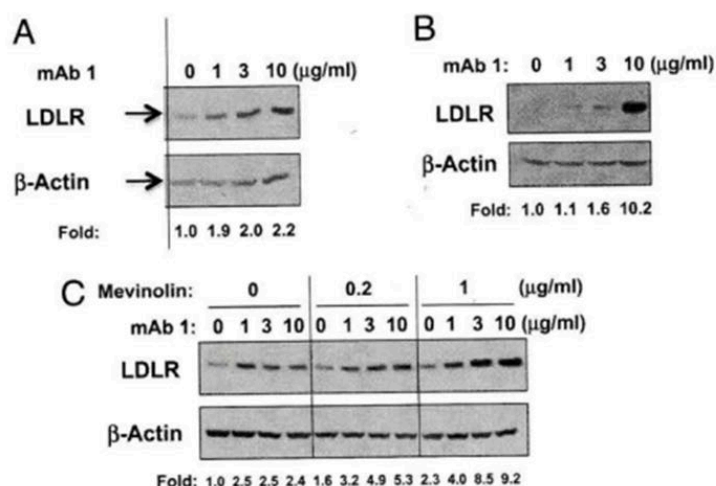
- Le récepteur P2Y₁₂ de l'ADP contribue à l'agrégation plaquettaire induite par le collagène.
- Le patient P2 présente un défaut de sécrétion d'ADP en réponse à une stimulation des plaquettes au collagène.
- La phosphorylation d'AKT induite par le collagène est en grande partie dépendante de l'ADP sécrété par les plaquettes et de son récepteur P2Y₁₂.
- Les résultats obtenus sont compatibles avec un défaut d'activation du récepteur P2Y₁₂ de l'ADP chez le patient P1.
- Le récepteur P2Y₁₂ de l'ADP du patient P2 est incapable d'activer la protéine G hétérotrimérique Gi.

Les QCM 12 et 13 sont liées :

La protéine PCSK9 est une protéine sécrétée par de nombreux types cellulaires. Une des propriétés de PCSK9 est de se lier au LDL-récepteur membranaire (LDL-R), auquel elle reste associée au cours du processus d'endocytose, l'orientant vers la dégradation lysosomiale au détriment du recyclage à la membrane plasmique, qui est le parcours habituel du LDL-R. De ce fait, la liaison de PCSK9 au LDL-R induit un défaut d'expression membranaire de ce récepteur. Récemment, des mutations "gains de fonctions" de PCSK9 ont été décrites, qui sont associées à une situation d'hypercholestérolémie familiale. Ces dernières années, plusieurs laboratoires ont développé des anticorps monoclonaux (monoclonal antibodies, mAb) dirigés contre PCSK9 et capables d'inhiber sa liaison au LDL-R.

QCM 12 -

Des hépatocytes humains ont été incubés pendant 48h avec des concentrations croissantes d'un anticorps monoclonal anti-PCSK9 (mAb1, panneaux A,B,C), et de mévinoline, qui est une statine (panneau C). Au panneau B, on a utilisé des cellules sur-exprimant la protéine PCSK9 à un taux 4 fois plus important que les cellules utilisées aux panneaux A et C. Après lyse cellulaire, le LDL-R est mis en évidence par Western-Blot utilisant un anticorps spécifique. L'intégration optique des bandes obtenues permet une quantification relative de la quantité de LDL-R (chiffres en bas des blots, lignes « Fold »), la valeur de 1.0 étant attribuée aux cellules incubées en absence de mAb1 et de mévinoline. Un Western-Blot de β -Actine est aussi réalisé à titre de contrôle.

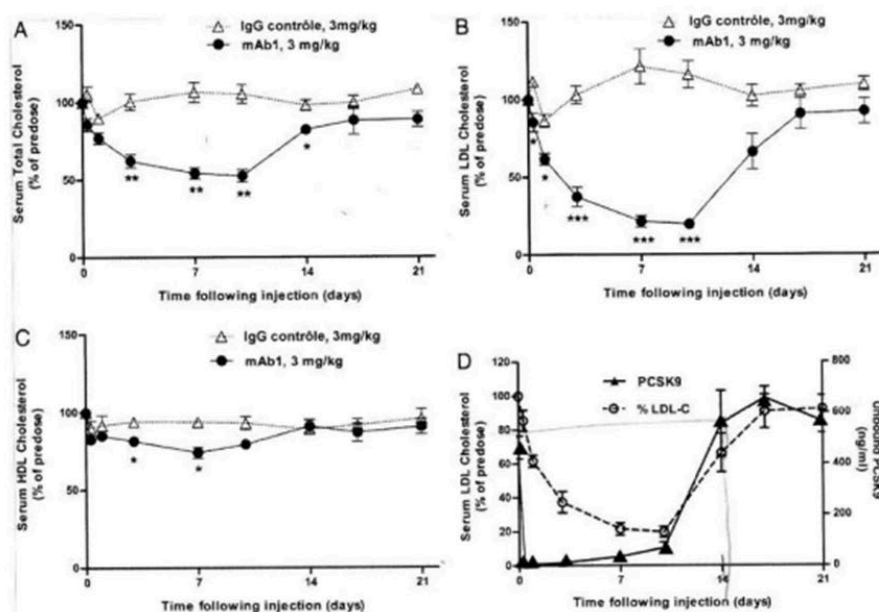


- La mévinoline utilisée seule est sans effet sur l'expression du LDL-récepteur.
- Dans les cellules ne surexprimant pas PCSK9, en absence de mévinoline, le traitement par mAb1 induit une augmentation du contenu cellulaire en LDL-récepteur.
- Dans toutes les conditions expérimentales, l'effet maximal de l'anticorps mAb1 est obtenu dès la concentration de 1 μ g/ml.
- L'effet de l'anticorps mAb1, à la concentration maximale utilisée, est plus marqué dans les cellules sur-exprimant PCSK9.
- La mévinoline et l'anticorps mAb1 ont des effets antagonistes sur l'expression du LDL-récepteur.

QCM 13 -

Deux groupes de singes (panneaux A, B, C) ont reçu une injection intraveineuse d'anticorps mAb1 (symboles noirs) ou d'une IgG contrôle (symboles clairs). Les panneaux A, B, C, montrent respectivement l'évolution, en fonction des jours après injection, des taux, dans le sérum sanguin, de cholestérol total, de cholestérol associé aux fractions LDL et HDL, exprimés en pourcentages des valeurs au jour 0 (% prédose). Au panneau D, figure l'évolution de la concentration de la protéine PCSK9 libre (triangles noirs) après injection de mAb1 - les données du LDL-cholestérol sont également reprises pour comparaison (ronds clairs).

Les astérisques donnent la significativité statistique des différences entre les conditions « mAb1 » et « IgG contrôle » : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



- L'administration de l'anticorps mAb1 provoque un effondrement rapide de la concentration sérique de PCSK9 libre.
- Deux semaines après injection de l'anticorps mAb1, la concentration de PCSK9 libre retrouve une valeur proche de ce qu'elle était avant injection.
- Dans les 7 jours qui suivent l'administration de l'anticorps mAb1, on observe une diminution significative du LDL-cholestérol sérique.
- Une injection intraveineuse de mAb1 toutes les 3 semaines serait suffisante pour obtenir une réduction stable des concentrations de LDL-cholestérol.
- Sept jours après injection de l'anticorps mAb1, on observe une augmentation du rapport HDL-cholestérol/cholestérol total par rapport au jour 0.

Les QCM 14 et 15 sont liées :

La formation de la salive comporte la sécrétion d'électrolytes du pôle apical des cellules acineuses vers la lumière glandulaire et un mouvement osmotique d'eau de l'intérieur des cellules acineuses vers la lumière glandulaire. La sécrétion d'électrolytes est stimulée par la pilocarpine, un agoniste muscarinique parasympathomimétique. Les aquaporines 5 (AQP5) sont les principales aquaporines exprimées au niveau des glandes salivaires où elles pourraient contribuer aux mouvements d'eau en réponse aux gradients osmotiques. Leur unique inhibiteur est, comme pour l'AQP1 et l'AQP2, le chlorure de mercure (HgCl_2). Des travaux précédents ont montré que des souris déficientes en AQP5 sécrètent un volume de salive moindre. Les auteurs du présent travail ont étudié l'effet d'une mutation inactivante de l'AQP5 *in vivo* (AQP5^{-/-}) sur la sécrétion salivaire en réponse à la pilocarpine (Figure 1) en comparaison à des souris non mutées (AQP5^{+/+}). Ensuite, (Figure 2), ils ont étudié *in vitro*, à partir de cultures de cellules acineuses de glandes salivaires de souris AQP5^{-/-} ou AQP5^{+/+}, les modifications de perméabilité à l'eau et de volume cellulaire en réponse à des variations de gradient osmotique.

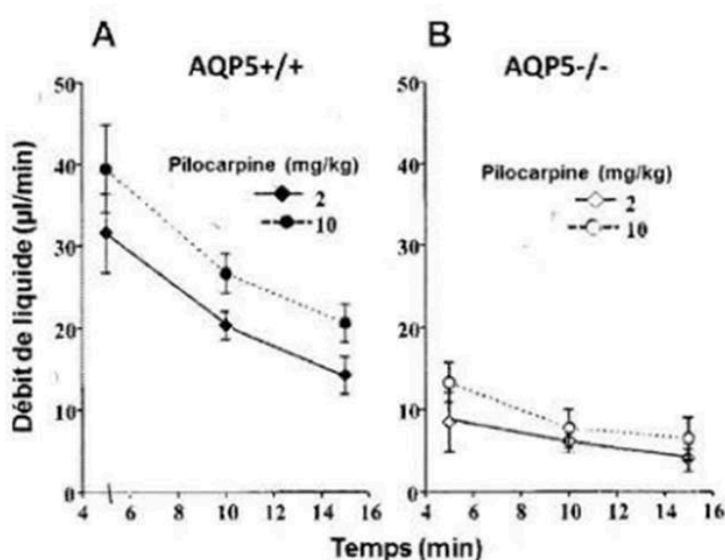


Figure 1A et B : Effets de deux doses de pilocarpine (2 et 10 mg/kg de masse corporelle) sur le débit de fluide salivaire en fonction du temps (première mesure effectuée 5 min après l'injection) chez des : (A) souris non mutées AQP5^{+/+} et (B) souris mutées AQP5^{-/-}.

QCM 14 - A partir de vos connaissances sur les aquaporines et de la Figure 1, il est exact que :

- A. Chez les souris AQP5+/+, le débit de liquide salivaire 5 minutes après une injection de 2 mg/kg de pilocarpine apparaît supérieur à celui mesuré 15 minutes après l'injection de 10 mg/kg de pilocarpine.
- B. Chez les souris AQP5+/+, l'absence d'indication sur le débit de liquide salivaire avant l'injection de pilocarpine ne permet pas de savoir si 15 minutes après cette injection le débit salivaire est revenu à sa valeur non stimulée.
- C. La pilocarpine induit l'expression de l'AQP5 au niveau des glandes salivaires.
- D. Chez les souris AQP5-/-, l'injection de pilocarpine augmente le débit de liquide salivaire plus tardivement que les chez souris AQP5+/+,
- E. L'administration quotidienne d'une dose bloquante d'HgCl₂, pendant plusieurs semaines chez des souris AQP5+/+ diminuerait leur sécrétion salivaire.

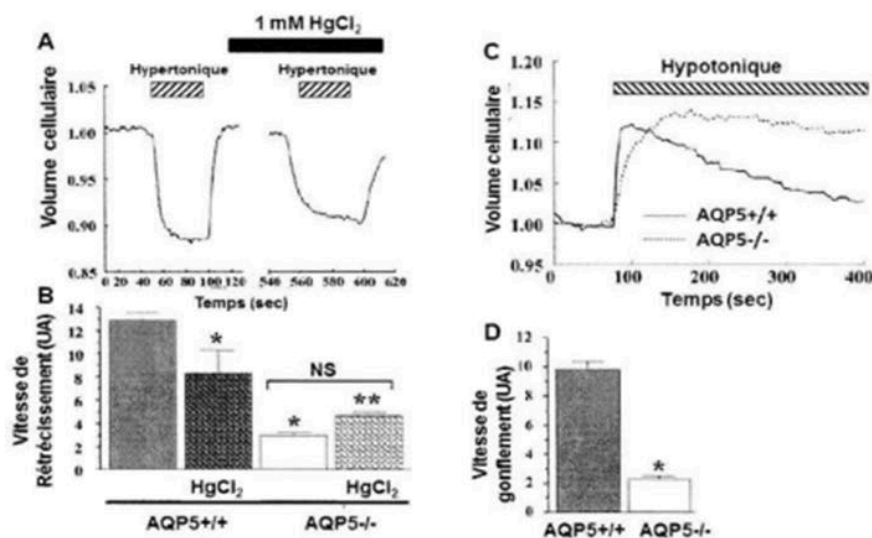


Figure 2A à D : Variations du volume de cellules acineuses de souris AQP5+/+ et AQP5-/- mises en culture primaire et exposées à un milieu extracellulaire hypertonique (A et B) ou hypotonique (C et D). Figure 2A : volume cellulaire final en absence ou en présence de chlorure de mercure. Expérience réalisée sur des cellules AQP5+/+.

Figure 2B: vitesse de rétrécissement cellulaire exprimée en unité arbitraire (UA). Plus la valeur est grande, plus la vitesse est grande.

Figure 2C : volume cellulaire final en présence d'un milieu hypotonique et sans exposition au chlorure de mercure.

Figure 2D : vitesse de gonflement des cellules exprimée en unité arbitraire. Plus la valeur est grande, plus la vitesse est grande.

NB : Les symboles * indiquent une différence significative avec le groupe contrôle correspondant dans chaque figure (AQP5+/+ sans exposition au HgCl₂) : NS Indique l'absence de différence significative entre les deux groupes comparés.

QCM 15 - A partir de vos connaissances sur les aquaporines et de la Figure 2, il est exact que :

- A. La diminution de volume des cellules acineuses après exposition à un milieu hypertonique (Figure 2A) évoque un efflux d'eau hors des cellules.
- B. L'incubation de cellules acineuses dans un milieu hypertonique après exposition au chlorure de mercure (Figure 2A) bloque les mouvements d'eau de part et d'autre de la membrane cellulaire.
- C. D'après la figure 2B, les cellules acineuses AQP5^{-/-} ont une vitesse de rétrécissement moindre que les cellules AQP5^{+/+} lorsqu'elles sont exposées à un milieu extracellulaire hypertonique.
- D. D'après la figure 2B, l'exposition des cellules acineuses au HgCl₂ diminue la vitesse de rétrécissement des cellules AQP5^{+/+} mais n'a pas d'effet notable sur les cellules AQP5^{-/-}.
- E. D'après les figures 2C et 2D, les cellules acineuses AQP5^{-/-} sont imperméables aux mouvements d'eau provoqués par l'exposition à un milieu extracellulaire hypotonique.

Correction

QCM 1 - AC

- A. (VRAI) Lecture de la figure 1B : On a réalisé une immunoprécipitation avec des billes couplées à Jac (colonne de gauche) et un extrait protéique d'épiderme : on observe un signal à 150k Da (PM de Dsg1, cf. Enoncé) détecté par des anticorps anti-Dsg1. Il y a une interaction Jac/Dsg1.
- B. Lecture de la figure 1A : On a réalisé une immunoprécipitation avec des billes couplées à Jac (colonne de gauche) et la forme recombinante du domaine extracellulaire de la Dsg1 - on observe un signal à 66 kDa (PM de rDsg1) : il y a une interaction Jac/Dsg1. On sait aussi que Jac interagit avec Dsg1 entière (Cf. Item A). Par contre, rien ne nous permet d'affirmer que Jac interagit avec le même épitope dans ces deux cas (un en extracellulaire et un en intracellulaire par exemple).
- C. (VRAI) Une électrophorèse SDS-Page se fait dans des conditions dénaturantes, il ne reste que les épitopes séquentiels. On a bien une interaction rDsg1/Ac anti-Dsg1 car on observe une bande à 66 kDa. L'Ac reconnaît donc forcément un épitope séquentiel du domaine extracellulaire.
- D. Encore une fois, on n'a aucun moyen de savoir si Jac se fixe sur le même épitope que l'Ac anti-Dsg1 (et c'est statistiquement peu probable). En plus, on sait que Jac fixe Dsg1 en conditions non dénaturantes (*"les molécules accrochées à la molécule Jac ont été libérées par chauffage et soumises à une électrophorèse en PAGE-SDS"*) et que l'Ac reconnaît un épitope séquentiel et non conformationnel (de moins en moins probable).
- E. On sait que l'Ac anti-Dsg1 reconnaît rDsg1 en conditions dénaturantes, mais on n'a aucun moyen de savoir ce qu'il en est en conditions non-dénaturantes. L'épitope séquentiel qu'il reconnaît pourrait très bien être cryptique et donc caché en conditions non-dénaturantes, auquel cas on ne pourrait pas faire la co-immunoprécipitation.

QCM 2 - ACDE

- A. (VRAI) D'après le QCM 1, Jac interagit avec Dsg1, et l'énoncé nous dit que la pré-incubation des tissus avec Jac inhibe la liaison des auto-anticorps. Donc il est très probable que le phénomène d'inhibition de la liaison soit dû à une interaction avec Dsg1.
- B. On nous dit que si on met d'abord Jac puis les Ac, cela inhibe la liaison, et on sait que Jac lie Dsg1 (Cf. QCM 1). Donc il n'y a aucune raison de dire que les Ac reconnaissent Jac (on pense plutôt au fait que Jac se lierait aux épitopes reconnus par les Ac et empêchent ainsi la liaison, ou que sa fixation modifierait la conformation de Dsg1).
- C. (VRAI) Jac lie Dsg1 et empêche les auto-Ac de se lier : c'est possible qu'il le fasse en provoquant un changement de conformation en rendant des épitopes séquentiels inaccessibles.
- D. (VRAI) Jac lie Dsg1 et empêche les auto-Ac de se lier : c'est possible qu'il le fasse en provoquant un changement de conformation en modifiant des épitopes conformationnels.
- E. (VRAI) Jac prévient l'apparition de la maladie et empêche les auto-Ac responsables de la maladie de se lier à leur cible, donc elle peut potentiellement être utilisée pour le traitement de la PF.

QCM 3 - BCE

- A. Lecture de la figure A : les cellules transfectées avec le variant IDH1-R132H n'ont aucune activité IDH1, alors que les IDH1-WT ont 100% d'activité : le variant IDH1-R132H abolit l'activité IDH1.
- B. (VRAI) Lecture de la figure B : plus on augmente la concentration en IDH1-R132H, plus la production d' α -cétooglutarate diminue : c'est bien une diminution dose-dépendante.
- C. (VRAI) Lecture de la figure B : pour cette expérience, les cellules sont pré-transfectées avec 5 μ g d'IDH1-WT (Cf. Enoncé). Ici, on prend le cas d'un hétérozygote WT/R132H, donc on regarde la colonne avec 5 μ g de R132H (pour avoir la même concentration de WT et de R132H) : il y a près de 50% de production d' α -cétooglutarate.
- D. Lecture de la figure C : l'IC50 d'AGI-5198 pour IDH2 est la même pour IDH2 mutée et IDH2 WT, donc AGI-5198 n'inhibe pas IDH2.
- E. (VRAI) Pour 375 et 3000 nM d'AGI-5198, les différences de prolifération cellulaire sont significatives (baisse de la prolifération). Cela laisse penser qu'à 1500 nM (entre 375 et 3000 nM), la différence sera aussi significative = on aura une action anti-proliférative d'AGI-5198.

QCM 4 - BDE

- A. Dans des conditions de normoxie (physiologiques), les anticorps anti-PKM2 reconnaissent une structure quaternaire nucléaire (signal sur la piste LKO/Nuc) et une structure quaternaire cytoplasmique (signal sur la piste LKO/Cyt). Or les structures quaternaires sont différentes entre le noyau et le cytoplasme, donc l'Ac anti-PKM2 reconnaît 2 structures quaternaires différentes.
- B. (VRAI) Comme son nom l'indique, PCNA est nucléaire et elle n'est présente que dans les pistes Nuc. GAPDH est une enzyme de la glycolyse, et la glycolyse est une réaction cytoplasmique = GAPDH est cytoplasmique, et n'est présente que dans les pistes Cyt. Le sous-fractionnement cellulaire est respecté.
- C. L'isoforme tétramérique est cytosolique (Cf. Enoncé). Il y a un signal pour la piste LKO/Cyt en normoxie, il ne peut donc pas être induit par l'hypoxie (car déjà présent en normoxie).
- D. (VRAI) En normoxie, quand JMJD5 est présente, on a la présence de PKM2 nucléaire (piste LKO/Nuc). Par contre, quand JMJD5 est absente, on n'a plus de PKM2 nucléaire (piste shJMJD5/Nuc). JMJD5 est donc essentielle à la localisation nucléaire de PKM2 en normoxie.
- E. (VRAI) En hypoxie, sur la piste shJMJD5/Nuc, on a des signaux pour PKM2 et JMJD5, ce qui n'était le cas pour aucun des deux en normoxie. C'est très probablement l'œuvre d'une régulation transcriptionnelle (induite par l'hypoxie par exemple).

QCM 8 - A

- A. (VRAI) Lecture de la figure 1A : En présence d'EGF, on n'observe pas de bande pour le WB : P-Tyr avec A14. Les tyrosines liées aux EGF-R n'ont pas été phosphorylées même en présence de ligand (EGF) : A14 inactive la tyrosine kinase.
- B. Lecture de la figure 1B : G58 inhibe effectivement la prolifération cellulaire (environ 10% d'activation quand G58+). Par contre, elle ne bloque pas toutes les voies d'activation, PLC γ 1 est toujours présente en présence de G58 (Cf. figure 1A).
- C. Rien ne permet de le savoir.
- D. Le début de la phrase est bon (Cf. figure 1A WB : P-Erk1/2 quand G58+) mais G58 a un effet apoptotique (Cf. figure 1B).
- E. Lecture de la figure 1A : WB : Erk1/2, toutes les cellules (même avec A14+ ou G58+) expriment les MAP-Kinases, c'est la phosphorylation (Cf. WB : P-Erk1/2) qui semble indispensable à l'effet prolifératif de l'EGF : c'est elle qui est bloquée par A14 et G58.

QCM 9 - ACE

- A. (VRAI) Lecture de la figure 1A : On compare chez le donneur sain (D1) le % d'agrégation en présence de collagène et celui en présence de collagène et de Ticagrelor (= antagoniste du récepteur P2Y12, cf. Enoncé) : la présence de Ticagrelor diminue le pourcentage, donc P2Y12 contribue à l'agrégation.
- B. Lecture de la figure 1B : Le pourcentage de sécrétion de granules denses pour le patient 2 (donc d'ADP, Cf. Enoncé) est quasiment normal en réponse à la stimulation par le collagène, donc pas de défaut.
- C. (VRAI) Lecture de la figure 1C : Pour le patient sain (D1), en présence de Ticagrelor, le taux de phosphorylation est clairement diminué : la phosphorylation est en grande partie dépendante du récepteur P2Y12 et de l'ADP.
- D. Lecture de la figure 1D : Pour le patient sain (D1), le taux d'AMPc produit baisse quand il y a stimulation du récepteur par l'ADP, P2Y12 est donc lié à G_i (*Rappel ICM* : G_i va inhiber la production d'AMPc). Pour le patient P1, en présence d'ADP, le taux d'AMPc est autant diminué que chez D1 = son récepteur P2Y12 est donc bien activé (et déclenche G_i).
- E. (VRAI) Lecture de la figure 1D : même en présence d'ADP le taux d'AMPc ne diminue pas chez P2, P2Y12 n'est pas capable d'activer G_i .

QCM 12 - BD

- A. Lecture de la figure C : En absence de Mevinolin et de mAb 1 (1ère colonne), Fold = 1.0. En présence de Mevinolin (0.2 µg/ml et 1 µg/ml) et en absence de mAb 1 - Fold = 1,6 et 2.3 respectivement = la Mevinolin augmente l'expression des LDL-R à elle toute seule.
- B. (VRAI) Lecture de la figure A : En présence de mAb 1 avec des concentrations croissantes, le Fold augmente : mAb 1 induit une augmentation de l'expression du LDL-R.
- C. Lecture de la figure B : pour 10 µg/ml de mAb 1, le Fold est 10 x plus élevé qu'avec 1 µg/ml.
- D. (VRAI) Lecture de la figure B (cellules surexprimant PCSK9) : c'est là où on a le Fold le plus grand pour les mêmes concentrations.
- E. Ils augmentent tous deux l'expression du LDL-R (on voit même un effet plus marqué quand on associe les 2) : ils ont un effet agoniste.

QCM 13 - ABCE

- A. (VRAI) Cf. figure D.
- B. (VRAI) Lecture de la figure D : A 14 jours c'est revenu au de départ (environ 500/600 ng/ml).
- C. (VRAI) Lecture de la figure B : De 0 à 7 jours après la dose, on a toujours une significativité statistique ($p < 0.05$, puis $p < 0.001$).
- D. Lecture de la figure B : Au bout de 14 jours, la concentration en LDL-cholestérol est revenue au même niveau qu'avant l'injection (plus de significativité statistique). Il faudrait une injection chaque semaine.
- E. (VRAI) Lecture de la figure C : Le HDL-cholestérol a peu diminué (environ 75% restants) au bout de 7 jours. Lecture de la figure A : Le cholestérol total a beaucoup plus diminué (environ 50% restants). Donc le rapport HDL-cholestérol/cholestérol total augmente.

QCM 14 - AB

- A. (VRAI) Cf. figure 1A.
- B. (VRAI) Si on ne connaît pas la valeur normale, on ne peut pas savoir si ça revient à la normale.
- C. Rien ne permet de l'affirmer, on a juste les débits salivaires.
- D. Il faudrait avoir le débit avant stimulation par pilocarpine pour pouvoir conclure qu'il y a eu une augmentation.
- E. L'administration chronique d'une dose d' HgCl_2 serait mortelle pour les souris (bloque d'autres aquaporines aussi).

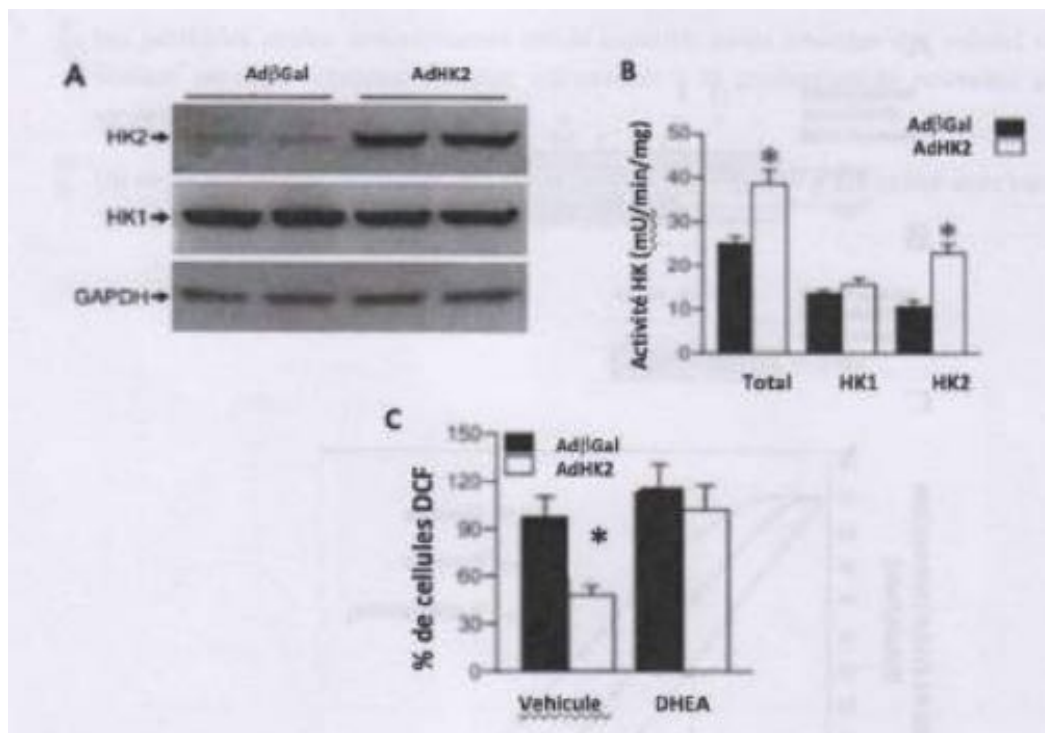
QCM 15 - ACD

- B. On a toujours une diminution du volume cellulaire (mais moindre) donc on a toujours un efflux d'eau hors de la cellule.
- C. (VRAI) On a une petite étoile qui dit que c'est significatif (entre AQP5+/+ sans HgCl_2 et AQP5-/- sans HgCl_2).
- D. (VRAI) On a une étoile pour AQP5 +/+ (donc significatif entre avec et sans HgCl_2) et NS pour AQP5 -/- (= non significatif entre avec et sans HgCl_2).
- E. Le volume augmente quand même, même si la vitesse de gonflement est moins élevée.

Purpan 2018-2019

Une lignée cellulaire NRV est transfectée par un vecteur contrôle (Ad β Gal) ou un vecteur exprimant l'hexokinase 2 (AdHK2). Après transfection, le taux des différentes isoformes d'hexokinase (**Figure A**) est évalué par Western-Blot après PAGE-SDS en utilisant des anticorps anti-HK2, anti-HK1 et anti-GAPDH (référence). L'activité hexokinase totale et celle de chaque isoforme est également mesurée (**Figure B**). La production de radicaux libres dans le cytoplasme cellulaire est mesurée grâce à une sonde fluorescente (DCF: Di-Chlorofluorescein) à l'état basal (véhicule) ou après inhibition de la voie des pentoses phosphates par la DHEA (Dehydroepiandrosterone) (**Figure C**).

* : différence significative par rapport au contrôle (Ad β Gal).



QCM3 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que:

- A. La transfection par le vecteur HK2 est sans effet sur l'isoforme HK1.
- B. L'activité HK2 est inversement proportionnelle à la quantité de cette isoforme.
- C. L'activité HK2 induit la production de radicaux libres.
- D. La production de radicaux libres observée dans les cellules AdHK2 est modulée par la voie des pentoses phosphates.
- E. L'isoforme HK2 pourrait être un protecteur du stress oxydant dans la cellule.

Vous travaillez sur une maladie auto-immune (MAI) dans laquelle la protéine hépatique X est suspectée d'être la cible antigénique d'auto-anticorps. Vous savez qu'il existe plusieurs formes de X, certaines pouvant avoir été modifiées enzymatiquement. Vous cherchez à caractériser la ou les formes de X potentiellement reconnues par des auto-anticorps présents dans le sérum des patients atteints de MAI (MAI+).

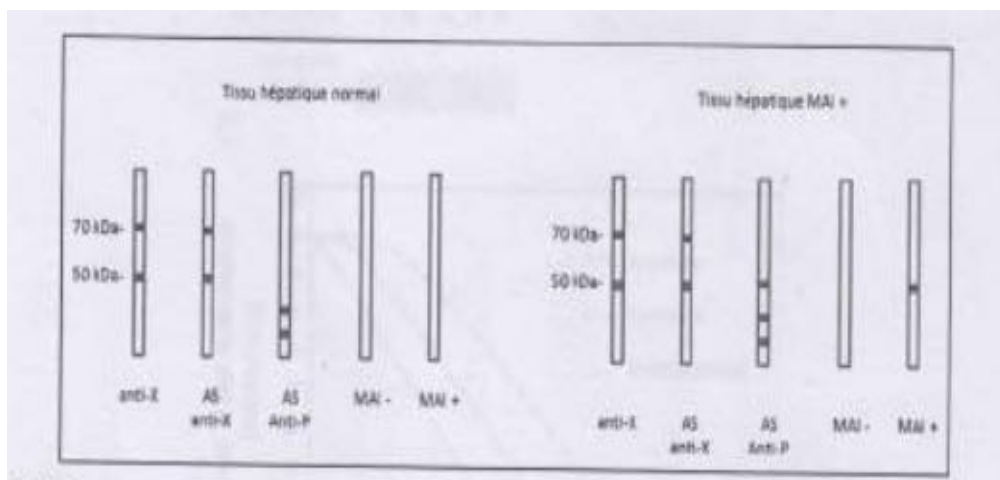
Vous possédez 3 anticorps:

- Anti-X: anticorps monoclonal de souris anti-X humaine, parfaitement caractérisé, qui ne donne aucune réaction croisée sur un extrait protéique de foie normal.

-AS anti-X: anti-sérum de lapin qui reconnaît toutes les formes de X humaine.

-AS anti-P: Antisérums de lapin qui reconnaît toutes les protéines humaines phosphorylées.

Vous extrayez les protéines hydrosolubles de tissu hépatique normal et de tissu hépatique provenant d'un patient MAI+ puis vous les séparez par électrophorèse en PAGE-SDS. Vous réalisez ensuite des immuno transferts avec vos anticorps et avec des sérums provenant respectivement d'un sujet sain (MAI-) et d'un sujet malade (MAI+).



QCM 6 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que :

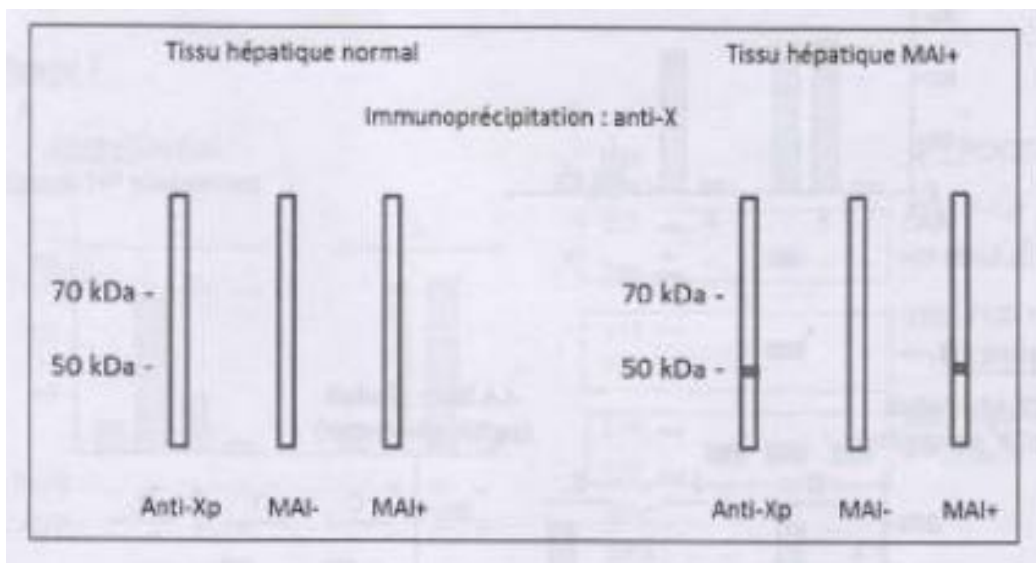
- Il existe dans le tissu hépatique normal comme dans le tissu hépatique MAI +, deux formes de X de 50 kDa et 70 kDa, et l'anticorps anti-X reconnaît un épitope séquentiel porté par la portion commune à ces deux formes.
- Il existe dans le tissu hépatique normal, comme dans le tissu hépatique MAI+, plusieurs formes protéiques de X phosphorylées.
- Il existe dans le tissu hépatique normal, comme dans le tissu hépatique MAI+, plusieurs protéines phosphorylées dont une de 50 kDa qui n'existe que dans le tissu hépatique MAI+.
- L'anti-X reconnaît un épitope conformationnel sur la forme de 50 kDa qui disparaît lorsque X est phosphorylée.
- Ni le sérum MAI-, ni le sérum MAI+ ne contiennent d'auto-anticorps anti-X mais on trouve dans le sérum MAI+ des auto-anticorps dirigés contre une autre protéine phosphorylée.

Vous cherchez à développer un test diagnostique pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la MAI.

Vous faites l'hypothèse que c'est une forme phosphorylée de X (Xp) qui est l'antigène (Ag)-cible des auto-anticorps présents dans les sérums des patients MAI+.

Pour le vérifier, à partir de vos extraits contenant les protéines hydrosolubles, vous réalisez une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-X, suivie d'une analyse de l'immunoprécipité par immunotransfert avec un anticorps monoclonal anti-Xp reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de X mais aussi avec les sérums des patients.

Une fois votre antigène caractérisé, vous pourrez envisager plusieurs méthodes pour la détection des auto-anticorps.



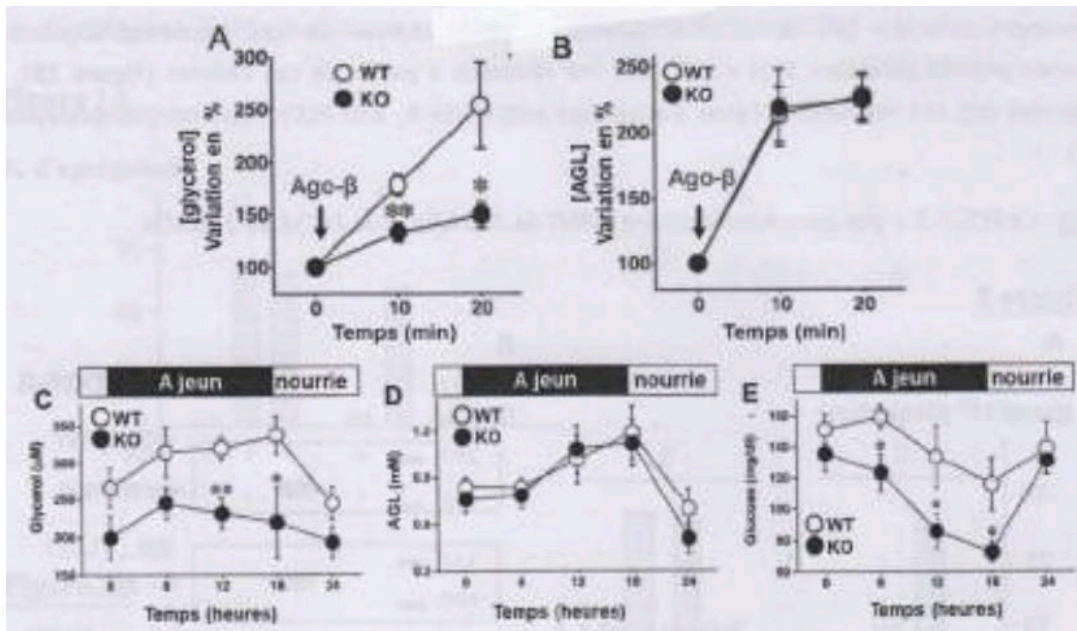
QCM 7 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que :

- A. Les résultats des deux expériences montrent que l'anticorps anti-Xp reconnaît un épitope présent uniquement sur la forme de X de 50 kDa, lorsque celle-ci est phosphorylée.
- B. Il existe dans le tissu hépatique normal comme dans le tissu hépatique MAI +, plusieurs formes protéiques phosphorylées, mais une forme de X de 50 kDa phosphorylée n'existe que chez le patient MAI+.
- C. Comme test diagnostique, vous pouvez développer un immunotransfert avec, comme Ag-cible, la protéine X purifiée à partir d'un extrait protéique de foie normal grâce à des billes magnétiques revêtues d'anticorps anti-Xp.
- D. Vous pouvez tester la réactivité des sérums en ELISA indirect avec, comme immunosorbent (Ag-cible), la protéine Xp purifiée par chromatographie d'affinité avec l'anticorps anti-Xp, à partir d'un extrait protéique de foie malade.
- E. Vous pouvez tester la réactivité des sérums en dot blot avec, comme Ag-cible, un extrait de protéines solubles de foie malade.

Les QCM 10 et 11 sont liés :

Dans une série d'expériences, des chercheurs s'intéressent aux rôles physiologiques de l'aquaporine 7 (AQP-7) qui est exprimée dans le tissu adipeux blanc. Pour ce faire, ils ont développé un modèle de souris porteuses d'une mutation invalidante du gène de l'AQP-7 (KO) dont les résultats sont comparés à ceux de souris non mutées (WT).

Aux temps 12 et 18 heures, toutes les valeurs sont significativement différentes du temps 0.



Dans une première série d'expériences (**figures A et B**), les auteurs ont isolé des adipocytes de tissu adipeux blanc de souris KO et WT. Ils ont exposé ces cellules à un agoniste B-adrénergique (Ago-B) capable d'activer la lipolyse et d'induire la libération de glycérol et d'acides gras libres (AGL) à partir des triglycérides. Les variations en glycérol et en AGL dans le milieu extracellulaire des cultures d'adipocytes ont été exprimées en pourcentage par rapport à la valeur initiale mesurée au Temps 0, avant l'injection de l'agoniste B-adrénergique. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'écarts réduits. Les étoiles * et ** indiquent une différence significative entre les valeurs des souris KO et les WT.

QCM 10 - En vous basant sur les résultats de cette première expérience, il est exact que :

- Chez les souris WT, la stimulation de la lipolyse induit un doublement de la concentration en AGL dans le milieu extracellulaire en moins de dix minutes.
- Chez les souris KO, l'invalidation du gène de l'AQP-7 inhibe la lipolyse dans les cellules adipeuses.
- Chez les souris KO, l'agoniste B-adrénergique n'induit pas d'augmentation du glycérol dans le milieu extracellulaire.
- Chez les souris KO, l'invalidation du gène de l'AQP-7 pourrait être associée à une diminution de la perméabilité des adipocytes au glycérol.
- Si l'on exposait les adipocytes des souris WT à du chlorure de mercure (HgCl₂) on empêcherait les augmentations extracellulaires de glycérol et d'acides gras libres induites par l'agoniste B-adrénergique.

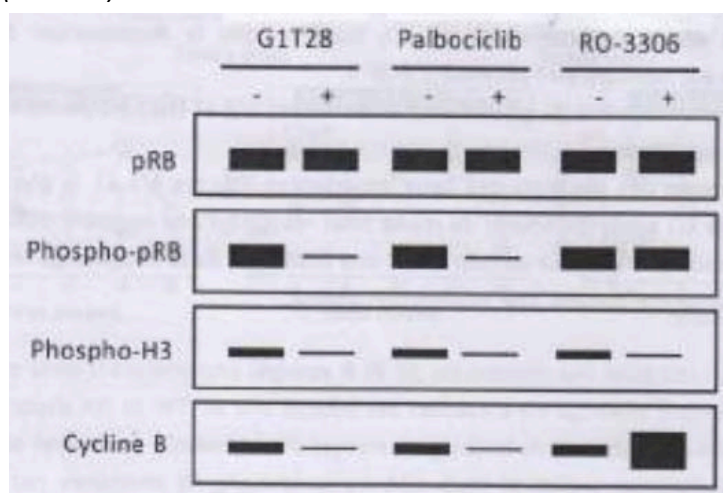
Dans une seconde expérience (**figures C, D et E**), les auteurs ont étudié les concentrations sanguines de glycérol et d'acides gras libres (AGL) et glucose, *in vivo*, chez des souris KO et WT normalement nourries (périodes correspondant aux rectangles blancs au-dessus des figures) ou en état de jeûne (période correspondant aux rectangles noirs). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et écarts réduits. Les étoiles * et ** indiquent une différence significative entre les valeurs des souris KO et les WT.

QCM 11 - En vous basant sur les résultats de ces expériences, il est exact que :

- A. Chez les souris WT, les augmentations du glycérol et des AGL plasmatiques au cours du jeûne indiquent la mise en jeu de la lipolyse.
- B. Lors du jeûne, la différence des profils de variation du glycérol et des acides gras libres plasmatiques entre les souris WT et KO, suggère que la mobilisation des triglycérides adipocytaires est moindre en l'absence d'AQP-7.
- C. Après 18 heures de jeûne, la glycémie chez les souris WT et chez les souris KO diminue dans les mêmes proportions.
- D. (HP?) En tenant compte des résultats des deux expériences (figures A à E), la glycémie plus basse chez les souris KO après 18 heures de jeûne peut résulter d'une moindre diffusion du glycérol hors des adipocytes avec pour conséquence une limitation de la néoglucogenèse.
- E. L'AQP-7 se comporte comme une aquaglycéroporine.

Les QCM 12 et 13 sont liés :

Le G1T28 et le Palbociclib sont des inhibiteurs de la kinase CDK4. Le RO-3306 est un inhibiteur de CDK1. Les travaux présentés ci-dessous visent à caractériser les effets de ces trois composés sur la prolifération de la lignée cellulaire cancéreuse d'origine mammaire MCF7. Ces cellules ont été cultivées pendant 24 heures en présence (+) ou non (-) de 1 μ M G1T28 ou de 5 μ M Palbociclib ou de 5 μ M RO-3306 puis des extraits cellulaires ont été préparés et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivie d'un transfert sur filtre de nitrocellulose. Un Western-blot a ensuite été réalisé en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine pRB, contre la forme phosphorylée de pRB, contre la protéine Histone H3 phosphorylée et contre la protéine Cycline B (**Figure**). Sur les mêmes cellules traitées ou non par les trois composés, la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux et les pourcentages de cellules déterminés (**Tableau**).



	G1T28				Palbociclib				RO-3306			
	G1	S	G2	M	G1	S	G2	M	G1	S	G2	M
Sans traitement	45	20	30	5	46	19	30	5	44	21	29	6
Avec traitement	87	4	9	0	91	2	7	0	8	12	80	0

Les résultats sont exprimés en % de cellules dans les différentes phases.

QCM 12 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que:

- A. La phosphorylation de l'histone H3 est dépendante de la kinase CDK4.
- B. La phosphorylation de la protéine RB est dépendante de la kinase CDK4.
- C. Lors d'un traitement par un inhibiteur de CDK4, l'accumulation de la cycline B montre que cet inhibiteur bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1.
- D. L'analyse du cycle cellulaire montre que le G1T28 est un inhibiteur spécifique des kinases CDKs mitotiques.
- E. L'inhibition de l'activité kinase de CDK1 est responsable du blocage en mitose de la lignée MCF7.

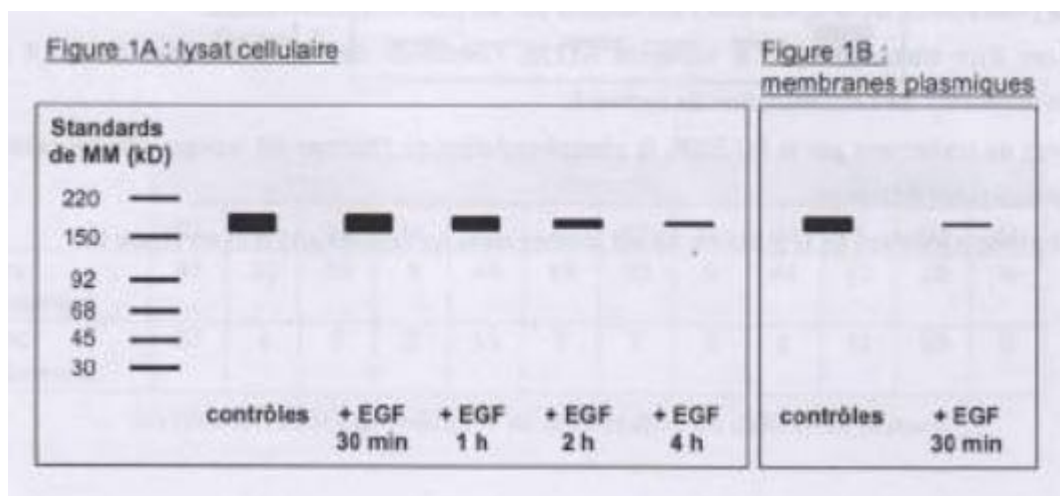
QCM 13 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que:

- A. Le Palbociclib n'est pas un inhibiteur des kinases CDK qui contrôlent l'entrée en mitose.
- B. La prolifération de la lignée MCF7 est inhibée par les trois inhibiteurs testés.
- C. Lors d'un traitement par la molécule G1T28, l'inhibition de l'activité kinase de CDK4 est responsable de l'accumulation de cycline B.
- D. Lors du traitement par le RO-3306, la phosphorylation de l'histone H3 indique que les cellules progressent en mitose.
- E. La phosphorylation de la protéine RB est inhibée dans les cellules arrêtées en phase G2.

Interaction entre l'EGF (facteur de croissance épidermique) et les fibroblastes humains.

Figure 1A: des fibroblastes en culture sont incubés avec 10 nM d'EGF, à 37°C, pour différents temps, comme indiqué. Les cellules contrôles sont incubées sans EGF. A l'issue de l'incubation, les cellules sont lavées puis lysées; les protéines du lysat cellulaire sont séparées par SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose et analysées en Western-blot, en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le récepteur humain à l'EGF (EGF-R.) Les quantités de protéines sont identiques dans les différents dépôts d'électrophorèse.

Figure 1B: des conditions expérimentales identiques sont appliquées à des fibroblastes incubés avec ou sans EGF (contrôles) pendant 30 min. Après la lyse cellulaire, les membranes plasmiques sont purifiées et leurs protéines sont soumises à analyse comme à la figure 1A.



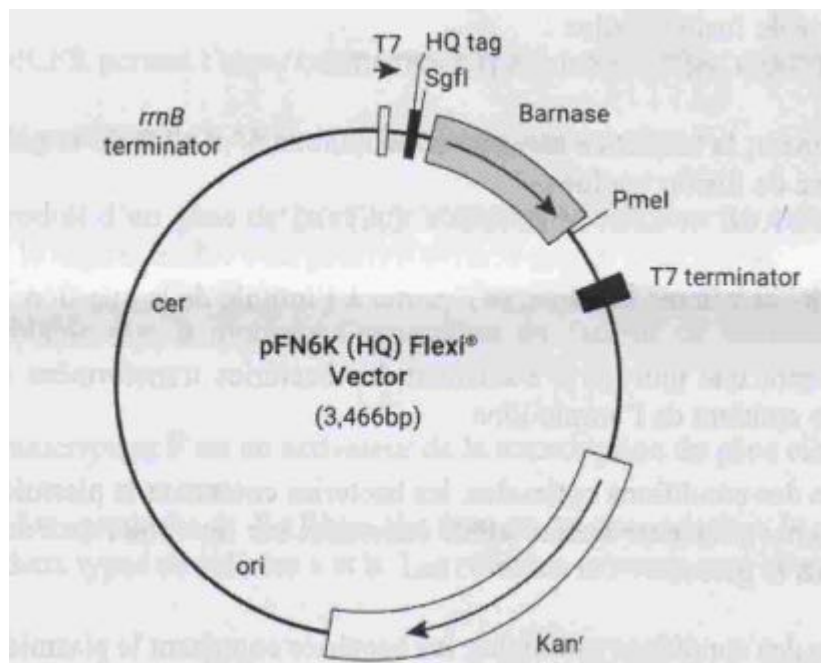
QCM 14 - En considérant vos connaissances et les données expérimentales, vous pouvez conclure que:

- A. Les analyses en Western-blot de la figure 1 mettent en évidence l'homodimère d'EGF-R.
- B. Un prétraitement des fibroblastes avec 10 nM d'EGF pendant 4h induit une réduction du contenu cellulaire total en EGF-R.
- C. Un prétraitement des fibroblastes avec 10 nM d'EGF pendant 30 min induit une réduction très prononcée du contenu cellulaire total en EGF-R.
- D. Un prétraitement des fibroblastes avec 10 nM d'EGF pendant 30 min induit une réduction de près de 80% du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules.
- E. (HP?) L'évolution du contenu cellulaire total en EGF-R entre 30 min et 4h de traitement par 10 nM d'EGF est compatible avec un processus d'endocytose suivie de dégradation intracellulaire.

Génome

QCM 12 -

Le plasmide représenté ci-dessous est utilisé pour l'expression d'une protéine de fusion contenant l'étiquette HQ Tag en 5' de la séquence codante d'une protéine humaine d'intérêt. La séquence codante de la protéine humaine d'intérêt a été préalablement amplifiée par PCR de façon à permettre après clonage dans le vecteur la production de la protéine de fusion.



L'étiquette HQ tag code pour la séquence en acides aminés suivante : MKHQHQHQIA.

Les séquences des enzymes de restriction suivantes sont données :

PmeI: GTTTAAAC

SgfI: GCGATCGC

SmaI: CCCGGG

PvuI: CGATCG

Le plasmide représenté ci-dessus non modifié et un plasmide recombinant dans lequel est insérée entre SgfI et PmeI la séquence codante de la protéine d'intérêt sont utilisés dans des expériences indépendantes pour transformer des bactéries.

- A. Un fragment d'ADN coupé par SmaI peut être inséré dans le plasmide digéré par PmeI.
- B. Un fragment d'ADN coupé par PvuI peut être inséré dans le plasmide digéré par SgfI.
- C. La digestion de l'ADN génomique humain par PvuI génèrera moins de fragments que celle par SgfI.
- D. L'enzyme dont le site de reconnaissance est CGAT peut couper le site SgfI.
- E. L'amplification par PCR utilisera une ADN polymérase thermostable avec un haut niveau de fidélité.

Correction

QCM 3 - ADE

Pour la compréhension de ce QCM, seule l'étude des figures est nécessaire.

A. (VRAI) Pour répondre à cet item il faut se fier à la figure A. En effet, on remarque que le taux de l'isoforme HK1 dans le vecteur contrôle (Ad β Gal) est similaire au taux d'HK1 exprimé par le vecteur exprimant l'hexokinase 2 (AdHK2).

B. Pour répondre à cet item il faut se fier à la figure B. On remarque que lorsqu'on exprime de manière plus importante de l'HK2 (AdHK2, colonne blanche), l'activité de l'HK2 augmente, et ceci de manière significative, par rapport à une expression normale de l'HK2 dans les cellules (Ad β Gal, colonne noire). On a \nearrow expression HK2 (AdHK2) = activité HK2 \nearrow .

C. Pour répondre à cet item il faut se fier à la figure C, et considérer que les résultats de l'état basal (vehicule). On remarque qu'à l'état basal, plus on exprime HK2 (AdHK2), moins on aura la production de radicaux libre (la production de radicaux libre est représentée par le % de cellules DCF), en comparaison à une expression normale d'HK2 (Ad β Gal), et ceci de manière significative (représenté par l'astérisque *). Donc, l'activité HK2, empêche la production de radicaux libres. On a \nearrow expression HK2 (AdHK2) = \searrow radicaux libres.

D. (VRAI) Pour répondre à cet item il faut se fier à la figure C, et considérer que les résultats sont induits par l'inhibition de la voie des pentoses phosphates (DHEA). On constate que lorsqu'on inhibe la voie des pentoses phosphates, les cellules AdHK2 ne régulent plus négativement la production de radicaux libres. Donc, on en déduit, que la voie des pentoses phosphate module la production de radicaux libres observées dans les cellules AdHK2.

E. (VRAI) Ceci est la conclusion de toutes les expériences effectuées. En effet, on remarque que l'HK2 induit une diminution de la production de radicaux libres, donc il pourrait être un protecteur du stress oxydant dans la cellule.

QCM 6 - AC

A. (VRAI) Il est précisé dans l'énoncé qu'un SDS PAGES est réalisé, c'est une condition dénaturante qui détruit la structure quaternaire des protéines et donc fait disparaître les **épitopes conformationnels**. C'est donc forcément un même épitope séquentiel qui est reconnu par l'anticorps anti X sur les deux composés différents.

B. On constate que le western blot réalisé à l'aide d'un antisérum anti protéines phosphorylées ne reconnaît aucune protéine de poids correspondant à X dans un tissu hépatique normal et qu'il reconnaît la forme de 50kDa dans le tissu hépatique MAI+. Il n'existe donc pas de protéine X phosphorylée dans le tissu hépatique normal.

C. (VRAI)(cf item précédent). Une bande apparaît à 50kDa dans le tissu hépatique MAI+.

D. L'anti X reconnaît un épitope **séquentiel** (cf A : conditions dénaturantes).

E. A première vue on peut penser que cet item est vrai, cependant, en y regardant de plus près on se rend compte que c'est la protéine X phosphorylée (50kDa) qui est reconnue par un auto-anticorps présent dans le sérum MAI+. (Pour cet item la réponse est donnée dans l'énoncé du QCM qui suit donc il faut bien lire cela arrive souvent, il faut quand même vérifier que l'hypothèse du QCM suivant est la bonne).

QCM 7 - ABDE

- A. (VRAI) Si on clarifie l'énoncé : - immunoprécipitation chez le sujet sain et le sujet malade avec un anticorps anti X : on se retrouve avec la protéine X et/ou Xp. - immunotransfert (=western blot = immuno-empreinte) avec un anticorps anti Xp sur ce que l'on a isolé avec l'immunoprécipitation : s'il y a une bande c'est forcément Xp (c'est la référence). - immunotransfert avec sérum patient malade sur ce que l'on a isolé par immunoprécipitation : s'il y a une bande pour le même poids que celle de l'immunotransfert précédent c'est forcément Xp => cela veut dire que le patient présente des auto-anticorps spécifiquement dirigés contre Xp. - immunotransfert avec sérum de patient sain sur ce que l'on a isolé par immunoprécipitation : contrôle (si c'est positif : problème de manip ++).
- B. (VRAI) Le fait que le sérum de patient malade (qui contient des auto anticorps dirigés contre Xp) ne reconnaît aucun composé signifie que le tissu hépatique normal ne contient pas le composé Xp.
- C. Le test qu'on veut développer dans cet item est le suivant : faire un SDS PAGES avec des protéines hépatiques normales (donc pas Xp). Et ensuite réaliser un immunotransfert avec les potentiels auto-anticorps séparés par billes magnétiques du sérum du patient. Le problème c'est que quoi qu'il arrive la cible des autoanticorps n'est pas présente sur le SDS PAGES donc même si le sérum du patient contient des auto-anticorps, ils ne se fixeront pas sur le SDS PAGES.
- D. (VRAI) Le principe de l'ELISA indirecte est de présenter sur une surface un antigène, de faire passer un sérum de patient sur cette surface, et de révéler la fixation de l'antigène du patient grâce à un anticorps anti anticorps humain. Les conditions sont remplies.
- E. (VRAI) Le Dot Blot consiste à greffer au fond d'un puit un antigène puis d'ajouter un anticorps couplé à une enzyme et de constater un changement de densité optique couleur ... s'il y a des anticorps. Si on greffe au fond du puit un extrait de protéines solubles du foie malade il contiendra la protéine Xp (condition nécessaire au bon fonctionnement du test), ensuite si le sérum du patient contient des anticorps anti Xp il se fixeront et cela sera visible par DO.

QCM 8 - ABD

- A. (VRAI) L'aspirine inhibe la cyclooxygénase (COX) nécessaire à la formation de TXA2 à partir de l'AA, or la figure 1B montre que les plaquettes du patient 1 ne produisent pas de TXA2 après stimulation par de l'AA.
- B. (VRAI) La thromboxane synthase est une enzyme nécessaire à la transformation de l'AA en TXA2 (voir A)
- C. La PLA2 du patient 1 est active car on observe une production d'AA libre après stimulation par le collagène.
- D. (VRAI) Chez le patient 2 - PLA2 inactive car absence de production d'AA après stimulation par le collagène et pas d'agrégation plaquettaire après stimulation par l'U46619 (analogue stable du TXA2) donc possible perte de fonction du récepteur TXA2.
- E. La cyclooxygénase est nécessaire à la production de TXA2 après stimulation par l'AA présente chez le patient 2 (Figure 1B)

QCM 9 - CD

- A. L'ADP entraîne une baisse de la production d'AMPc, il stimule donc un récepteur couplé à la protéine Gi.
- B. L'adénylate cyclase est active chez le patient 3 car on observe une production d'AMPc après stimulation par la PGI₂.
- C. (VRAI) Dans la figure 2A : absence de diminution de la production d'AMPc après stimulation par l'ADP chez le patient 3 et Figure 2B : absence de sécrétion de PDGF chez ce patient donc le secrétât n'entraîne pas de phosphorylation de PDGF-R ni de recrutement de la PLC γ 1.
- D. (VRAI) Pas de réponse après la stimulation d'ADP.
- E. Cette figure montre que le PDGF-R est phosphorylé sur tyrosine.

QCM 10 - AD

- A. (VRAI) On voit sur la figure B qu'on passe d'une variation de concentration d'AGL de 100% à 0 minute à plus de 200% à 10 minutes.
- B. Si l'inactivation du gène de l'AQP-7 inhibait la lipolyse dans les cellules adipeuses, on n'aurait une variation nulle (qui resterait à 100%). Or, pour le glycérol, cette variation est seulement diminuée (on va jusqu'à 150%) et pour les AGL, elle n'est même pas diminuée (on atteint les 200%). On ne peut donc pas dire que cela inhibe.
- C. Il y a une augmentation du glycérol (on passe de 100% à 150%), elle est seulement diminuée.
- D. (VRAI) La diminution de la perméabilité des adipocytes au glycérol peut expliquer qu'après une activation de la lipolyse, une quantité réduite de glycérol passe dans le milieu extracellulaire.
- E. Le **chlorure de mercure inhibe les aquaporines**. On serait dans le même cas qu'avec une souris KO pour AQP7. Le glycérol ne pourrait plus sortir, mais les acides gras libres continueraient de diffuser à travers la membrane sans l'aide des AQP.

QCM 11 - ADE

- A. (VRAI) En cas de jeûne, la lipolyse est activée (comme le corps manque de ressources, il va les puiser dans le tissu adipeux), on a donc une libération de glycérol et d'AGL dans la circulation sanguine.
- B. On voit en effet que pour les souris sans aquaporines 7, la mobilisation de glycérol est bien diminuée, cependant celle des AGL n'est pas significativement diminuée. On ne peut donc pas affirmer que la mobilisation des triglycérides adipocytaires est moindre en l'absence des AQP-7.
- C. A 0h, la différence de glycémie n'est pas significative tandis qu'elle l'est à 18h. On voit que la glycémie baisse de façon plus importante chez les souris sans aquaporines 7.
- D. (VRAI) On a vu qu'en période de jeûne, il y a une stimulation de la lipolyse. Cette lipolyse entraîne la libération de glycérol afin de produire du glucose. Or, sans AQP7, les adipocytes libèrent moins de glycérol (car la perméabilité est diminuée) et donc moins de glucose est produit.
- E. (VRAI) D'après ces expériences, on peut conclure que les aquaporines 7 ont un rôle dans le passage du glycérol : ce sont donc des aquaglycéroporines.

QCM 12 - B

- A. En regardant la première figure on voit que la phosphorylation de l'histone H3 n'a pas lieu après un traitement par palbociclib ou G1T28 (inhibiteurs de CDK4) mais aussi après traitement par RO-3306 qui est lui un inhibiteur de CDK1 ne touchant donc pas CDK4. Donc cette phosphorylation n'est pas dépendante de CDK4.
- B. (VRAI) Ici, de la même manière on voit que la phosphorylation de la protéine RB est toujours effectuée après traitement par RO-3306 mais pas après traitement par palbociclib ou G1T28 ; on peut donc en déduire que cette phosphorylation est dépendante de l'activité de CDK4.
- C. En regardant la deuxième figure on voit que le traitement par inhibiteurs de CDK4 bloque effectivement le cycle en phase G1, cependant sur la première figure on voit bien qu'il n'y a pas d'accumulation de cycline B, il y a même une diminution de celle-ci vu que le signal est diminué.
- D. En regardant la deuxième figure, on voit que G1T28 bloque le cycle cellulaire en phase G1, il touche donc les CDKs concernant cette phase mais pas ceux de la phase mitotique.
- E. En regardant la deuxième figure, on voit que le traitement par RO-3306 bloque le cycle en phase G2 et pas en mitose.

QCM 13 - AB

- A. (VRAI) La phase de contrôle d'entrée en mitose est la phase G2, or on voit sur la deuxième figure que le palbociclib agit au niveau des kinases de la phase G1 (qui est plutôt une phase de contrôle de l'entrée en phase S). Donc il n'agit PAS sur le contrôle de l'entrée en mitose.
- B. (VRAI) Ces 3 traitements vont bloquer le cycle cellulaire que ce soit en phase G1 ou G2, ce qui va donc empêcher l'entrée en mitose ainsi que tout le déroulement du cycle et donc empêcher la prolifération de ces cellules.
- C. Comme pour l'item 12.C on voit bien qu'il n'a pas d'accumulation de cycline B avec l'inhibition de CDK4.
- D. Ici, comme pour l'item 12.A, on voit bien que le traitement par RO-3306 n'entraîne pas la phosphorylation de l'histone H3 (vu qu'il y a une diminution du signal donc une diminution de celui-ci). De plus avec la deuxième figure on voit bien aussi que ce traitement empêche les cellules d'entrer en mitose.
- E. Les cellules bloquées en phase G2 sont celles traitées par RO-3306 (figure 2), traitement où la protéine RB est toujours phosphorylée (figure 1) donc FAUX.

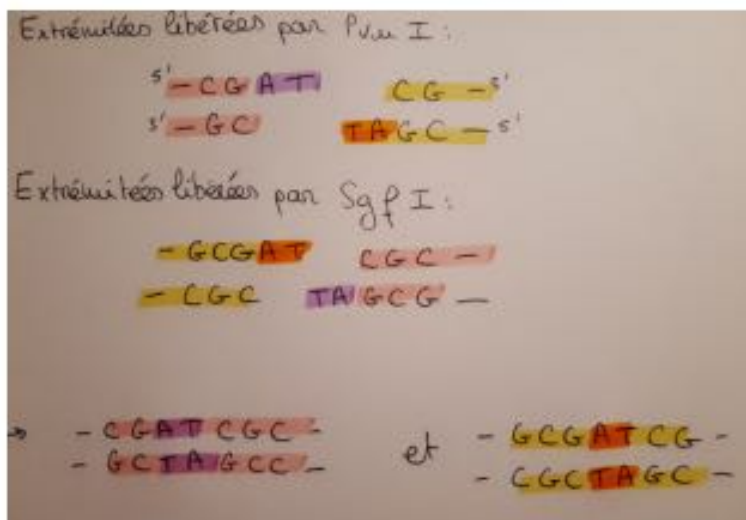
QCM 14 - BDE

- A. On ne voit qu'une seule bande sur le western-blot des protéines du lysat cellulaire (ou de la membrane plasmique), même après action du SDS-PAGE, nous ne pouvons donc pas mettre en évidence une structure multimérique (on pourrait avoir un résultat différent si on ajoutait du beta mercaptoethanol à notre lysat cellulaire).
- B. (VRAI) (figure 1A) bande beaucoup plus fine au bout de 4h (comparé au contrôle).
- C. (figure 1A) il y a une petite réduction de la bande au bout d'un prétraitement de 30min à l'EGF (comparé au contrôle) mais cela reste infime, nous n'avons pas "une réduction très prononcée du contenu cellulaire total en EGF-R".
- D. (VRAI) On voit bien une réduction importante de la bande (figure 1B) au bout de 30min de prétraitement à l'EGF (environ 80%, la figure n'est pas précise mais le pourcentage paraît être cohérent donc item vrai).
- E. (VRAI) Suite à une exposition prolongée à l'EGF, endocytose et dégradation cellulaire vont induire une diminution du nombre d'EGF-R, c'est ce qui explique les résultats obtenus sur la figure 1.

Génome

QCM 12 - ABDE

- A. (VRAI) SmaI et PmeI génèrent tous les deux des extrémités franches/non cohésives, qui sont toujours compatibles entre elles.
- B. (VRAI) Il y a une compatibilité entre les sites de reconnaissance de ces 2 enzymes. (voir ci contre)

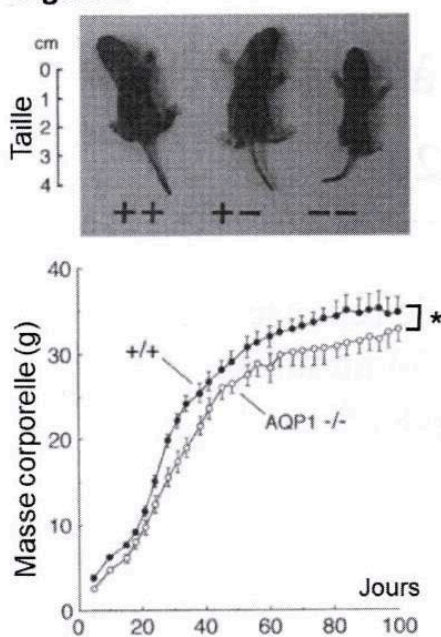


- C. SgfI et PmeI sont des sites de restrictions rares dans le génome humain. Donc la digestion par PvuI de l'ADN génomique humain générera plus de fragments.
- D. (VRAI) On retrouve l'enchaînement "CGAT" dans le site de reconnaissance de SgfI.
- E. (VRAI) Lorsqu'on clone une protéine d'intérêt, il faut garder la même séquence entre chaque réplication, c'est pourquoi on doit utiliser une ADN thermostable (qui fonctionne à haute température) à haute fidélité (on n'utilisera pas la TAQ ADNpol car elle a une FAIBLE fidélité).

Les QCM 1 et 2 sont liés

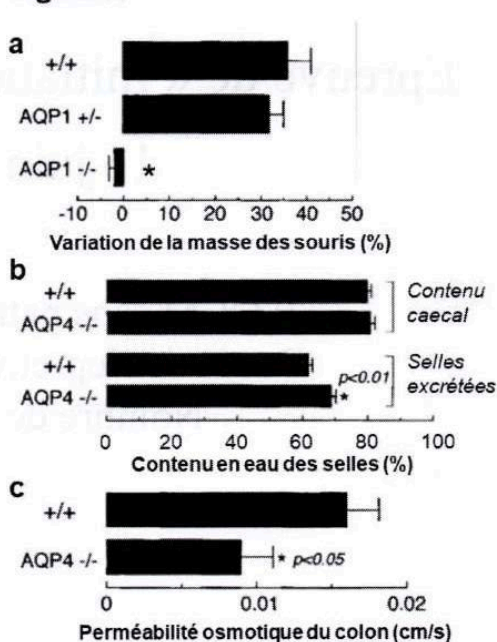
Des travaux se sont intéressés aux diverses conséquences de l'inactivation des gènes de l'aquaporine 1 (AQP1) et de l'aquaporine 4 (AQP4). Les auteurs ont utilisé des souris homozygotes (AQP1^{-/-}) ou hétérozygotes (AQP1^{+/-}) pour la mutation inactivante du gène AQP1 et des souris homozygotes pour la mutation inactivante d'AQP4 (AQP4^{-/-}). Des souris non mutées (AQP1^{+/+} et AQP4^{+/+}) ont été utilisées comme contrôle. Dans une première étude (**Figure 1**) les courbes de croissance pondérale des souris AQP1^{+/+} et AQP1^{-/-} ont été comparées en condition de régime alimentaire et de boisson normale. Dans une seconde étude (**Figure 2**), ils se sont intéressés à l'impact de la mutation inactivante d'AQP1 et d'AQP4 au niveau du tube digestif. Dans la Figure 2a, l'effet de 8 jours d'un régime enrichi en graisses sur le poids des animaux est rapporté. Dans la Figure 2b, les auteurs ont mesuré la teneur en eau de selles prélevées au niveau du caecum (qui sépare l'intestin grêle du côlon) et dans les selles finalement excrétées. Dans la Figure 2c, les auteurs ont mesuré la perméabilité osmotique du côlon in situ (unité exprimée en cm de colon par seconde de contact : plus le chiffre est grand plus la perméabilité est importante). Ce paramètre quantifie les mouvements d'eau de la lumière du côlon vers sa paroi en réponse au gradient osmotique généré par l'absorption des électrolytes de la perfusion.

Figure 1



* : Différence significative avec le groupe contrôle correspondant

Figure 2



QCM 1

Concernant l'interprétation des expériences et en prenant en compte vos connaissances sur les aquaporines (AQP), il est exact que :

A - Selon la photo de la figure 1, les souris AQP1^{-/-} sont plus petites que les souris non mutées et que les souris hétérozygotes AQP1^{+/-}.

B - Connaissant le rôle des aquaporines dans les transferts d'eau, on en déduit que les souris AQP^{-/-} sont déshydratées.

C - Si l'impact de l'inactivation du gène d'AQP1 s'exprime de façon autosomique récessive, on s'attend à ce que la courbe de croissance des souris AQP1^{+/-} soit superposable à celle des souris AQP^{+/+}.

D - D'après la Figure 2a, un régime riche en lipides provoque une augmentation pondérale d'au moins 30% en 8 jours chez les souris non mutées AQP1^{+/+} et chez les hétérozygotes AQP1^{+/-}.

E - Dans la Figure 2a, l'absence de prise de poids chez les souris mutées AQP1^{-/-} après 8 jours de régime riche en lipides est normale car le poids d'une souris ne peut pas augmenter de 30 % en 8 jours.

QCM 2

Concernant l'interprétation des expériences et en prenant en compte vos connaissances sur les aquaporines (AQP), il est exact que :

A - D'après la Figure 2a, les souris AQP1^{-/-} pourraient présenter un défaut d'absorption digestive des lipides.

B - D'après la teneur en eau des selles prélevées au niveau du caecum, dans la Figure 2b, l'absence d'AQP4 fonctionnelle (souris AQP4^{-/-}) diminue l'absorption d'eau dans l'intestin grêle.

C - D'après la teneur en eau des selles excrétées, dans la Figure 2b, L'absence d'AQP4 fonctionnelle (souris AQP4^{-/-}) provoque un défaut d'absorption d'eau dans le colon.

D - Dans la Figure 2c, la diminution de perméabilité osmotique chez les souris AQP4^{-/-} indique un moindre passage d'électrolytes à travers les molécules d'aquaporines au niveau du colon.

E - Les figures 1 et 2 montrent que l'AQP1 et l'AQP4 sont exprimées tout au long du tube digestif.

Les QCM 3 et 4 sont liés

L'HGF ou "hépatocyte growth factor" est un facteur de croissance qui stimule la survie et la prolifération des hépatocytes et de plusieurs autres types cellulaires. Il interagit avec un récepteur spécifique, l'HGFR comportant un seul segment transmembranaire, qui déclenche une cascade d'événements de signalisation intracellulaire. Des mutations activatrices de l'HGFR ou des dérégulations des voies de signalisation déclenchées par HGF sont impliquées dans la survenue de cancers du foie. Parmi les molécules de la signalisation déclenchée par HGF, on s'intéresse à la serine/threonine kinase **Akt**, agissant sur de multiples cibles, dont des facteurs nucléaires intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération. Akt peut elle-même être phosphorylée sous l'action d'enzymes appelées PDK, pour « phosphoinositide dependent kinases ». En effet, les PDK sont activées par le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI-3,4,5P3).

Dans les expériences décrites ci-dessous, on s'intéresse à l'effet d'un inhibiteur la « wortmanine » (Wort), sur la voie de signalisation déclenchée par HGF.

Figure 1: des hépatocytes ont été traités en absence ou en présence d'HGF 10 nM (+/- HGF) pendant 10 minutes, à 37°C. Les cellules ont été ensuite lysées et soumises à une immunoprécipitation à avec un anticorps dirigé **contre l'HGFR**. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées en SDS- PAGE, transférées sur nitrocellulose puis analysées à l'aide d'anticorps spécifiques (Western-blot): un anti-HGFR (pistes 1, 2), un anti-phosphotyrosine (piste 3, 4), et un anticorps dirigé contre la sous-unité régulatrice de la PI-3 kinase (anti-PI3K, piste 5, 6).

Figure 2: en complément de la fig.1, une fraction identique de chaque immunoprécipitat anti-HGFR a été analysée pour son activité PI3K, en réalisant une incubation de 30 min en présence de phosphatidylinositol (PI) et de [γ 32P]ATP ; le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) formé était ensuite séparé par chromatographie et sa radioactivité mesurée. Les mesures d'activité ont été réalisées en présence ou en absence de wortmanine 5 nM.

Figure 3: des hépatocytes ont été traités pendant 10 minutes à 37°C, en absence ou en présence d'HGF, 10 nM (+/- HGF) et de wortmanine 5 nM (+/- Wort). Les cellules ont ensuite été lysées et soumises à une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé **contre Akt**. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées en SDS-PAGE, transférées sur nitrocellulose puis analysées à l'aide d'anticorps spécifiques (Western-blot): un anti-Akt totale (pistes 1 à 4), et un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'Akt (pistes 5 à 8).

Figure 4: en complément de la fig.3, une fraction identique de chaque immunoprécipitat anti-Akt a été analysée pour son activité kinase, en utilisant un peptide substrat spécifique d'Akt (Fig. 4A). Pour comparaison, des hépatocytes ont été traités avec ou sans HGF comme précédemment, et sans wortmanine, puis soumis à une immuno-précipitation anti-Akt (Fig. 4B). L'activité kinase d'Akt a été ensuite mesurée, en absence ou en présence de wortmanine (Wort) **ajoutée au moment de la mesure enzymatique.**

Figure 1 : immunoprécipitation anti-HGFR et Western Blot

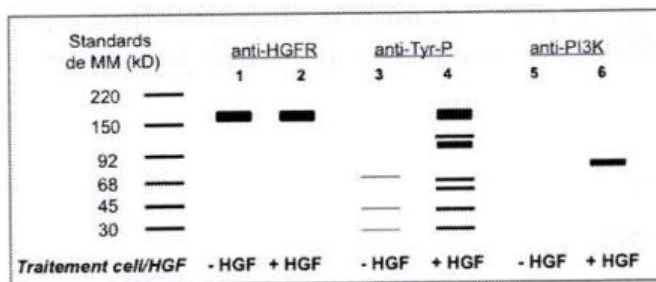


Figure 2 : activité PI-3 kinase

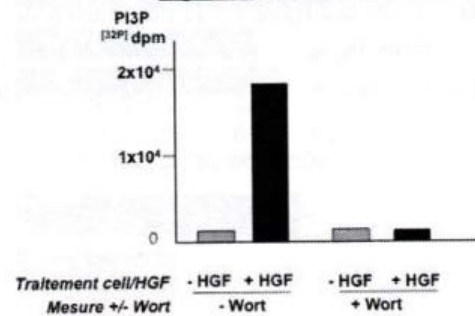


Figure 3 : immunoprécipitation anti-Akt et Western Blot

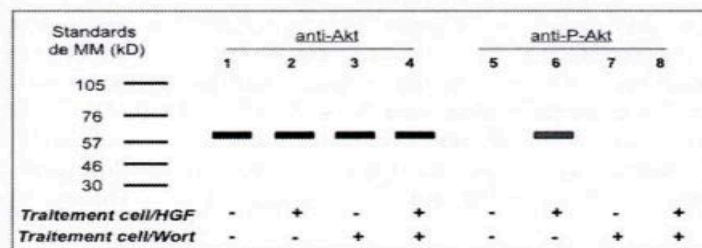
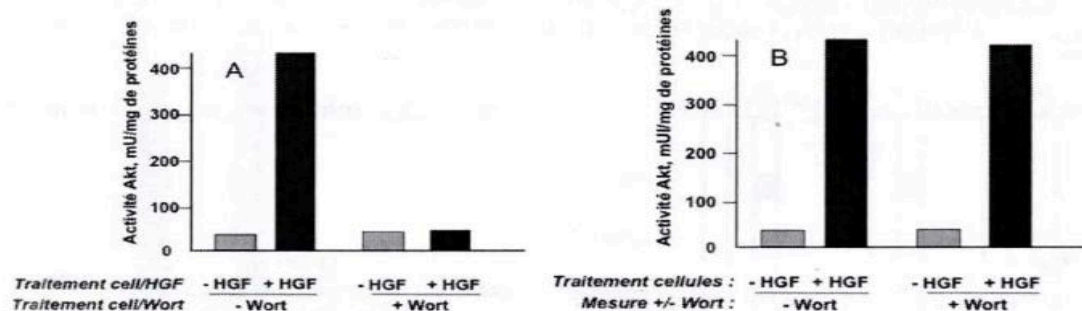


Figure 4, 4A et 4B : activité Akt



Abréviations : MM, masse moléculaire, kD, kilodaltons.

QCM 3

- A - Un traitement des hépatocytes par HGF pendant 10 min entraîne une diminution très prononcée du contenu cellulaire en HGFR.
- B - Le traitement des hépatocytes par HGF induit la phosphorylation de l'HGFR sur des résidus tyrosine.
- C - Le traitement des hépatocytes par HGF induit la phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la PI3K sur des résidus tyrosine.
- D - Au cours de l'activation des hépatocytes par HGF, l'HGFR forme un complexe avec la PI3K.
- E - Au cours de la mesure de l'activité enzymatique de la PI3K, un des produits formés est le [32P] ADP.

QCM 4

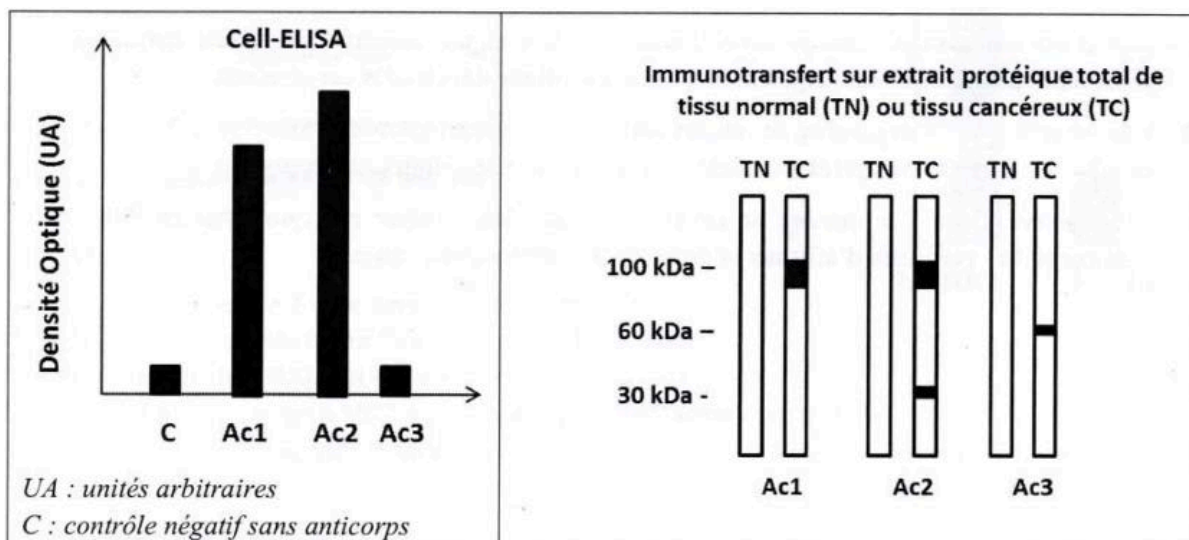
- A - Le traitement des hépatocytes par HGF induit l'activation de la kinase Akt.
- B - La wortmanine (Wort) est un activateur de la PI3K.
- C - La kinase Akt active est sous forme phosphorylée.
- D - La wortmanine (Wort) est un inhibiteur de la kinase Akt.
- E - Le traitement des hépatocytes par la wortmanine (Wort) empêche la phosphorylation d'Akt induite par HGF.

Les QCM 6 et 7 sont liés

Le diagnostic du cancer de la vessie repose sur l'analyse cytologique des cellules desquamées dans les urines. Pour améliorer le diagnostic, vous entreprenez de produire des anticorps (Ac) monoclonaux de souris dirigés contre des antigènes présents sur les cellules cancéreuses. Vous immunisez une série de souris avec un extrait protéique d'une lignée cellulaire issue d'un cancer de vessie humain (CV) et vous mettez en œuvre la production d'Ac monoclonaux selon la technologie des hybridomes.

Vous avez identifié trois anticorps Ac1, Ac2 et Ac3 que vous évaluez en Cell-ELISA sur la lignée CV et en immunotransfert à partir d'extraits protéiques de tissu vésical.

Voici les résultats :



Pour l'ensemble du problème, vous possédez tous les réactifs nécessaires à vos expérimentations.

QCM 6

- A - L'anticorps Ac1 reconnaît un épitope séquentiel sur une protéine membranaire de 100 kDa présente dans le cancer de la vessie.
- B - L'anticorps Ac2 reconnaît un épitope séquentiel différent de l'épitope reconnu par Ac1 mais qui peut être présenté par la même protéine de 100 kDa ainsi que par une protéine de 30 kDa, toutes deux exprimées spécifiquement dans le tissu cancéreux.
- C - L'anticorps Ac2 reconnaît un épitope séquentiel présenté par une protéine de 100 kDa qui peut être différente de la protéine reconnue par Ac1 ainsi que par une protéine de 30 kDa, toutes deux exprimées spécifiquement dans le tissu cancéreux.
- D - La bande de 30 kDa peut correspondre à un fragment de la protéine de 100 kDa, l'épitope reconnu par Ac2 étant localisé sur une portion commune à ces deux bandes.
- E - La protéine de 60 kDa reconnue par l'anticorps Ac3 est probablement une protéine intracellulaire spécifique du cancer de la vessie.

QCM 7

Après purification et analyse biochimique, vous démontrez que la bande de 30 kDa est un fragment protéolytique de la protéine de 100 kDa que vous identifiez comme étant la protéine membranaire M, tandis que la bande de 60 kDa correspond à la protéine I.

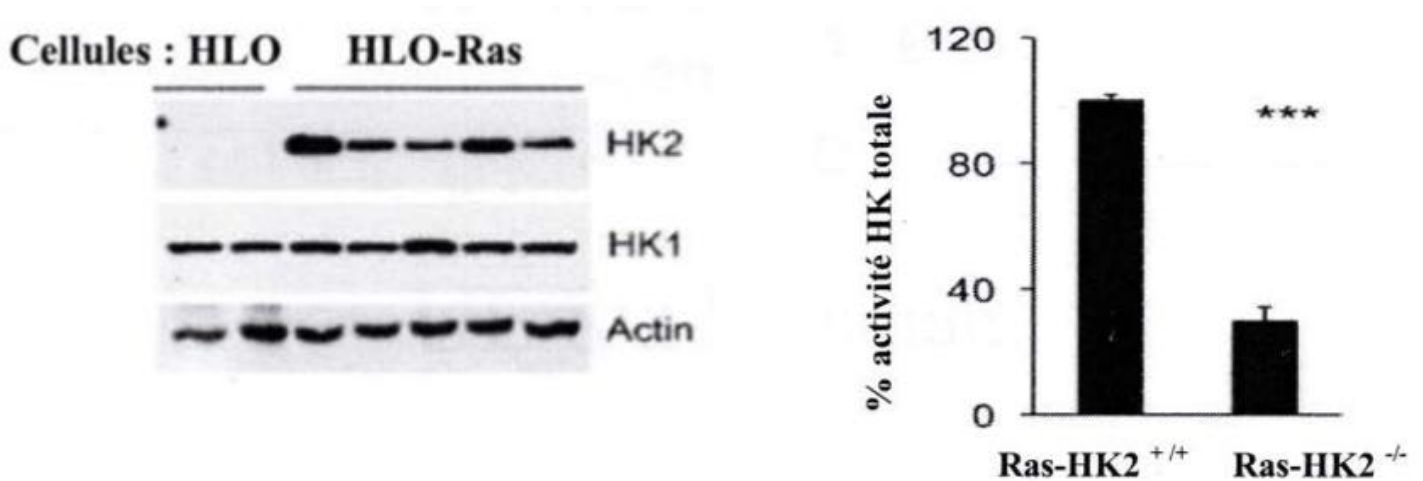
Pour aider au diagnostic de cancer de la vessie, vous utilisez les anticorps Ac1, Ac2 et Ac3 dans différentes techniques sur les cellules desquamées dans les urines et analysez comparativement les différentes cellules, normales et cancéreuses.

- A - Une étude immunocytochimique avec l'anticorps Ac1 et un anticorps secondaire marqué à la peroxydase, mettra en évidence une forte expression de M sur les cellules cancéreuses.
- B - Une étude par immunofluorescence avec l'anticorps Ac2 et un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine, montrera un marquage membranaire uniquement sur les cellules cancéreuses.
- C - Une étude immunocytochimique avec l'anticorps Ac3 et un anticorps secondaire marqué à la peroxydase donnera un marquage intracellulaire spécifique des cellules cancéreuses.
- D - Sous réserve d'avoir un nombre de cellules suffisant, un immunotransfert réalisé avec l'Ac2 sur des extraits protéiques totaux permettra d'affirmer la présence de cellules cancéreuses.
- E - Sous réserve d'avoir un nombre de cellules suffisant, leur analyse par cytométrie en flux avec l'anticorps Ac1 permettra d'affirmer la présence de cellules cancéreuses.

Des cellules HLO issues du tissu pulmonaire d'un individu sain sont transfectées par 20 µg de plasmides contenant l'oncogène Ras. L'expression des deux seules isoformes d'hexokinase (HK) est mesurée par Western Blot avec des anticorps anti-HK1 et anti-HK2, et rapportée à l'expression de l'Actine (anticorps anti-Actin). Il est considéré que la quantité totale de protéine est identique dans toutes les conditions de ce Western Blot.

Ces cellules sont ensuite modifiées par le système Cre-LoxP permettant de supprimer spécifiquement le gène HK2 (**Ras-HK2 -/-**). L'activité hexokinase totale est mesurée dans les deux modèles cellulaires.

*** : différence significative comparé aux cellules Ras-HK2 +/+ , $p < 0.001$



QCM 8

- A - L'isoforme HK2 est exprimée de façon ubiquitaire
- B - L'oncogène Ras induit l'expression de HK1 et HK2
- C - Les cellules HLO-Ras correspondent aux cellules Ras-HK2 +/+
- D - La délétion du gène HK2 a un faible impact sur l'activité hexokinase
- E - L'activité hexokinase résiduelle des cellules Ras-HK2 -/- est potentiellement liée à l'activité HK1

Correction

QCM 1 - ACD

QCM 2 - AC

QCM 3 - BD

A. On regarde sur la figure 1 les 2 colonnes anti-HGFR, on voit qu'avec ou sans traitement par HGF, la quantité de HGFR est la même (les bandes font la même taille).

B. (VRAI) On regarde maintenant la colonne anti-Tyr-P. Sans traitement préalable à l'HGF, et on s'aperçoit qu'il y a 2 bandes qui apparaissent après traitement par l'HGF. Notre anticorps est dirigé contre la phosphotyrosine donc ces bandes correspondent à la phosphorylation de l'HGFR sur des résidus tyrosines.

C. On regarde la colonne anti-PI3K, une bande apparaît après traitement par l'HGF mais elle est différente de celles de la colonne anti-Tyr-P donc ce n'est pas une phosphorylation sur des résidus tyrosine.

D. (VRAI) On regarde la figure 2 - On mesure l'activité de la PI-3 kinase à partir d'un immunoprécipitat anti-HGFR, donc on récupère l'HGFR et ses partenaires protéiques. On voit une activité après traitement par HGF donc l'HGFR forme bien un complexe avec la PI3K.

E. Le phosphate radiomarké sera celui utilisé pour la phosphorylation du PI, donc l'ADP, qui est un produit de la réaction, ne sera pas radiomarké.

QCM 4 - ACE

A. (VRAI) On regarde la figure 4A : Après traitement par HGF on mesure une activité de la kinase Akt alors qu'il n'y en avait pas avant le traitement par HGF.

B. Figure 2, on voit qu'en présence de wortmanine, l'activité PI-3 kinase disparaît alors qu'elle était présente sans celle-ci.

C. (VRAI) Figure 3 - piste 6, anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'Akt, une bande apparaît après traitement par HGF.

D. Figure 4B : on voit que même en présence de wortmanine, la kinase Akt a une activité qui est la même que sans wortmanine. On l'ajoute au moment de la mesure enzymatique, l'activité devrait quand même être un peu diminuée. Et figure 3 - on voit qu'en présence de wortmanine, il n'y a pas de bande pour l'anti P-Akt, donc pas de présence de la forme phosphorylée d'Akt. Cela veut dire que la wortmanine doit bloquer en amont de la cascade de signalisation.

E. (VRAI) voir item D.

QCM 6 - ABCDE

- A. (VRAI) On est en conditions dénaturantes : immunotransfert donc pas d'épitope conformationnel (ils ne sont pas conservés). On regarde l'immunotransfert sur la piste Ac1 et on voit une bande pour le TC à 100 kDa.
- B. (VRAI) L'épitope reconnu par Ac2 est différent de celui reconnu par Ac1 car sinon il y aurait la même bande de 30 kDa sur la piste Ac1. Et on peut tout à fait avoir une protéine exprimant plusieurs épitopes différents et donc reconnue par plusieurs anticorps différents. Elles sont bien exprimées spécifiquement dans le tissu cancéreux car il n'y a pas de bande pour le TN.
- C. (VRAI) Une bande à 100 kDa peut correspondre à 2 protéines différentes mais qui ont le même poids moléculaire.
- D. (VRAI) Oui, on est en conditions dénaturantes donc le fragment de 30 kDa et celui de 100 kDa peuvent avoir une portion commune.
- E. (VRAI) Il y a bien une protéine de 60 kDa reconnue par Ac3 uniquement dans le TC. De plus si on regarde le Cell-ELISA, on s'aperçoit que la piste Ac3 est présente en même quantité que le contrôle négatif sans anticorps, cela veut dire que Ac3 reconnaît un épitope intracellulaire et qu'il n'a pas pu le fixer car les cellules ne sont pas lysées dans cette technique.

QCM 7 - ABCDE

- A. (VRAI) Etude immunocytochimique = utilisation d'un anticorps secondaire marqué à une enzyme qui va convertir son substrat en produit facilement détectable, ici avec la peroxydase. L'énoncé nous dit que la protéine M est membranaire et correspond bien à la protéine qui porte l'épitope reconnu par Ac1.
- B. (VRAI) Etude d'immunofluorescence = utilisation d'un anticorps secondaire marqué à un fluorochrome. Le marquage sera en effet membranaire (confirmé par Cell-ELISA) et uniquement sur les cellules cancéreuses Ac2 ne reconnaît pas d'épitope dans le tissu normal (TN).
- C. (VRAI) Voir QCM 6, item E. L'épitope reconnu par Ac3 n'est présent que dans le tissu cancéreux (TC).
- D. (VRAI) Ac2 reconnaît un épitope présent uniquement sur les cellules cancéreuses. Si on a un nombre de cellules suffisant, la protéine qui porte l'épitope reconnu par Ac2 sera donc sûrement présente.
- E. (VRAI) Oui car Ac1 est spécifique d'un épitope présent uniquement sur les cellules cancéreuses donc on pourra affirmer la présence de cellules cancéreuses grâce à une cytométrie en flux car on va isoler les cellules cancéreuses.

QCM 8 - CE

- A. L'actine agit comme témoin : elle est exprimée tout le temps et dans tous les tissus de l'organisme. Or on voit que l'isoforme HK2 n'est pas exprimée par les cellules HLO saines (pas de bande pour la piste HLO).
- B. L'oncogène Ras induit l'expression de HK2 mais pas de HK1 qui est déjà présente chez les cellules HLO saines.
- C. (VRAI) Les cellules ont été transfectées par un plasmide contenant l'oncogène Ras, cela ne veut pas dire qu'on a supprimé le gène Ras, ni le gène HK2. On ajoute un oncogène Ras au génome des cellules saines. Donc les cellules HLO-Ras correspondent aux cellules Ras-HK 2+/+
- D. On voit qu'il y a une baisse significative (***) de l'activité hexokinase chez les cellules où on a supprimé spécifiquement le gène HK2 comparé aux cellules Ras-HK2 +/+.
- E. (VRAI) Ce sont des isoformes...

Rangueil 2012-2013

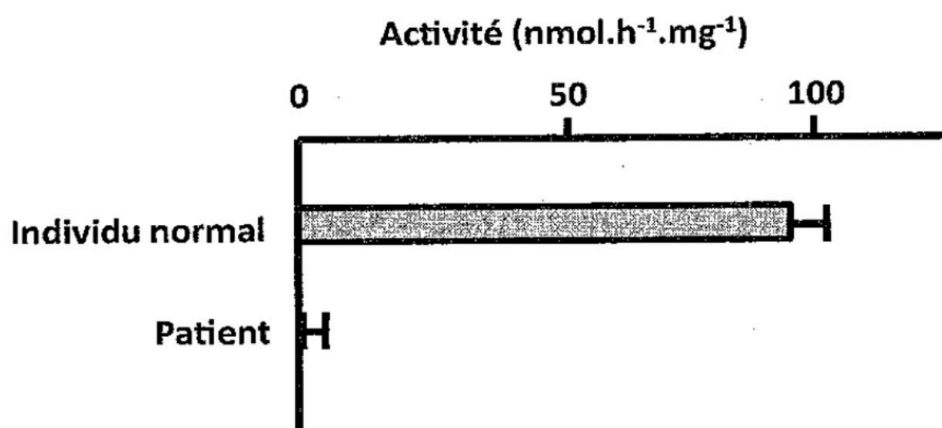
Biomolécules :

QCM 19. Vous analysez la liaison de lipoprotéines LDL à la surface de deux types cellulaires différents. La représentation des résultats selon Scatchard révèle des max identiques dans ces deux types cellulaires.

Vous pourrez conclure que :

- A/ Les LDL sont internalisées via les mêmes récepteurs dans ces deux types cellulaires.
- B/ Dans ces deux types cellulaires, la concentration de LDL permettant d'obtenir la moitié de la liaison maximale des LDL est identique.
- C/ Ces deux types cellulaires expriment à leur surface le même nombre de récepteurs liant les LDL.
- D/ Dans ces deux types cellulaires, il n'existe aucune liaison nonspécifique des LDL.
- E/ Pour ces deux types cellulaires, la pente des droites obtenues selon Scatchard n'est pas nécessairement la même.

QCM 20. La mesure de l'activité de la lipase acide dans les fibroblastes d'un patient et ceux d'un individu normal montre le résultat suivant:



Vous pourrez conclure que :

- A/ Les fibroblastes du patient doivent accumuler des esters de cholestérol dans les lysosomes.
- B/ Les fibroblastes du patient doivent accumuler des esters de cholestérol dans le cytosol en raison d'une activité accrue de l'ACAT.
- C/ Les fibroblastes du patient doivent exprimer à leur surface un plus grand nombre de récepteurs aux LDL que les fibroblastes de l'individu normal.
- D/ Les fibroblastes du patient doivent synthétiser (par la voie de biosynthèse de novo) moins de cholestérol que les fibroblastes de l'individu normal.
- E/ La captation récepteur-indépendante des LDL par les fibroblastes du patient doit être significativement inférieure à celle des fibroblastes de l'individu normal.

Recherche :

QCM 3 à 5. Vous disposez d'une lignée cellulaire (CR) issue du cancer du rein humain. Comme le cancer dont elle est issue, cette lignée exprime un antigène (Ag) protéique de 75 kDa appelé M, absent des cellules rénales normales. Vous souhaitez étudier l'Ag M.

Vous avez purifié l'AgM à partir de la lignée CR et vous avez produit une série d'anticorps monoclonaux (ACm) de souris contre cet Ag selon un protocole classique. Vous avez sélectionné 4 hybridomes (I, II, III et IV) par ELISA, en utilisant l'Ag M purifié adsorbé sur des plaques de microtitration en polystyrène.

Vous vérifiez ensuite leur spécificité par électrophorèse en PAGE-SDS suivie d'autoradiographie à partir d'immunoprécipités d'extraits protéiques de la lignée CR préalablement radiomarqués. Avec chacun des anticorps (I, II, III et IV), vous observez une bande à 75 kDa. Avec l'anticorps I, vous observez en plus une bande de 40 kDa.

En immunotransfert (ou immuno-empreinte), avec le même extrait non radiomarké, l'anticorps I reconnaît une bande de 75 kDa et une bande de 40 kDa. Les anticorps II et III identifient une bande de 75 kDa. L'anticorps IV ne présente aucune réactivité.

QCM 3. Vous pouvez conclure que:

- A. L'épitope reconnu par l'anticorps I sur la protéine de 40 kDa peut correspondre à une réactivité croisée avec une protéine différente de l'Ag M.
- B. L'épitope reconnu par l'anticorps I sur la protéine de 40 kDa est un épitope conformationnel.
- C. L'épitope reconnu par l'anticorps IV est accessible sur l'Ag M soluble dans l'extrait protéique de CR ainsi que sur l'Ag M fixé au polystyrène.
- D. L'épitope reconnu par l'anticorps IV sur la protéine de 75 kDa correspond à une réactivité croisée avec une protéine de l'extrait de CR, différente de l'Ag M.
- E. Les anticorps II et III sont identiques car ils reconnaissent le même épitope sur l'Ag M.

QCM 4. Vous cherchez à savoir si, à partir des cellules de cancer du rein, l'Ag M est libéré dans le sang circulant. Il pourrait alors constituer un marqueur sérique pour le diagnostic de cancer du rein. Vous souhaitez donc développer une technique permettant de détecter spécifiquement la forme soluble de l'Ag M de 75 kDa grâce aux anticorps que vous avez produits.

Il est exact de dire que :

- A. Dans le milieu de culture de la lignée CR, vous pouvez réaliser une évaluation semi-quantitative de l'Ag M en dot blot, en utilisant l'anticorps I.
- B. Dans le milieu de culture de la lignée CR, vous pouvez réaliser une évaluation semi-quantitative de l'Ag M en immunotransfert, en utilisant l'anticorps I.
- C. Grâce aux anticorps II et IV, vous pouvez évaluer la capacité des cellules de la lignée CR à libérer l'Ag M dans le surnageant de culture, par ELISpot.
- D. Vous pouvez développer un dosage immunoenzymatique de type ELISA « sandwich » en utilisant l'anticorps III et l'anticorps IV.
- E. Les anticorps II et III sont les anticorps les plus appropriés pour le développement d'un ELISA « sandwich ».

QCM 5. Vous envisagez d'utiliser les ACm dans le traitement du cancer du rein et vous réfléchissez aux difficultés que vous pourriez rencontrer.

Il est exact de dire que:

- A. Contrairement aux anticorps I, II et III, l'anticorps IV ne reconnaîtra pas l'Ag M in vivo.
- B. Après plusieurs injections, les patients pourraient développer une réaction immune contre les ACm injectés, ce qui les rendrait inefficaces.
- C. Les ACm de souris pourraient ne pas reconnaître l'Ag M sur les cellules cancéreuses rénales parce qu'ils ont été produits à partir de la lignée cellulaire CR.
- D. L'accès des ACm à l'Ag M pourrait être difficile dans les tissus tumoraux et il serait alors préférable de n'utiliser que les fragments Fc qui pénétreraient plus facilement dans la tumeur rénale solide.
- E. Les fonctions effectrices activées par les anticorps pourraient être optimisées en utilisant des anticorps chimériques Homme/souris.

Pharmacie :

QCM 7. Quelle(s) est ou sont la (les) proposition(s) exacte(s) concernant les plasmides ?

- A- Le nombre de copies d'un plasmide est toujours régulé
- B- Ils sont de taille supérieure au chromosome bactérien
- C- Ils sont circulaires
- D- Ils ont une origine de réplication
- E- Certains plasmides ne peuvent pas cohabiter dans une même bactérie

Correction

Biomolécules :

QCM 19 - CE

- A. Le Bmax n'a pas de lien avec le type de récepteurs auquel se lie le ligand.
- B. Avoir la même valeur de Bmax et donc de Bmax/2 ne signifie que la concentration de LDL pour avoir la moitié de liaison maximale des LDL est identique pour les deux types cellulaires.
- D. Nous n'avons aucun moyen de le savoir.

QCM 20 - AC

Rappels de cours : La lipase acide, chez les individus normaux, permet de dégrader les esters de cholestérol, qui en sortant de la cellule, vont entraîner des réponses régulatrices, comme l'augmentation de l'ACAT et donc de l'estérification du cholestérol, la diminution de l'HMG-CoA réductase et donc de la synthèse de cholestérol ainsi que la diminution du nombre de récepteurs à la surface des cellules.

- B. Ici, l'ACAT n'a pas une activité accrue, car la lipase acide n'agit pas chez ces patients : elle n'est donc pas régulée positivement, même avec l'augmentation du taux de cholestérol.
- D. La lipase acide n'ayant pas d'activité, il n'y a pas de régulation négative de la synthèse de novo du cholestérol. Donc les fibroblastes du patient continuent de synthétiser du cholestérol.
- E. Là encore, le cholestérol n'étant pas dégradé par la lipase acide, il ne peut sortir de la cellule et aucun rétrocontrôle négatif n'est donc effectué concernant la captation du cholestérol par les fibroblastes. Elle n'est donc pas inférieure chez les patients par rapport aux individus normaux.

Recherche :

QCM 3 - AC

- B. On observe lors de l'immunotransfert que l'anticorps reconnaît une bande de 75 kDa et une bande de 40 kDa, or, l'immunotransfert est une technique dénaturante, détruisant donc les épitopes conformationnels. L'épitope sur la protéine de 40 kDa est donc séquentiel.
- D. On observe une bande à 75 kDa lorsqu'on effectue une électrophorèse à partir d'immunoprécipités d'extraits protéiques de la lignée CR, ce qui pourrait laisser penser que l'épitope reconnu par l'anticorps IV sur la protéine de 75 kDa correspond à une réactivité croisée avec une protéine de l'extrait CR. Malgré tout, lors de l'immunotransfert réalisé avec le même extrait, on n'observe aucune réactivité pour l'anticorps IV, ce qui indique que ce n'est pas la présence des protéines de l'extrait CR qui causent cette réaction.
- E. Ce n'est pas parce que les deux anticorps obtiennent les mêmes bandes qu'ils reconnaissent le même épitope sur AgM, et donc ne sont pas forcément identiques.

QCM 4 - BCD

A. Ici, on précise dans l'énoncé que l'on cherche à détecter **spécifiquement** la forme soluble de l'Ag M de 75 kDa. L'anticorps I, lui, reconnaît une protéine de 75 kDa, ainsi qu'une autre de 40 kDa, on n'a donc pas la spécificité désirée.

E. Pour réaliser une ELISA « sandwich », il est nécessaire de disposer de 2 anticorps qui sont dirigés contre des épitopes différents du même antigène, or, ici, rien ne nous permet d'affirmer que c'est le cas.

QCM 5 - BE

A. La technique d'immunotransfert n'est pas représentative de la situation in vivo car elle est dénaturante. On ne peut donc pas affirmer que l'anticorps IV ne reconnaîtra pas l'Ag M in vivo en nous basant uniquement sur ces résultats.

C. Les AgM des cellules cancéreuses rénales et ceux de la lignée CR possèdent les mêmes épitopes : donc les anticorps ACm les reconnaîtront de la même manière.

D. Il n'est pas possible de n'utiliser que les fragments Fc des anticorps : les fragments Fab sont indispensables, ce sont eux qui portent le paratope.

Pharmacie :

QCM 7 - CDE

A. La régulation de la réplication des plasmides est indépendante de celles des chromosomes bactériens, et n'est pas forcément aussi finement régulée.

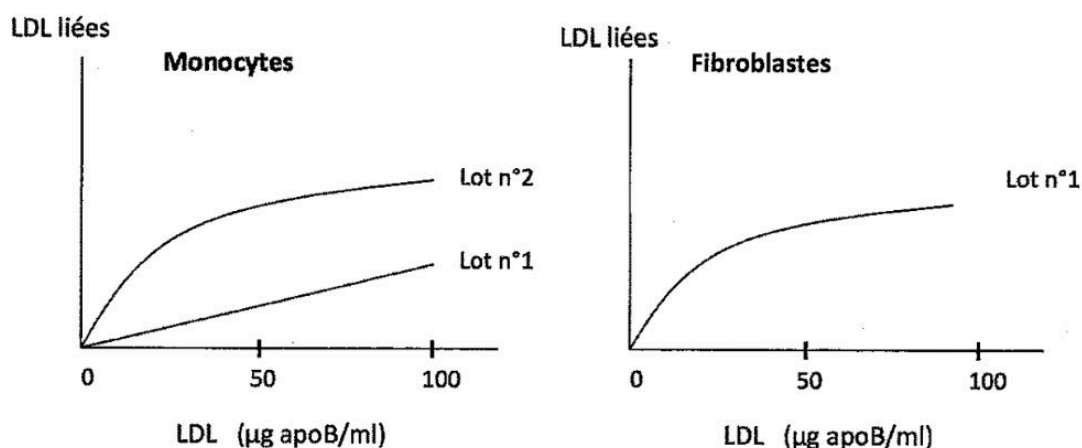
B. Les plasmides sont en général plus petits que des chromosomes.

Rangueil 2013-2014

Biomolécules :

QCM 25. Vous disposez de deux lots (lot n°1 et lot n°2) de LDL humaines. Tandis que le lot n°1 a été préparé très récemment et maintenu à l'abri de l'air et de la lumière, le lot n°2 est très ancien et a été longuement exposé à l'oxygène. Vous analysez la liaison de ces deux lots de LDL en les incubant à 4°C avec des monocytes d'un donneur. Vous étudiez aussi la liaison du lot n°1 de LDL à des fibroblastes de peau du même donneur.

Vous obtenez les résultats suivants:



D'après les résultats de ces expériences, vous pourrez conclure que :

- A. Les LDL des lots n°1 et n°2 se sont liées aux monocytes selon des mécanismes distincts.
- B. Les monocytes expriment principalement à leur surface des récepteurs "scavenger".
- C. Les apolipoprotéines du lot n°2 ont dû subir des modifications importantes.
- D. En présence de 100 µg apoB/ml de LDL, les monocytes internalisent deux fois plus de LDL du lot n°2 que de LDL du lot n°1.
- E. Le donneur des cellules (monocytes et fibroblastes) n'est probablement pas atteint d'hypercholestérolémie familiale par absence des récepteurs apoB/E.

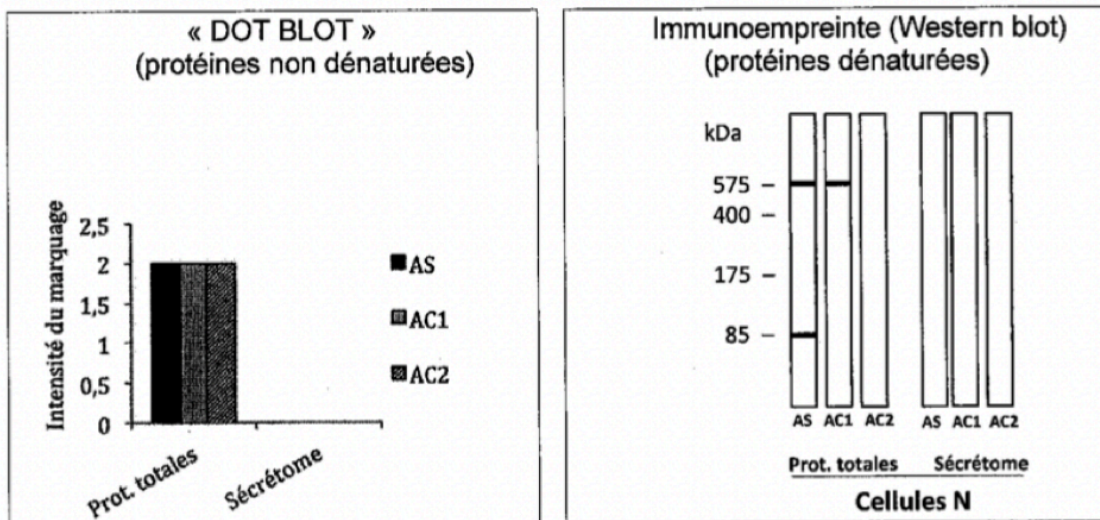
Recherche :

QCM 3 à 5. Afin d'identifier de nouveaux marqueurs sériques du cancer, vous analysez l'ensemble des protéines sécrétées (sécrétome) par une lignée cellulaire "C" dérivée d'un cancer du pancréas. Vous identifiez des polypeptides provenant d'une protéine de la famille des protéines membranaires Tat qui comprend plusieurs isoformes de tailles variables résultant d'un épissage alternatif.

Vous étudiez l'expression de Tat dans les cellules normales (N) du pancréas et dans la lignée C, grâce à un anti-sérum de lapin (AS) parfaitement caractérisé, spécifique de Tat, qui reconnaît toutes les formes et tous les fragments de Tat.

Vous utilisez également deux anticorps monoclonaux de souris, AC1 et AC2, dont la spécificité anti-Tat a été clairement établie.

QCM 3. A partir des cellules N, vous réalisez un extrait protéique total contenant toutes les protéines cellulaires, dont on considérera dans la suite du problème qu'il ne contient aucune protéine du sécrétome. Vous analysez cet extrait en conditions non dénaturantes, par « dot blot ». L'intensité du marquage varie de 0 à 2. Vous analysez ensuite le même extrait, en conditions dénaturantes, par immunoempreinte après électrophorèse en PAGE-SDS (« Western blot »). Vous analysez de la même manière les protéines du sécrétome.



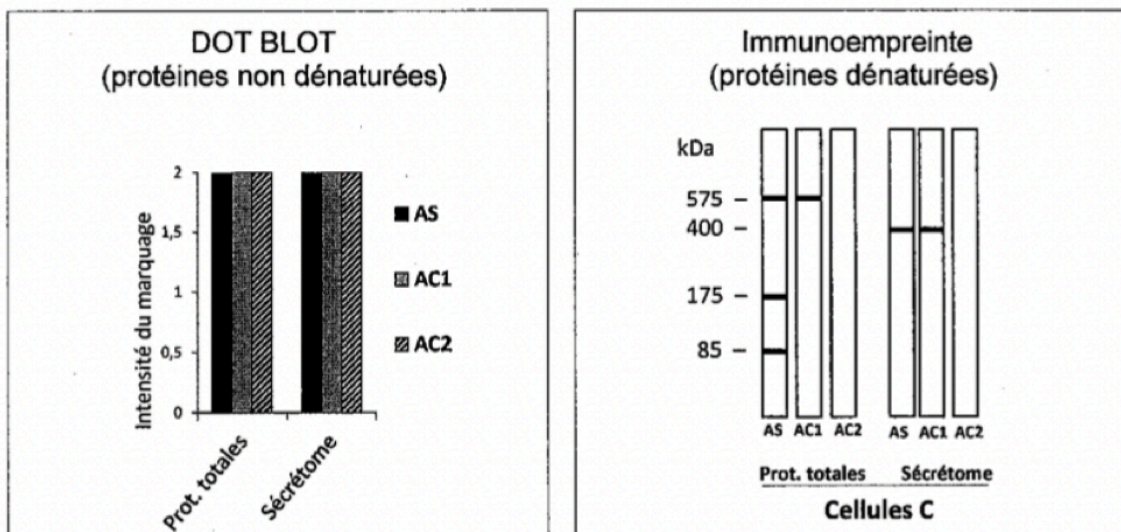
Prot. totales : extrait protéique contenant toutes les protéines de la cellule sauf les protéines du sécrétome.

Sécrétome : protéines sécrétées ou libérées par clivage dans le surnageant par les cellules en culture.

La(les)quelle(s) des conclusions suivantes est(sont) compatible(s) avec ces premiers résultats:

- A. Les protéines de 575 kDa et 85 kDa peuvent correspondre à deux isoformes de Tat et l'épitope reconnu par l'AC1 peut être un épitope séquentiel propre à la protéine de 575 kDa.
- B. La protéine de 85 kDa peut être issue de la dégradation de la protéine de 575 kDa et l'épitope reconnu par l'AC1 peut être un épitope conformationnel propre à la protéine de 575 kDa.
- C. La protéine de 575 kDa peut porter l'épitope conformationnel reconnu par l'AC2.
- D. La protéine de 85 kDa peut porter l'épitope conformationnel reconnu par l'AC2.
- E. Afin de déterminer sur quelle(s) protéine(s) est localisé l'épitope reconnu par l'AC2, vous pouvez réaliser une chromatographie d'affinité avec l'AC2, à partir de l'extrait protéique total, en conditions non dénaturantes, puis identifier les protéines retenues, après élution, par immunoempreinte en PAGE-SDS avec l'AS.

QCM 4. Vous analysez ensuite les cellules C de la même manière que précédemment. On considérera ici aussi que l'extrait protéique total ne contient aucune protéine du sécrétome. Les résultats sont représentés ci-dessous.



Prot. totales : extrait protéique contenant toutes les protéines de la cellule sauf les protéines du sécrétome.

Sécrétome : protéines sécrétées ou libérées par clivage dans le surnageant par les cellules en culture.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus sur les cellules N et C, la(les)quelle(s) de ces conclusions vous semble(nt) vraisemblable(s):

- A. La protéine de 400 kDa porte l'épitope conformationnel reconnu par l'AC2.
- B. La protéine de 85 kDa peut porter l'épitope conformationnel reconnu par l'AC2.
- C. La protéine de 575 kDa peut porter l'épitope conformationnel reconnu par l'AC2.
- D. Dans les cellules C, la protéine de 575 kDa peut être clivée en une forme de 175 kDa et une forme de 400 kDa libérée dans le sécrétome.
- E. Afin de vérifier sur quelle(s) protéine(s) l'épitope reconnu par l'AC2 est localisé, vous pouvez immunoprécipiter cette(ces) protéine(s) avec l'AC2, à partir de l'extrait protéique total et du sécrétome des cellules C, en conditions non dénaturantes, puis les identifier par immunoempreinte en PAGE-SDS avec l'AS.

QCM 5. Vous pensez que certaines formes (ou fragments) de Tat, spécifiquement présentes dans les cellules cancéreuses, pourraient constituer un marqueur diagnostique du cancer du pancréas. Vous pouvez rechercher ces formes (ou fragments) soit dans le sérum (protéines « libérées » par la tumeur), soit dans le tissu pancréatique, soit au niveau de cellules cancéreuses qui se sont détachées de la tumeur pancréatique et circulent dans le sang des patients (cellules cancéreuses circulantes).

La(les)quelle(s) de ces techniques vous semblent) adaptée(s) pour identifier les patients atteints de cancer du pancréas?

- A. Vous pouvez mettre en évidence la forme de 175 kDa à partir d'un extrait protéique total de la tumeur pancréatique, par immunoempreinte en PAGE-SDS, grâce à l'AS.
- B. Vous pouvez doser la forme de 400 kDa dans le sérum, grâce à un ELISA sandwich réalisé avec l'AC1 et AC2.
- C. Sur cryocoupes tissulaires, un marquage avec l'AS vous permettra de distinguer les cellules normales des cellules cancéreuses.
- D. Sachant que les cellules pancréatiques normales ne circulent pas, vous pouvez identifier, par cytométrie en flux, des cellules cancéreuses circulantes grâce à un marquage avec l'AC1 si l'AC1 reconnaît son épitope dans sa conformation cellulaire.
- E. Sous réserve de pouvoir maintenir en culture les cellules provenant du sang du patient, suffisamment longtemps, vous pouvez mettre en évidence l'existence de cellules cancéreuses circulantes en ELISpot avec l'AC1 et l'AC2.

QCM 6 et 7. Une molécule inhibitrice des CDK, appelée P1209X, a été identifiée par un laboratoire pharmaceutique. Les deux expériences suivantes ont pour objectif de caractériser ses propriétés et son activité.

QCM 6. Des anticorps polyclonaux contre CDK1, CDK2 et CDK6 sont utilisés dans des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits cellulaires totaux de cellules humaines.

Les immunoprécipitats sont soumis à une réaction de phosphorylation en présence d'ATP et des substrats S1 et S2, respectivement spécifiques des CDK mitotiques et de

G1. Le tableau ci-dessous présente les différentes conditions expérimentales utilisées et résume les résultats obtenus.

Anticorps contre CDK1	Anticorps contre CDK2	Anticorps contre CDK6	P1209X	Phosphorylation S1	Phosphorylation S2
Oui	Non	Non	Non	++++++	-
Non	Oui	Non	Non	++++	-
Non	Non	Oui	Non	-	++++++
Oui	Non	Non	Oui	-	-
Non	Oui	Non	Oui	-	-
Non	Non	Oui	Oui	-	++++++

(+): le nombre de croix indique l'importance de la phosphorylation

(-): pas de phosphorylation

Que pouvez-vous conclure ?

- A. Les activités des protéines phosphatases CDK2 et CDK6 ne sont pas inhibées par la molécule P1209X.
- B. L'activité kinase de CDK1 est inhibée par la molécule P1209X.
- C. Les résultats de cette expérience confirment que CDK6 phosphoryle les mêmes substrats que CDK1 en mitose.
- D. Les activités des protéines kinases CDK1 et CDK2 humaines sont mesurées dans cette expérience.
- E. La molécule P1209X est un inhibiteur des kinases CDKs mitotiques.

QCM 7. Afin de valider l'intérêt de la molécule inhibitrice P1209X et de son dérivé

P1215Y, des expériences doivent être réalisées pour apprécier leur activité sur des cellules en culture. Pour cela, des cellules cancéreuses (HCT116, MCF7, MCF7-R) ont été traitées pendant 24h par ces inhibiteurs et les effets antiprolifératifs ont été appréciés en examinant la répartition dans les phases du cycle cellulaire.

Les résultats sont les suivants :

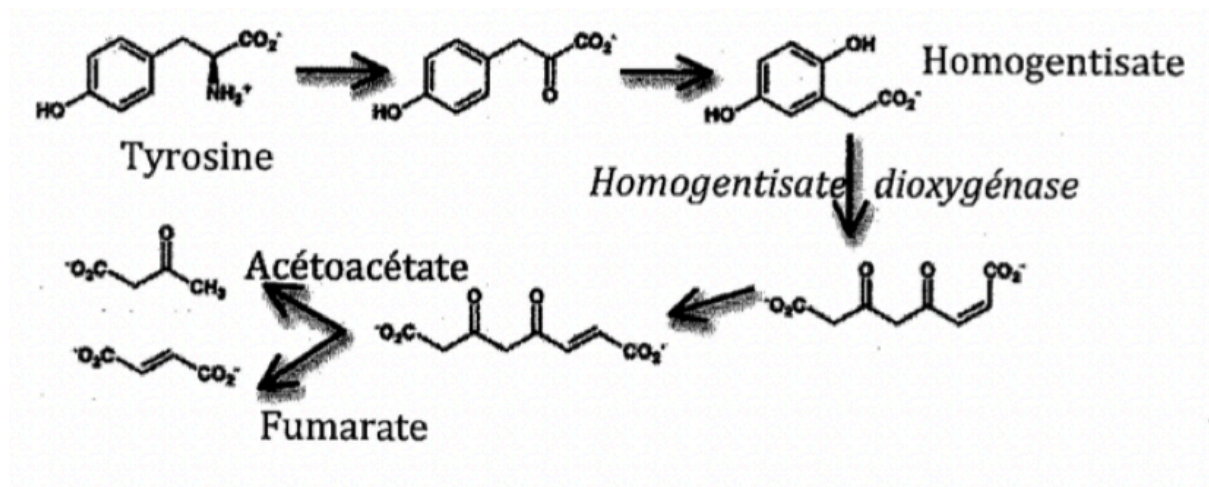
Type cellulaire	Sans traitement				+ P1209X				+ P1215Y			
	G1	S	G2	M	G1	S	G2	M	G1	S	G2	M
HCT116	45	20	30	5	2	3	95	0	86	1	12	1
MCF7	52	18	26	4	8	1	91	0	90	4	6	0
MCF7-R	55	15	25	5	54	16	25	5	55	14	26	5

Les résultats sont exprimés en % de cellules dans les différentes phases.

Que pouvez-vous conclure ?

- A. Un traitement par P1209X bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1 de toutes les lignées de cellules cancéreuses testées.
- B. Le dérivé P1215Y ne semble pas être un inhibiteur des CDKs qui contrôlent l'entrée en mitose.
- C. La prolifération de la lignée MCF7-R est inhibée par les deux molécules P1209X et P1215Y.
- D. L'inhibition de l'activité kinase de CDK1 est probablement responsable de l'effet observé lorsque la lignée HCT116 est traitée par la molécule P1215Y.
- E. Le dérivé P1215Y est un inhibiteur spécifique des kinases CDKs mitotiques.

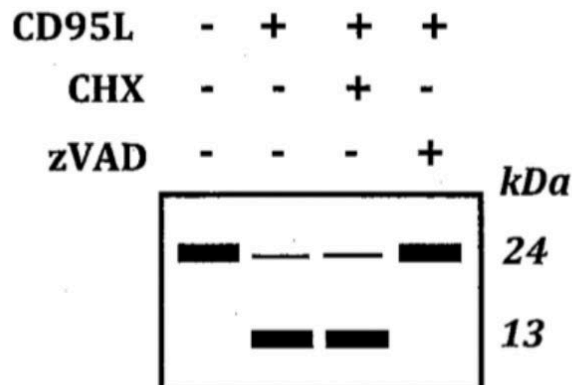
QCM 12 - L'alcaptonurie est une maladie héréditaire due au déficit en homogentisate dioxygénase (cf. figure ci-dessous).



Un patient atteint d'alcaptonurie :

- A. Présente les mêmes signes qu'un malade atteint de phénylcétonurie.
- B. Accumule du fumarate et de l'acétoacétate.
- C. Accumule de l'acide homogentisique (ou homogentisate).
- D. Pourrait être efficacement traité par un régime totalement dépourvu à la fois de phénylalanine et de tyrosine.
- E. Pourrait être traité par un médicament qui inhibe la phénylalanine hydroxylase.

QCM 13 - Vous traitez ou non des cellules leucémiques par CD95L, un ligand de mort qui entraîne l'apoptose. Dans certaines conditions, vous ajoutez soit un inhibiteur de l'activité enzymatique des caspases (zVAD) soit de la cycloheximide (CHX), qui inhibe la synthèse protéique. Après quelques heures d'incubation, vous séparez les protéines cellulaires par électrophorèse (SDS-PAGE) et vous réalisez un Western blot en utilisant comme anticorps primaire un anticorps polyclonal dirigé spécifiquement contre la protéine Bid humaine. Vous obtenez les résultats suivants :



A. La protéine d'environ 24 kDa reconnue par l'anti-Bid est un homodimère formé par l'association, via des liaisons faibles, de 2 protéines d'environ 13 kDa.

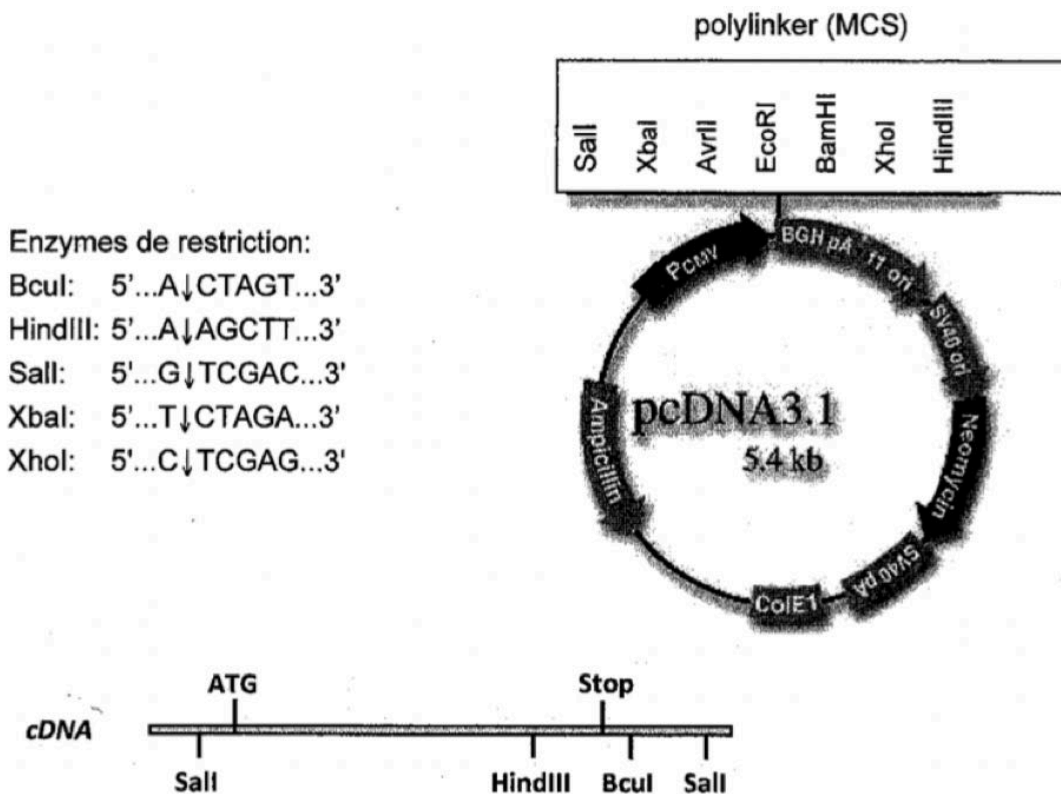
B. Après traitement par CD95L, les cellules leucémiques synthétisent une protéine de 13 kDa reconnue par l'anti-Bid.

C. La protéine d'environ 24 kDa est nécessairement une caspase.

D. Le traitement par CD95L des cellules leucémiques a entraîné l'activation d'une protéase qui a Bid comme substrat.

E. Les cellules leucémiques traitées à la fois par CD95L et par zVAD ne mourront pas d'apoptose.

QCM 14. Afin d'étudier le rôle de Bid, vous voulez exprimer Bid dans des cellules eucaryotes. Pour cela, vous cherchez à construire un vecteur plasmidique contenant toute la partie codante du cDNA du gène humain codant pour Bid. Vous disposez de son cDNA et du plasmide pcDNA3.1 dont les cartes de restriction sont montrées ci-dessous. Ce vecteur permet aux cellules eucaryotes qui le contiennent de résister à l'antibiotique Néomycine.



Vous pourrez affirmer que :

- A. Le cDNA de Bid digéré par Sall pourra être inséré dans le plasmide préalablement digéré par Sall.
- B. Le cDNA de Bid digéré par Sall et HindIII pourra être inséré dans le plasmide préalablement digéré par Sall et HindIII.
- C. Le cDNA de Bid digéré par Sall pourra être inséré dans le plasmide préalablement digéré par Sall et XhoI.
- D. Le cDNA de Bid digéré par Sall et BclI pourra être inséré dans le plasmide préalablement digéré par Sall et XbaI.
- E. Le plasmide préalablement digéré par Sall et XhoI devra être impérativement traité par la phosphatase alcaline.

QCM 15. Ayant obtenu un plasmide recombinant contenant le cDNA entier de Bid, vous avez également préparé deux autres plasmides pcDNA3.1 recombinants :

- un vecteur contenant tout le cDNA de Bid mais portant une mutation pour que le codon 60 ne code plus pour Asp mais pour Glu (mutant D60E),
- Un vecteur contenant la séquence correspondant seulement à la protéine de 13 kDa observée dans le QCM 13 (protéine dite tBid).

Vous transfectez des cellules humaines avec le plasmide pcDNA3.1 vide ou un des 3 plasmides recombinants décrits ci-dessus. L'analyse par Western blot d'extraits protéiques préparés à partir de ces cellules transfectées montre l'expression de la protéine Bid attendue. Après avoir incubé ces cellules pendant quelques heures en absence ou en présence de CD95L, vous comptez le nombre de cellules présentant un noyau condensé et fragmenté. Vous obtenez les résultats suivants :

Transfection avec plasmide	Proportion de cellules avec noyau fragmenté (%)	
	sans CD95L	avec CD95L
vide	5	75
Bid	6	78
D60E	5	9
tBid	65	79

Au vu de ces résultats, vous pourrez conclure que, dans ces cellules :

- La seule expression de Bid n'est pas suffisante pour induire l'apoptose en l'absence de CD95L.
- Dans les cellules transfectées avec le plasmide codant pour Bin, puis traitées par CD95L, un Western blot réalisé avec un anticorps anti-Bid montrerait seulement la protéine de 24 kDa.
- Sous l'effet de CD95L, la protéine mutante D60E inhibe fortement l'apoptose.
- La seule expression de tBid suffit à induire l'apoptose en l'absence de CD95L.
- Sachant que l'addition de zVAD (l'inhibiteur de l'activité enzymatique des caspases) réduit à 7% le nombre de cellules avec noyau fragmenté après transfection du plasmide tBid, en l'absence de CD95L, tBid doit activer des caspases qui entraînent la mort.

Correction

Biomolécules :

QCM 25 - ABDE

C. On observe que la liaison du lot n°2 sur les monocytes est similaire à la liaison du lot n°1 sur les fibroblastes, nous manquons d'information pour conclure de la présence de modifications du lot n°2.

Recherche :

QCM 3 - ACDE

B. L'épitope reconnu par l'AC1 ne peut pas être un épitope conformationnel car il est observable en conditions dénaturantes.

QCM 4 - ABCDE

QCM 5 - ABDE

C. Ce marquage ne sera pas spécifique des cellules cancéreuses car on observe lors des DOT BLOT réalisés que l'AS réagit avec les extraits protéiques des cellules saines tout comme ceux des cellules cancéreuses.

QCM 6 - BDE

A. L'activité de CDK2 est inhibée par la molécule P1209X.

C. Cette expérience ne nous donne aucune indication sur la nature des substrats des différentes CDK, on ne peut pas le savoir.

QCM 7 - B

A. On voit que pour la lignée MCF7-R, les résultats avec ou sans P1209X sont similaires : cette dernière ne semble pas avoir beaucoup d'effets ici.

C. Les résultats dans le tableau montrent que les pourcentages de cellules de la lignée MCF7-R dans les différentes phases sont similaires, qu'il y ait un des inhibiteurs ou non. Les deux molécules inhibitrices ne semblent avoir aucun effet.

D. Les résultats du tableau ne permettent pas de définir sur quelle molécule les deux inhibiteurs agissent.

E. P1215Y diminue le pourcentage de kinase CDKs en mitose, mais pas uniquement : il diminue également le taux de cellules en phases S et G2.

QCM 12 - C

A. La phénylcétonurie est due à une accumulation en phénylalanine et non pas en homogentisate et donc ne présente pas les mêmes symptômes.

B. Il y a un déficit en fumarate et acétoacétate et une accumulation en homogentisate.

D. La phénylalanine est un acide aminé essentiel, le traitement peut passer par un régime pauvre en cet acide aminé pour éviter la formation d'un surplus de tyrosine qui deviendra de l'homogentisate, mais ne peut pas en être totalement dépourvu.

E. Si on adapte pas le régime du patient, l'inhibition de la phénylalanine hydroxylase ne suffira pas car il y aura toujours un apport exogène trop élevé de tyrosine.

QCM 13 - DE

- A. Ce n'est pas possible que ce soit une association de deux protéines par des liaisons faibles, car la SDS-PAGE a des propriétés dénaturantes : il ne sortirait dans ce cas-là qu'une bande à 13 kDa.
- B. Si les cellules leucémiques synthétisaient une protéine de 13 kDa après traitement par CD95L, cette protéine serait aussi présente dans la dernière colonne : or ce n'est pas le cas.
- C. Ce n'est pas une caspase car elle est également présente lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur de caspases.

QCM 14 - ACDE

- B. Le cDNA ne sera pas complet, puisque la coupure par HindIII implique une cassure au milieu.

QCM 15 - ACDE

- B. On observe sur la figure du QCM 13 que après addition du CD95L, l'anticorps anti-Bid détecte une protéine de 13 kDa.

Rangueil 2014-2015

QCM 3 à 5. Vous travaillez sur une maladie de la peau nouvellement décrite et possiblement auto-immune.

QCM 3 - Vous recherchez s'il existe, dans le sérum des patients, des auto-anticorps (IgG) dirigés contre des antigènes protéiques de l'épiderme. Pour cela:

A. Vous pouvez réaliser une immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de peau humaine avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

B. Vous pouvez réaliser une analyse immunohistochimique sur cryocoupes de peau humaine avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG humaines marqué à la peroxydase.

C. Vous pouvez utiliser une technique dot-blot à partir d'un extrait protéique total d'épiderme humain.

D. Vous pouvez utiliser une technique de type ELISA sandwich.

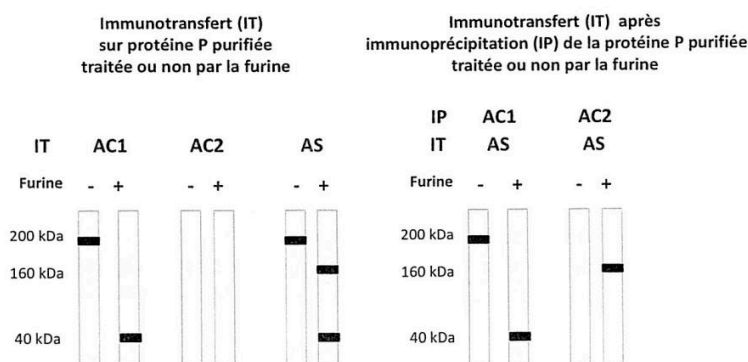
E. Après séparation d'un extrait protéique total d'épiderme humain par électrophorèse bidimensionnelle, vous pouvez réaliser un immunotransfert (Western Blot) qui vous permettra de préciser le point isoélectrique de l'éventuelle protéine-cible des auto-anticorps.

QCM 4 et 5 - Les sérums des patients ont reconnu une protéine P déjà décrite. Celle-ci est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif (pré-P), clivé dans l'appareil de Golgi par une protéase (la furine) pour donner la forme mature (P-mat), exprimée à la membrane plasmique des cellules de l'épiderme (kératinocytes).

Vous possédez un anti-sérum (AS) de lapin spécifique de P, parfaitement caractérisé. De plus, à partir des lymphocytes d'un patient, vous avez produit par des méthodes classiques deux anticorps monoclonaux humains (AC1 et AC2), spécifiques de P.

Vous avez analysé la réactivité de ces anticorps (AS, AC1 et AC2) avec deux méthodes complémentaires:

- en immunofluorescence indirecte par cryo coupes de peau humaine normale, l'AS marque le cytoplasme et la périphérie des kératinocytes tandis que l'AC 1 marque uniquement le cytoplasme et que l'AC2 donne un marquage cytoplasmique faible et un marquage périphérique franc.
- en immunotransfert, vous avez analysé leur réactivité sur la protéine P purifiée traitée ou non par la furine, et leur capacité à immunoprécipiter la protéine P purifiée, traitée ou non par la furine, le précipitat étant révélé en immunotransfert par l'AS (figure ci-dessous)



QCM 4 - Parmi les interprétations suivantes de la figure ci-dessus, la(les)quelle(s) est (sont) exacte(s) ?

- A. La protéine de 200 kDa est clivée en une forme de 160 kDa et une forme de 40 kDa qui porte l'épitope reconnu par l'AC1.
- B. L'épitope reconnu par l'AC2 absent de la pré-P a été probablement généré sur la P-mat par le changement de conformation induit par le clivage.
- C. L'épitope reconnu par l'AC1 sur le fragment peptidique de 40 kDa est un épitope conformationnel.
- D. L'AC1 reconnaît un épitope séquentiel de la pré-P absent sur la P-mat.
- E. L'épitope reconnu par l'AC2 est un épitope séquentiel.

QCM 5 - Vous cherchez à développer de nouveaux traitements qui ciblent spécifiquement les kératinocytes. Vous souhaitez notamment utiliser vos anticorps monoclonaux humains pour véhiculer des drogues jusqu'aux kératinocytes. Pour cela, vous fabriquez une chimère (AC2-D) avec l'AC 2 que vous couplez à une drogue D. Vous maîtrisez un système expérimental vous permettant de montrer que certains lymphocytes T sécrètent de l'interféron γ (IFN γ) en présence de D. Vous voulez vérifier qu'une fois associés, AC2 et D gardent leurs propriétés biologiques.

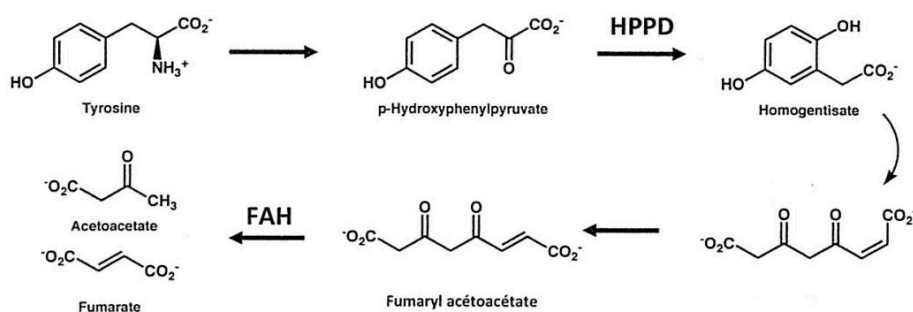
- A. Vous pouvez vérifier la réactivité de l'AC 2-D en immunofluorescence indirecte sur cryocoupes de peau humaine avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).
- B. Vous pouvez vérifier, après IP de P clivée par la furine avec l'AC 2-D, suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE et immunotransfert avec l'AS et un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase, que l'AC 2-D reconnaît P-mat.
- C. Vous pouvez vérifier par ELISpot qu'il existe des lymphocytes T capables de sécréter de l'IFN γ en présence d'AC2-D.
- D. Vous pouvez mesurer dans le milieu de votre système expérimental la concentration de l'IFN γ sécrété par les lymphocytes T mis en présence d'AC 2-D, par une méthode de type ELISA sandwich.
- E. Vous pouvez mesurer dans le milieu de votre système expérimental la concentration de l'IFN γ sécrété par les lymphocytes T mis en présence de D, par une méthode de type ELISpot.

QCM 8 - Chez les souris d'un fond génétique défini, soit un gène g codant pour une protéine G, porté par un autosome et spécifiquement exprimé dans les fibres musculaires striées squelettiques.

Vous souhaitez disposer de souris transgéniques. Il est exact d'affirmer que :

- A. Des souris -/- (dont les 2 allèles du gène g sont invalides) pourront être obtenues par microinjection d'un gène g délété de plusieurs exons dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé puis réimplanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante.
- B. Des souris -/- (dont les 2 allèles du gène g sont invalidés) pourront être obtenues par recombinaison homologue en utilisant une construction du gène g qui renferme entre autres la cassette neo au centre du premier exon (contenant l'ATG initiateur).
- C. La microinjection du cDNA correspondant au gène g dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé puis réimplanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante permettrait d'obtenir des souris transgéniques surexprimant ce cDNA dans tous les tissus.
- D. L'injection d'un vecteur viral porteur du cDNA correspondant au gène g directement dans le système nerveux central des souris adultes permettrait d'obtenir une lignée de souris transgéniques surexprimant ce cDNA spécifiquement dans les motoneurones α .
- E. La microinjection, dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé, du cDNA correspondant au gène g placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique des motoneurones α permettrait d'obtenir des souris transgéniques surexprimant ce cDNA seulement dans les motoneurones α .

QCM 12 à 15 - La tyrosinémie de type I est une maladie autosomale récessive sévère due au déficit de l'activité de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAH)



Il est à noter que le blocage de la 1ère ou de la 2ème étape (HPPD) de cette voie métabolique est responsable d'autres types de tyrosinémie caractérisées par des troubles moins sévères que ceux causés par la tyrosinémie de type I.

QCM 12 - Connaissant le métabolisme de la tyrosine, un patient atteint de tyrosinémie de type I.

- A. Est capable de synthétiser de la phénylalanine.
- B. Accumule du fumarate et de l'acétoacétate.
- C. Accumule du fumarylacétoacétate.
- D. Pourrait être efficacement traité de manière exclusive par un régime totalement dépourvu de tyrosine.
- E. Pourrait être traité par un médicament qui inhibe la conversion de tyrosine en hydroxyphénylpyruvate.

QCM 15 - Ayant produit des cellules ES dont la mutation créée ne permet plus de synthèse de FAH, vous avez obtenu des souris hétérozygotes pour cette mutation. Après avoir croisé ces souris entre elles, vous obtenez des souriceaux sans anomalie morphologique particulière. Par contre, vous notez que certains souriceaux nouveau-nés meurent en moins de 24h après la naissance. Le génotypage des souriceaux immédiatement après la naissance montre que ce sont seulement les nouveaux nés homozygotes pour la mutation de la FAH qui meurent.

- A. Après croisement des souris hétérozygotes, à chaque portée, environ 25% des nouveau-nés meurent.
- B. Vous concluez que la mutation de la FAH que vous avez créée est létale à l'état embryonnaire.
- C. Après croisement des souris hétérozygotes, à chaque portée, environ 50% des nouveau-nés ont une activité enzymatique de la FAH nulle.
- D. Sachant qu'il est possible d'éviter la mortalité des souriceaux nouveau-nés homozygotes en inhibant l'enzyme HPPD (cf. schéma du QCM 12), vous concluez que c'est l'accumulation de tyrosine qui est responsable de la mortalité des animaux.
- E. Sachant qu'il est possible d'éviter la mortalité des souriceaux nouveau-nés homozygotes en inhibant l'enzyme HPPD (cf. schéma du QCM 12), et sachant que le "knockout" homozygote du gène de la HPPD est viable, la double invalidation du gène de la FAH et de la HPPD permettra d'obtenir des souris homozygotes viables.

Correction

QCM 3 - ABCE

- D. Non, ici on recherche la présence d'anticorps dirigés contre l'épiderme du patient. La technique ELISA sandwich sert à doser des antigènes et non des anticorps.
- E. (VRAI) En effet, la technique du Western Blot implique de réaliser d'abord une électrophorèse, on pourra alors connaître le point isoélectrique de la protéine ciblée par les auto-anticorps.

QCM 4 - ABD

- A. (VRAI) En effet, on voit que lorsque la protéine est traitée par la furine, 2 fragments de 40 kDa et 160 kDa sont reconnus par l'antisérum et que le fragment de 40 kDa est marqué par l'AC1 au niveau de l'immunotransfert.
- B. (VRAI) On peut voir qu'en absence de traitement par la furine (il s'agit alors de la pré-P), l'AC2 ne reconnaît aucun épitope. Mais après traitement on voit grâce à l'immunoprécipitation que l'AC2 reconnaît un épitope sur la forme clivée: c'est sûrement dû à un changement conformationnel.
- C. Non, ce n'est pas un épitope conformationnel car on peut voir que l'AC1 reconnaît cet épitope même avant le clivage par la furine (il reconnaît la pré-P). Donc il s'agit d'un épitope séquentiel.
- D. (VRAI) On peut savoir grâce à l'immunofluorescence que la protéine de 40 kDa reconnue par l'AC1 se retrouve au niveau du cytoplasme. Or, la forme mature P-mat est exprimée à la membrane plasmique de la cellule donc il s'agit de la protéine clivée de 160 kDa. L'AC1 ne reconnaissant par d'épitope sur la protéine de 160 kDa, on peut alors dire que l'épitope séquentiel qu'elle reconnaît sur la pré-P est absent sur la P-mat.
- E. Non, on peut voir que l'AC2 ne reconnaît pas cet épitope avant le clivage par la furine : en effet, sur l'immunoprécipitation l'AS ne signale aucune protéine précipitée par l'AC2. Par contre, après clivage par la furine, l'immunoprécipitation par AC2 permet de retenir une protéine. L'épitope reconnu est alors généré par le clivage et est alors conformationnel.

QCM 5 - ABCD

- B. (VRAI) Après clivage par la furine, il s'agit de P-mat. Si l'AS reconnaît une protéine à l'immunotransfert après immunoprécipitation à l'aide de AC2-D, c'est que AC2-D a immunoprécipité P-mat et donc qu'il l'a reconnu.
- D. (VRAI) L'ELISA sandwich permet bien le dosage d'un antigène.
- E. Non, la technique d'ELISpot ne permet pas le dosage d'un antigène spécifique (ici l'IFN γ) mais plutôt de dénombrer les cellules sécrétrices d'antigène.

QCM 8 - BCE

- A. Si on injecte un gène g délété de plusieurs exons, la souris transgénique exprimera une protéine tronquée mais aussi la protéine normale car il lui restera un gène valide.
- B. (VRAI) Une recombinaison homologue d'un gène permet de l'inactiver et donc d'empêcher l'expression de la protéine.
- D. Pour exprimer un ADNc spécifiquement dans des cellules comme les motoneurones α , il faut un promoteur spécifique.

QCM 12 - CE

- A. La phénylalanine étant un acide aminé essentiel, elle ne peut pas être synthétisée par le corps humain.
- B. La dernière transformation étant impossible à cause du manque de FAH, il n'y aura pas d'accumulation de fumarate.
- D. Pas de manière exclusive car la tyrosine est aussi synthétisée dans le corps humain à partir de phénylalanine (par la phénylalanine hydroxylase).

QCM 15 - AE

- A. (VRAI) En effet lorsque l'on croise deux souris hétérozygotes pour la mutation, il y aura à chaque portée environ 25% de souriceaux homozygotes pour la mutation (50% hétérozygotes et 25% homozygotes non mutés), donc 25% qui meurent.
- B. Non, la mutation n'est pas létale à l'état embryonnaire vu que les souriceaux possédant la mutation de façon hétérozygote ne meurent pas.
- C. Non, seuls les souriceaux homozygotes pour la mutation auront une activité enzymatique de la FAH nulle, donc 25% seulement.
- D. A l'aide du schéma, on peut voir que l'inhibition de l'enzyme HPPD entraîne l'accumulation de tyrosine. Donc si cette inhibition permet d'éviter la mort des souriceaux homozygotes, alors ce n'est pas cette accumulation qui est responsable de leur mort.

Rangueil 2015-2016

QCM 3 à 5. La neuromyéélite optique (NMO) est une maladie inflammatoire démyélinisante du système nerveux central suspecte d'être d'origine auto-immune

QCM 3 - Afin de rechercher la présence d'auto-anticorps dans le sérum des patients NMO, vous réalisez une immunofluorescence indirecte sur des cryocoupes de cerveau humain avec un mélange de sérums de patients NMO en utilisant comme anticorps secondaire un anti-sérum de lapin anti-IgG humaines marqué à la fluorescéine.

Vous observez un marquage punctiforme péricellulaire de certaines cellules.

Par ailleurs, vous réalisez un extrait protéique total de cerveau que vous analysez par immunotransfert avec les sérums des patients NMO et un anticorps secondaire adapté après électrophorèse en PAGE-SDS en conditions réductrices.

Aucune bande n'est observée.

Pour l'ensemble de l'exercice, on considérera que l'antigène-cible des auto-anticorps est de nature protéique.

Les résultats de vos expérimentations vous permettent de conclure que :

- A. Le sérum des patients NMO contient des IgG reconnaissant des antigènes exprimés dans le cerveau.
- B. L'(es) épitope(s) reconnu(s) par les autoanticorps présents dans le sérum des patients NMO est(sont) un(des) épitope(s) séquentiel(s).
- C. Le point isoélectrique de l'antigène-cible pourra être précisé après séparation bidimensionnelle de l'extrait protéique total de cerveau et analyse par immunotransfert.
- D. Étant hydrosoluble, l'antigène-cible des auto-anticorps présents dans le sérum des patients nMO est absent de l'extrait utilisé en immunotransfert.
- E. Si vous utilisiez des conditions d'extraction qui préservent la conformation de la protéine-cible, vous pourriez mettre en évidence l'existence d'auto-anticorps dans le sérum des patients NMO par dot-blot.

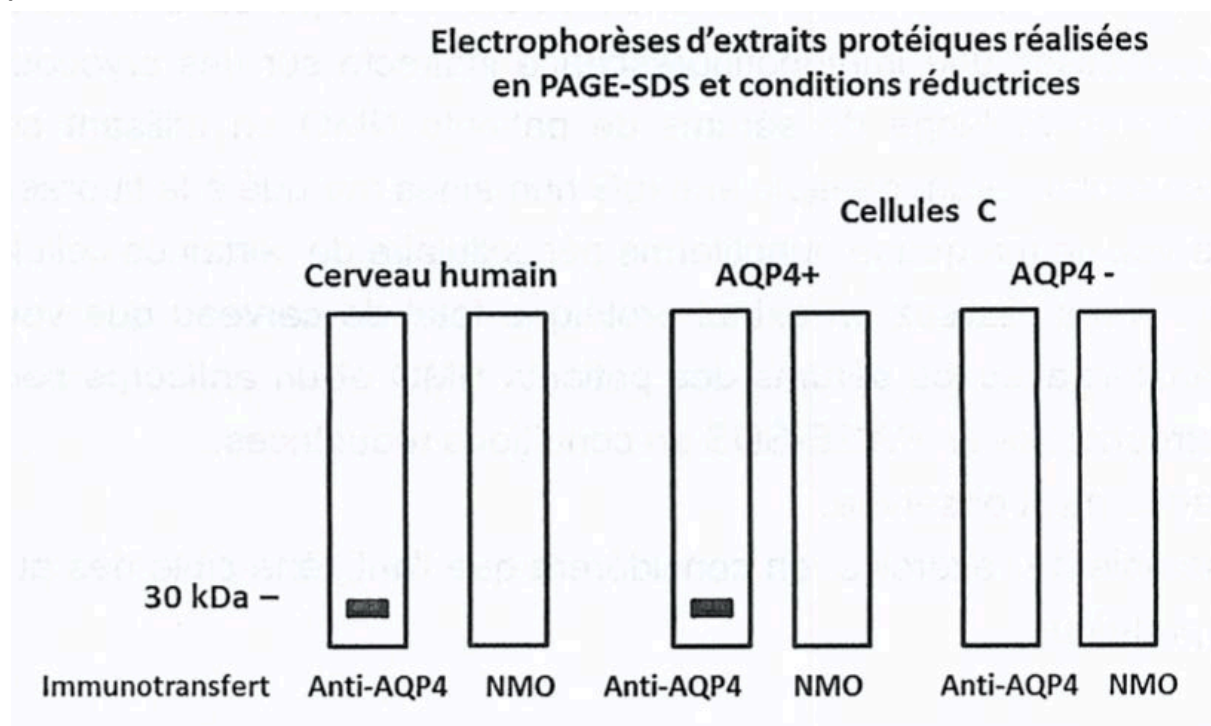
QCM 4 - La nature des cellules marquées et le type de marquage observé vous font penser que l'aquaporine 4 (AQP4), protéine transmembranaire de 30 kDa, est la cible antigénique d'auto-anticorps présents dans le sérum des patients NMO.

Par des techniques de biologie moléculaire, vous faites exprimer ou non l'AQP4 par une lignée cellulaire C (cellules C respectivement AQP4+ et AQP4-).

Vous possédez un anticorps monoclonal anti-AQP4 parfaitement caractérisé.

Vous analysez la réactivité du sérum de patients NMO en immunofluorescence indirecte sur les cellules de la lignée C. Vous n'observez aucun marquage sur les cellules AQP4- tandis que sur les cellules AQP4+, le marquage est identique à celui que vous avez observé sur les coupes de cerveau humain.

Vous réalisez divers extraits protéiques décrits dans la figure ci-dessous, que vous analysez par immunotransfert après électrophorèse en PAGE-SDS en conditions réductrices, avec le sérum de patients NMO et avec l'anti-AQP4.



A l'analyse de ces résultats:

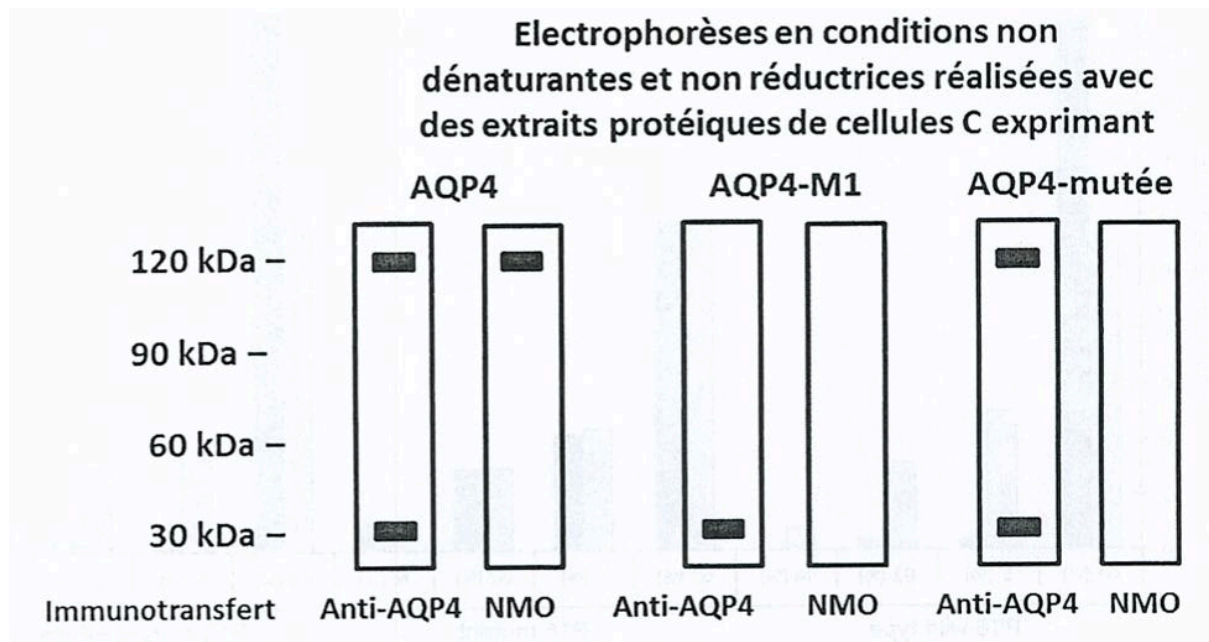
- A. Vous pouvez affirmer que l'AQP4 n'est pas la cible des auto-anticorps présents dans le sérum des patients NMO.
- B. L'anticorps anti-AQP4 reconnaît un épitope conformationnel.
- C. Vos résultats suggèrent que les épitopes reconnus par les auto-anticorps présents dans le sérum des patients NMO sont des épitopes conformationnels.
- D. Sous réserve de disposer des anticorps nécessaires, un cell-ELISA vous aurait permis de vérifier l'expression d'AQP4 par les cellules AQP4+
- E. Sous réserve de disposer des anticorps nécessaires, vous pourriez déterminer, par double marquage en immunofluorescence indirecte, si les cellules reconnues par les auto-anticorps présents dans le sérum des patients NMO sont aussi celles qui expriment l'AQP4.

QCM 5 - L'AQP4 est exprimée sous forme de monomères et de tétramères. Il existe une isoforme d'AQP4 (AQP4-M1), différente par son extrémité N-terminale, qui n'existe que sous forme monomérique. Ces deux isoformes d'AQP4 (AQP4 et AQP4-M1) présentent une petite boucle extracellulaire identique.

Vous faites exprimer par la lignée cellulaire C soit AQP4-M1, soit AQP4, soit une forme AQP4-mutée dans laquelle la boucle extracellulaire est absente.

En immunofluorescence indirecte avec le sérum des patients NMO, vous observez un marquage punctiforme sur les cellules AQP4+ mais aucun marquage sur les autres cellules AQP4-M1 et AQP4-mutée.

Vous réalisez des extraits protéiques dans des conditions vous permettant de garder les tétramères intacts; vous analysez ces extraits en conditions non dénaturantes et non réductrices.



Les résultats de vos expérimentations vous permettent de conclure que :

- A. L'AQP4 forme des tétramères dans les cellules qui expriment AQP4.
- B. L'AQP4-M1 forme des tétramères dans les cellules qui expriment AQP4-M1.
- C. L'AQP4-mutée forme des tétramères dans les cellules qui expriment AQP4-mutée.
- D. Les auto-anticorps présents dans le sérum des patients NMO reconnaissent un(des) épitope(s) conformationnel(s) présent(s) uniquement sur les formes tétramériques d'AQP4.
- E. La boucle extracellulaire de l'AQP4 est nécessaire à la constitution de l'(des) épitope(s) conformationnel(s) reconnu(s) par les auto-anticorps présents dans le sérum de patients NMO.

QCM 8 - Chez des souris d'un fond génétique défini, soit un gène g, codant pour une protéine G, porté par un autosome et spécifiquement (grâce à sa région promotrice) exprimé dans les fibres musculaires striées squelettiques.

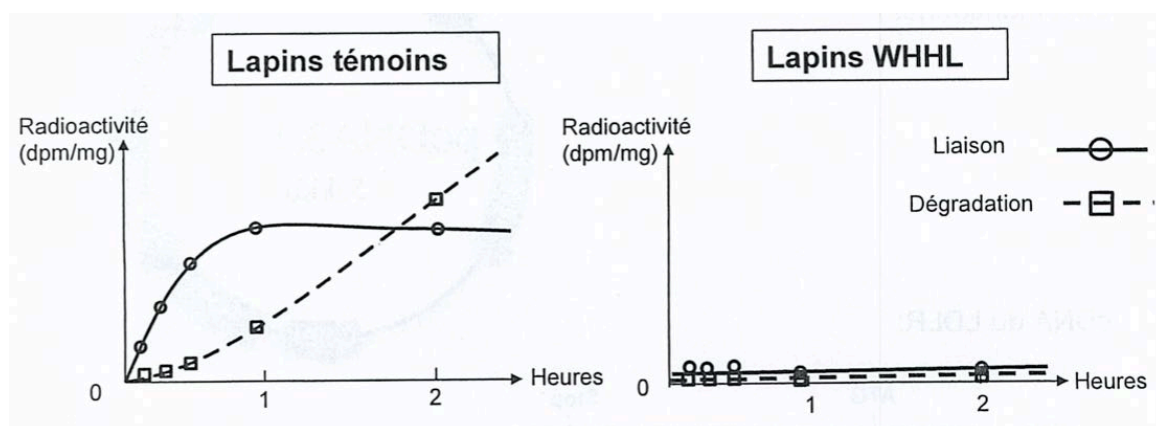
Vous souhaitez disposer de souris transgéniques. Il est exact d'affirmer que:

- A. Des souris +/- (dont un seul allèle du gène g est invalidé) pourront être obtenues par microinjection d'un gène g délété du premier exon (contenant l'ATG initiateur) dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé puis réimplanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante.
- B. Des souris +/- (dont un seul allèle du gène g est invalidé) pourront être obtenues par administration d'un vecteur permettant l'expression d'un gène suicide ("ablation génique") dans toutes les fibres musculaires striées squelettiques.
- C. Des souris +/- (dont un seul allèle du gène g est invalidé) pourront être obtenues par administration dans les muscles striés squelettiques d'une construction antisens (dirigée contre le produit du gène g).
- D. Des souris surexprimant le cDNA correspondant au gène g spécifiquement dans les fibres musculaires striées squelettiques pourront être obtenues par recombinaison homologue en remplaçant toute la séquence du gène g (y compris sa région promotrice) par le seul cDNA.
- E. Des souris surexprimant le cDNA correspondant au gène g spécifiquement dans les fibres musculaires striées squelettiques pourront être obtenues par microinjection, dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé, de ce cDNA placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique des fibres musculaires striées squelettiques.

QCM 12 - Des lapins dits WHHL (ou Watanabe) sont hypercholestérolémiques. Par rapport à des lapins témoins, leurs concentrations sériques de cholestérol sont les suivantes :

	Cholestérol total (mg/L)	LDL-Cholestérol (mg/L)
Lapins témoins	240	60
Lapins WHHL	9320	8460

Vous incubez des fibroblastes de ces lapins avec des LDL marquées à l'iode (^{125}I) et vous déterminez en fonction du temps d'incubation la liaison et la dégradation de ces LDL radioactives. Vous obtenez les résultats suivants:



- A. Des résultats identiques à ceux des fibroblastes des lapins normaux auraient été obtenus sur les fibroblastes des lapins WHHL si on les avait incubés en présence d'un excès de LDL non marquées.
- B. Les fibroblastes des lapins WHHL présentent uniquement un déficit de l'activité de la lipase acide.
- C. La seule anomalie des fibroblastes des lapins WHHL consiste en un défaut de l'internalisation des LDL (et aucun autre défaut).
- D. Après plusieurs jours de culture dans un milieu contenant du sérum, l'activité de l'HMG-CoA réductase doit être nettement plus élevée dans les fibroblastes des lapins WHHL que dans les fibroblastes des lapins témoins.
- E. Après addition de cholestérol apporté sous forme de LDL, l'activité de l'HMG-CoA réductase doit être nettement plus basse dans les fibroblastes des lapins WHHL que dans les fibroblastes des lapins témoins.

Correction

QCM 3 - AE

- B. Ce sont des épitopes conformationnels car on n'observe aucun résultat en condition dénaturante (électrophorèse) et réductrice.
- C. Non car il est dit qu'aucune bande n'est observée après immunotransfert.
- D. L'hydrosolubilité n'a aucun rapport avec l'absence de l'immuno transfert.

QCM 4 - CDE

- A. Les auto anticorps sont surement conformationnels (voir QCM 3). Il faudrait donc les tester en condition non dénaturante et non réductrice.
- B. Il donne un marquage en condition dénaturante et réductrice: il est alors séquentiel.

QCM 5 - ACDE

- B. Il est dit dans l'énoncé qu'elle n'existe que sous forme monomérique. De plus on n'observe qu'une bande à 30 kDa et rien à 120 kDa: donc c'est un monomère et non un tétramère.

QCM 8 - E

- A. Non, pas directement.
- B. On obtiendrait des souris -/-.
- C. On obtiendrait des souris +/-.
- D. Non, ce ne serait pas spécifique des FMSS et il manquerait un promoteur.

QCM 12 - D

- A. Ici le problème n'est pas lié à la quantité ou à la radioactivité, dans tous les cas, on voit qu'il n'y a aucune liaison et aucune dégradation.
- B. Non, si il y avait seulement un déficit de l'activité de cette enzyme, il n'y aurait pas de dégradation mais on verrait des liaisons.
- C. Non, si il y avait seulement un défaut d'internalisation, il n'y aurait pas de dégradation mais on verrait des liaisons. Il existe d'autres anomalies qui expliquent cette maladie.
- D. (VRAI) En effet, dans les fibroblastes de lapins témoins, après entrée des LDL dans la cellule, l'activité de l'HMG-CoA réductase va diminuer alors que dans les fibroblastes des lapins WHHL, les LDL n'étant pas internalisés, son activité ne diminuera pas. Son activité sera alors nettement plus élevée.
- E. Encore une fois le LDL ne pouvant pas être internalisé chez les lapins WHHL, l'apport de cholestérol sous cette forme ne diminuera pas l'activité de l'HMG-CoA réductase donc son activité ne sera pas plus basse.

Rangueil 2016-2017

QCM 4 à 6 - Vous travaillez sur une souche bactérienne sauvage Bs pathogène pour l'Homme et pour la souris, dont il existe plusieurs souches atténuées (Ba1, Ba2, Ba3). Vous souhaitez utiliser les souches atténuées pour vacciner vos patients et induire une immunité efficace contre la souche Bs. Les bactéries Bs expriment 3 protéines, P1, P2 et P3, de respectivement 70, 45 et 25 kDa. Vous vaccinez des souris avec des extraits protéiques de Ba1, Ba2 ou Ba3. Vous souhaitez mettre en évidence la production d'anticorps chez les animaux vaccinés. Vous possédez un extrait protéique Bs contenant les protéines P1, P2 et P3.

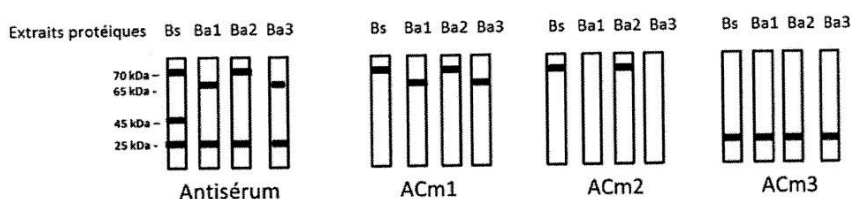
QCM 4 - La(les)quelle(s) des propositions suivantes est (sont) exacte(s) ?

- A. Vous pouvez vérifier la présence d'anticorps anti-Bs dans le sérum de chacun des animaux vaccinés par une méthode semi-qualitative telle que le dot-blot en utilisant l'extrait protéique de Bs.
- B. Pour identifier les animaux qui produisent des anticorps anti-Bs, vous pouvez tester le sérum des souris par ELISA indirect, en utilisant l'extrait Bs.
- C. Pour identifier les animaux qui produisent des anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels de P1, P2 ou P3, vous pouvez réaliser un immunotransfert (Western Blot) à partir de l'extrait Bs.
- D. En ELISA indirect, la densité optique mesurée sera inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Bs détectés.
- E. En ELISA sandwich, la densité optique mesurée sera proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-Bs détectés.

QCM 5 - Vous souhaitez identifier les antigènes présents dans les différentes souches bactériennes (Bs, Ba1, Ba2 et Ba3).

A partir d'une souris infectée par la souche Bs, vous avez produit un antisérum et 3 anticorps monoclonaux, ACm1, ACm2 et ACm3. Vous réalisez un immuno-transfert sur les extraits protéiques de chaque souche bactérienne avec ces anticorps.

Voici les résultats : [On considère que les bandes de 70, 45 et 25 kDa correspondent respectivement aux protéines P1, P2 et P3 de la bactérie Bs]



La(les)quelle(s) des propositions suivantes est (sont) exacte(s) ?

- A. La bande de 65 kDa reconnue dans les extraits de Ba1 et Ba3 correspond vraisemblablement à une forme clivée de la protéine P1.
- B. L'ACm 1 reconnaît vraisemblablement un épitope séquentiel de P1 ou de la forme de 65 kDa, conservé dans toutes les souches.
- C. L'ACm 2 reconnaît un épitope séquentiel de P1 présent dans Bs et Ba2 mais clivé ou modifié dans les souches atténuées Ba1 et Ba3.
- D. L'ACm 3 reconnaît un épitope séquentiel de P2.
- E. La protéine P2 n'induit pas de réponse humorale.

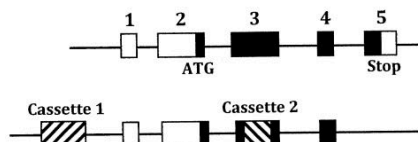
QCM 6 - Pour être efficace, le vaccin doit induire chez les sujets vaccinés la synthèse d'anticorps neutralisants anti-P1.

Vous vaccinez vos souris avec les différentes souches atténuées. Avant de les infecter avec la souche Bs pour vérifier l'efficacité du vaccin, vous voulez vérifier la présence d'anticorps anti-P1 dans le sérum des souris.

La(les)quelle(s) des propositions suivantes est(sont) exacte(s) ?

- A. Vous pouvez purifier la protéine P1 par chromatographie d'affinité à partir d'un extrait protéique de Bs en utilisant l'ACm 1, puis tester les sérums des animaux vaccinés par ELISA indirect sur la protéine purifiée.
- B. Vous pouvez purifier la protéine P1 par chromatographie d'affinité à partir d'un extrait protéique de Bs en utilisant l'ACm 2, puis tester les sérums des animaux vaccinés par ELISA indirect sur la protéine purifiée.
- C. Vous pouvez purifier la protéine P1 par cytométrie en flux à partir d'un extrait protéique de Bs en utilisant l'ACm 2, puis tester les sérums des animaux vaccinés en immuno-transfert sur la protéine purifiée.
- D. Sous réserve de disposer de P1 purifiée, vous pourrez dénombrer par ELISpot les hybridomes anti-P1 produits à partir des animaux vaccinés.
- E. Vous pouvez tester les sérums des animaux vaccinés en immuno-transfert sur un extrait protéique de Bs.

QCM 9 - Chez les souris d'un fond génétique défini, soit un gène g codant pour une protéine G, porté par un autosome et exprimé seulement dans les fibres musculaires striées squelettiques et les cellules musculaires lisses. Vous souhaitez disposer de souris transgéniques où le gène g est spécifiquement invalidé. Il est exact d'affirmer que :



- A. Des souris -/- (dont les 2 allèles du gène g sont invalides) pourront être obtenues par micro injection du vecteur indiqué ci-dessus dans le pronucléus mâle d'un ovocyte fécondé puis réimplanté dans l'utérus d'une souris pseudo-gestante.
- B. Des souris -/- (dont les 2 allèles du gène g sont invalidés) pourront être obtenues par fécondation in vitro en utilisant un ovocyte de souris sauvage +/+ et des spermatozoïdes de souris +/+ transfectés par le vecteur indiqué ci-dessus.
- C. Des souris +/- (dont un seul allèle du gène g est invalide) pourront être obtenues par injection du vecteur indiqué ci-dessus dans les muscles squelettiques de souriceaux +/+ nouveaux-nés.
- E. Si vous transfectez des cellules ES avec un vecteur contenant les cassettes de sélection appropriées pour permettre la recombinaison homologue, toutes les cellules ES sélectionnées auront les 2 allèles du gène g invalidés.

QCM 13 - Il existe un modèle murin de phénylcétonurie. Ces souris portent une mutation faux-sens dans l'exon 7 du gène PAH codant pour la phénylalanine hydroxylase. Vous voulez développer une méthode de thérapie génique somatique pour traiter ces souris malades, méthode qui serait applicable à l'Homme. Vous disposez du cDNA du gène PAH (codant pour sa séquence normale) ainsi que des autres cDNA nécessaires.

Dans le but d'une telle thérapie génique somatique pour cette affection (en connaissant sa physiopathologie), vous développerez :

- A. Un vecteur viral capable de transduire spécifiquement les cellules germinales (ovocytes ou spermatozoïdes) avec le cDNA du gène PAH pour corriger toutes les cellules.
- B. Un vecteur viral capable de transduire efficacement les hépatocytes avec le cDNA du gène PAH.
- C. Une méthode de transfert de gène permettant l'expression du cDNA du gène PAH spécifiquement dans les cellules souches hématopoïétiques et à l'âge adulte.
- D. Une méthode de transfert de gène permettant l'expression dans un tissu approprié du cDNA du gène PAL (phénylalanine ammoniac lyase).
- E. Une méthode de transfert de gène permettant la surexpression d'une enzyme capable de synthétiser la tyrosine.

Correction

QCM 4 - AB

- C. Car la technique d'immuno- transfert dénature les protéines. Les épitopes conformationnels sont donc détruits.
- D. En ELISA indirect la densité optique mesurée est proportionnelle à la quantité d'Ac antiBs détectés.
- E. La technique d'ELISA sandwich permet la détection des antigènes. La densité optique sera donc proportionnelle à la quantité d'antigènes détectés (et non à la quantité d'Ac anti-Bs).

QCM 5 - ABC

- A. (VRAI) Car l'anticorps-monoclonal 1 reconnaît les protéines de 70 kda et de 65 kda, donc la partie reconnue sur la protéine de 65 kda correspond en réalité à la partie clivée de la protéine de 70 kda.
- B. (VRAI) Car on voit une bande de 65 kda ou de 70 kda (selon les souches). Sachant que l'immuno transfert est une méthode dénaturante pour les protéines, on peut conclure que tout épitope reconnu par cette méthode sera forcément séquentiel et non pas conformationnel. En effet, s'il avait été conformationnel, il aurait été dénaturé par l'immuno-transfert et aucune bande n'aurait été visible.
- D. Acm3 est un épitope conformationnel de P3 car c'est elle qui fait 25 kda, et non pas P2.
- E. Les épitopes de la protéine P2 reconnus par l'antisérum et les anticorps-monoclonaux étaient tous conformationnels donc n'ont effectivement pas pu être détectés par cette méthode dénaturante (immuno-transfert). En effet, pour les détecter il faudrait utiliser une autre méthode, non dénaturante cette fois-ci.

QCM 6 - ABDE

Pour être efficace, le vaccin doit induire chez les sujets vaccinés la synthèse d'Ac neutralisants anti-P1. Vous vaccinez vos souris avec les différentes souches atténuées. Avant de les infecter avec la souche Bs pour vérifier l'efficacité du vaccin, vous voulez vérifier la présence d'Ac anti-P1 dans le sérum des souris. L'une des méthodes quantitatives en immunodosage vue en cours permettant de vérifier la présence d'Ac (et pas d'Ag) est l'ELISA INDIRECT. On possède un extrait de Bs et on sait que Bs contient P1 de 70 kDa. De plus, on sait avec le QCM précédent que : ACm1 reconnaît l'épitope séquentiel de P1 ou la forme de 65 kDa dans toutes les souches (que ce soit Ba1, Ba2, Ba3 ou Bs) et qu'ACm2 reconnaît l'épitope séquentiel de P1 présent dans les souches Bs et Ba2 mais cet épitope est sûrement clivé ou modifié dans Ba1 ou Ba3.

- A. (VRAI) ACm1 reconnaît bien P1 dans l'extrait protéique Bs donc on peut purifier P1. ELISA indirect est bien la méthode permettant de vérifier la présence d'Ac dans les sérums des animaux.
- B. (VRAI) ACm2 reconnaît bien P1 dans l'extrait protéique Bs donc on peut purifier P1. ELISA indirect est bien la méthode permettant de vérifier la présence d'Ac dans les sérums des animaux.
- C. La cytométrie en flux ne permet pas de purifier une protéine mais de compter et de trier des cellules.
- D. (VRAI) ELISPOT permet la détection et la numération des plasmocytes ou hybridomes sécréteurs d'un Ac spécifique. Ainsi si on possède bien P1 purifiée, le puit de culture est recouvert de P1. On dépose en suspension les cellules du sérum des patients vaccinés. Si les sérums contiennent bien des hybridomes anti-P1, les Ac sécrétés se lient à l'Ag à proximité des cellules puis les cellules sont éliminées par lavage. On ajoute un Ac anti-Ig marqué par une enzyme permettant la formation d'un produit insoluble. On obtient donc autant de tâches colorées que de cellules sécrétrices. S'il n'y a aucune tâche colorée, on pourra donc en déduire que le sérum ne contenait pas de cellules sécrétant des Ac anti-P1 et donc que le sujet ne contenait pas d'Ac anti-P1 dans son sang.
- E. (VRAI) Cf. technique du QCM précédent, on réalise un immuno-transfert sur l'extrait protéique Bs (en sachant qu'il possède P1, voir énoncé) avec les sérums des animaux vaccinés. Si on observe une bande vers 70 kDa, cela signifie que le sérum contient un Ac anti-P1, à 65 kDa, il reconnaît une forme clivée de P1.

QCM 9 - TOUX FAUX

- A. Car le gène g n'est pas spécifiquement invalidé, l'intégration est aléatoire avec cette technique.
- B. Les 2 souris que l'on croise sont des souris +/- et donc porteuses du gène g, on ne peut pas obtenir de souriceaux -/-.
- C., le vecteur seul ne présente aucune invalidation du gène g.
- D. Pas au programme
- E., la recombinaison homologue ne se fait que sur un seul chromosome.

QCM 13 - BD

- A. Ce traitement ne permet pas de guérir les souris malades puisque seules leurs cellules germinales exprimeront la PAH.
- C. On cherche principalement à traiter les cellules hépatiques. De plus, il ne s'agit pas d'un traitement somatique ici.
- E. Les souris seront toujours atteintes de phénylcétonurie puisque cette maladie est due à une accumulation de phénylalanine. Ici, on augmente le taux de tyrosine sans modifier celui de Phe.

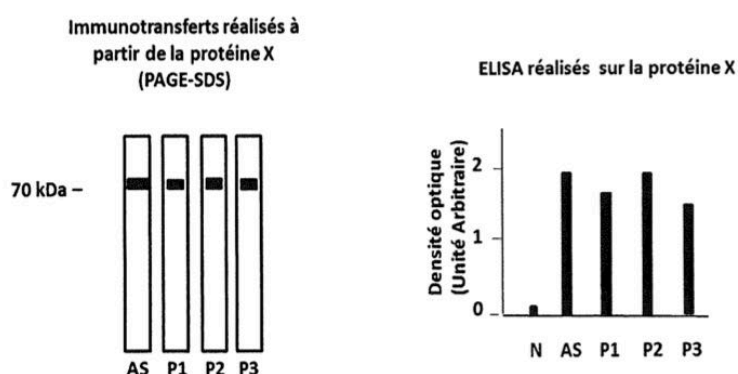
Rangueil 2017-2018

QCM 4 à 6. Vous travaillez sur une allergie alimentaire fréquente chez les enfants, liée à l'ingestion de la protéine X. Le seul traitement efficace est l'éviction de la protéine X de l'alimentation.

QCM 4 - Par immunotransfert, vous testez sur la protéine X purifiée le sérum de 3 patients (P1, P2 et P3) ainsi qu'un antisérum (AS) de chèvre anti-X. La réaction antigène-anticorps est révélée par des antisérums capables de reconnaître tous les isotypes des immunoglobulines (Ig): un anti-Ig de chèvre pour l'AS et un anti-Ig humaines pour les sérums de patients.

Vous testez les mêmes sérums en ELISA sur la protéine X avec plusieurs antisérums anti- Ig d'isotype E marqués par la peroxydase: un anti-IgE de chèvre pour l'AS et un anti-IgE humaines pour les sérums de patients.

Un anticorps ne reconnaissant pas X est aussi testé comme contrôle négatif (N)



Vous pouvez affirmer que:

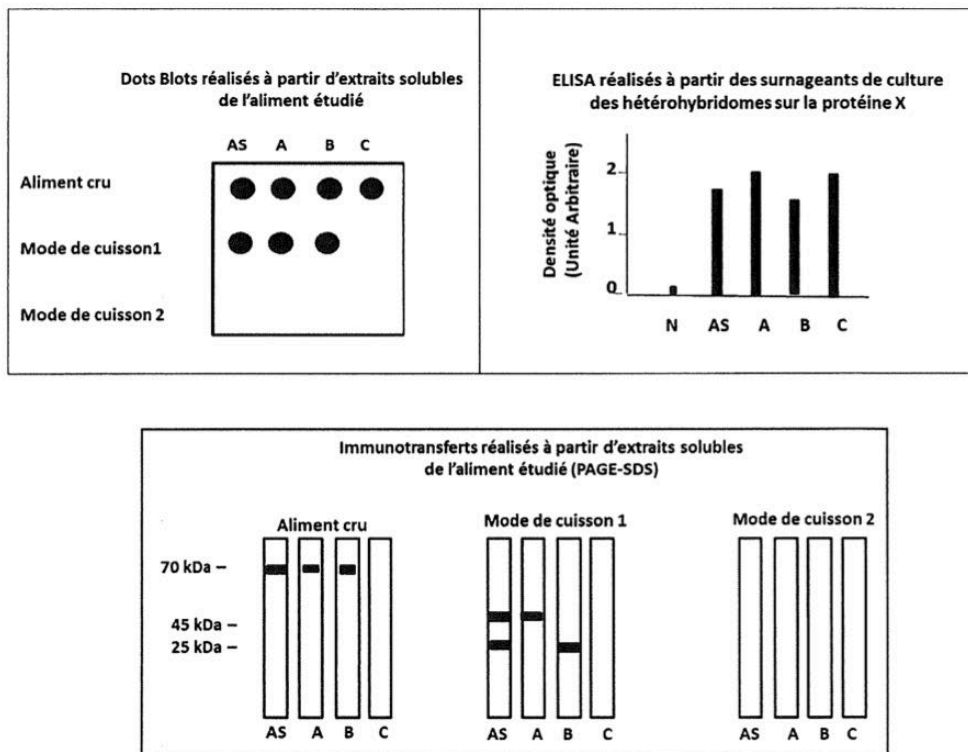
- A. Les sérums des patients P1, P2, P3 contiennent des IgG-anti X.
- B. Les sérums des patients P1, P2, P3 contiennent des IgE-anti X.
- C. Vous avez évalué de façon quantitative la présence des IgE anti-X dans le sérum des patients grâce à un ELISA-sandwich.
- D. Tous les épitopes reconnus sur X par les IgE de ces patients sont des épitopes séquentiels.
- E. Un ELISpot réalisé à partir des cellules du sang des patients aurait permis d'évaluer le nombre de plasmocytes circulants sécrétant des IgE anti-X

QCM 5 - Les polynucléaires basophiles (PNB) des patients allergiques, lorsqu'ils sont activés par X en présence d'IgE spécifiques anti-X, expriment le marqueur protéique CD203 à leur surface et sécrètent de l'histamine. Vous souhaitez explorer les marqueurs de cette allergie chez vos patients. Vous possédez tous les anticorps monoclonaux (ACM) nécessaires.

Vous pouvez affirmer que :

- A. Vous pouvez mettre en évidence la présence de PNB activés à partir des cellules du sang des patients par cytométrie en flux grâce à un AcM anti-CD203.
- B. Vous pouvez doser l'histamine dans le sang circulant des patients en utilisant un ELISA sandwich.
- C. Afin d'étudier in vitro la capacité des PNB à être activés par X, vous pouvez les trier avec des billes magnétiques recouvertes d'un AcM anti-histamine puis les mettre en présence d'IgE anti-X.
- D. L'ELISpot est une technique utilisable pour dénombrer les PNB sécrétant de l'histamine.
- E. Vous pouvez doser l'histamine dans le sang circulant des patients en utilisant un ELISA indirect et un antisérum anti-IgE humaines.

QCM 6 - Dans l'espoir de proposer à vos patients des modes de cuisson permettant de réduire le caractère allergénique de divers aliments riches en protéine X, vous étudiez l'impact sur la protéine X de divers procédés de cuisson de l'un de ces aliments. A partir de lymphocytes du patient P1, vous avez produit des anticorps monoclonaux (ACM) humains anti-X. Vous avez criblé les surnageants des hétérohybridomes par ELISA sur la protéine X et vous avez obtenu 3 ACM: A, B et C. Un anticorps contrôle (N) ne reconnaissant pas X est aussi testé. A partir d'extraits protéiques solubles de l'aliment étudié, vous réalisez une immuno empreinte après électrophorèse en PAGE-SDS et un dot blot.



Vous pouvez affirmer que :

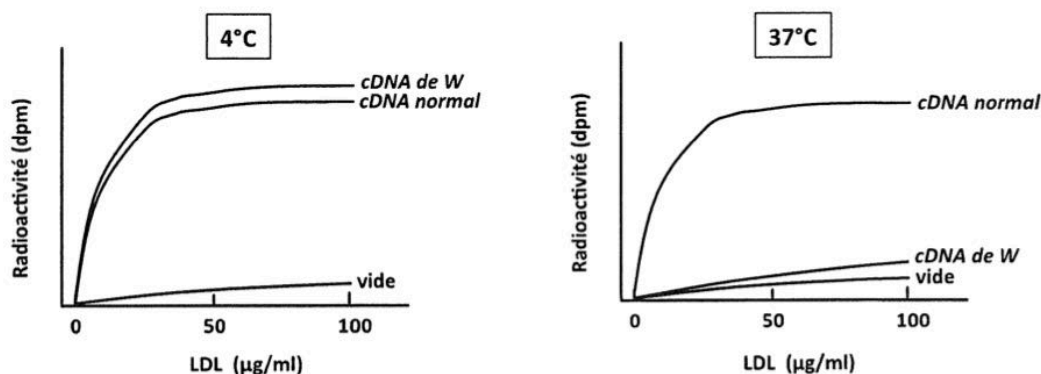
- A. La réaction immune anti-X chez le patient P1 est polyclonale.
- B. Les anticorps produits par le clone C ne reconnaissent pas la protéine X.
- C. Les anticorps produits par le clone C reconnaissent un épitope conformationnel de X détruit lorsque l'aliment a subi le mode de cuisson 1.
- D. Sous réserve de contrôles supplémentaires, ces résultats conduisent à proposer au patient P1 d'utiliser de préférence le mode de cuisson 2.
- E. Les différents modes de cuisson sont à l'origine d'une dégradation plus ou moins importante de la protéine X

QCM 15 - Le patient W, âgé de 7 ans, présente un taux plasmatique de cholestérol d'environ 6 mmol/L. Avant tout traitement hypocholestérolémiant, ce taux de cholestérol avait atteint la valeur de 9,8 mmol/L.

Par séquençage Sanger du gène LDLR (codant pour le récepteur des LDL), la variation nucléotidique c.2483A>G à l'état hétérozygote a été identifiée. Cette transition au niveau du nucléotide 2483 est responsable, au niveau peptidique, de la substitution Tyr828Cys (la tyrosine en position 828 est remplacée par une cystéine).

Vous disposez de fibroblastes humains issus d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale à l'état homozygote par délétion étendue des premiers exons du gène LDLR. Vous transfectez ces fibroblastes soit avec le vecteur ci-dessus vide, soit avec le vecteur contenant le cDNA normal de LDLR, soit avec le vecteur contenant un cDNA de LDLR porteur de la variation c.2483A>G (comme le patient W).

Le surlendemain, vous incubez ces fibroblastes d'abord à 4°C puis à 37°C pendant une heure avec des lipoprotéines LDL marquées à l'iode 125, puis vous mesurez la radioactivité totale associée aux cellules. Vous obtenez les résultats suivants :

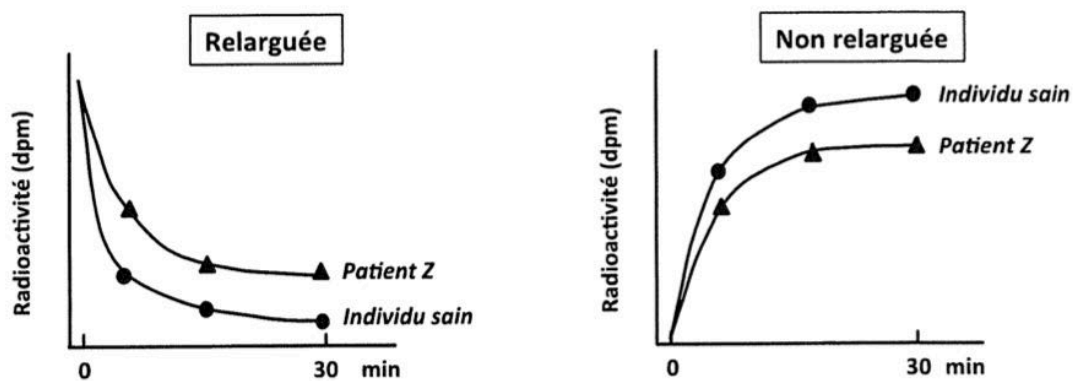


Vous pourrez affirmer que:

- A. Si vous aviez fait un Northern blot sur les ARN extraits des fibroblastes transfectés, vous auriez constaté que les cellules transfectées avec le cDNA porteur de la mutation du patient W contiennent une plus faible quantité du transcrit de LDLR que les cellules transfectées avec le vecteur contenant le cDNA normal.
- B. Si vous aviez fait un Western blot en utilisant un anticorps primaire anti-LDLR dirigé contre la partie N-terminale du récepteur, vous auriez constaté une absence complète de signal dans l'extrait protéique préparé à partir des cellules transfectées avec le CDNA porteur de la mutation du patient W.
- C. La variation c.2483A>G observée chez le patient W bloque l'accès du LDLR nouvellement synthétisé à l'appareil de Golgi.
- D. A la suite de l'incubation à 37°C des cellules avec les LDL, une plus grande quantité d'esters de cholestérol a atteint les lysosomes dans les fibroblastes transfectés avec le CDNA normal de LDLR que dans les fibroblastes transfectés avec le vecteur vide.
- E. Ces résultats peuvent expliquer l'hypercholestérolémie du patient W.

QCM 16 et 17. Un autre patient Z a une hypercholestérolémie, de transmission autosomale. Une étude élargie du génome de ce patient a montré qu'il ne présentait aucune variation nucléotidique pathogène dans le gène LDLR. Par contre, une mutation ponctuelle, à l'état hétérozygote, a été identifiée dans l'exon 2 d'un gène nommé PCSK9. Cette mutation remplace la sérine en position 127 par une arginine (Ser127Arg).

QCM 16 - Pour comprendre les anomalies biologiques chez le patient Z, vous incubez à 4°C des fibroblastes de peau du patient Z (triangles) ou d'un individu sain (cercles) avec des LDL marquées avec de l'iode 125. Puis, après avoir incubé ces cellules à 37°C pendant des temps variables, vous mesurez la radioactivité relarguée (figure de gauche) et la radioactivité non relarguée, toujours associée aux cellules (figure de droite) après lavage des cellules à l'héparine. Vous obtenez les résultats suivants :



Vous pourriez affirmer que:

- A. Pour les fibroblastes du patient Z, la capacité de liaison des LDL radiomarquées est voisine de celle des fibroblastes de l'individu sain.
- B. Après incubation à 37°C, avant lavage à l'héparine, la quantité de LDL radiomarquées présentes à la surface des fibroblastes du patient Z est supérieure à celle des fibroblastes de l'individu sain.
- C. Après incubation à 37°C, la quantité de LDL radiomarquées internalisées par les fibroblastes du patient Z est inférieure à celle des fibroblastes de l'individu sain.
- D. Au temps 0 de cette expérience, le nombre de récepteurs des LDL à la surface des fibroblastes du patient Z est nettement supérieur à celui des fibroblastes de l'individu sain.
- E. Le patient Z présente un risque athérogène élevé.

QCM 17 - Vous souhaitez créer une lignée de souris transgéniques servant de modèle d'étude optimal pour l'anomalie génétique présentée précisément par le patient Z.

Pour obtenir dans un premier temps des souris hétérozygotes pour cette pathologie, vous pourrez :

- A. Introduire, par recombinaison homologue dans des cellules ES, une construction du gène PCSK9 humain dont tout l'exon 1 (portant l'ATG initiateur) a été remplacé par une cassette de sélection positive.
- B. Introduire, par recombinaison homologue dans des cellules ES, une construction du gène PCSK9 de souris dont tout l'exon 2 a été remplacé par la séquence normale (non mutée) de l'exon 2 du gène PCSK9 humain.
- C. Introduire, par recombinaison homologue dans des cellules ES, une construction du gène PCSK9 humain dont l'exon 2 porte la substitution Ser127Arg.
- D. Introduire, par recombinaison homologue dans des cellules ES, une construction du gène PCSK9 humain dont tout l'exon 2 a été remplacé par la séquence humaine normale du promoteur du gène PCSK9.
- E. Introduire, par micro-injection dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé, un vecteur codant pour le gène humain de PCSK9 dont tout l'exon 2 a été délété.

Correction

QCM 4 - BE

On effectue ici un IT et un ELISA en utilisant :

- La protéine X purifiée (qu'on veut reconnaître)
- Un antisérum de chèvre anti-X
- Le sérum de 3 patients (contenant donc chacun divers anticorps humains dirigés contre X)
- Des antisérums dirigés contre les Ig-E respectivement de chèvre et humain pour permettre la révélation.

A. On utilise un AS anti-IgE pour la reconnaissance, les Ig-G ne pourront donc pas être révélés avec la méthode utilisée ci-dessus.

C. On a évalué de façon quantitative la présence de la protéine X grâce à un ELISA indirect, l'item est donc doublement faux.

D. On ne peut pas l'affirmer, le sérum d'un patient contient une multitude d'anticorps dirigés contre la protéine X dont certains reconnaissent probablement un épitope conformationnel.

E. (VRAI) On met les plasmocytes dans une cuve dont les bords sont recouverts de l'antigène X, les plasmocytes sécréteurs vont sécréter des IgE qui vont se fixer dans la proximité immédiate de chaque cellule sécrétrice : on les révèle grâce aux antisérums et on peut numérer les cellules sécrétrices selon le nombre de points observés.

QCM 5 - ABD

A. (VRAI) Avec la cytométrie en flux, on peut trier les cellules reconnues par l'AcM correspondant aux PNB activés.

C. Il faut effectuer la manip dans l'autre sens :

- on met d'abord les PNB en présence d'IgE anti-X
- cela active les PNB qui vont exprimer CD203 à leur surface

-on peut ensuite les trier en utilisant des billes magnétiques recouvert d'AcM anti-CD203 (et non pas anti- histamine).

E. L'antisérum anti-IgE humaines ne permet pas la reconnaissance de l'histamine, il faudrait un ac anti- histamine.

QCM 6 - ACDE

A. (VRAI) Etant donné que la réaction implique plusieurs anticorps monoclonaux, il s'agit d'une réaction polyclonale.

B. C reconnaît un épitope conformationnel (pas de bande en IT mais signal présent en ELISA et sur le dotblot) sur la protéine X, qui disparaît lorsque l'on utilise les modes de cuissons 1 et 2 (disparition des points sur le dotblot).

D. (VRAI) Pour ce mode de cuisson, aucun type d'anticorps ne reconnaît la protéine.

E. (VRAI) Sur l'IT après le mode de cuisson 1, on observe la création de fragments c'est-à-dire une dégradation de la protéine antigénique. (après le mode de cuisson 2 on n'obtient carrément plus de bande du tout).

QCM 15 - DE

A. On voit que la liaison est quasi identique que le LDLR soit muté ou normal, donc ça veut dire que dans les deux cas, on a un nombre de récepteurs quasi identique, et donc un nombre de transcrits aussi similaire.

B. Avec la variation du gène, on a quand même une liaison du Rc LDLR aux LDL, donc la protéine est bien exprimée et on la retrouverait sur un WB.

C. Si le récepteur était bloqué dans le Golgi, il ne serait pas exprimé à la surface, et on n'aurait pas de liaison.

QCM 16 - ABCE

D. Au temps 0 de l'expérience, les deux patients ont la même radioactivité, ce qui signifie que leurs capacités de liaisons sont identiques, donc que leur proportion de récepteur doit être similaire.

QCM 17 - C

A. Cette technique entraînerait un KO du gène car le codon initiateur est supprimé alors que le modèle que l'on veut reproduire est une mutation ponctuelle.

B. Cette technique n'entraînera pas de modification génique car on remplace une séquence normale par une séquence normale...

C. (VRAI) Ainsi on reproduit bien la mutation retrouvée chez le patient.

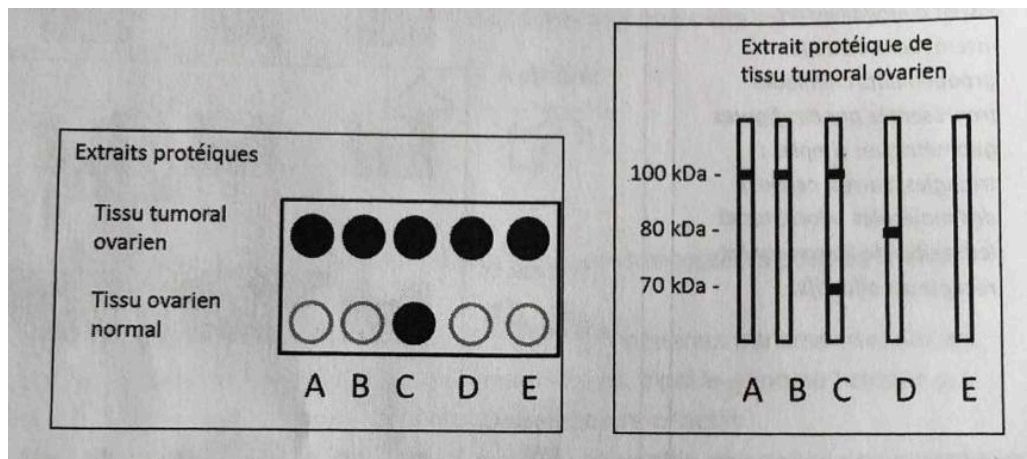
D. Cette technique entraînerait une ablation de l'intégralité de l'exon 2 qui serait remplacée par une séquence différente.

E. Cette technique permet de faire de la mutagenèse insertionnelle : on ajouterait une séquence dans le génome mais elle ne remplacerait pas la séquence que l'on veut modifier.

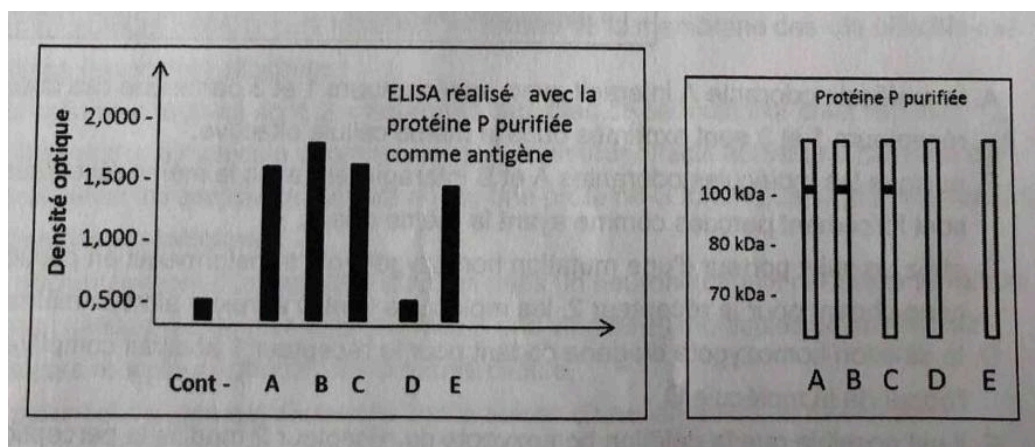
Rangueil 2018-2019

QCM 5 à 7. Vous souhaitez produire des anticorps monoclonaux (ACm) de souris spécifiques du cancer (humain) de l'ovaire pour une utilisation diagnostique et thérapeutique. Vous disposez de tissu ovarien normal et cancéreux (tumoral) et d'une lignée cellulaire humaine (Co) dérivée du même cancer. Vous avez immunisé une série de souris avec un extrait protéique de la lignée Co et vous mettez en œuvre la production d'ACm selon la technologie des hybridomes.

Vous avez criblé les surnageants en immunohistochimie sur la lignée Co, ce qui vous a conduit à sélectionner 5 ACm (A, B, C, D et E) dont vous analysez la réactivité en dot blot et en immunotransfert sur des extraits de protéines hydrosolubles de vos tissus ovariens.



Parallèlement à vos résultats, il a été montré par d'autres chercheurs qu'une protéine P de 100 kDa est surexprimée dans le cancer de l'ovaire. Vous cherchez à savoir si vos anticorps reconnaissent cette dernière : vous réalisez un ELISA et un immunotransfert en utilisant P sous forme purifiée. En ELISA, vous ajoutez un contrôle négatif (Cont-) sans anticorps.



QCM 5 - Vous pouvez affirmer que :

- A. Les ACm A et B reconnaissent le même épitope sur P.
- B. La réactivité de l'ACm C avec la protéine de 70 kDa peut correspondre à une réactivité croisée avec une protéine différente de P présente dans le tissu ovarien normal comme dans le tissu ovarien tumoral.
- C. La protéine de 70 kDa reconnue par l'ACm C résulte du clivage protéolytique de P.
- D. L'épitope reconnu par l'ACm D est un épitope séquentiel présent sur une protéine différente de P.
- E. L'épitope reconnu par l'ACm E sur P est un épitope conformationnel.

QCM 6 - Vous souhaitez développer des tests diagnostiques du cancer ovarien reposant sur le dosage de protéines spécifiques de celui-ci dans le sérum des patients. Au préalable, vous cherchez si les protéines reconnues par vos anticorps sont "libérées" (sécrétées ou libérées par clivage) par les cellules cancéreuses.

- A. Grâce au couple d'ACm A et E, vous pouvez évaluer par ELISpot la capacité des cellules Co à libérer P dans le surnageant de culture.
- B. Grâce au couple d'ACm D et E, vous pouvez évaluer par ELISpot la capacité des cellules Co à libérer P dans le surnageant de culture.
- C. Le couple d'ACm A et B est plus approprié que le couple d'ACm A et E pour développer un ELISA sandwich permettant le dosage de P.
- D. Le couple d'ACm A et C pourrait permettre de doser P en ELISA indirect dans le surnageant des cellules Co en culture.
- E. L'ACm D ne peut pas être utilisé dans un test diagnostique car il n'est pas spécifique du cancer ovarien.

QCM 7 - Vous souhaitez utiliser vos ACm dans le but de détruire spécifiquement les cellules tumorales du cancer ovarien. Vous pouvez affirmer que :

- A. Les ACm de souris ne pourront pas reconnaître leurs cibles antigéniques puisqu'elles sont exprimées par des cellules ovariennes humaines.
- B. Contrairement aux ACm A et B, l'ACm D ne reconnaîtra pas les cellules cancéreuses ovariennes.
- C. L'ACm C est l'ACm le plus approprié pour un couplage à un radio-isotope de haute énergie.
- D. Afin d'éviter une réaction immune contre les ACm injectés, qui les rendrait inefficaces, il serait préférable d'utiliser des anticorps monoclonaux humains.
- E. Les fonctions effectrices activées par les ACm pourraient être optimisées en utilisant des anticorps chimériques Homme/souris, porteurs d'un fragment Fc humain.

QCM 11 - Concernant l'oxygène (O₂), vous pouvez affirmer que:

- A. C'est un gaz incolore, inodore, insipide et peu soluble dans l'eau.
- B. Le transport de l'O₂ dans le sang des poissons est assuré par une hémoglobine dont la structure tridimensionnelle est très différente de celle des oiseaux et des mammifères.
- C. La pression partielle en O₂ de l'air atmosphérique inhalé au niveau de la mer est d'environ 150 mmHg.
- D. La mitochondrie ne produit pas d'anion superoxyde car tout l'oxygène est utilisé par la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP.
- E. La phagocytose s'accompagne d'une activation de la NADPH oxydase et d'une augmentation de la consommation en O₂.

QCM 12 à 14. Pour étudier le rôle de la protéine Apaf1 dans l'apoptose, vous voulez obtenir un modèle murin transgénique présentant une invalidation totale (KO) du gène codant pour Apaf1.

QCM 12 - Pour répondre à cet objectif, vous pouvez :

- A. Injecter, par voie intraveineuse, à des souris femelles un vecteur lentiviral contenant le cDNA humain de Apaf1.
- B. Injecter, par voie intramusculaire, à des souris mâles un vecteur lentiviral contenant le cDNA murin de Apaf1 portant une mutation ponctuelle faux-sens.
- C. Microinjecter, dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé de souris, une construction portant la séquence normale du cDNA humain de Apaf1.
- D. Microinjecter, dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé de souris, une construction portant le cDNA murin de Apaf1 qui contient une mutation non-sens.
- E. Microinjecter, dans le pronucleus mâle d'un ovocyte fécondé de souris, une construction portant un gène suicide (codant pour une toxine) pour réaliser une "ablation génétique".

QCM 13. Après avoir obtenu des souris hétérozygotes pour le KO d'Apaf1 (animaux +/-), vous croisez ces souris entre elles et analysez le génotype de leur descendance, soit au 14ème jour de vie embryonnaire (E14) soit le 1er jour après la naissance (P1).

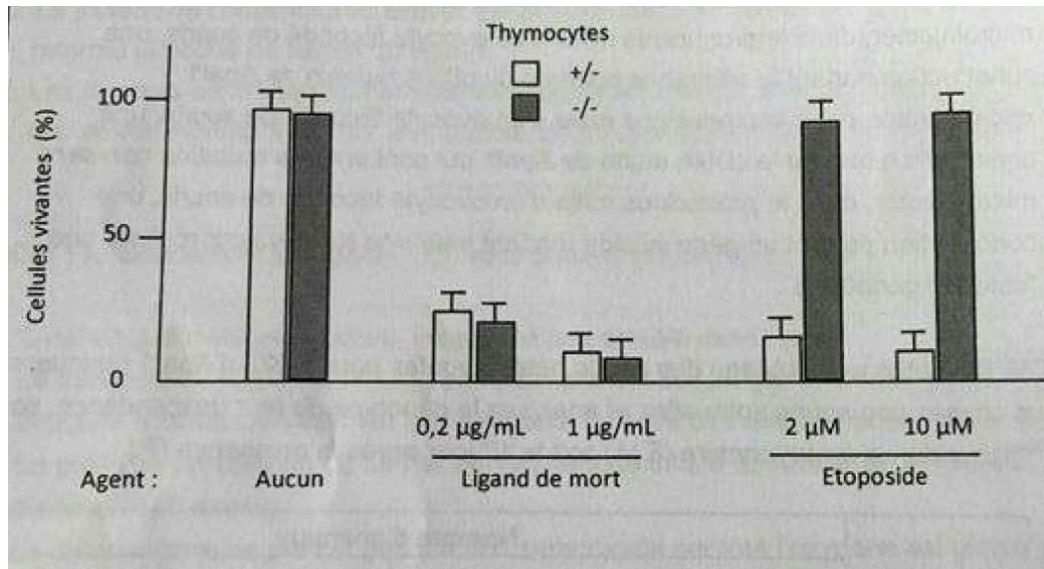
	Nombre d'animaux			
	+/+	+/-	-/-	total
E14	15	29	14	58
P1	63	124	10	197

D'après les résultats obtenus ci-dessus, vous pouvez affirmer que :

- A. Jusqu'à leur 14ème jour de vie embryonnaire, le développement des embryons -/- est sensiblement normal.
- B. Les 10 nouveau-nés -/- qui ont survécu au 1er jour de vie sont des souriceaux chimères, composés de cellules sauvages et de cellules génétiquement modifiées.
- C. Au 1er jour de vie après la naissance, la proportion des nouveau-nés +/- par rapport aux nouveau-nés +/+ est celle attendue pour la transmission d'un caractère mendélien.
- D. A l'état hétérozygote, l'invalidation du gène Apaf1 n'a pas de conséquence néfaste sur le développement.
- E. Une opération de mutagenèse conditionnelle, utilisant une construction avec promoteur inductible et/ou promoteur tissu-spécifique, aurait conduit à l'obtention de 50% de nouveau-nés -/-.

QCM 14 - Vous isolez des thymocytes (cellules du thymus) à partir des souris $+/-$ ou des souris $-/-$. Vous incubez ces cellules pendant 24 heures avec ou sans agents connus pour induire la mort par apoptose de thymocytes $+/+$. Ces agents sont soit un ligand de mort, soit de l'Etoposide, utilisés à différentes concentrations. Ces deux agents sont aussi connus pour entraîner le clivage protéolytique de substrats contenant le motif peptidique DEVD.

Après incubation, vous quantifiez les cellules vivantes de morphologie normale. Vous obtenez les résultats suivants:



Vous pouvez affirmer que:

- A. Après traitement par l'Etoposide, la surface des thymocytes $+/-$ présente plus de "blebs" (évaginations de la membrane plasmique) que celle des thymocytes $-/-$.
- B. Après traitement par l'Etoposide, le feuillet externe de la membrane plasmique des thymocytes $-/-$ contient plus de phosphatidylsérines que celui des thymocytes $+/-$.
- C. L'ADN des thymocytes $+/-$ traités par le ligand de mort (à 1 µg/mL) migrerait en électrophorèse sous l'aspect de fragments en "échelle".
- D. Dans les thymocytes $-/-$ traités par l'Etoposide, des peptides contenant le motif DEVD doivent être moins clivés que dans les thymocytes $-/-$ traités par le ligand de mort.
- E. La protéine Apaf1 ne joue pas de rôle indispensable dans la mort par apoptose induite par le ligand de mort.

Correction

QCM 5 - BDE

- A. Rien ne le prouve.
- C. Rien ne permet de l'affirmer: une autre possibilité est notamment mise en évidence dans l'item B.
- D. (VRAI) L'épitope reconnu par l'ACm C est séquentiel car il ne disparaît pas en immunotransfert, et se trouve sur une protéine différente de P car l'ACm C ne reconnaît pas de protéine de 100 kDa, alors que l'on sait que P fait 10 kDa.
- E. (VRAI) L'épitope est conformationnel car disparaît en immunotransfert.

QCM 6 - A

- B. À l'ELISA l'anticorps D ne reconnaît pas la protéine P.
- C. Les anticorps A et B reconnaissent tous deux des épitopes séquentiels de P, alors que l'anticorps E reconnaît un épitope conformationnel. Ainsi, on est sûr que A et E ne reconnaissent pas le même épitope, ce qui n'est pas le cas pour A et B. Il est donc préférable d'utiliser le couple A et E pour effectuer un ELISA sandwich.
- D. Un ELISA indirect permet le dosage d'anticorps et pas d'antigènes.
- E. En dot blot, on voit que l'anticorps D reconnaît des protéines du tissu tumoral ovarien mais de protéines du tissu ovarien normal. Il semble donc être spécifique du cancer ovarien.

QCM 7 - DE

- A. Au contraire, on a pris des ACm de souris justement pour qu'ils reconnaissent les Ag humains.
- B. Si, elle ne reconnaîtra juste pas la protéine P.
- C. Le moins approprié: il détruirait les cellules cancéreuses ET normales.

QCM 11 - ACE

- B. Non, la structure tridimensionnelle est très similaire (attention pas identique!).
- D. Du moment qu'on utilise de l'O₂, il est impossible de complètement empêcher la formation d'anion superoxyde. (De plus tout l'O₂ n'est pas utilisé par la phosphorylation oxydative)

QCM 12 - TOUX FAUX

- A. Cela n'invaliderait pas le gène codant pour Apaf1 de manière totale et en plus les modifications ne seraient pas transmises à la descendance donc les souris ne seraient pas transgéniques.
- B. Une mutation ponctuelle faux-sens entraînerait l'expression d'une protéine mutée, mais n'invaliderait pas le gène. De plus, les modifications seraient spécifiques aux muscles et ne seraient pas transmises à la descendance.
- C. Cela permettrait l'expression du gène codant pour Apaf1 dans toutes les cellules des souris obtenues, on cherche à l'invalider.
- D. On obtiendrait l'expression d'une protéine Apaf1 mutée et tronquée, le gène ne serait pas invalidé.
- E. On cherche à invalider le gène et pas à tuer les cellules (et éventuellement les souris).

QCM 13 - ACD

- A. (VRAI) Ils représentent environ un quart de la population totale.
- B. On n'a pas créé de souris chimères, mais des souris KO.
- C. (VRAI) Deux fois plus de +/- que de +/+.
- D. (VRAI) Le pourcentage de souris +/- est normal.
- E. Aurait conduit à l'obtention de 25% de nouveau-nés -/-.

QCM 14 - ACDE

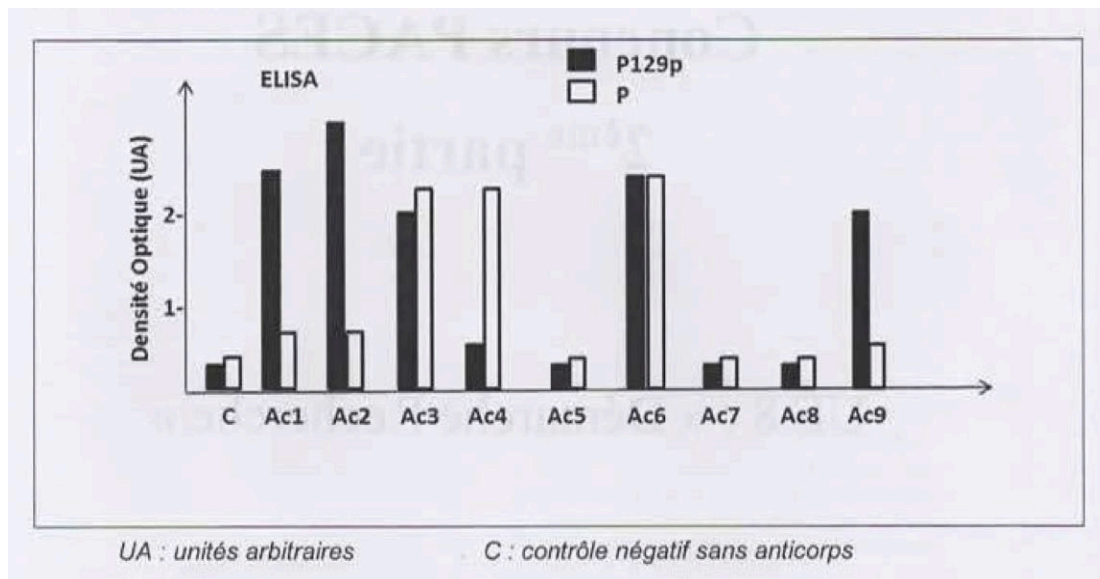
- A. (VRAI) C'est une des caractéristiques des cellules apoptotiques.
- B. La présence de phosphatidylsérines (PS) sur le feuillet externe de la membrane plasmique est un marqueur de l'apoptose. Plus il y en a, moins il y a des cellules vivantes. Après traitement par l'Etoposide, il y a plus de cellules -/- vivantes que de cellules +/- : le feuillet externe de la membrane plasmique des thymocytes contient moins de PS que celui des thymocytes +/-.
- C. (VRAI) Lors de l'apoptose, l'ADN internucléosomal est coupé, entraînant l'apparition de bandes de multiples d'environ 200 pb à l'électrophorèse, ce qui donne un aspect de fragments en "échelle".
- D. (VRAI) L'etoposide n'a pas d'effet sur les thymocytes -/- alors que le ligand de mort entraîne l'apoptose de ces cellules.
- E. (VRAI) Il n'y a pas de différence entre les cellules +/- (exprimant Apaf1) et les cellules -/- (n'exprimant pas Apaf1) après traitement par le ligand de mort donc la présence d'Apaf1 n'est pas indispensable.

Rangueil 2019-2020

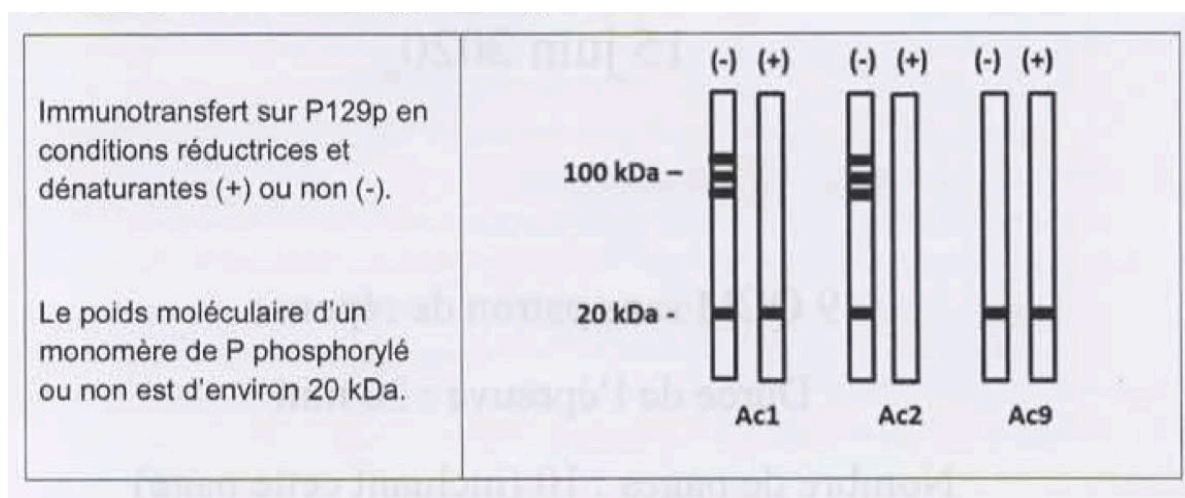
QCM 1 à 3. La maladie neurodégénérative M se caractérise par la présence dans les neurones d'agrégats de la protéine P sous une forme phosphorylée sur la sérine 129 (P129p).

Afin de produire des anticorps monoclonaux (Ac) spécifiques de P129p, vous produisez une forme recombinante de P que vous purifiez et phosphoryler in vitro. Après les différentes étapes de production d'hybridomes chez la souris, vous criblez les surnageants de culture par ELISA sur P et sur P129p.

Ac1 à Ac9 désignent à la fois les différents hybridomes et les anticorps produits par chacun de ces hybridomes.



Vous choisissez de caractériser les Ac1, Ac2 et Ac9 par immunotransfert. Vous souhaitez évaluer leur capacité à reconnaître les formes agrégées ou non de P129p. Pour cela, vous réalisez des électrophorèses de P129p comparativement en conditions réductrices et dénaturantes (+) ou non (-).

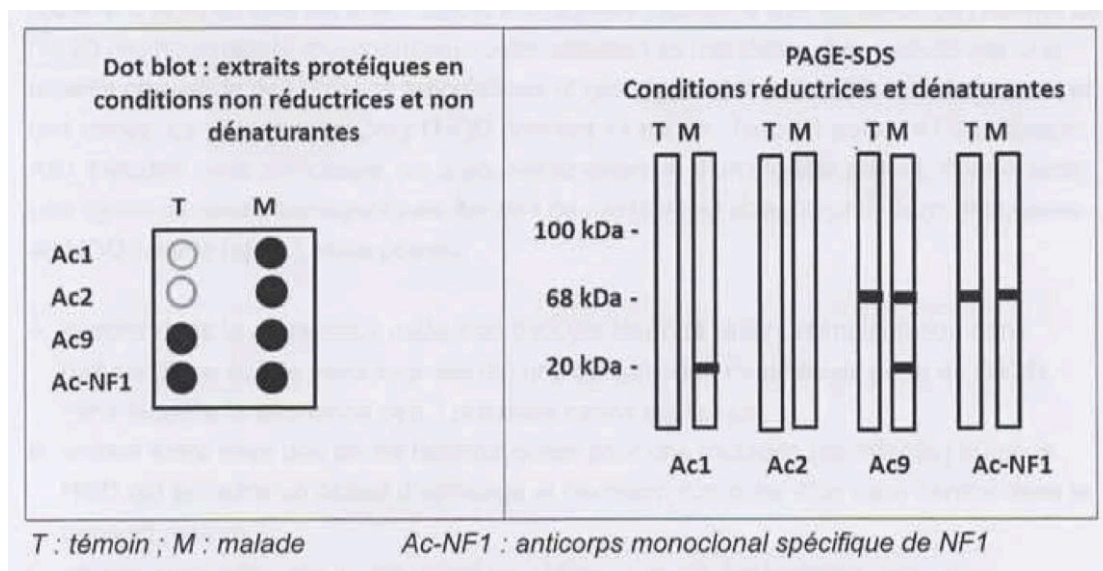


QCM 1 - Vous pouvez dire que :

- A. Les hybridomes Ac5, Ac7 et Ac8 ne sécrètent pas d'Ac ou produisent des Ac qui ne sont spécifiques ni de P ni de P129p.
- B. La sérine 129 phosphorylée est obligatoirement présente dans le ou les épitope(s) reconnu(s) par les Ac3 et Ac6.
- C. Les bandes observées autour de 20 kDa correspondent à P129p.
- D. Les trois bandes observées autour de 100 kDa correspondent à des formes multimériques (agrégats) de P129p qui disparaissent en conditions réductrices et dénaturantes.
- E. L'Ac2 reconnaît un épitope conformationnel présent sur P129p.

QCM 2. Vous voulez vérifier que vos Ac ne présentent pas de réactivité croisée avec une protéine normalement phosphorylée dans les neurones, la protéine NF1 de 68 kDa.

Vous analysez la réactivité de vos Ac sur des extraits protéiques de tissu cérébral d'individus témoins (T) et de malades (M), en dot blot et en immunotransfert après PAGE-SDS.

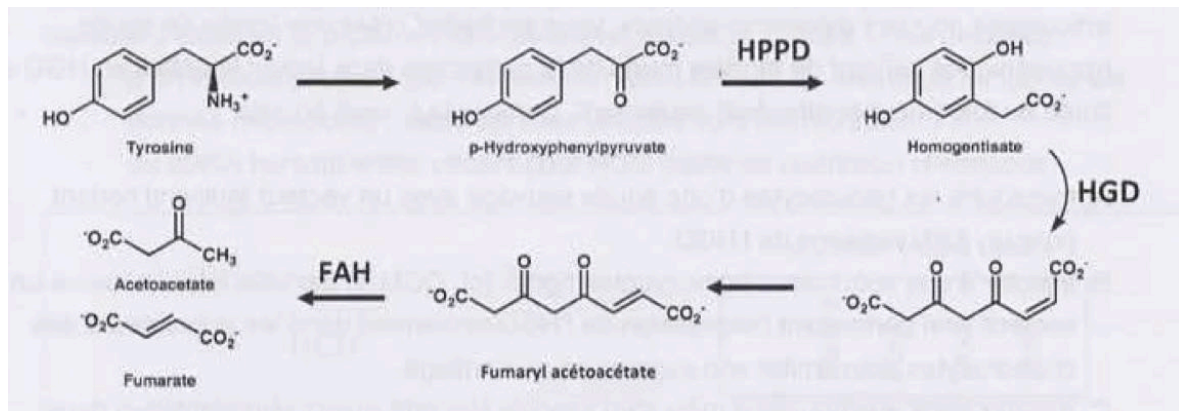


- A. NF1 est présent chez les témoins comme chez les malades.
- B. P129p est présente chez les témoins comme chez les malades.
- C. L'Ac2 reconnaît un épitope conformationnel commun à P129p et NF1.
- D. L'Ac9 reconnaît un épitope séquentiel commun à P129p et NF1.
- E. Parmi les anticorps monoclonaux spécifiques de P129p, tous reconnaissent ses formes agrégées.

QCM 3. Vous souhaitez développer un test biologique pour le diagnostic de la maladie M permettant d'évaluer dans le LCR (liquide céphalo-rachidien) des patients la quantité de la forme soluble non agrégée de P129p, seule forme capable de diffuser.

- A. Vous pouvez doser P129p en ELISA indirect avec l'Ac2.
- B. Vous pouvez doser P129p en ELISA sandwich avec les Ac1 et Ac2.
- C. Sous réserve d'avoir une concentration suffisante de P129p, vous pouvez évaluer semi-quantitativement P129p par immunotransfert après électrophorèse en PAGE- SDS avec l'Ac1.
- D. Sous réserve d'avoir une concentration suffisante de P129p, vous pouvez évaluer semi-quantitativement P129p par immunotransfert après électrophorèse en PAGE- SDS avec l'Ac9.
- E. Vos outils ne vous permettent pas de réaliser un dosage quantitatif de P129p.

QCM 6 :Chez l'Homme, le catabolisme de la tyrosine se déroule ainsi :

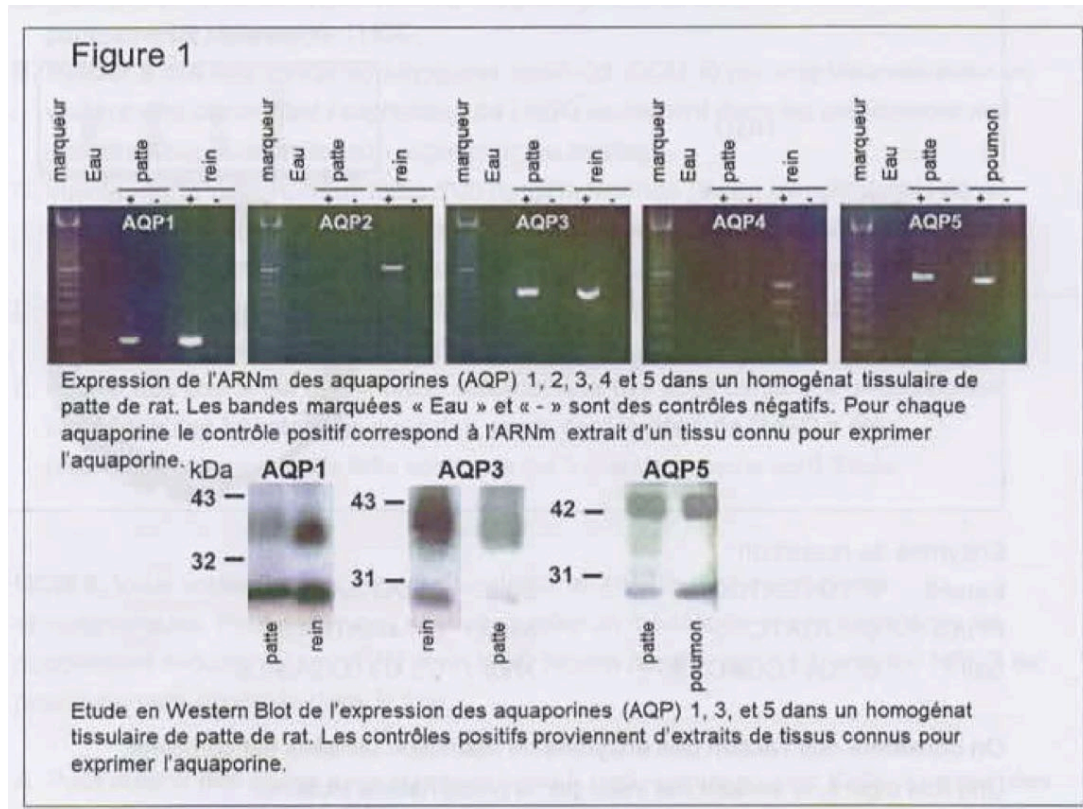


La tyrosinémie de type I est une maladie autosomale récessive sévère due au déficit de l'activité de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAH); elle touche le foie et les reins. Il est à noter que le blocage d'autres étapes de cette voie métabolique est responsable d'autres maladies (erreurs innées du métabolisme) caractérisées par des troubles moins sévères que ceux causés par la tyrosinémie de type I.

Vous voulez tester l'impact d'un déficit en HPPD chez des patients alcaptonuriques. Pour cela, vous souhaitez créer un modèle de souris transgéniques doublement déficitaires en HPPD et en HGD (souris *hppd*^{-/-} *hgd*^{-/-}). L'enzyme HPPD est principalement exprimée dans le foie :

- Pour obtenir des souris transgéniques *hppd*^{-/-} *hgd*^{-/-}, vous pouvez d'abord croiser des souris déficitaires en HGD (*hgd*^{-/-}) et des souris knockout *hppd*^{-/-}.
- (Pas au programme)
- Pour obtenir une lignée de souris transgéniques *hppd*^{-/-} *hgd*^{-/-}, vous pourriez utiliser des cellules ES dérivées d'un blastocyste de souris *hgd*^{-/-}, et les transfecter par une construction appropriée pour parvenir par recombinaison homologue à une invalidation du gène de l'HPPD.
- La concentration urinaire d'homogentisate sera plus élevée chez les souris transgéniques *hppd*^{-/-} *hgd*^{-/-} que chez les souris *hgd*^{-/-}.
- Si les troubles biologiques et cliniques de l'alcaptonurie sont améliorés par le déficit génétique en HPPD, et sachant que ce sont les produits de la réaction catalysée par l'HGD qui sont toxiques, une molécule qui inhiberait spécifiquement l'HPPD pourrait être testée chez des patients atteints de tyrosinémie de type I.

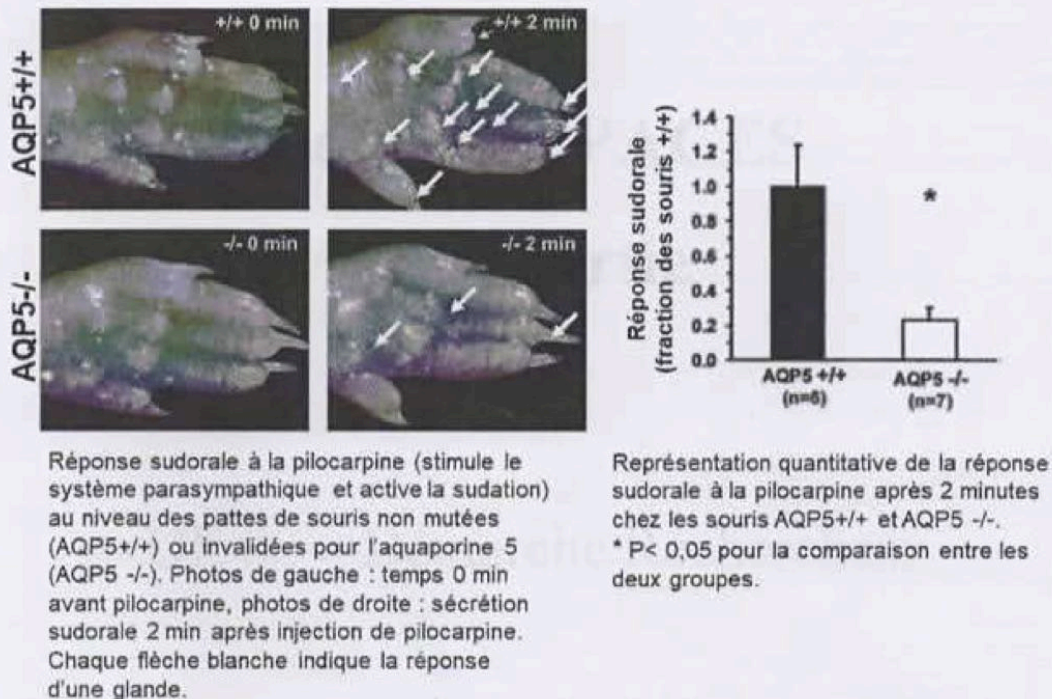
QCM 8 à 9. Rats et souris possèdent des glandes sudorales à la face palmaire des pattes. Elles contribuent à humidifier la surface cutanée, ce qui augmente leur perception tactile. Le présent travail s'est intéressé à l'expression des aquaporines au niveau des pattes de ces rongeurs et à leur implication dans la sécrétion sudorale.



QCM 8. Concernant l'interprétation de cette expérience et en prenant en compte vos connaissances sur les aquaporines (AQP), on peut affirmer que:

- A. Les conditions expérimentales de la Figure 1 n'ont pas permis de détecter les ARNm d'AQP2 et d'AQP4 dans les extraits de patte de rat.
- B. La Figure 1 montre que l'ARNm d'AQP1 est exprimé dans les capillaires de la patte des rats.
- C. Utiliser l'ARNm d'un tissu connu pour exprimer l'AQP d'intérêt comme contrôle positif permet de s'assurer qu'il n'existe pas de contamination dans la solution d'amplification des ARNm.
- D. Le Western blot de la Figure 1 indique que seules l'AQP1 et l'AQP5 sont exprimées au niveau protéique dans les extraits de patte de rat.
- E. Sur le Western blot, la bande supérieure (de plus haut poids moléculaire) pour chaque aquaporine correspond à la forme glycosylée de l'AQP, ce qui suggère son expression à la membrane cellulaire.

Figure 2



QCM 9. Concernant l'interprétation de cette expérience, on peut affirmer que :

- A. D'après la photo avant stimulation par la pilocarpine, l'absence d'AQP5 ne paraît associée à aucune malformation apparente de la face plantaire de la patte chez la souris.
- B. Après stimulation par la pilocarpine, il n'y a pas de réponse sudorale chez les souris mutées AQP5^{-/-}.
- C. Le Figure 2 indique que seule l'AQP5 permet les mouvements d'eau lors de la sudation des pattes de souris.
- D. Le recours à deux espèces différentes d'animaux pour ces expériences (le rat pour la Figure 1 et la souris pour la Figure 2) pose un problème pour affirmer avec certitude le rôle fonctionnel de l'AQP5 dans la sudation de la patte de rat.
- E. La localisation d'AQP5 à l'échelon tissulaire et cellulaire par immunohistochimie serait particulièrement intéressante pour comprendre son rôle précis au cours du phénomène de sudation de la patte.

Correction

QCM 1 - ACDE

- B. Ici on voit sur le premier que pour les hybridomes Ac3 et Ac6, ils sont presque autant retenus par la protéine P que le protéine P129p, donc ils reconnaissent les deux de la même façon et la sérine 129 ne fait pas de réelle différence. La sérine 129 n'est alors pas obligatoirement dans l'épitope reconnu.
- E. (VRAI) En effet, on peut voir qu'en condition dénaturante Ac2 ne reconnaît plus P129p donc l'épitope reconnu est conformationnel (dans le cas contraire il aurait été séquentiel).

QCM 2 - ADE

- B. Au contraire de NF1, P129p (protéine reconnue de 20 kDa) n'est présente que chez les malades.
- C. En effet, il reconnaît un épitope conformationnel (car plus reconnu en conditions dénaturantes), mais cet épitope n'est reconnu que chez les malades. Il n'est alors pas retrouvé sur NF1.
- D. (VRAI) On voit qu'Ac9 reconnaît cet épitope en condition dénaturante comme en condition non dénaturante donc il s'agit bien d'un épitope séquentiel. Et Ac9 reconnaît la protéine de 68 kDa et celle de 20 kDa donc cet épitope leur est bien commun.
- E. (VRAI) En effet, les anticorps spécifiques de P129p sont Ac1 et Ac2 (Ac9 n'est pas spécifique vu qu'il reconnaît aussi NF1) et on voit sur le deuxième document que les deux anticorps reconnaissent bien les formes agrégées de 100 kDa.

QCM 3 - BCD

- A. L'ELISA indirect permet de doser des anticorps et non des antigènes : ici on veut doser P129p donc un antigène.
- E. C'est faux, la technique ELISA sandwich permet ce dosage et nous possédons des anticorps spécifiques de P129p: Ac1 et Ac2 qui nous permettent de la réaliser.

QCM 6 - ACE

- B. (Pas au programme)
- D. Les souris hppd-/-, hgd-/- ne produiront pas du tout d'homogénisate alors que les hgd-/- en produisent et l'accumulent à cause du déficit en enzyme hgd. Donc la concentration urinaire sera plus élevée chez les hgd-/-.

QCM 8 - AE

- B. Rien ne prouve que c'est exprimé dans les capillaires.
- C. Non, cela permet de s'assurer de la validité de l'expérience et que les résultats sont exploitables.
- D. Non, on voit aussi une trace correspondant à l'ARNm de l'AQP3. Donc l'AQP3 est aussi exprimée au niveau protéique dans les extraits de patte de rat.

QCM 9 - ADE

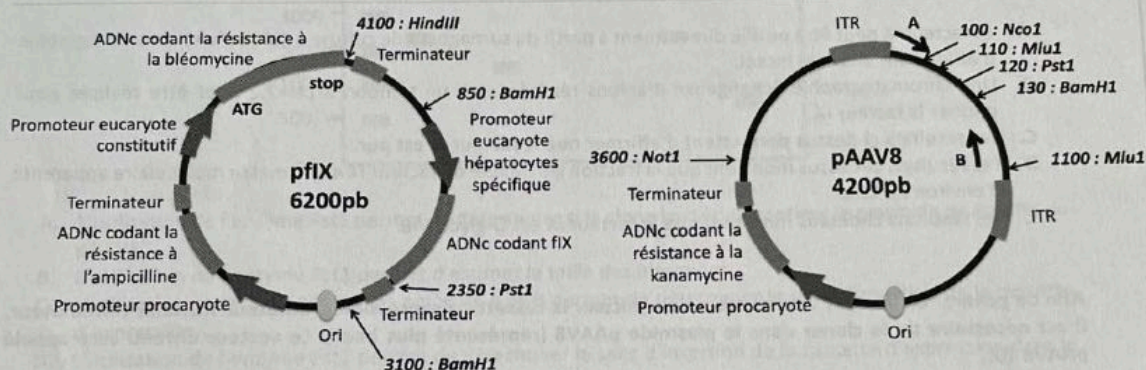
- B. Même si la réponse est significativement moins importante que chez les souris AQP5 +/+, on voit quand même une réponse sudorale chez les souris AQP5 -/-.
- C. Sur les deux documents, on voit que même chez les souris AQP5 -/-, après stimulation par la pilocarpine, il existe une réponse et une sudation au niveau des pattes de souris. On peut alors dire qu'il n'y a pas qu'AQP5 qui permet les mouvements d'eau au niveau des pattes de souris.

PACES doublants 2020-2021

Indiquer le caractère vrai ou faux des affirmations suivantes.

L'énoncé suivant est commun pour les QCM 1 à 5. Vous pouvez répondre de façon indépendante à ces 5 QCM.

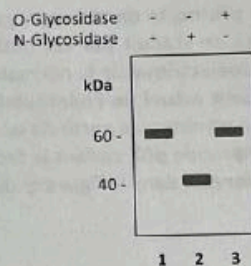
Des chercheurs veulent mettre au point un protocole de thérapie génique pour soigner les patients atteints d'hémophilie B. Cette pathologie héréditaire se traduit par un déficit en facteur IX. Le facteur IX est une glycoprotéine de 60 kDa possédant un point isoélectrique de 6, normalement synthétisé par les hépatocytes, qui joue un rôle dans la coagulation. Le traitement actuel de l'hémophilie B consiste en l'injection 2 à 3 fois par semaine de facteur IX recombinant. Ce dernier est obtenu à partir du surnageant de culture de cellules eucaryotes qui ont été génétiquement modifiées par le plasmide pflX codant le facteur IX. La représentation de 2 plasmides pflX et pAAV8 utilisés par les chercheurs est donnée dans la figure ci-dessous.



QCM1.

- Les cellules eucaryotes transfectées par pflX sont sélectionnées grâce à la résistance à la bléomycine.
- N'importe quelles cellules eucaryotes peuvent être transfectées par pflX et produire le facteur IX.
- Pour que le facteur IX soit sécrété, il doit contenir une séquence dite « signal ».
- Pour être glycosylé, le facteur IX doit être obligatoirement produit dans un système eucaryote.
- Pour analyser la production du facteur IX, un test de coagulation peut être réalisé à partir du surnageant de culture des hépatocytes transfectés.

QCM2. A propos de la purification du facteur IX : une analyse du facteur IX purifié est réalisée par Western Blot, à l'aide d'un anticorps spécifique de la partie protéique, après traitement (+) ou non (-) de la fraction purifiée par une O-glycosidase ou par une N-glycosidase. Le résultat obtenu est représenté ci-dessous :



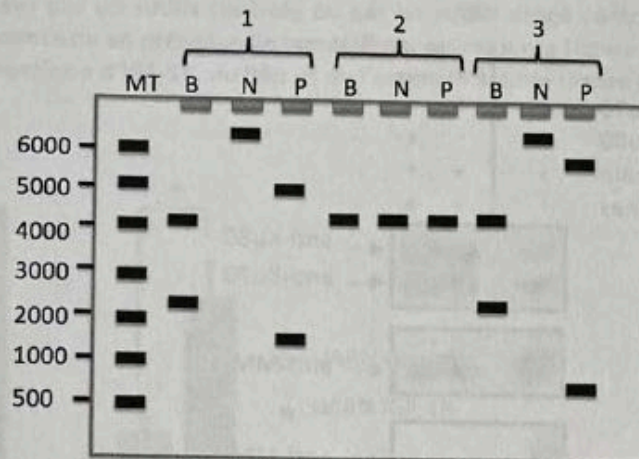
- A. Le facteur IX peut être purifié directement à partir du surnageant de culture à l'aide d'une chromatographie d'affinité sur billes de nickel.
- B. Une chromatographie échangeuse d'anions réalisée avec un tampon à pH=7,2 peut être réalisée pour purifier le facteur IX.
- C. Les résultats ci-dessus permettent d'affirmer que le facteur IX est pur.
- D. Les résultats ci-dessus montrent que la fraction glucidique du facteur IX a une masse moléculaire apparente d'environ 20 kDa.
- E. Les résultats ci-dessus montrent que le facteur IX est O-glycosylé.

Afin de générer un vecteur viral capable de véhiculer la cassette d'expression promoteur-ADNcfIX-terminateur, il est nécessaire de la cloner dans le plasmide pAAV8 (représenté plus haut). Le vecteur obtenu sera appelé pAAV8-fIX.

QCM 3. Pour obtenir le vecteur pAAV8-fIX, les plasmides pAAV8 et pfIX sont digérés par l'enzyme BamH1. Le fragment d'ADN correspondant à la cassette d'expression d'intérêt issu de pfIX, et le vecteur linéarisé pAAV8, sont purifiés et mis en présence dans un tube contenant tous les éléments nécessaires à une ligation. Des bactéries sont ensuite transformées par le produit de ligation.

- A. Les bactéries transformées sont sélectionnées grâce à la résistance à l'ampicilline.
- B. L'origine de réplication sert à la réplication du plasmide dans les cellules transformées.
- C. Cette stratégie correspond à un clonage orienté.
- D. Le plasmide recombinant pAAV8-fIX peut servir à générer des brebis transgéniques qui produiront la protéine fIX recombinante dans le lait.
- E. Le plasmide pAAV8-fIX transfecté dans une cellule eucaryote peut permettre la production de la protéine fIX glycosylée.

QCM4. Trois clones bactériens ont été obtenus après transformation et sélection. Afin d'identifier si les clones correspondent bien à des bactéries transformées, les chercheurs ont extrait l'ADN plasmidique de trois clones bactériens différents (1, 2 et 3). Cet ADN est digéré par différentes enzymes de restriction (B : BamH1 ; N : Nco1 ; P : Pst1). Les fragments obtenus sont analysés sur un gel d'électrophorèse comprenant une piste avec un marqueur de taille (MT). Le gel coloré au SYBrGreen est présenté ci-dessous :

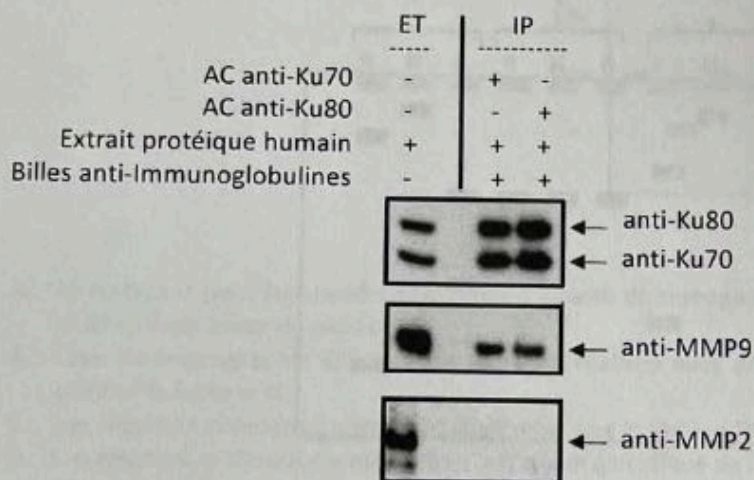


- A. L'utilisation de l'enzyme Pst1 permet de déterminer si le clone bactérien contient le plasmide pAAV8-FIX ou pAAV8.
- B. L'utilisation de l'enzyme Pst1 permet d'estimer la taille des plasmides.
- C. L'utilisation de la PCR utilisant les amorces A et B permet de déterminer le sens d'insertion de la cassette d'expression.
- D. L'utilisation de l'enzyme Pst1 permet de déterminer le sens d'insertion de la cassette d'expression dans le plasmide pAAV8.
- E. Le plasmide extrait du clone bactérien 1 permettra d'obtenir une transcription et une traduction de pflX dans les hépatocytes, alors que le plasmide extrait du clone bactérien 3 ne le permettra pas.

QCM5. Afin de déterminer si la thérapie génique utilisant un vecteur viral codant FIX peut permettre de soigner des patients humains, il est nécessaire de tester auparavant la stratégie dans un modèle murin. Pour cela, les chercheurs ont eu besoin d'un modèle animal d'hémophilie B. Ils ont donc réalisé de la transgénèse par recombinaison (KO du gène FIX) sur les cellules ES.

- A. Dans la transgénèse par recombinaison sur des cellules ES, le transgène est injecté dans des cellules issues d'un blastocyste.
- B. Toutes les cellules des souriceaux obtenus de la mère à qui le blastocyste modifié a été implanté, sont KO pour l'expression de ce gène.
- C. Les cellules ES pourraient être transfectées par utilisation de vecteurs synthétiques (analogues de liposomes).
- D. Les souris transgéniques KO pour les deux allèles du gène codant le facteur IX ainsi que leur descendance (modèle de la pathologie humaine) devront recevoir du facteur IX recombinant tout au long de leur vie.
- E. Un KO du gène pourrait également être obtenu par utilisation de la technique CRISPR/Cas9 sur zygote.

QCM6. Afin d'identifier de nouveaux partenaires de l'hétérodimère Ku, constitué de deux protéines Ku70 et Ku80, une expérience d'immunoprécipitation est réalisée. Pour cela, un anticorps de souris reconnaissant la protéine Ku70 ou la protéine Ku80 est ajouté à un extrait protéique humain (ET). Des billes spécifiques dirigées contre les immunoglobulines sont ajoutées au mélange. Après lavage, les complexes liés aux billes sont analysés par Western Blot grâce à des anticorps dirigés contre Ku70, Ku80, MMP9 ou MMP2. Le résultat obtenu est représenté ci-dessous :



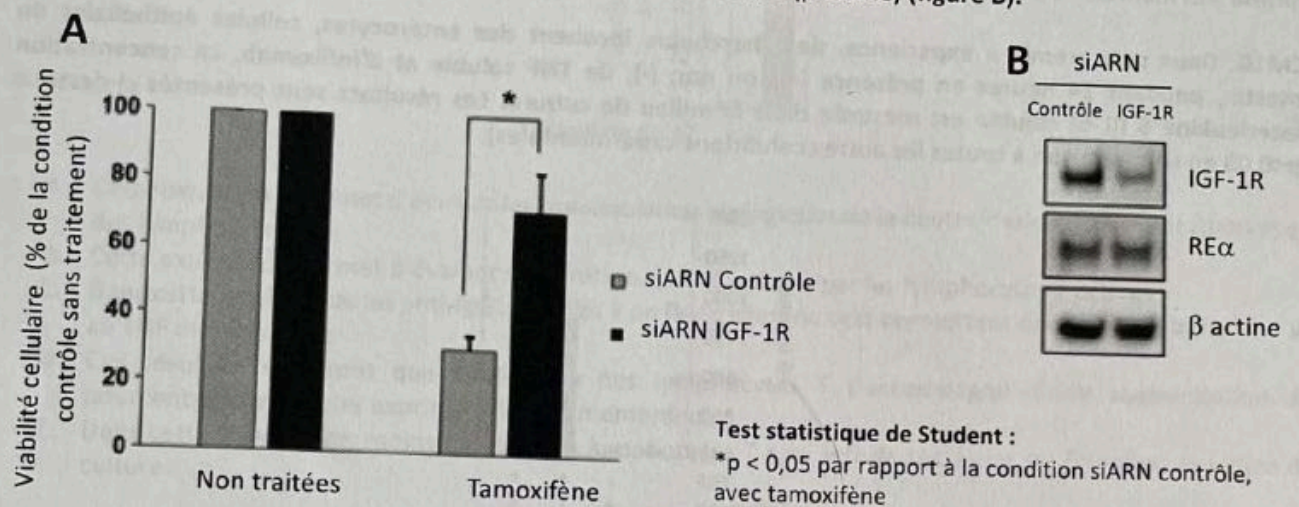
- A. Cette expérience montre que l'hétérodimère Ku interagit avec la MMP9.
- B. Cette expérience montre que seule la protéine Ku70 interagit avec la MMP2.
- C. L'extrait protéique humain ne contient pas la protéine MMP2.
- D. Les billes utilisées pour l'immunoprécipitation doivent être dirigées contre des immunoglobulines de souris.
- E. Cette expérience montre que l'anticorps dirigé contre Ku70 utilisé pour l'immunoprécipitation reconnaît également Ku80.

QCM8. Grâce au système CRISPR/Cas9, des chercheurs ont créé des souris transgéniques exprimant le récepteur humain de l'insuline sous le contrôle du promoteur du TCR. Le promoteur du TCR ne s'exprime que dans les lymphocytes T.

- A. Les souris transgéniques possèdent le gène codant le récepteur humain de l'insuline dans toutes les cellules nucléées.
- B. La recombinaison homologue est nécessaire à l'obtention de ces souris transgéniques.
- C. Pour obtenir ces souris transgéniques, un plasmide contenant la séquence du gène du récepteur humain de l'insuline a été transfecté dans les lymphocytes T.
- D. Les lymphocytes T de ces souris transgéniques expriment le récepteur humain de l'insuline.
- E. Pour qu'une cassure double brin soit créée, l'ARN guide doit contenir une séquence s'hybridant de façon complémentaire et antiparallèle avec la séquence du gène du récepteur humain de l'insuline.

6

QCM9. Le facteur de croissance IGF-1 est connu pour jouer un rôle dans la cancérogenèse mammaire. La perte d'expression de son récepteur, IGF-1R, est associée à une faible efficacité du tamoxifène. Des chercheurs souhaitent déterminer si le récepteur IGF-1R joue un rôle dans la résistance au traitement par le tamoxifène des cancers mammaires hormono-dépendants. Pour vérifier leur hypothèse, ils utilisent les cellules MCF-7, cellules de cancer du sein exprimant le récepteur des œstrogènes (RE α) et sensibles au tamoxifène. Les cellules sont transfectées par un siARN contrôle ou par un siARN dirigé contre IGF-1R (siARN IGF-1R). La viabilité des cellules, en absence ou en présence de tamoxifène, est mesurée (figure A). Un Western Blot permet l'analyse de l'expression protéique d'IGF-1R, du RE α et de l'actine (β actine) (figure B).

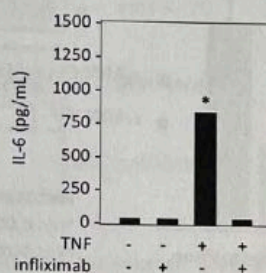


- A. Le tamoxifène entraîne une diminution de plus de 50% de la viabilité des cellules MCF-7 transfectées avec le siARN contrôle.
- B. Le siARN IGF-1R augmente d'environ 100% la viabilité des cellules MCF-7 non traitées.
- C. Le siARN IGF-1R entraîne une diminution importante de l'expression d'IGF-1R, mais pas du RE α dans les cellules MCF-7.
- D. Le siARN IGF-1R entraîne une résistance complète des cellules MCF-7 vis-à-vis du tamoxifène.
- E. Le siARN IGF1R inhibe de façon statistiquement significative l'effet du tamoxifène sur la viabilité des cellules MCF-7.

L'énoncé suivant est commun pour les QCM 10, 11 et 12. Vous pouvez répondre de façon indépendante à ces 3 QCM.

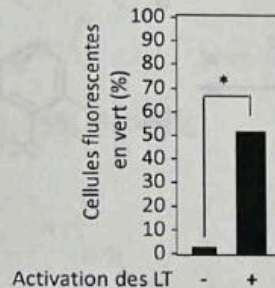
La maladie de Crohn est une maladie autoimmune de l'intestin, caractérisée, entre autres, par une production chronique de cytokines proinflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF). Les patients atteints de cette maladie peuvent être traités par l'infliximab, un anticorps monoclonal de classe IgG1, dirigé contre le TNF. Il existe deux formes de TNF, le TNF soluble, sécrété dans l'environnement extracellulaire et le TNF membranaire, exprimé à la membrane plasmique de leucocytes.

QCM10. Dans une première expérience, des chercheurs incubent des entérocytes, cellules épithéliales de l'intestin, pendant 24 heures en présence (+), ou non (-), de TNF soluble et d'infliximab. La concentration d'interleukine 6 (IL-6) soluble est mesurée dans le milieu de culture. Les résultats sont présentés ci-dessous (* $p < 0,05$ en comparaison à toutes les autres conditions expérimentales).



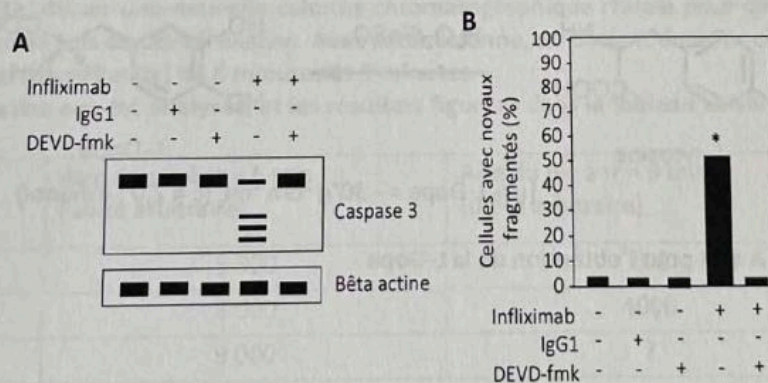
- Ces résultats montrent que l'incubation des entérocytes en présence de TNF soluble s'accompagne d'une sécrétion augmentée d'IL-6.
- La concentration d'IL-6 soluble dans le milieu de culture peut être mesurée par ELISpot.
- Ces résultats montrent que l'infliximab inhibe la sécrétion d'IL-6 induite par le TNF soluble.
- Ces résultats montrent que l'infliximab n'est pas spécifique du TNF mais reconnaît de façon croisée l'IL-6.
- Cette expérience montre que l'infliximab neutralise efficacement le TNF membranaire.

QCM11. Dans une deuxième expérience, une activation polyclonale des lymphocytes T (LT) est induite (+), ou non (-), pendant 24 heures. Les lymphocytes T sont marqués avec l'infliximab et un anti-IgG1 couplé à un fluorochrome vert, avant d'être analysés par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules fluorescentes en vert est déterminé. Dans cette expérience, les anti-IgG1 couplés à un fluorochrome vert n'interagissent pas directement avec les lymphocytes T. Les résultats sont présentés ci-dessous (*p<0,05).



- Cette expérience permet d'évaluer les conséquences biologiques de la neutralisation du TNF sur l'activation des lymphocytes T.
- Cette expérience permet d'évaluer la sécrétion de TNF soluble par les lymphocytes T activés.
- Dans cette expérience, les anti-IgG1 couplés à un fluorochrome vert permettent de détecter l'infliximab lié au TNF membranaire.
- Ces résultats montrent que l'activation des lymphocytes T s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le TNF membranaire.
- Dans cette expérience, moins de 10% des lymphocytes T non activés sécrètent du TNF dans le milieu de culture.

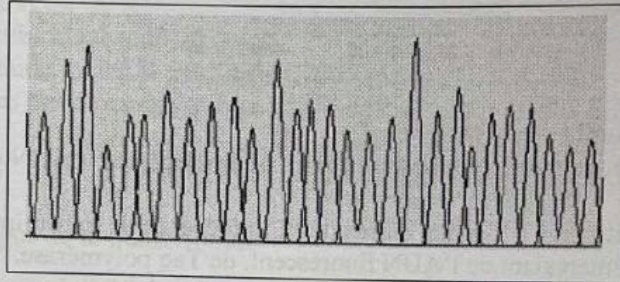
QCM12. Dans une dernière expérience, des lymphocytes T activés sont incubés pendant 24h en présence (+), ou non (-), d'infliximab, d'une IgG1 et d'un inhibiteur de la caspase 3 (DEVD-fmk). Les extraits protéiques sont analysés par Western Blot avec un anticorps dirigé contre la caspase 3 ou un anticorps dirigé contre la bêta actine (Figure A). Alternativement, le pourcentage de cellules ayant un noyau fragmenté est déterminé par microscopie (Figure B), (*p<0,05 en comparaison à toutes les autres conditions expérimentales).



- Dans l'expérience de la Figure A, le clivage de la caspase 3 indique son activation.
- Ces résultats montrent que l'infliximab inhibe la signalisation apoptotique induite par le TNF soluble.
- Dans la condition d'incubation en présence d'infliximab, 50% des lymphocytes T sont morts par apoptose.
- Ces résultats montrent que les effets de l'infliximab sur les lymphocytes T dépendent uniquement de son fragment Fc.
- Ces résultats montrent que l'infliximab peut induire l'apoptose de lymphocytes T activés par un mécanisme dépendant de la caspase 3.

QCM 21 extrait de l'annale du S1 de génome, séquençage SANGER :

QCM 21. Chez un jeune homme, le patient P, atteint de cardiomyopathie, vous analysez le gène *GSD2B* par séquençage Sanger de l'ADN extrait à partir de ses leucocytes. En parallèle, vous faites de même sur de l'ADN extrait des leucocytes d'un individu témoin T.
La lecture des électrophorégrammes du type suivant



donne les séquences ci-dessous, lues de gauche à droite, sachant que le premier pic (à gauche) correspond au fragment le plus petit :

Individu témoin T : ...TTACTCACCATGGTGCCATT...

Patient P : ...TTACTCACTATGGTGCCATT...

Vous pouvez affirmer que :

- A. Chaque pic correspond à un fragment d'ADN portant un 2',3'-didésoxynucléotide à son extrémité 5'.
- B. Chez l'individu témoin T, un brin d'ADN du gène *GSD2B* porte la séquence 5'...AATGGCACCATGGTGAGTAA...3'.
- C. Chez le patient P, un brin d'ADN du gène *GSD2B* porte la séquence 5'... TTACTCACTATGGTGCCATT...3'.
- D. Par rapport à l'individu témoin T, le patient P porte une variation de séquence sur un brin G>A.
- E. A ce stade des investigations (et d'après les seules données de l'énoncé), rien ne permet de dire avec certitude que cette variation est pathogène, c'est-à-dire est responsable de la cardiomyopathie du patient P.

Correction

QCM 1 - ACDE

B. On a devant la séquence d'ADNc codant *flx* un promoteur eucaryote hépatocytes spécifique, donc n'importe quelle cellule eucaryote peut être **transfectée**, MAIS seulement les hépatocytes **produiront** le facteur *flx*.

QCM 2 - BD

- A. Ce n'est pas possible car la chromatographie d'affinité utilisant les billes de nickel sert à purifier les séquences possédant une étiquette ou TAG 6-HIS (6 x histidine)
- C. Au contraire, on confirme qu'il est impur car la fraction purifiée par la N-Glycosidase est plus petite, donc une partie de la protéine a été séparée.
- E. Non, c'est la N-Glycosidase qui a eu un effet, donc le facteur est N-glycosylé.

QCM 3 - BE

- A. Non, on pourrait sélectionner les bactéries pour leur résistance à la kanamycine car on a la séquence codant cette résistance sur notre plasmide. Mais pas d'ampicilline ici.
- C. On utilise ici uniquement BAMH1, donc une seule enzyme de restriction, donc on a un clonage non orienté. Pour qu'il soit orienté il faudrait deux enzymes de restriction.
- D. La protéine fIX recombinante ne sera pas produite dans le lait car le promoteur de notre séquence est spécifique aux hépatocytes, elle sera donc produite dans les hépatocytes.

QCM 4 - ABD

- C. Une PCR utilisant les amorces A et B ne permettra pas de déterminer le sens d'insertion de la cassette d'expression, en faisant ça on n'a aucune information sur le sens d'insertion car peu importe le sens en PCR le résultat sera le même, on verra juste que notre séquence est présente.
- E. C'est faux car les deux clones bactériens 1 et 3 permettront la transcription et la traduction de pflX dans les hépatocytes. Car on peut déduire des tailles des fragments obtenus par la digestion de Pst1 que les deux extraits contiennent bien notre cassette d'expression, mais juste pas insérée dans le même sens.

QCM 5 - ACDE

- B. On part du stade blastocyste, donc certaines cellules auront donc intégré le transgène mais d'autres ne l'auront pas intégré. Toutes les cellules ne seront donc pas transgéniques (certaines auront 0 copie du transgène).

QCM 6 - AD

- B. On n'a aucune trace dans notre dernier rectangle anti-MMP2, donc que ce soit Ku70 ou Ku80 aucune des deux n'interagit avec MMP2.
- C. Si justement, on remarque une trace dans le rectangle anti-MMP2 pour l'extrait protéique humain, c'est donc que l'extrait protéique humain contient quelque chose reconnu par l'anti-MMP2, donc logiquement c'est la protéine MMP2.
- E. Non, cette expérience ne montre pas ça. On a envie de le dire parce qu'on voit qu'après immunoprécipitation avec l'AC anti-Ku70 ou l'AC anti-Ku80 on obtient les mêmes résultats. Or attention à l'énoncé, on a un hétérodimère constitué de Ku70 et Ku80 donc ce résultat est normal ! Si on purifie l'une des deux on a forcément l'autre qui vient avec, car elles sont en hétérodimère.

QCM 8 - ABD

- C. Par recombinaison homologue, le plasmide a dû être transfecté dans les cellules souches d'un blastocyste d'une souris afin d'obtenir des souris transgéniques. Pas juste dans les lymphocytes T, sinon aucun intérêt on n'obtiendra pas de lignée transgénique. Ces lymphocytes sont uniquement les cellules dans lesquelles le récepteur humain de l'insuline sera exprimé et produit.
- E. Ce n'est pas l'ARN guide mais **l'ADN guide** qui doit contenir la séquence.

QCM 9 - ACE

B. Il n'augmente pas de 100% la viabilité des cellules non traitées, on voit qu'il n'y a aucune différence qu'avec les cellules contrôle, ici il n'y a pas de traitement donc pas encore d'impact de notre expérience. La viabilité reste à 100% ce qui est normal sans traitement.

D. Le siARN IGF-1R entraîne une résistance incomplète car on voit que la viabilité cellulaire n'est tout de même pas de 100% mais d'environ 70%. Donc le tamoxifène a une moins bonne efficacité, mais celle-ci n'est pas nulle.

QCM 10 - AC

B. Non, ELISpot permet de quantifier le nombre de cellules sécrétrices d'antigènes, pas de quantifier le nombre d'antigènes directement. Ici en ELISpot on pourrait numérer le nombre de cellules sécrétrices d'IL-6.

D. On en sait rien, ici on peut juste déduire que l'infliximab permet d'inhiber la sécrétion d'IL-6 produite par le TNF soluble, c'est tout.

E. L'expérience utilise ici le TNF soluble, on n'a aucune information à tirer ici à propos du TNF membranaire.

QCM 11 - CD

A. Non, cette expérience permet de voir le pourcentage de LT qui en s'activant augmentent leur expression de TNF membranaire.

B. Non plus, (voir A) ici on se concentre sur les LT directement donc le TNF membranaire.

E. Le moins de 10% représente le pourcentage de LT exprimant du TNF membranaire même lorsqu'ils sont inactivés.

QCM 12 - ACE

B. Rien à voir, on comprend ici que l'infliximab induit justement une activation apoptotique en clivant la caspase 3 et donc en l'activant.

D. Non justement, cette expérience montre que l'infliximab n'a pas uniquement un impact sur les fragments Fc des lymphocytes T, mais a aussi un rôle d'induction d'apoptose des lymphocytes T dans un mécanisme impliquant la caspase 3.

QCM 21 - BCDE

A. Lorsqu'on fait un séquençage selon Sanger, on utilise des nt synthétiques : les didésoxynucléotides (ddnt). Ainsi, on va synthétiser de 5' en 3' un brin complémentaire et antiparallèle à celui que l'on veut séquençer. Dès qu'un ddnt est ajouté, la synthèse s'arrête. On retrouve donc le ddnt au niveau de l'extrémité 3' du fragment.