



Méthode Pour l'Épreuve de l'Expérience





Présentation de l'épreuve





- En UE2 il y a 45 QCM pour 60 minutes d'épreuve
- 15 QCM De Biologie Cellulaire souvent divisés entre une partie cours et une partie expérience (*bien que le Pr. Gilson puisse décider de faire seulement des QCM d'expérience/de cours*)
- L'épreuve d'expérience va demander un maximum de concentration, va faire appel à vos capacités d'analyses, de déduction, à votre raisonnement scientifique ++, et à un certains nombre de connaissances pour vous faciliter la compréhension de l'expérience.
- Pas la plus simple des épreuves (surtout en terme de **temps** et de stress ...) mais elle pourra vous rapporter des points qui peuvent vous faire prendre un certain avantage. ++



Stratégie et conseils



salu salu c moa votre meilleur poto pour l'experience

- Pensez à apporter un **SURLIGNEUR** (en plus de votre PaperMate noir) pour surligner les **informations importantes** de l'expérience.
 - Il est primordial de bien **TRIER** les informations.
- Certaines parties du texte qui pourra vous être proposé seront **inutiles** pour la résolution des QCM → **ne pas s'attarder dessus.**
- But du surlignage = bien repérer les éléments qui pourront vous être utiles à la résolution des QCM
 - Difficulté première de l'expérience est **le temps ++**
-  **FAIRE L'EXPÉRIENCE À LA FIN ++++++** 
- Pour un QCM donné, toujours faire attention à ce que l'expérience **SUGGÈRE** ou **DÉMONTRE** (la nuance est importante +++ *c'est pas comme si je vous l'avais dit 50 fois*)



Expérience n°1

Minutes		120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
Puits	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

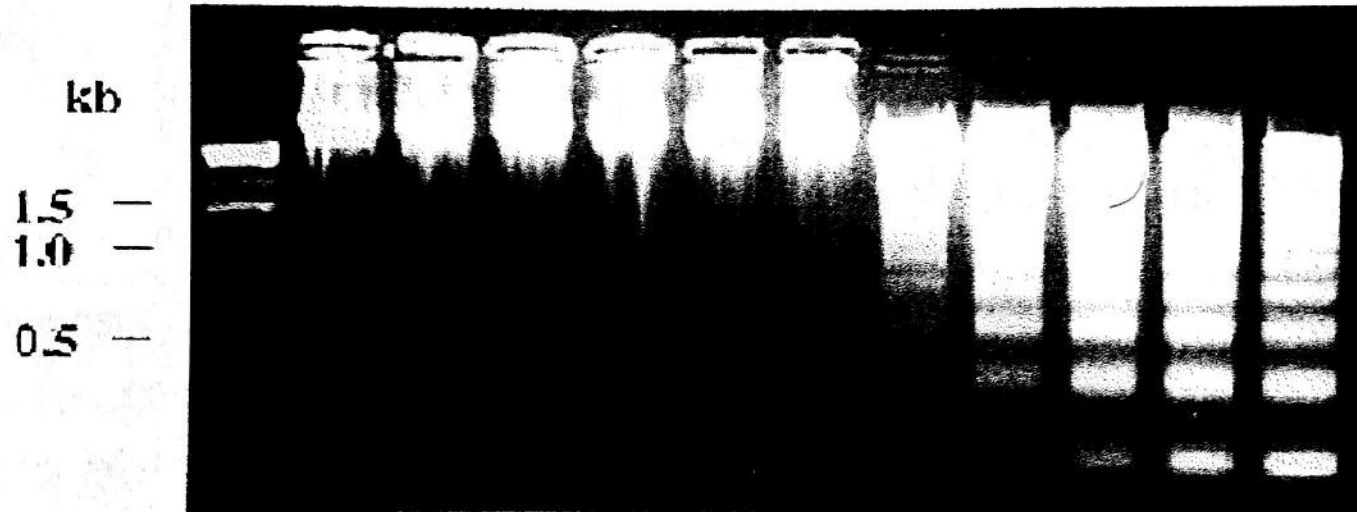


Figure 2

Expérience montrant un gel d'agarose après migration de l'ADN génomique. Les cellules des puits 1 et des puits 7-11 ont été traitées pendant des temps croissants (en minutes) par de la staurosporine, un antibiotique induisant l'apoptose.

Les cellules des puits 2-6 n'ont pas été traitées par la staurosporine.

Dans l'expérience du puits 1, les cellules ont aussi été transfectées avec un ARN interférant (siRNA) dirigé contre l'ARNm du gène codant pour la caspase-3. M = marqueurs de poids moléculaires.



Minutes		120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
Puits	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

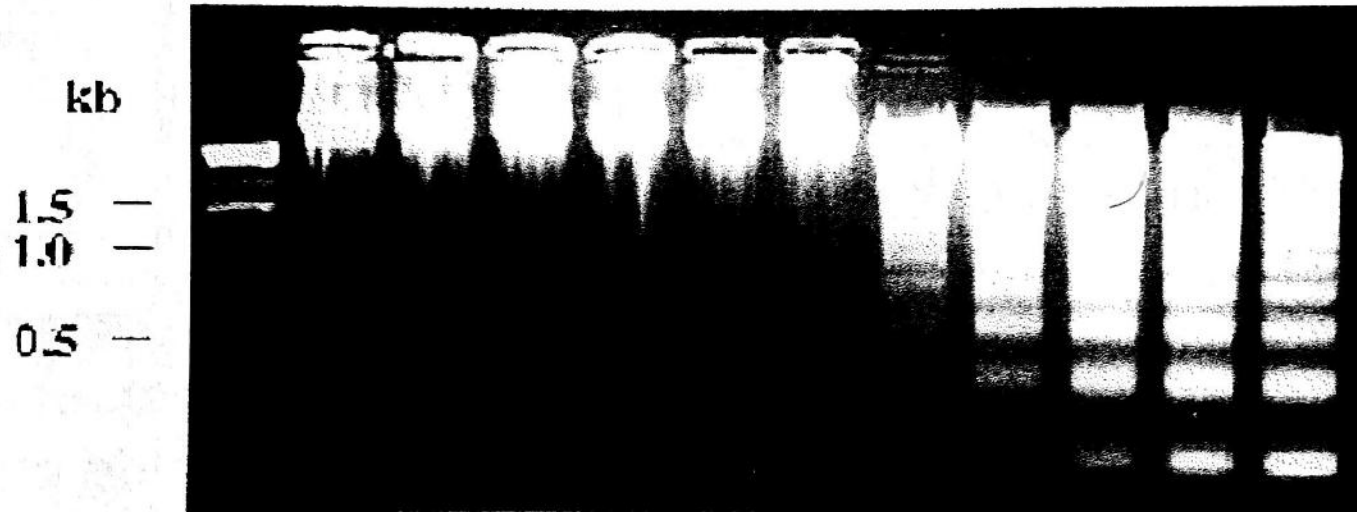


Figure 2

Expérience montrant un gel d'agarose après migration de l'ADN génomique. Les cellules des puits 1 et des puits 7-11 ont été traitées pendant des temps croissants (en minutes) par de la staurosporine, un antibiotique induisant l'apoptose.

Les cellules des puits 2-6 n'ont pas été traitées par la staurosporine.

Dans l'expérience du puits 1, les cellules ont aussi été transfectées avec un ARN interférant (siRNA) dirigé contre l'ARNm du gène codant pour la caspase-3. M = marqueurs de poids moléculaires.

■ QCM 1: Donnez la/les vraies concernant la figure 2 ci-jointe :

- A) Les résultats démontrent que l'apoptose est accompagnée par une dégradation de l'ADN génomique
- B) Les résultats démontrent que la caspase-3 est une nucléase (détruit l'ADN génomique)
- C) Les résultats démontrent que les nucléosomes ne sont pas détruits lors de l'apoptose
- D) Les résultats suggèrent que l'apoptose induit la réplication de l'ADN
- E) ABCD fausses

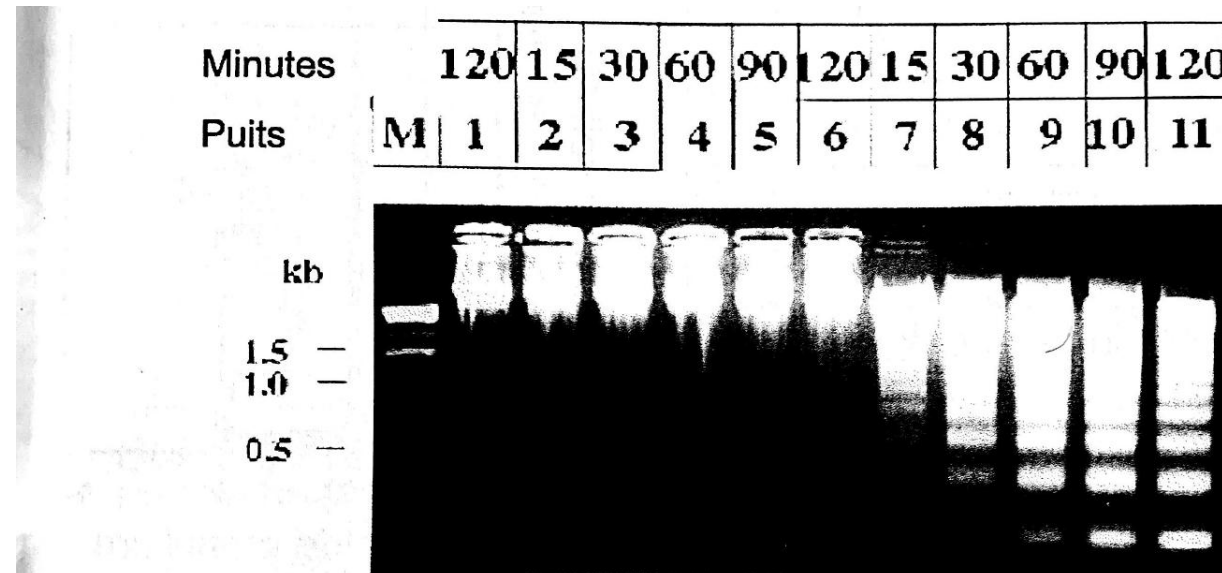


Figure 2

Expérience montrant un gel d'agarose après migration de l'ADN génomique. Les cellules des puits 1 et des puits 7-11 ont été traitées pendant des temps croissants (en minutes) par de la staurosporine, un antibiotique induisant l'apoptose.

Les cellules des puits 2-6 n'ont pas été traitées par la staurosporine.

Dans l'expérience du puits 1, les cellules ont aussi été transfectées avec un ARN interférant (siRNA) dirigé contre l'ARNm du gène codant pour la caspase-3. M = marqueurs de poids moléculaires.



• **QCM 1 : Donnez la/les vraies concernant la figure 2 ci-jointe :**

A) Les résultats démontrent que l'apoptose est accompagnée par une dégradation de l'ADN génomique

B) Les résultats démontrent que la caspase-3 est une nucléase (détruit l'ADN)

C) Les résultats démontrent que les nucléosomes ne sont pas détruits lors de l'apoptose

D) Les résultats suggèrent que l'apoptose induit la réplication de l'ADN

E) ABCD fausses

→ **Explications**

Réponses A et B:

La **staurosporine induit l'apoptose** quand elle est injectée dans une cellule (donnée énoncé).

Quand on l'injecte dans une cellule, on a une **fragmentation de l'ADN** (puits 7,8,9,10,11).

On pourrait penser que c'est la staurosporine qui fragmente l'ADN directement.

MAIS, quand on ajoute de la staurosporine dans une **cellule qui n'exprime pas la caspase 3** grâce à un ARN interférent, **on n'a pas de fragmentation de l'ADN** (puits 1).

→ On en déduit que ce n'est pas la staurosporine qui induit directement la fragmentation de l'ADN mais bien **les processus apoptotiques dans les cellules cibles** (cf. cours sénescence/apoptose de Dams&Tiff <3). **Réponse A**

→ On **démontre que la caspase 3 est une nucléase responsable de la fragmentation de l'ADN** lors de l'apoptose (on n'a pas de fragmentation lorsqu'on n'a pas de caspase, dans le puits 1). **Réponse B**

Réponses C et D:

Rien ne permet de **démontrer** la réponse C ++

La D est complètement **fausse et illogique**, et de plus, rien n'aurait pu le démontrer ici ...



Expérience n°2

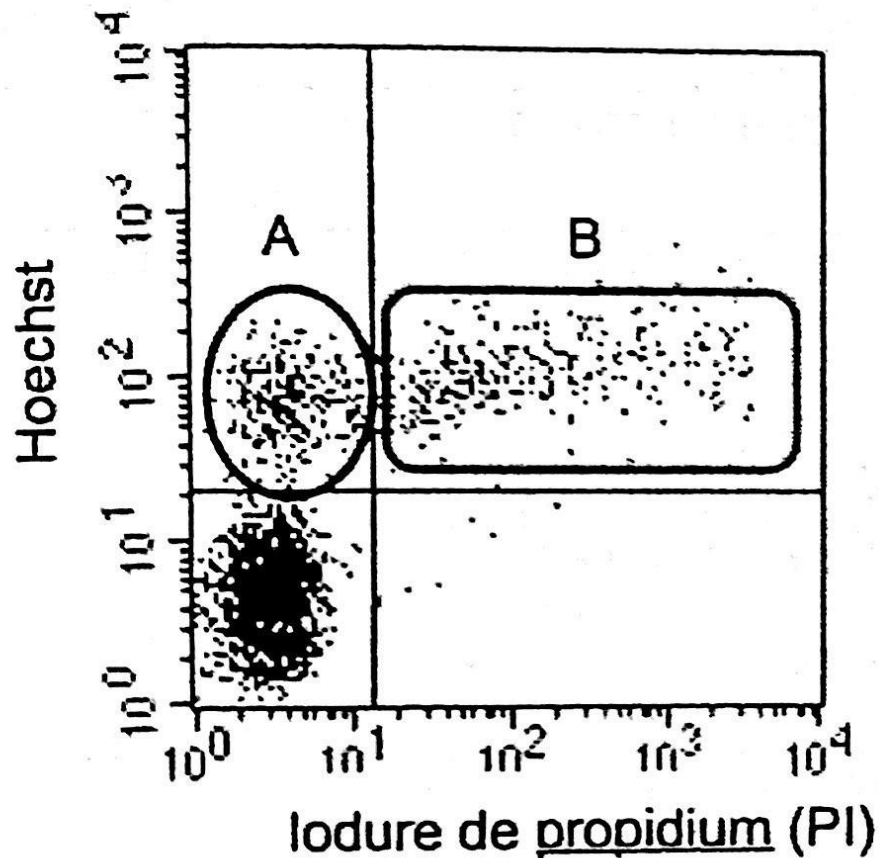


Figure 4

Expérience de cytométrie de flux où des cellules non perméabilisées sont traitées à l'iodure de propidium (PI) et par l'Hoechst, deux composés devenant fluorescent lorsqu'il est fixé à l'ADN. Contrairement à l'Hoechst, le PI est incapable de traverser la membrane plasmique.

La quantité de fluorescence incorporée par les cellules provenant du Hoechst et du PI est indiqué en ordonnée et en abscisse, respectivement. Chaque point est une cellule analysée.



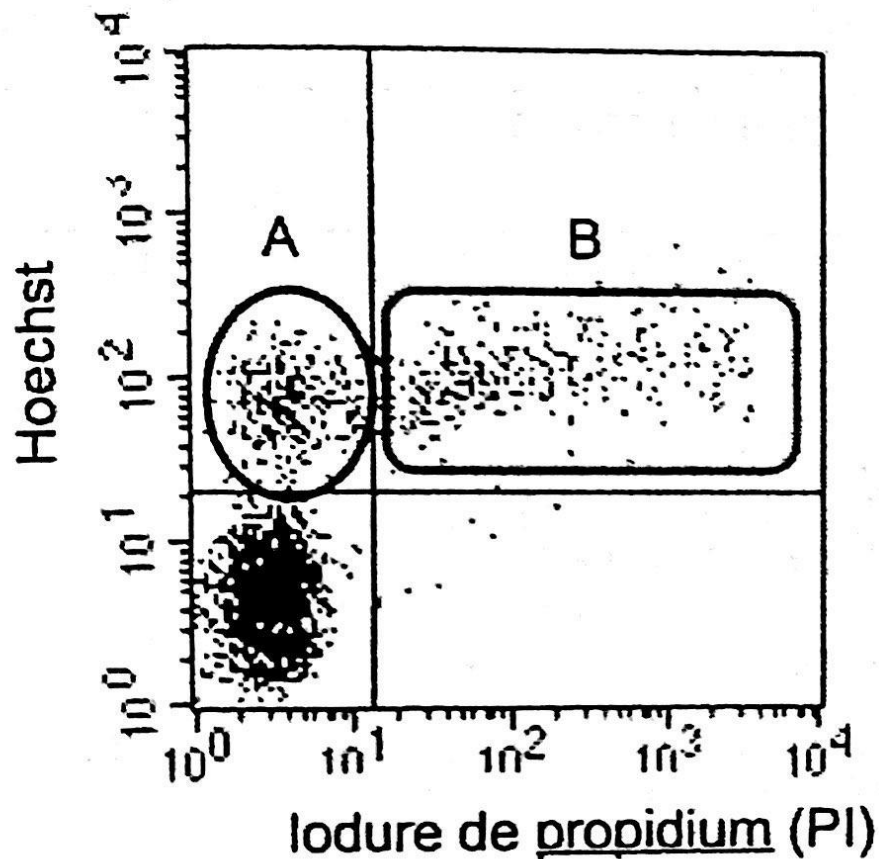


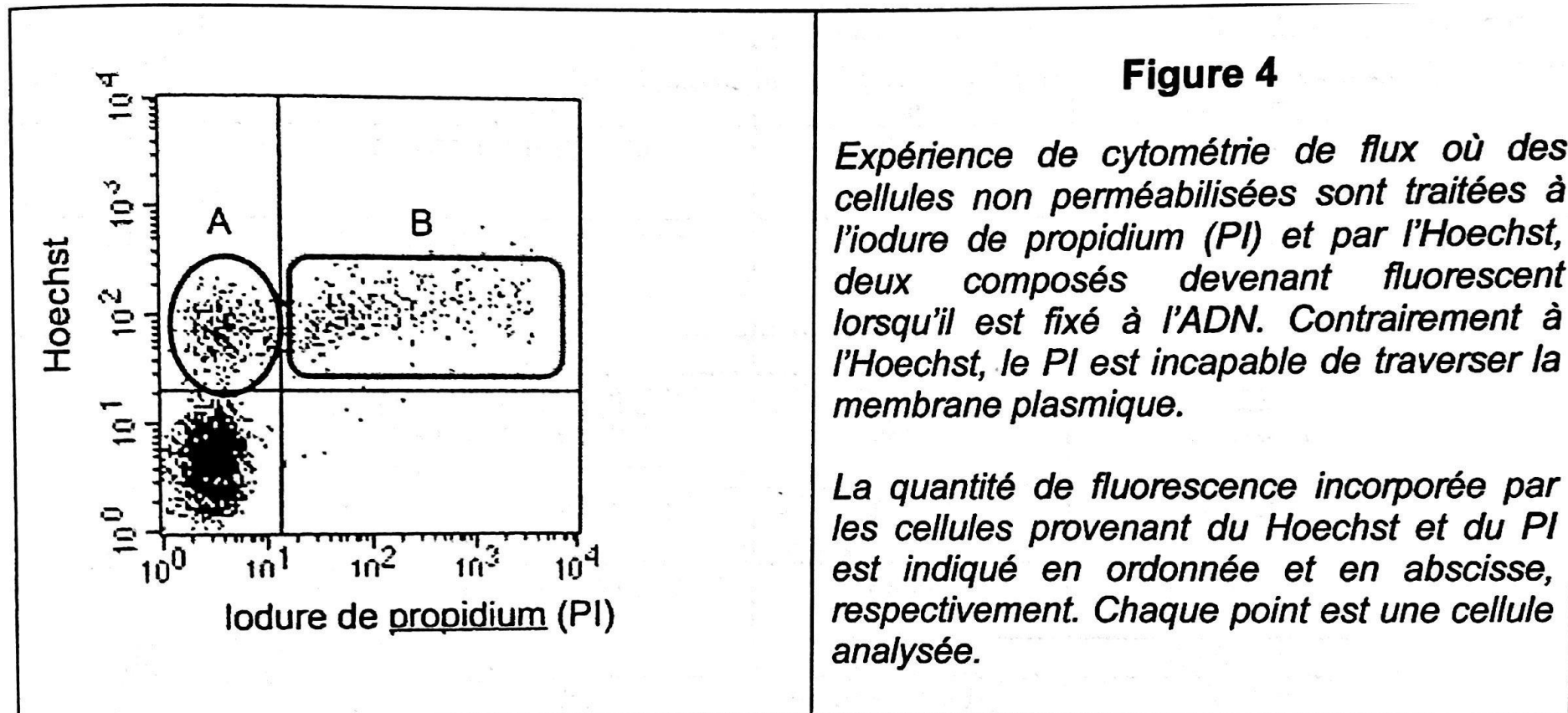
Figure 4

Expérience de **cytométrie de flux** où des cellules **non perméabilisées** sont traitées à l'iodure de propidium (PI) et par l'Hoechst, deux composés **devenant fluorescent lorsqu'il est fixé à l'ADN**. Contrairement à l'Hoechst, le **PI est incapable de traverser la membrane plasmique**.

La quantité de fluorescence incorporée par les cellules provenant du Hoechst et du PI est indiqué en ordonnée et en abscisse, respectivement. Chaque point est une cellule analysée.

QCM 2: Donnez la/les vraies concernant la figure 2 ci-jointe :

- A) L'intégrité des membranes plasmiques des cellules en B est conservée
- B) Les cellules en A incorporent du Hoechst mais pas du PI
- C) Les cellules nécrotiques ne peuvent pas incorporer du PI
- D) Les cellules en A sont forcément mortes
- E) ABCD fausses

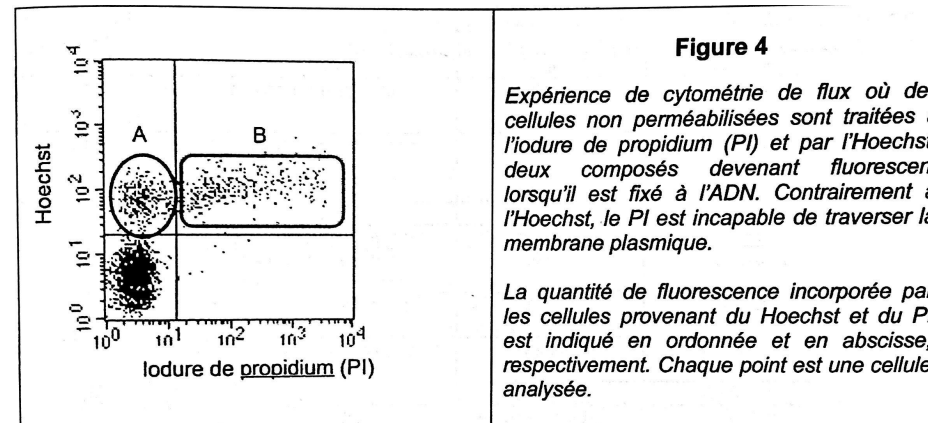


QCM: Donnez la/les vraies concernant la figure 2 ci-jointe :

- A) L'intégrité des membranes plasmiques des cellules en B est conservée
- B) Les cellules en A incorporent du Hoechst mais pas du PI
- C) Les cellules nécrotiques ne peuvent pas incorporer du PI
- D) Les cellules en A sont forcément mortes
- E) ABCD fausses

→ Explications

- A) Le PI se fixe sur l'ADN des cellules B, étant donné qu'il ne peut passer à travers les membranes, celles-ci sont **forcément trouées**
- B) Simple lecture graphique
- C) FAUX: **Les cellules nécrotiques peuvent au contraire incorporer le PI**
- D) Non, l'Hoeschst n'a pas besoin de perméabilisation de la membrane pour se fixer à l'ADN, rien ne porte à croire qu'elles sont mortes.
- E) Faux





ANTA
ODGE

TA TETE QUAND TU VAS VOIR L'EXPÉRIENCE 3

©

Un modèle murin de carcinogénèse hépatique consiste à transplanter dans le foie de souris des cellules progénitrices embryonnaires (hépatoblastes) qui ont été transduites in vitro par des vecteurs rétroviraux exprimant l'allèle oncogénique de la protéine Ras (RasV12) et un ARN interférant inhibant l'expression du gène p53 (shp53).

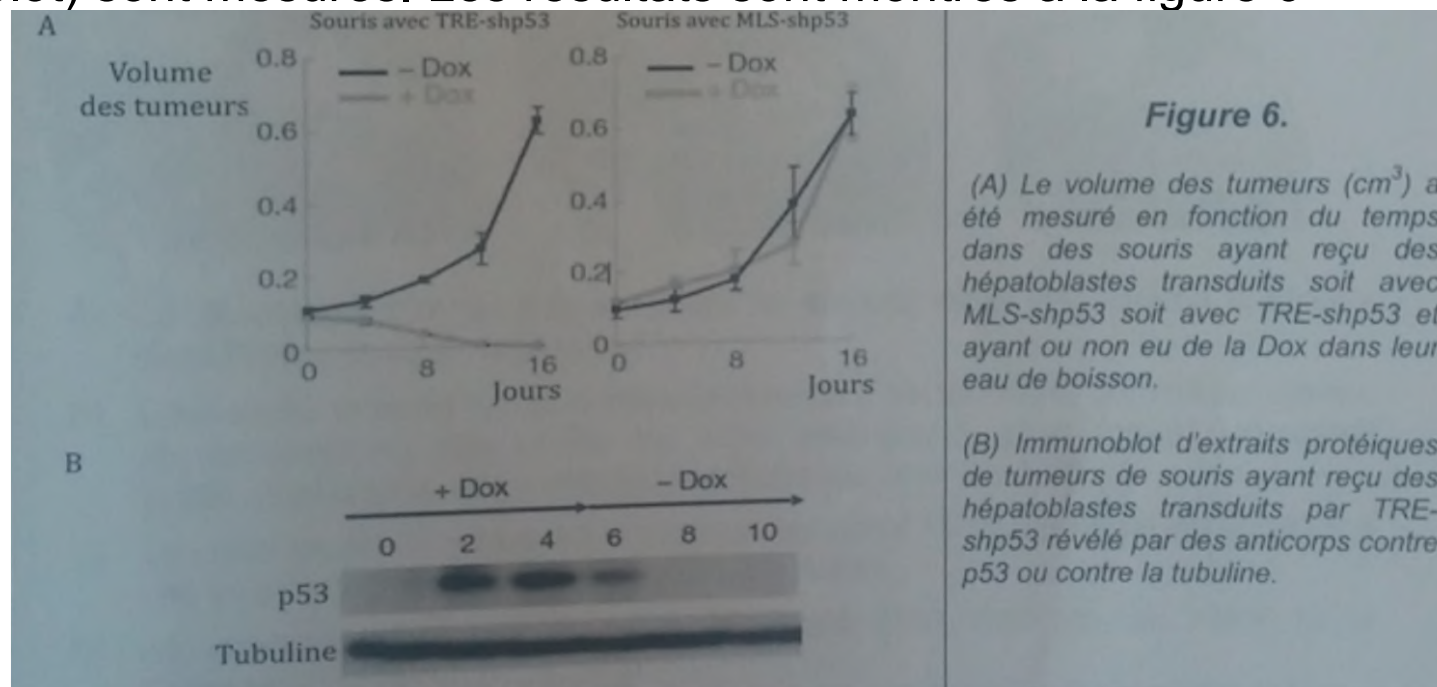
Dans un type de vecteur (TRE-shp53), l'expression de l'ARN interférant shp53 est réprimée par ajout de doxycycline (Dox) dans l'eau de boisson des souris.

Dans l'autre type de vecteur (MLSAshp53) l'expression du shp53 est constitutive et ne dépend pas de Dox.

Après transplantation des hépatoblastes transduits soit avec TRE-shp53 ou avec MLSshp53 des hépatocarcinomes invasifs sont rapidement formés.

Dès que ces tumeurs apparaissent, les souris sont divisées en deux groupes : celles qui boivent de l'eau sans Dox et celles qui boivent de l'eau avec Dox (jour 0).

Au cours du temps, le volume des tumeurs (en cm^3) et l'expression tumorale de la protéine p53 (par la technique de l'immunoblot) sont mesurés. Les résultats sont montrés à la figure 6



Un modèle murin de carcinogénèse hépatique consiste à transplanter dans le foie de souris des cellules progénitrices embryonnaires (hépatoblastes) qui ont été transduites in vitro par des vecteurs rétroviraux exprimant l'allèle oncogénique de la protéine Ras (RasV12) et un ARN interférant inhibant l'expression du gène p53 (shp53).

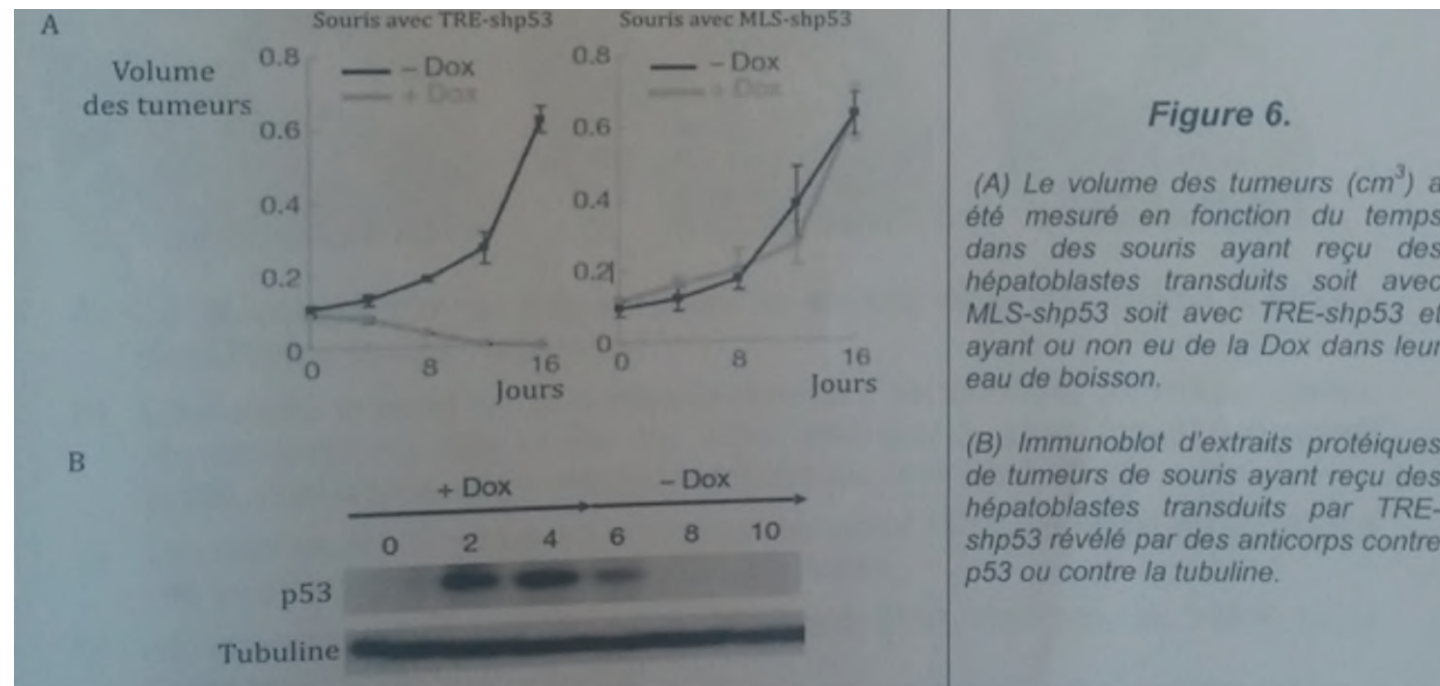
Dans un type de vecteur (TRE-shp53), l'expression de l'ARN interférant shp53 est réprimée par ajout de doxycycline (Dox) dans l'eau de boisson des souris.

Dans l'autre type de vecteur (MLSAshp53) l'expression du shp53 est constitutive et ne dépend pas de Dox.

Après transplantation des hépatoblastes transduits soit avec TRE-shp53 ou avec MLSshp53 des hépatocarcinomes invasifs sont rapidement formés.

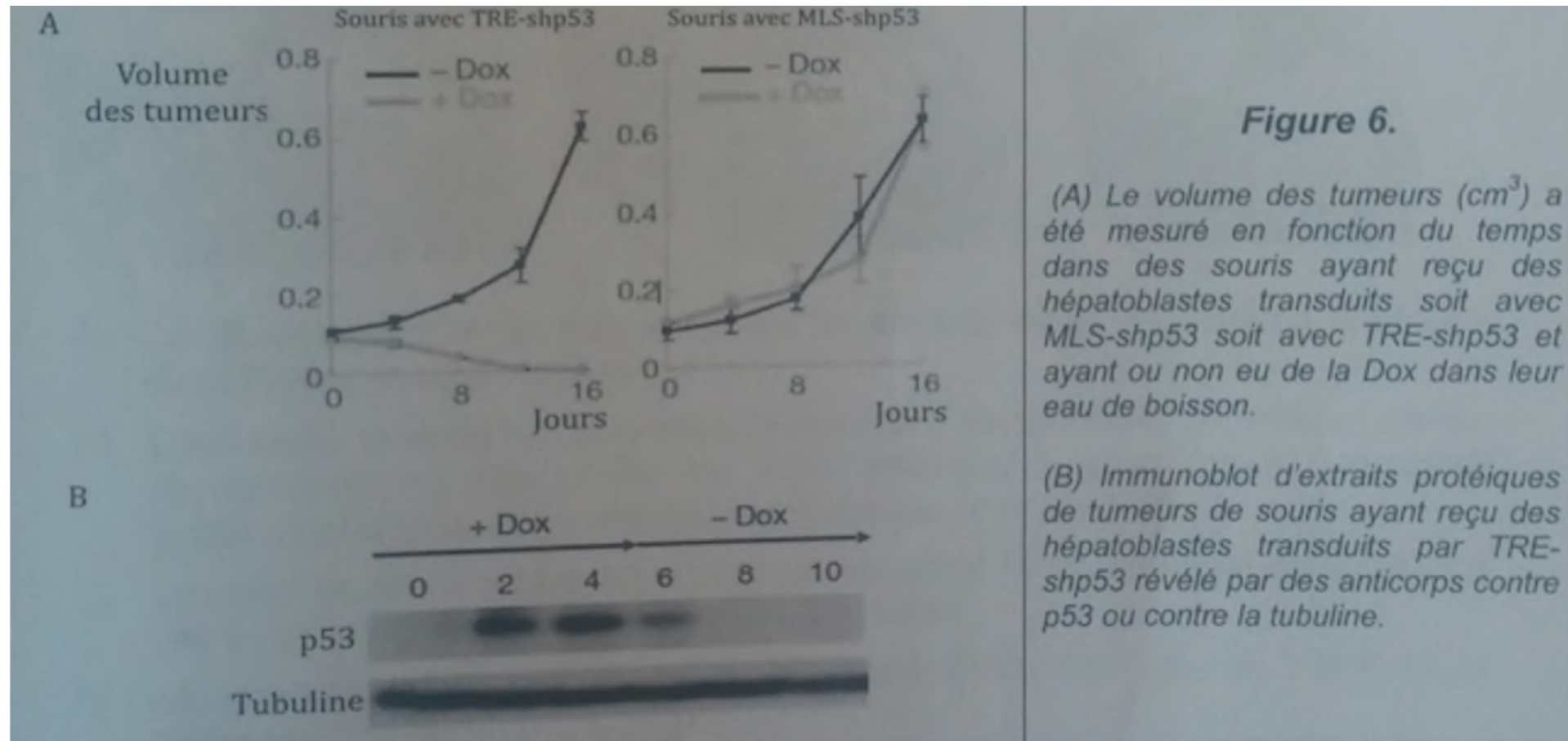
Dès que ces tumeurs apparaissent, les souris sont divisées en deux groupes : celles qui boivent de l'eau sans Dox et celles qui boivent de l'eau avec Dox (jour 0).

Au cours du temps, le volume des tumeurs (en cm^3) et l'expression tumorale de la protéine p53 (par la technique de l'immunoblot) sont mesurés. Les résultats sont montrés à la figure 6



QCM n°3: Laquelle ou lesquelles de ces conclusions est (sont) démontrées par les résultats de la figure 6 ?

- A) p53 doit être surexprimé pour la formation d'un hépatocarcinome
- B) L'absence de p53 est nécessaire pour initier la formation d'un hépatocarcinome mais n'est pas nécessaire pour la progression de la tumeur
- C) Inactiver p53 diminue la taille des tumeurs
- D) Dox est une molécule pouvant avoir un intérêt thérapeutique contre les hépatocarcinomes
- E) ABCD fausses



QCM n°3: Laquelle ou lesquelles de ces conclusions est (sont) démontrées par les résultats de la figure 6 ?

- A) p53 doit être surexprimé pour la formation d'un hépatocarcinome
- B) L'absence de p53 est nécessaire pour initier la formation d'un hépatocarcinome ~~mais n'est pas nécessaire pour la progression de la tumeur~~
- C) Inactiver p53 diminue la taille des tumeurs
- D) Dox est une molécule pouvant avoir un intérêt thérapeutique contre les hépatocarcinomes
- E) ABCD fausses

→ Explications

- A) FAUX: C'est le contraire, il doit être sous-exprimé: on regarde l'évolution de la masse tumorale de TRE-shp53 Dox – ou de MLS-shp53 qui **n'expriment pas/sous expriment** p53: l'hépatocarcinome se forme
- B) FAUX: On regarde la progression de TRE-shp53 avec Dox+ (qui permet à p53 de s'exprimer) et on voit que la progression de la tumeur s'arrête. L'absence de p53 est donc nécessaire à la progression de la tumeur.
- C) FAUX: On a inactivé p53 dans tous les cas (sauf TRE-shp53 Dox+) et dans tous ces cas la taille des tumeurs a **AUGMENTÉ**
- D) FAUX: Dox sert uniquement à inhiber l'ARN interférent shp53. Or cet ARNi est uniquement présent dans ce modèle expérimental, **pas chez la souris sauvage** (ou l'Homme ...). Par conséquent Dox n'aurait absolument aucun intérêt thérapeutique (désolé pour le faux espoir 😞)





TOI À CE STADE DU COURS

ATTENTION ET PRÉCISION
POUR QUE VOTRE AVENTURE
NE BASCULE PAS

Le gène TSPYL5 fait partie d'une région du chromosome 8 fréquemment impliqué dans le cancer du sein.

Sa fonction reste inconnue mais sa surexpression est un marqueur de mauvais pronostic vis-à-vis de la progression de la maladie.

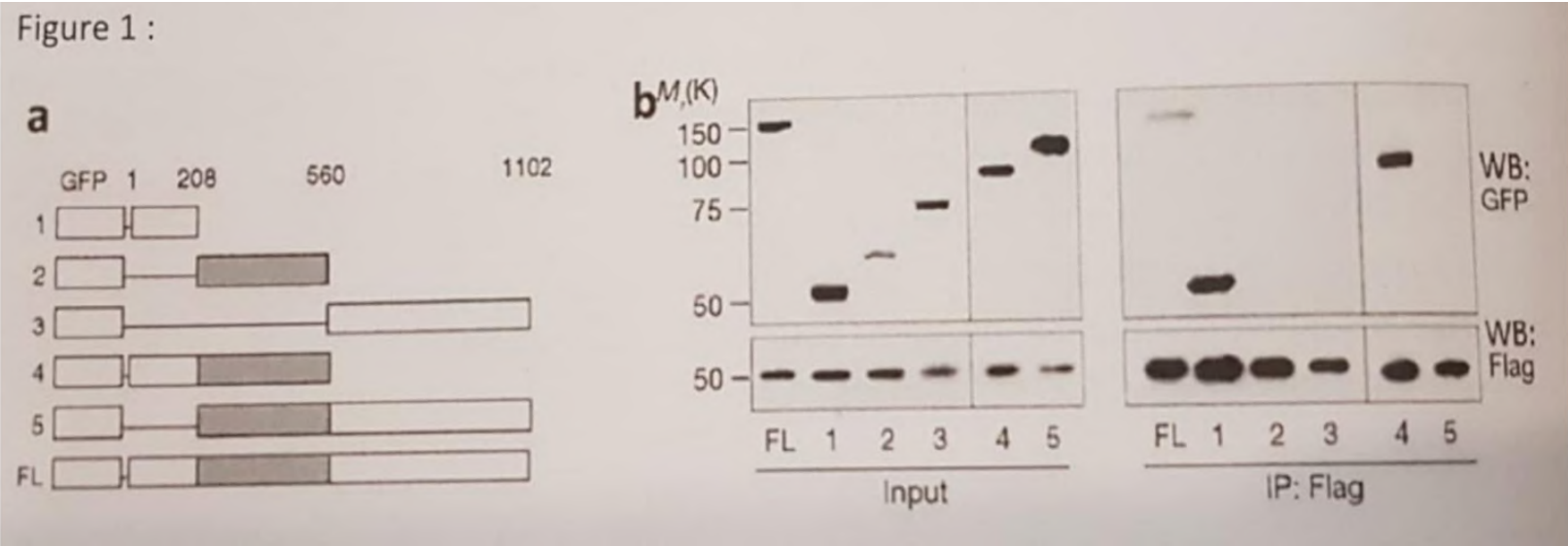
Une analyse par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de la protéine TSPYL5 a révélé qu'elle interagit avec la protéine USP7. USP7 est une protéase de 1102 acides aminés qui hydrolyse l'ubiquitine (« déubiquitinase ») sur de nombreuses cibles limitant ainsi leur destruction par le protéasome.

Afin de préciser la nature de l'interaction entre TSPYL5 et USP7 ainsi que son rôle, les chercheurs réalisent des protéines de fusion entre la GFP et tout (FL) ou fragments (1 à 5) de USP7 (Figure 1a, la position des acides aminés est indiquée en haut) qu'ils co-expriment chacune dans une lignée de cellules humaines avec une seconde protéine de fusion entre l'étiquette Flag et TSPYL5 (Flag-TSPYL5).

Des extraits cellulaires sont alors préparés et on réalise une immunoprécipitation (IP) avec des anticorps anti-Flag.

Les extraits d'origine (Input) ainsi que les immunoprécipitats (IP : Flag) sont ensuite analysés par immunoblot (WB) avec des anticorps anti-GFP ou anti-Flag.

Les résultats sont présentés en Figure 1b, les masses moléculaires étant indiquées sur la gauche ($M_r(K)$, en kdaltons).



Le gène *TSPYL5* fait partie d'une région du chromosome 8 fréquemment impliqué dans le cancer du sein.

Sa fonction reste inconnue mais sa surexpression est un marqueur de mauvais pronostic vis-à-vis de la progression de la maladie.

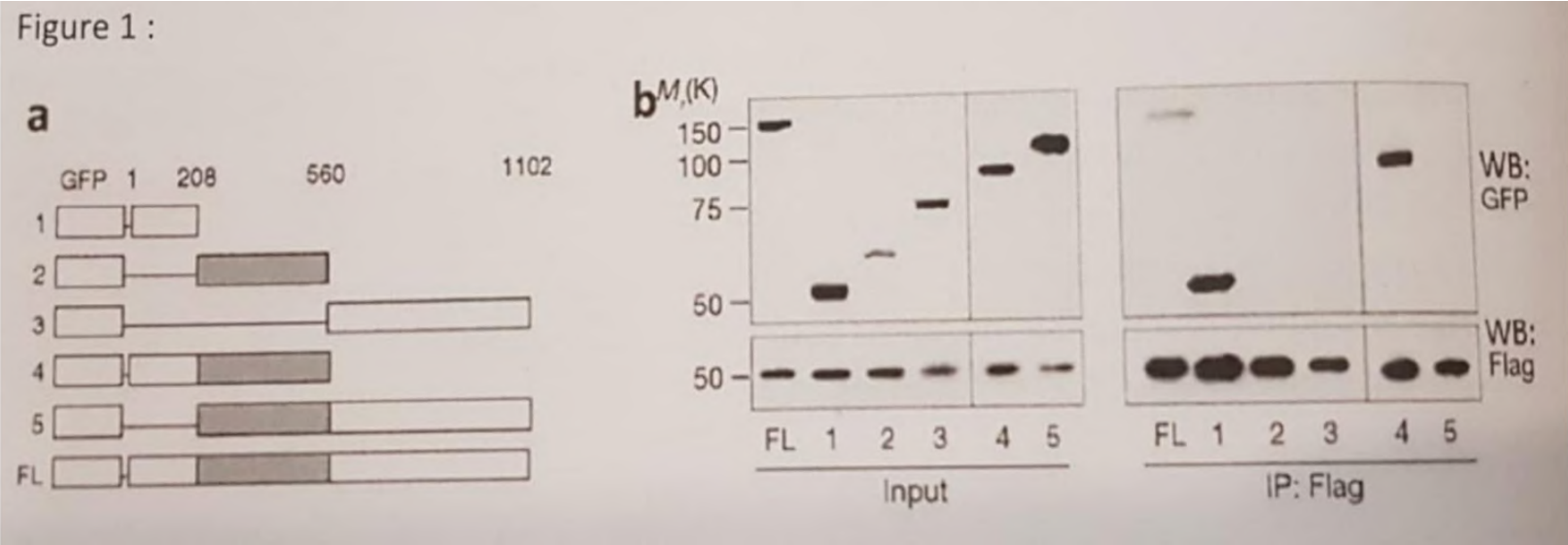
Une analyse par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de la protéine **TSPYL5** a révélé qu'elle **interagit avec la protéine USP7**. USP7 est une **protéase** de 1102 acides aminés qui hydrolyse l'ubiquitine (« déubiquitinase ») sur de nombreuses cibles limitant ainsi leur destruction par le protéasome.

Afin de préciser la nature de l'interaction entre TSPYL5 et USP7 ainsi que son rôle, les chercheurs réalisent des **protéines de fusion entre la GFP et tout (FL) ou fragments (1 à 5) de USP7** (**Figure 1a**, la position des acides aminés est indiquée en haut) qu'ils co-expriment chacune dans une lignée de cellules humaines avec une seconde protéine de fusion entre l'étiquette Flag et TSPYL5 (**Flag-TSPYL5**).

Des extraits cellulaires sont alors préparés et on réalise une **immunoprécipitation (IP) avec des anticorps anti-Flag**.

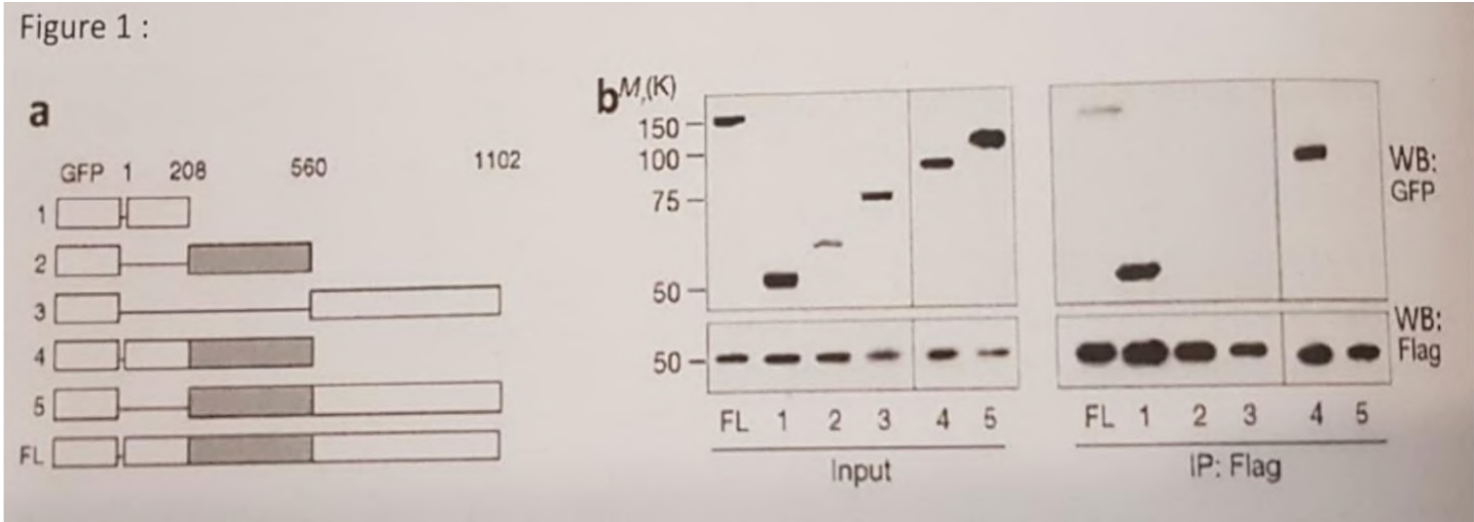
Les extraits d'origine (Input) ainsi que les immunoprécipitats (IP : Flag) sont ensuite analysés **par immunoblot (WB)** avec des anticorps anti-GFP ou anti-Flag.

Les résultats sont présentés en Figure 1b, les masses moléculaires étant indiquées sur la gauche ($M_r(K)$, en kdaltons).



QCM n°4 : à propos de la figure 1, indiquez la ou les propositions(s) exacte(s) ?

- A) Toutes les combinaisons possibles des 3 domaines de USP7 indiquées en figure 1a ont été réalisées en fusion avec la GFP.
- B) La partie gauche de la figure 1b permet de vérifier les niveaux d'expression des différentes protéines de fusion dans l'Input.
- C) La partie droite de la figure 1b permet de déterminer quelles protéines de fusion ne s'expriment pas en présence de Flag-TSPYL5.
- D) L'utilisation de la protéine FL sert de témoin positif dans l'expérience en figure 1b.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.



QCM n°4 : à propos de la figure 1, indiquez la ou les propositions(s) exacte(s) ?

- A) Toutes les combinaisons possibles des 3 domaines de USP7 indiquées en figure 1a ont été réalisées en fusion avec la GFP.
- B) La partie gauche de la figure 1b permet de vérifier les niveaux d'expression des différentes protéines de fusion dans l'Input.
- C) La partie droite de la figure 1b permet de déterminer quelles protéines de fusion ne s'expriment pas en présence de Flag-TSPYL5.
- D) L'utilisation de la protéine FL sert de témoin positif dans l'expérience en figure 1b.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

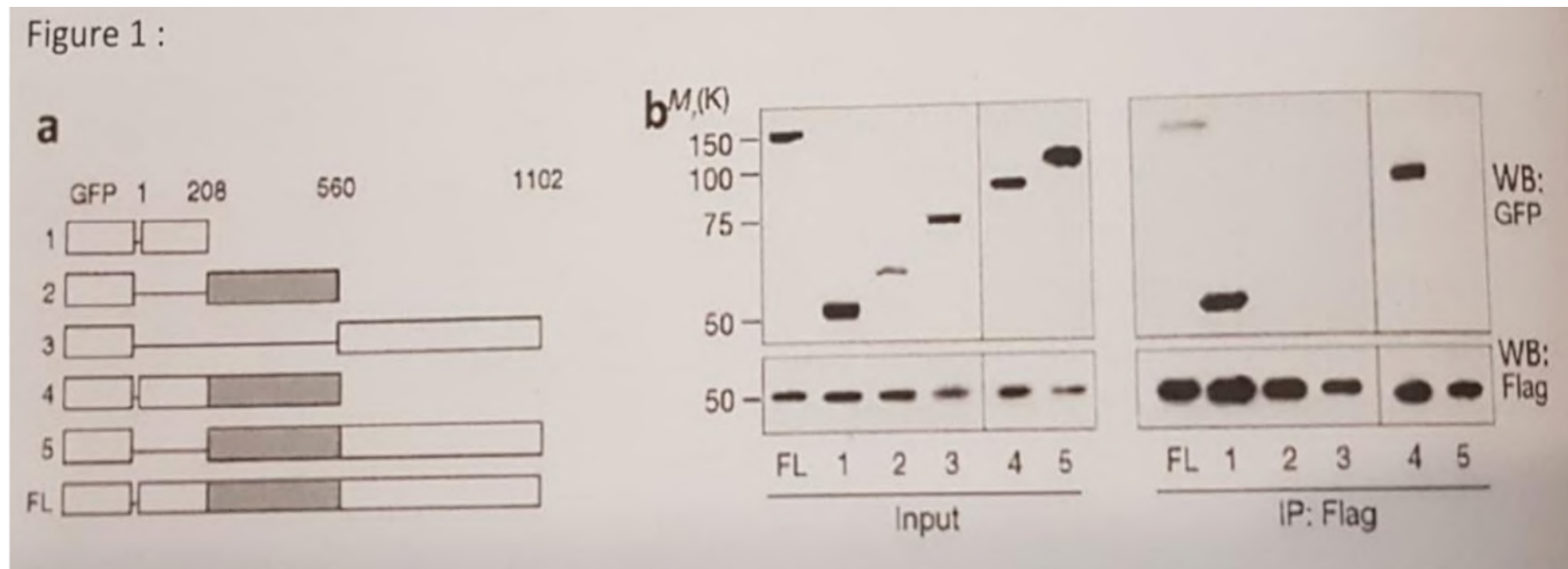
→ Explications

- A) VRAI: En effet il est spécifié dans l'énoncé « protéines de fusion entre la GFP et tout (FL) ou fragments (1 à 5) de USP7 »
- B) VRAI: On vérifie bien les niveaux d'expression de GFP et FLAG, afin de vérifier que ces marqueurs sont fonctionnels
- C) FAUX: Raisonnement incorrect. La partie droite de la figure permet de déterminer **quelles protéines de fusion interagissent avec FLAG-TSPYL5**, pas celles qui ne s'expriment pas en sa présence ...
- D) VRAI: Bien que on utilise plus souvent la notion de témoin négatif, le témoin positif existe aussi et dans ce cas-ci **correspond bien à FL** (car on sait qu'il interagit forcément, donc il apparaîtra forcément)



QCM n°5 : à propos de la figure 1, indiquez la ou les propositions(s) exacte(s) ?

- A) La figure 1b montre que seules les protéines de fusion comportant le domaine 1-208 ne sont pas dégradées.
- B) La figure 1b montre que le domaine 208-560 est nécessaire à l'expression des protéines de fusion.
- C) La figure 1b montre que le domaine 1-208 est nécessaire et suffisant à l'interaction d'USP7 et TSPYL5.
- D) Les résultats de la figure 1b n'excluent pas que le domaine 560-1102 puisse avoir un rôle modulateur de l'interaction entre TSPYL5 et USP7.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.



QCM n°5 : à propos de la figure 1, indiquez la ou les propositions(s) exacte(s) ?

- A) La figure 1b montre que seules les protéines de fusion comportant le domaine 1-208 ~~ne sont pas dégradées~~.
- B) La figure 1b montre que ~~le domaine 208-560 est nécessaire à l'expression des protéines de fusion~~.
- C) La figure 1b montre que le domaine 1-208 est nécessaire ~~et suffisant~~ à l'interaction d'USP7 et TSPYL5.
- D) Les résultats de la figure 1b n'excluent pas que le domaine 560-1102 puisse avoir un rôle modulateur de l'interaction entre TSPYL5 et USP7.
- E) Les propositions A, B, C et D sont fausses.

→ Explications

- A) FAUX: **On ne parle pas de dégradation** ici ... Seulement d'interaction entre USP7 et TSPYL5.
- B) FAUX: Doublement faux ? Les protéines de fusion n'ont pas besoin de 208-560 pour **s'exprimer** (item « distracteur » ...), *de plus 208-560 ne semble pas non plus nécessaire à l'interaction entre TSPYL5 et USP7*
- C) FAUX: Nécessaire oui, parce qu'on voit dans les pistes où il n'est pas présent il n'y a pas d'interaction ... **Suffisant en revanche non**. Rien ne montre qu'il est suffisant, et la piste FL semble prouver le contraire, en effet, on voit que la trace n'est pas aussi marquée que les autres, cela impliquerait qu'il y aurait **d'autres éléments qui régulent l'interaction entre les 2 protéines !**
- D) VRAI: Type de QCM que le Pr.Gilson aime bien, **rien ne peut EXCLURE cette hypothèse**, rien ne peut non plus la démontrer.

