

## Tutorat DM: Expérience 😊

Tutorat 2014-2015

La protéine Bcl-2 joue un rôle crucial dans les phénomènes d'apoptose et dans les processus de cancérisation. Des études de délétion de gènes suggèrent que les protéines Bcl-2 et Bax sont capables d'agir indépendamment. Cependant, quand elles sont co-exprimées dans une même cellule, elles peuvent être immunoprécipitées en tant que complexe protéique.

On crée 3 gènes hybrides : GFP-Bax, BFP-Bcl-2 et GFP-Cytochrome C. Les gènes hybrides GFP-Bax et GFP-Cytochrome C contiennent un gène de résistance à la néomycine. Le gène hybride BFP-Bcl-2 contient un gène de résistance à l'hygromycine.

On introduit les gènes hybrides dans des cellules eucaryotes. On crée 2 cultures de cellules : culture A et culture B. Dans les cellules de la culture A, on a transfecté les gènes hybrides GFP-Bax et BFP-Bcl-2. Dans les cellules de la culture B, on a transfecté les gènes hybrides GFP-Cytochrome C et BFP-Bcl-2. On réalise ensuite des expériences de FRET.

### **QCM1 : A propos du phénomène de FRET, donnez la/les réponse(s) exacte(s) :**

- A) Il permet de savoir si 2 protéines sont en interaction dans une cellule.
- B) Il permet de localiser le lieu d'une interaction entre protéines dans une cellule.
- C) Il n'a lieu que si les molécules fluorescentes sont localisées à moins de 1 nm l'une de l'autre.
- D) C'est une technique de photoblanchiment.
- E) Toutes les réponses sont fausses.

### **QCM2 : A propos de l'expérience ci-dessus, donnez la/les réponse(s) exacte(s) :**

- A) les protéines hybrides ont forcément les mêmes propriétés que les protéines codées par le gène sauvage.
- B) Toutes les cellules vont intégrer les gènes hybrides dans leur génome par recombinaison homologue ou illégitime.
- C) Pour sélectionner les cellules qui auront intégré le gène hybride BFP-Bcl-2, on met les cellules en présence d'hygromycine.
- D) Pour sélectionner les cellules dont on a besoin dans les cultures A ou B, on met les cellules en présence d'hygromycine et de néomycine.
- E) Toutes les propositions sont fausses

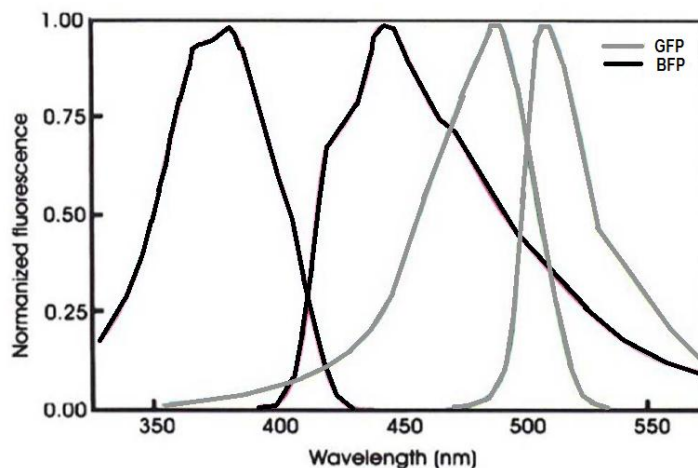


Figure 1 - Spectres d'excitation et d'émission de la BFP et de la GFP

La BFP (blue fluorescent protein) a un pic d'excitation à 389 nm et un pic d'émission à 445 nm alors que La GFP (green fluorescent protein) a un pic d'excitation à 489 nm et un pic d'émission à 511 nm. Dans une cellule sauvage, le cytochrome C est localisé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et la protéine Bcl-2 est localisée sur la face cytosolique de la membrane externe de la mitochondrie. Ainsi, si les mitochondries ne sont pas altérées par l'expérience, on ne devrait pas observer de FRET entre les hybrides GFP-Cytochrome et BFP-Bcl-2. Dans la culture A, lorsqu'on excite la cellule avec une radiation monochromatique de 389 nm, on observe une fluorescence de l'ordre de 511nm. Dans la culture B, dans les mêmes conditions, on observe une fluorescence de 445nm.

**QCM3 : A propos de l'expérience ci-dessus, donnez la/les réponse(s) exacte(s) :**

- A) On peut observer le phénomène de FRET dans les cultures A et B.
- B) On peut démontrer que GFP-Bax et BFP-Bcl-2 sont localisées à moins de 10nm l'une de l'autre dans les cellules de la culture A.
- C) On peut suggérer que les mitochondries sont altérées dans les cellules de la culture B.
- D) Les spectres d'émission de la BFP et d'absorption de la GFP se chevauchent, le phénomène de FRET est donc impossible.
- E) Toutes les propositions sont fausses.

**QCM4 : Parmi les propositions suivantes, laquelle (lesquelles) est (sont) compatible(s) avec l'expérience ci-dessus :**

- A) Bcl-2 et Bax peuvent former des hétérodimères.
- B) La protéine Bax joue un rôle dans la régulation de l'apoptose.
- C) Les gènes codant pour les protéines Bax et Bcl-2 ne sont jamais co-exprimés.
- D) La protéine Bax interagit avec la membrane externe de la mitochondrie.
- E) Toutes les propositions sont fausses.

On cherche à comprendre le rôle de Bcl-2 et de Bax dans l'apoptose, pour cela on fait exprimer différents gènes par des cellules. On compare la viabilité de ces cellules en présence et en absence de mitomycine C (MMC). La MMC a la propriété d'induire l'apoptose des cellules en endommageant leur ADN.

Le gène E6 correspond au gène HPV-16-E6 (human papillomavirus). Ce gène permet de rendre les cellules plus sensibles à l'apoptose liée à la présence de MMC.

Les cellules Mock sont des cellules contrôles. Elles n'expriment aucun gène hybride.

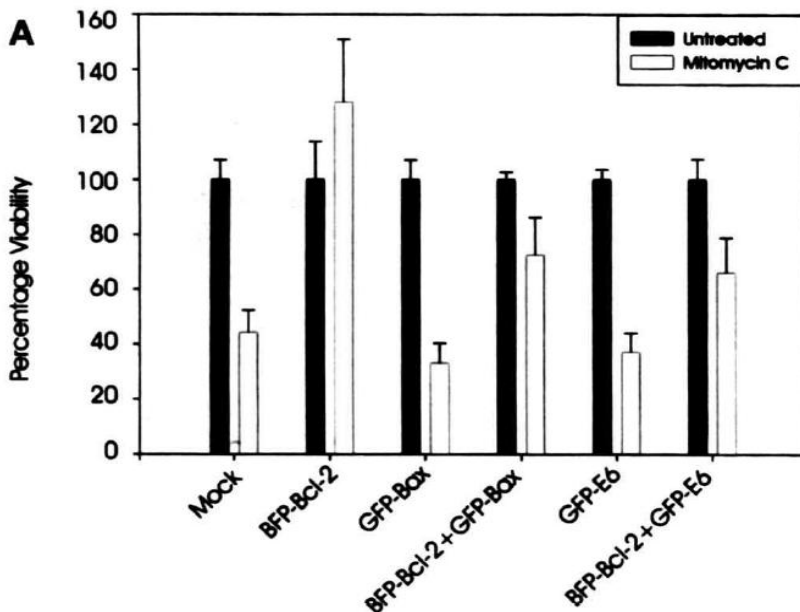


Figure 2 – comparaison de la viabilité des cellules avec ou sans présence de MMC.

**QCM5: Quelle(s) proposition(s) est(sont) compatible(s) avec l'expérience ci-dessus :**

- A) Bcl-2 s'associe à Bax pour inhiber son action
- B) L'action de HPV-16-E6 est indépendante de la présence de Bcl-2
- C) Bax inhibe la mitose, tout comme Bcl-2
- D) Bax permet l'induction de l'apoptose
- E) Toutes les propositions sont fausses

## CORRECTION ☺

### **QCM1 : AB**

- A) Vrai
- B) Vrai
- C) Faux : moins de 10nm !
- D) Faux : c'est le cas pour le FRAP et le FLIP
- E) Faux

### **QCM2 : CD**

- A) Faux : les protéines hybrides peuvent avoir des propriétés différentes des protéines sauvages : c'est un grand problème dans l'interprétation des expériences
- B) Faux : la recombinaison est phénomène rare
- C) Vrai
- D) Vrai
- E) Faux

### **QCM3 : B**

- A) Faux : il y a bien FRET dans les cellules de la culture A mais avec la culture B on obtient une fluorescence de 445 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde d'émission de la BFP, il n'y a donc pas eu FRET dans la culture B.
- B) Vrai : car c'est une condition au phénomène de FRET
- C) Faux : il n'y a pas FRET entre GFP-Cytochrome C et BFP-Bcl-2 donc au contraire on peut suggérer que les mitochondries ne sont pas altérées
- D) Faux : Justement c'est grâce à ça que c'est possible
- E) Faux

### **QCM4 : ABD**

- A) Vrai
- B) Vrai : car elle interagit avec Bcl-2 qui a un rôle dans l'apoptose
- C) Faux
- D) Vrai : car il s'y trouve Bcl-2
- E) Faux

### **QCM5: AD**

- A) Vrai : c'est compatible car en présence de Bax, la viabilité des cellules diminue -> augmentation de l'apoptose. Lorsqu'on rajoute Bcl-2 (en plus de la présence de Bax) on a une diminution de l'apoptose. Les expériences d'immunoprécipitations nous montrent que Bax et Bcl-2 peuvent former un complexe ensemble, on peut donc supposer que Bcl-2 s'associe à Bax pour inhiber son action.
- B) Faux: Quand il est seul, HPV-16-E6 augmente l'apoptose. En présence de Bcl-2 l'apoptose diminue malgré la présence de HPV-16-E6. La proposition n'est donc pas compatible avec l'expérience.
- C) Faux: n'importe quoi
- D) Vrai: la viabilité des cellules diminue quand on rajoute le gène hybride GFP-Bax par rapport à la situation sans ce gène (cellules Mock). Cette proposition est donc compatible avec l'expérience
- E) Faux