

Séance d'Anticipation de Biologie Cellulaire

Striker Spirit - Vega17817 - DrJekyll

I. Description de l'épreuve



- ▶ UE2 : 60min d'épreuve - 40 QCMs - 200 points sur 600 !
- ▶ Biologie Cellulaire : 15 QCMs en moyenne avec une répartition expériences/cours selon les envies du Maître - 67 points
- ▶ Matériel le jour de l'épreuve : Surligneur (+++) VERT et toute votre concentration !
- ▶ Stratégie : Faites les expériences à fin ! Ne revenez pas sur une réponse d'expérience (sauf certitude d'erreur) ! Lisez attentivement et séparez les informations essentielles des inutiles à l'aide de votre surligneur ! Si vous avez un problème lors de la réponse à une question n'hésitez pas à la sauter.

II. Sujet d'expérience (2014)

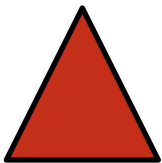


► **QCM 1** : Des expériences de double immunofluorescence ont été conduites avec des anticorps primaires de souris dirigés contre la protéine p53 et des anticorps primaires de lapin dirigés contre la protéine Myc. Laquelle de ces combinaisons d'anticorps secondaires vous paraît appropriée(s) pour visualiser séparément dans les mêmes cellules les deux anticorps primaires :

- A) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti- immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine
- B) Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à la fluorescéine et des anticorps de lapin anti- immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine
- C) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti- immunoglobuline de chèvre couplés à la fluorescéine
- D) Anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de chèvre anti- immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine
- E) ABCD fausses

- **QCM 1** : Des expériences de double immunofluorescence ont été conduites avec des **anticorps primaires de souris** dirigés contre la **protéine p53** et des **anticorps primaires de lapin** dirigés contre la **protéine Myc**. Laquelle de ces combinaisons d'anticorps **secondaires** vous paraît appropriée(s) pour visualiser **séparément dans les mêmes cellules** les deux anticorps primaires :

- A) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine
- B) Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin couplés à la fluorescéine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine
- C) Anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de lapin anti-immunoglobuline de chèvre couplés à la fluorescéine
- D) **Anticorps de cheval anti-immunoglobuline de lapin couplés à la rhodamine et des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplés à la fluorescéine**
- E) ABCD fausses



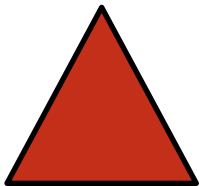
Attention : Il faut vraiment une lecture attentive pour ce QCM, il tombe tous les ans et vous fait perdre des places si vous ne l'avez pas!

► QCM 2 : Concernant la mise en culture des fibroblastes primaires, donnez la/les vraie/s :

- A) Les fibroblastes de culture primaire peuvent effectuer un nombre illimité de divisions, à condition de remplacer suffisamment de souvent le milieu de culture adéquat
- B) Un avantage de travailler avec des cellules en culture est de travailler avec un contenu cellulaire plus homogène qu'un tissu
- C) Aucune cellule humaine mise en culture n'est capable de pousser directement sur le plastique des boîtes de pétri
- D) Des lignées immortelles peuvent être obtenues de manière spontanée, mais il s'agit d'un phénomène très rare pour les cellules humaines
- E) ABCD fausses

► **QCM 2** : Concernant la mise en culture des fibroblastes primaires, donnez la/les vraie/s :

- A) Les fibroblastes de culture primaire peuvent effectuer un nombre illimité de divisions, à condition de remplacer suffisamment de souvent le milieu de culture adéquat
- B) **Un avantage de travailler avec des cellules en culture est de travailler avec un contenu cellulaire plus homogène qu'un tissu**
- C) ~~Aucune~~ cellule humaine mise en culture n'est capable de pousser directement sur le plastique des boîtes de pétri
- D) **Des lignées immortelles peuvent être obtenues de manière spontanée, mais il s'agit d'un phénomène très rare pour les cellules humaines**
- E) ABCD fausses



Attention : Méfiez-vous des QCMs exclusifs ! (#itemC)

► **QCM 5** : Il existe un groupe de maladies génétiques caractérisées par des défauts de biogénèse des peroxysomes appelé PBD (« Peroxisome Biogenesis Disorder »). Les patients atteints de PBD présentent une série de défauts des enzymes peroxysomales dont l'absence d'activité dihydroxyacétophosphate acyltransférase (DHAP-AT) qui intervient dans la biosynthèse de certains glycérophospholipides. L'activité DHAP-AT mesurée dans des fibroblastes de peau mis en culture primaire à partir d'individus normaux est d'environ 10 unités. On estime que le taux d'erreur de mesure de cette enzyme n'excède pas 20%. Des fibroblastes de 7 patients PBDs (appelés RCDP, ZS1, ZS2, ZS3, IRD, HPA et NALD) ont été mis en culture primaire et l'activité DHAP-AT mesurée est de 2 unités pour le patient RCDP, 1 unité pour le patient ZS1, 1 unité pour le patient ZS2, 1 unité pour le patient ZS3, 0.1 unité pour le patient IRD, 0.2 unité pour le patient HPA et 2 unités pour le patient NALD. Des hétérocaryons entre ces fibroblastes malades et des fibroblastes normaux ont été générés. L'efficacité de la fusion a été estimée comme le pourcentage de cellules multinucléées et se situe généralement entre 60 et 90%. Trois jours après la fusion, toutes les cultures de cellules expriment une activité entre 7 et 10 unités.

Concernant les mutations des 7 patients PBDs, donnez la/les vraie/s :

- A) Les mutations sont toutes portées par le même gène
- B) Les mutations forment 7 groupes de complémentation
- C) Les mutations des patients ZS1, ZS2 et ZS3 sont portées par le même gène et les mutations RCDP et NALD par un autre gène
- D) Les mutations sont dominantes
- E) ABCD fausses

- ▶ **QCM 5** : Il existe un groupe de maladies génétiques caractérisées par des défauts de biogénèse des **peroxysomes** appelé **PBD** (« Peroxisome Biogenesis Disorder »). Les patients **atteints** de **PBD** présentent une série de **défauts des enzymes peroxysomales** dont **l'absence d'activité dihydroxyacétophosphate acyltransférase (DHAP-AT)** qui intervient dans la biosynthèse de certains glycérophospholipides. **L'activité DHAP-AT** mesurée dans des fibroblastes de peau mis en culture primaire à partir d'individus **normaux** est d'**environ 10 unités**. On estime que le **taux d'erreur de mesure** de cette enzyme n'excède pas 20%. Des fibroblastes de **7 patients** PBDs (appelés **RCDP, ZS1, ZS2, ZS3, IRD, HPA et NALD**) ont été mis en culture primaire et l'activité DHAP-AT mesurée est de **2 unités** pour le patient **RCDP**, **1 unité** pour le patient **ZS1**, **1 unité** pour le patient **ZS2**, **1 unité** pour le patient **ZS3**, **0.1 unité** pour le patient **IRD**, **0.2 unité** pour le patient **HPA** et **2 unités** pour le patient **NALD**. Des **hétérocaryons** entre ces **fibroblastes malades** et des fibroblastes **normaux** ont été générés. L'efficacité de la fusion a été estimée comme le pourcentage de cellules multinucléées et se situe généralement entre 60 et 90%. Trois jours **après la fusion**, **toutes les cultures** de cellules expriment une **activité entre 7 et 10 unités**.

QCM 5 : Concernant les mutations des 7 patients PBDs, donnez la/les vraie/s :

- A) Les mutations sont toutes portées par le même gène
- B) Les mutations forment 7 groupes de complémentation
- C) Les mutations des patients ZS1, ZS2 et ZS3 sont portées par le même gène et les mutations RCDP et NALD par un autre gène
- D) Les mutations sont dominantes
- E) **ABCD fausses**

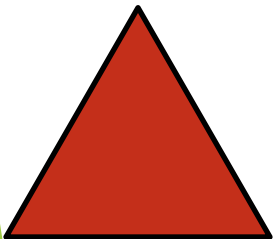
► **Explications :**

- A), B) et C) : On ne peut répondre à ces questions qu'en faisant un test de complémentation !
- D) On fait manifestement un test de récessivité (fusion des fibroblastes normaux avec des fibroblastes mutés) ce test est d'ailleurs positif car on obtient finalement un phénotype sauvage (activité DHAP-AT de 7 à 10 unités).

Attention aux conclusions hâtives, il faut trier les informations et bien différencier les tests vus en cours !

Test de récessivité : on prend une cellule saine et une cellule mutée puis on observe le phénotype.

Test de complémentation (APRÈS le test de récessivité) : on fusionne deux cellules mutées et on observe le phénotype.



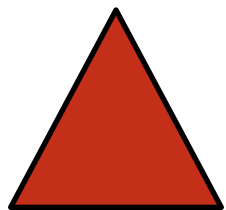
- **QCM 6** : Les fibroblastes des patients sont maintenant fusionnés deux à deux et les résultats d'activité DHAP- AT (trois jours après la fusion) sont donnés dans le tableau I :

	RCDP	ZS1	ZS2	ZS3	IRD	HAP	NALD
RCDP	2						
ZS1	8,8	1					
ZS2	9	9,8	1,1				
ZS3	8,6	9	10	1			
IRD	11	0,7	11,4	10	0,1		
HAP	10,5	1	8,3	9	0,3	0,2	
NALD	10	8,9	9	8	10	10,7	2,1

D'après le tableau I, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s)

- A) RCDP et ZS1 appartiennent au même groupe de complémententation
- B) Les 7 patients appartiennent à 5 groupes de complémententation
- C) Les fibroblastes ZS1 et IRD sont probablement mutés dans le même gène
- D) Il existe un groupe de complémententation comprenant 3 patients
- E) ABCD fausses

	RCDP	ZS1	ZS2	ZS3	IRD	HAP	NALD
RCDP	2						
ZS1	8,8	1					
ZS2	9	9,8	1,1				
ZS3	8,6	9	10	1			
IRD	11	0,7	11,4	10	0,1		
HAP	10,5	1	8,3	9	0,3	0,2	
NALD	10	8,9	9	8	10	10,7	2,1



Attention à la lecture du tableau!

QCM 6 :

D'après le tableau I, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s) :

- A) RCDP et ZS1 appartiennent au même groupe de complémententation
- B) **Les 7 patients appartiennent à 5 groupes de complémententation**
- C) **Les fibroblastes ZS1 et IRD sont probablement mutés dans le même gène**
- D) **Il existe un groupe de complémententation comprenant 3 patients**
- E) ABCD fausses

► Explications :

A) On obtient un phénotype sauvage (8,8 unités), RCDP et ZS1 sont donc dans des groupes de complémententation séparés !

B) Un groupe de complémententation est un ensemble de mutants qui ne complémentent pas. ZS1, IRD et HPA - RCDP - ZS3 - ZS2 - NALD (ces 5 combinaisons présentent des activités HAP-AT inférieurs à 7 unités).

C) ZS1 et IRD présentent un phénotype muté (activité de 0,7 unités). On affirme que ZS1 et IRD sont mutés sur le même gène !

D) On remarque dans la colonne 3 que les mutants ZS1, HAP et IRD présentent une activité inférieure à 7 unités. On lit dans le tableau que ces 3 mutations ne complémentent pas entre elles. Elles appartiennent donc au même groupe de complémententation !

- **QCM 7** : La digitonine perméabilise la membrane plasmique mais pas ou peu la membrane peroxysomale. De ce fait, plus de 200 $\mu\text{g/ml}$ de digitonine est nécessaire pour libérer à l'extérieur des cellules normales la totalité de l'activité catalase, une enzyme présente dans la matrice des peroxysomes. La quantité de digitonine ($\mu\text{g/ml}$) nécessaire à libérer la catalase à l'extérieur des hétérocaryons est donnée dans le tableau II.

	RCDP	ZS1	ZS2	ZS3	IRD	HPA	NALD
RCDP	200						
ZS1	200	<40					
ZS2	200	200	<40				
ZS3	200	200	200	<40			
IRD	200	<40	200	200	<40		
HPA	200	<40	200	200	<40	<40	
NALD	200	200	200	200	200	200	<40

D'après les résultats du tableau II, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s)

- A) La catalase n'est pas exprimée dans les cellules du patient RCDP
- B) L'intégrité des peroxysomes est altérée dans le patient ZS1
- C) La localisation de la catalase dans les peroxysomes des 7 patients est altérée
- D) ZS1 et ZS2 appartiennent au même groupe de complémentation
- E) ABCD fausses

QCM 7 : D'après les résultats du tableau II, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s) :

- A) La catalase n'est pas exprimée dans les cellules du patient RCDP
- B) **L'intégrité des peroxysomes est altérée dans le patient ZS1**
- C) La localisation de la catalase dans les peroxysomes des 7 patients est altérée
- D) ZS1 et ZS2 appartiennent au même groupe de complémentation
- E) ABCD fausses

► **Explications** :

A) Rien dans le tableau ne nous permet d'en venir à cette conclusion (*item wtf, ayez confiance en vous!*).

B) Après lecture du tableau on remarque qu'une quantité de 40 $\mu\text{g/ml}$ de digitonine est nécessaire à l'extériorisation de la catalase. Cette valeur étant très inférieure à la valeur physiologique on peut en déduire que l'intégrité des peroxysomes est altérée.

C) D'après le tableau, le patient RCPD n'a pas une membrane peroxysomale altérée, donc, les 7 patients ne peuvent pas être atteints.

D) La fusion des cellules des patients ZS1 et ZS2 n'entraîne pas de fragilité peroxysomale (phénotype sauvage). Donc ZS1 et ZS2 n'appartiennent pas au même groupe de complémentation.

- **QCM 8** : La distribution d'enzymes du cytosol (lactate déshydrogénase), des peroxysomes (uricase) et des lysosomes (hexosaminidase) a été déterminée le long d'un gradient de densité à partir d'homogénats de cellules fibroblastiques. Pour les cellules normales, on trouve que l'activité uricase est localisée entre le pic de lactate déshydrogénase et celui d'hexosaminidase. A partir d'homogénat des fibroblastes malades, les activités lactate déshydrogénase et hexosaminidase présentent le même profil le long du gradient que celui déterminé à partir des cellules normales. A partir d'homogénat de cellules fusionnées provenant des patients ZS1 et IRD, l'uricase co-sédimente avec la lactate déshydrogénase. Un résultat comparable est obtenu avec les hétérocaryons provenant des fusions entre les cellules ZS1, ZS2, ZS3 NALD et HPA qui ne présentaient pas de complémentation pour l'activité DHAP-AT (tableau I) ou pour la libération de catalase par la digitonine (tableau II). A partir d'hétérocaryons provenant de ZS1 et ZS3, l'uricase sédimente entre les pics de lactate déshydrogénase et d'hexominidase.

D'après ces résultats, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s)

- A) L'uricase des cellules malades ZS1 est cytosolique
- B) Les altérations de l'intégrité des peroxysomes révélées par les expériences à la digitonine sont compatibles avec celles révélées par les expériences en gradient de sédimentation
- C) Les mutations responsables du défaut de localisation intracellulaire de l'uricase dans les cellules ZS1 et IRD sont probablement présentes dans le même gène
- D) Il n'y a pas de peroxysomes dans les cellules des patients ZS1
- E) ABCD fausses

- ▶ **QCM 8** : La distribution d'enzymes du **cytosol (lactate déshydrogénase)**, des **peroxysomes (uricase)** et des **lysosomes (hexosaminidase)** a été déterminée le long d'un gradient de densité à partir d'homogénats de cellules fibroblastiques. Pour les **cellules normales**, on trouve que l'activité **uricase** est **localisée entre le pic de lactate déshydrogénase et celui d'hexosaminidase**. A partir d'homogénat des fibroblastes **malades**, les activités **lactate déshydrogénase et hexosaminidase** présentent le **même profil** le long du gradient que celui déterminé à partir des cellules **normales**. A partir d'homogénat de cellules **fusionnées** provenant des patients **ZS1 et IRD**, **l'uricase co-sédimente avec la lactate déshydrogénase**. Un **résultat comparable est obtenu avec les hétérocaryons provenant des fusions entre les cellules ZS1, ZS2, ZS3, NALD et HAP** qui ne présentaient pas de complémentation pour l'activité DHAP-AT (tableau I) ou pour la libération de catalase par la digitonine (tableau II). **À partir d'hétérocaryons provenant de ZS1 et ZS3, l'uricase sédimente entre les pics de lactate déshydrogénase et d'hexominidase.**

- D'après ces résultats, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s)
- A) L'uricase des cellules malades ZS1 est cytosolique
 - B) Les altérations de l'intégrité des peroxysomes révélées par les expériences à la digitonine sont compatibles avec celles révélées par les expériences en gradient de sédimentation
 - C) Les mutations responsables du défaut de localisation intracellulaire de l'uricase dans les cellules ZS1 et IRD sont probablement présentes dans le même gène
 - D) ~~Il n'y a pas de peroxysomes dans les cellules des patients ZS1~~
 - E) ABCD fausses

► Explications :

- A) Dans le texte il est indiqué que l'uricase l'hétérocaryon ZS1-IRD co-sédimente avec la lactate déshydrogénase qui est une enzyme cytosolique.
- B) Dans le tableau précédent 6 patients semblaient avoir l'intégrité de leur membrane peroxysomale compromise. On nous explique dans le texte que pour ces mêmes patients, l'uricase, contenue dans les peroxysomes co-sédimente avec la lactate déshydrogénase cytosolique.
- C) L'hétérocaryon ZS1-IRD est doté d'un phénotype muté (co-sédimentation anormale de l'uricase avec la lactate déshydrogénase). On peut donc conclure et affirmer que ZS1 et IRD sont des allèles présents sur le même gène.
- D) Rien ne nous permet d'arriver à une telle conclusion! Ayez confiance en vous et ne paniquez pas devant ce genre d'item pouvant s'avérer très fréquent en PACES.



Restez confiant devant un tel énoncé, trie les informations et vous verrez que tout est dans le texte !

- **QCM 9** : L'ensemble des analyses précédentes concernant la mesure de l'activité DHAP-AT, la libération de la catalase par le traitement à la digitonine et la sédimentation des peroxysomes suggèrent que :
- A) La présence de peroxysomes contenant de l'uricase est suffisante pour permettre l'expression de l'activité DHAP-AT
 - B) L'expression de l'activité catalase dans les cellules dépend de la présence d'activité DHAP-AT
 - C) Des problèmes d'importation des protéines dans les peroxysomes existent pour les patients ZS1, ZS2 et NALD
 - D) La mutation responsable de la perte d'activité DHAP-AT dans les cellules ZS1 est localisée dans un gène nécessaire à la biogenèse des peroxysomes
 - E) ABCD fausses

► Tableau I :

	RCDP	ZS1	ZS2	ZS3	IRD	HAP	NALD
RCDP	2						
ZS1	8,8	1					
ZS2	9	9,8	1,1				
ZS3	8,6	9	10	1			
IRD	11	0,7	11,4	10	0,1		
HAP	10,5	1	8,3	9	0,3	0,2	
NALD	10	8,9	9	8	10	10,7	2,1

► Tableau II :

	RCDP	ZS1	ZS2	ZS3	IRD	HPA	NALD
RCDP	200						
ZS1	200	<40					
ZS2	200	200	<40				
ZS3	200	200	200	<40			
IRD	200	<40	200	200	<40		
HPA	200	<40	200	200	<40	<40	
NALD	200	200	200	200	200	200	<40

- **QCM 9** : L'ensemble des **analyses précédentes** concernant la mesure de l'activité DHAP-AT, la libération de la catalase par le traitement à la digitonine et la sédimentation des peroxysomes **suggèrent que** :
- A) La présence de peroxysomes contenant de l'uricase est suffisante pour permettre l'expression de l'activité DHAP-AT
 - B) L'expression de l'activité catalase dans les cellules dépend de la présence d'activité DHAP-AT
 - C) Des problèmes d'importation des protéines dans les peroxysomes existent pour les patients ZS1, ZS2 et NALD
 - D) La mutation responsable de la perte d'activité DHAP-AT dans les cellules ZS1 est localisée dans un gène nécessaire à la biogenèse des peroxysomes
 - E) ABCD fausses

► **Explications :**

- A) L'hétérocaryon ZS1/ZS3 possède une enzyme uricase contenue dans les peroxysomes et présente une activité DHAP-AT normale.
- B) On remarque en effet en confrontant les deux tableaux que lorsqu'on a l'expression de l'activité catalase on aura la présence de l'activité DHAP-AT.
- C) En regardant de nouveau l'énoncé du QCM 8, on peut voir qu'on nous indique que l'uricase des patients ZS1, ZS2 et NALD co-sédimente avec la lactate-déshydrogénase. Par conséquent les protéines normalement peroxysomales se retrouvent dans le cytoplasme
- D) Cette affirmation est compatible avec les résultats car en plus de la perte d'activité DHAP-AT (tableau I) le malade ZS1, on remarque une fragilisation de la membrane des peroxysomes

- **QCM 10** : Les localisations dans les cellules normales et malades de la catalase et de l'uricase ont été étudiées par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps primaires de lapin dirigés contre la catalase ou contre l'uricase humaine et anticorps secondaires de chèvre anti-immunoglobulines de lapin et couplés à la fluorescéine. Pour permettre l'entrée des anticorps, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X100, un détergent qui perméabilise à la fois la membrane plasmique et la membrane des peroxysomes. La figure 1 représente les deux types d'image qui ont été obtenus (type A et type B)

D'après l'ensemble des résultats précédents, donnez la/les vraie/s :

- A) La catalase et l'uricase sont localisées à l'intérieur des peroxysomes des cellules normales
- B) Il n'y a pas de peroxysomes dans les cellules du patient RCDP
- C) La digitonine empêche les anticorps de rentrer dans les cellules
- D) La catalase et l'uricase sont capables d'être importées dans les peroxysomes
- E) ABCD fausses

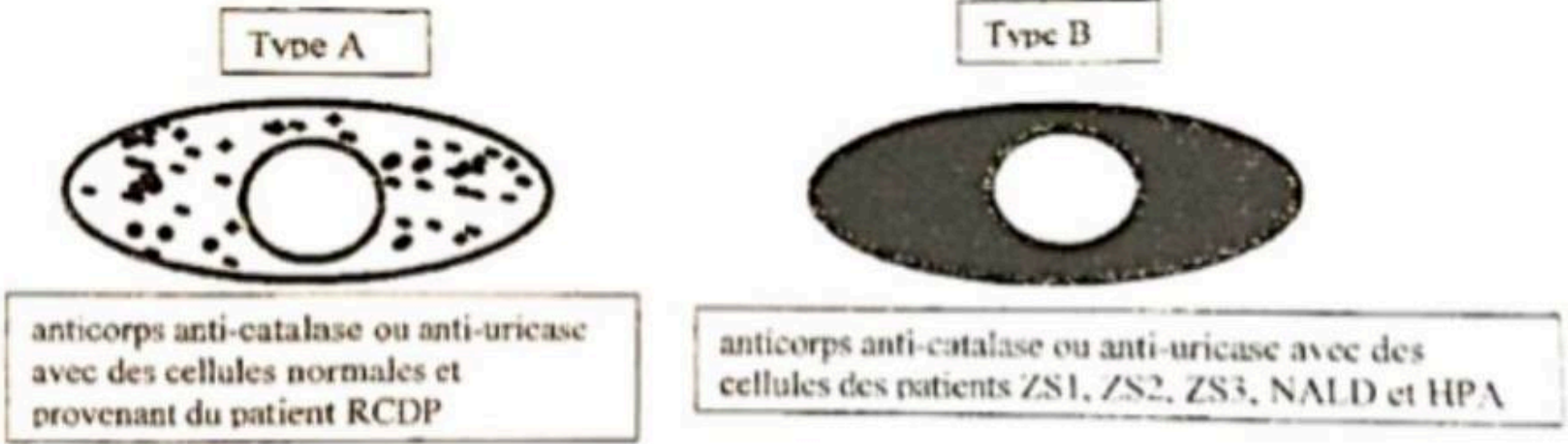


Figure 1 La fluorescence est indiquée en noir et les membranes plasmiques et nucléaires en traits gris. La coloration grise homogène indique la présence d'une fluorescence diffuse.

Les mêmes expériences d'immunofluorescence ont ensuite été effectuées mais en remplaçant le Triton X100 par de la digitonine à 30 µg/ml. Les patients ZS1, ZS2, ZS3, NALD et HPA présentent une coloration de type B (cf. figure 1). Les cellules des individus normaux ou celles du patient RCDP ne sont pas fluorescentes (figure 2, type C)

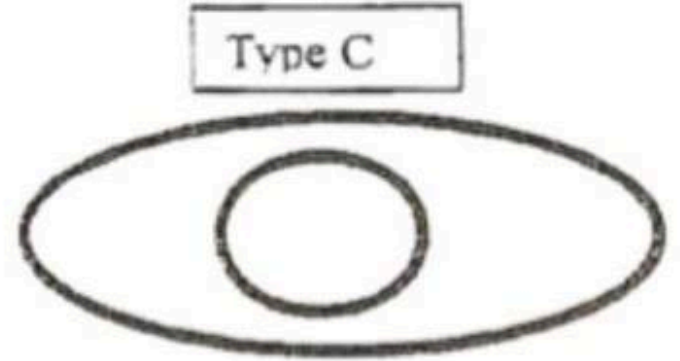


Figure 2 Les membranes plasmiques et nucléaires en traits gris. Aucune fluorescence n'est visible

- **QCM 10** : Les localisations dans les cellules **normales** et **malades** de la **catalase** et de l'**uricase** ont été étudiées par immunofluorescence indirecte en utilisant des **anticorps primaires** de lapin dirigés contre la **catalase** ou **contre l'uricase** humaine et anticorps secondaires de chèvre anti-immunoglobulines de lapin et couplés à la fluorescéine. Pour permettre l'entrée des anticorps, les cellules ont été **perméabilisées** avec du **Triton X100**, un détergent qui **perméabilise à la fois la membrane plasmique et la membrane des peroxysomes**. La figure 1 représente les deux types d'image qui ont été obtenus (type A et type B)

D'après l'ensemble des résultats précédents, donnez la/les vraie/s :

- A) **La catalase et l'uricase sont localisées à l'intérieur des peroxysomes des cellules normales**
- B) ~~Il n'y a pas de peroxysomes dans les cellules du patient RCDP~~
- C) ~~La digitonine empêche les anticorps de rentrer dans les cellules~~
- D) **La catalase et l'uricase sont capables d'être importées dans les peroxysomes**
- E) ABCD fausses

► Explications :

A) On remarque en effet dans la figure 1 (Type A) de nombreux points noirs, ce qui montre une localisation des Ac anti-catalase ou uricase au niveau des peroxysomes (leur membrane ainsi que celle des cellules perméabilisées grâce au Triton X100).

B) D'après la figure 1, nous pouvons affirmer le non sens de cet item.

C) Nous voyons bien que pour les patients autres que RCPD et normaux, il y a présence de fluorescence même après perméabilisation avec la digitonine (Figure 1, Type B).

D) En effet, cela est vérifié via l'expérience présentée dans la figure 1 Type A (cellules normales et RCDP).

- **QCM 11** : Des expériences d'immunofluorescence indirectes ont été effectuées en utilisant des anticorps primaires de lapin anti-PMP70, une protéine de la membrane peroxysomale. Les cellules normales et les cellules de tous les patients présentent une coloration de type A (cf. figure 1) :

Avec laquelle ou lesquelles des propositions suivantes ces données sont-elles compatibles ?

- A) Des structures aberrantes de type peroxysome existent dans les cellules du patient ZS1
- B) Le gène muté du patient ZS1 est indispensable à la formation des membranes des peroxysomes.
- C) La localisation cytosolique de la catalase dans les cellules du patient ZS1 est due à un défaut de son importation du cytoplasme vers la matrice des peroxysomes
- D) L'intégrité de la membrane peroxysomale est préservée dans les cellules de tous les malades
- E) ABCD fausses

- QCM 11 : Des expériences d'immunofluorescence indirectes ont été effectuées en utilisant des anticorps primaires de lapin **anti-PMP70**, une **protéine de la membrane peroxysomale**. Les cellules **normales** et les cellules de **tous les patients** présentent une **coloration de type A** (cf. figure 1) :

Avec laquelle ou lesquelles des propositions suivantes ces données sont-elles compatibles ?

- A) **Des structures aberrantes de type peroxysome existent dans les cellules du patient ZS1**
- B) Le gène muté du patient ZS1 est ~~indispensable~~ à la formation des membranes des peroxysomes.
- C) **La localisation cytosolique de la catalase dans les cellules du patient ZS1 est due à un défaut de son importation du cytoplasme vers la matrice des peroxysomes**
- D) **L'intégrité de la membrane peroxysomale est préservée dans les cellules de tous les malades**
- E) ABCD fausses

► Explications :

A) Effectivement, cet item est compatible avec le résultat obtenu, car nous observons une figure de type A. Les structures peroxysomales sont aberrantes du fait que les enzymes précédemment étudiées (catalase et uricase) se situent dans le cytosol alors que la membrane des peroxysome apparaît intacte.

B) Nous ne pouvons pas aller vers ces conclusions du fait que les patients mutés sur un autre gène (n'appartenant donc pas au même groupe de complémentation que le patient ZS1) possèdent tout comme ZS1 une membrane peroxysomale intacte (prouvé par le fait que nous obtenons bien une figure de type A pour tous les patients et les cellules normales dans cette expérience).

C) Comme nous l'avons montré dans l'item A la membrane peroxysomale de toutes les cellules (malades et saines) est intacte et que les enzymes catalase et uricase sont pourtant localisées dans le cytosol pour la plupart des patients.

D) Oui car on observe une figure de type A.

- **QCM 12** : Des expériences d'immunolocalisation avec anticorps anti-PMP70 associés à des particules d'or ont permis de visualiser par microscopie électronique des structures membranaires sphériques avec peu ou pas de contenu dans des coupes de cellules du patient ZS1. Dans des expériences de double immunofluorescence sur des cellules ZS1 avec des anticorps anti-PMP70 révélés à la fluorescéine (émission dans le vert) et des anticorps anti-LAMP-2 révélés à la rhodamine (émission dans le rouge), une coloration de type A (cf figure 1) est observée. Lorsque les images obtenues pour la fluorescence verte et rouge sont superposées les signaux fluorescents ne se chevauchent pratiquement pas : la majorité des signaux est soit rouge soit vert, avec une minorité de signaux jaunes

Sachant que LAMP-2 est une protéine de la membrane des lysosomes et que le jaune peut provenir de la superposition de signaux verts et rouges, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correct(s)

- A) Les structures aberrantes de type peroxysome des cellules ZS1 font parties du compartiment lysosomal
- B) Les structures aberrantes de type peroxysome des cellules ZS1 peuvent être dégradées par autophagie
- C) LAMP-2 et PMP70 colocalisent systématiquement
- D) Des anticorps associés à des particules d'or sont denses aux électrons ce qui permet de visualiser des particules spécifiques en microscopie électronique
- E) ABCD fausses

- **QCM 12** : Des expériences d'immunolocalisation avec anticorps anti-PMP70 associés à des particules d'or ont permis de visualiser par microscopie électronique des structures membranaires sphériques avec peu ou pas de contenu dans des coupes de cellules du patient ZS1. Dans des expériences de **double immunofluorescence** sur des cellules **ZS1** avec des **anticorps anti-PMP70 révélés à la fluorescéine** (émission dans le **vert**) et des **anticorps anti-LAMP-2 révélés à la rhodamine** (émission dans le **rouge**), une coloration de **type A** (cf figure 1) est observée. Lorsque les images obtenues pour la fluorescence verte et rouge sont superposées les **signaux fluorescents ne se chevauchent pratiquement pas** : la majorité des signaux est soit rouge soit vert, avec une **minorité de signaux jaunes**

Sachant que **LAMP-2** est une **protéine de la membrane des lysosomes** et que le jaune peut provenir de la superposition de signaux verts et rouges, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correct(s) :

- A) Les structures aberrantes de type peroxysome des cellules ZS1 font parties du compartiment lysosomal
- B) **Les structures aberrantes de type peroxysome des cellules ZS1 peuvent être dégradées par autophagie**
- C) LAMP-2 et PMP70 colocalisent **systématiquement**
- D) **Des anticorps associés à des particules d'or sont denses aux électrons ce qui permet de visualiser des particules spécifiques en microscopie électronique**
- E) ABCD fausses

► Explications :

A) Ces structures ne peuvent pas toutes faire parties du compartiment lysosomal car dans ce cas nous n'aurions qu'une fluorescence jaune, or, il est bien dit que l'on obtenait qu'une minorité de fluorescence jaune.

B) En effet, les lysosomes pouvant réaliser l'autophagie, et la présence de fluorescence jaune nous montre qu'il y a bien quelques dégradations de ces structures peroxysomales par autophagie.

C) Ces 2 protéines ne co-localisent pas systématiquement, sinon nous n'obtiendrions qu'une fluorescence jaune.

D) Cet item est vrai, c'est du cours pur (cf. fiche microscopie).

- **QCM 13** : De nouvelles expériences d'immunofluorescence indirectes ont été effectuées en utilisant du Triton X100 et des anticorps primaires de lapin anti-thiolase, une autre enzyme peroxysomale. Les cellules normales et celles du patient NALD présentent une coloration de type A quand les cellules sont perméabilisées au Triton X100 (cf figure 1) et de type C quand elles sont perméabilisées à la digitonine (cf figure 2) ; les cellules des patients ZS1, ZS2, ZS3, IRD, HPA et RCDP présentent une coloration de type B (cf figure 1), que ce soit avec le Triton X100 ou la digitonine

À propos de ces résultats, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s)

A) Les cellules du patient NALD sont altérées dans une voie d'importation des protéines peroxysomales qui est différente de celle affectée dans les cellules du patient RCDP

B) Le patient ZS1 présente des défauts au niveau de plusieurs voies d'importation des protéines peroxysomales C) La voie d'importation de la thiolase et de la catalase est identique

D) La digitonine empêche l'importation de la thiolase dans les peroxysomes des cellules normales

E) ABCD fausses

- **QCM 13** : De nouvelles expériences d'immunofluorescence indirectes ont été effectuées en utilisant du **Triton X100** et des **anticorps primaires** de lapin **anti-thiolase**, une autre **enzyme peroxysomale**. Les cellules **normales** et celles du patient **NALD** présentent une coloration de **type A** quand les cellules sont **perméabilisées** au **Triton X100** (cf figure 1) et de **type C** quand elles sont **perméabilisées** à la **digitonine** (cf figure 2) ; les cellules des patients **ZS1, ZS2, ZS3, IRD, HPA et RCDP** présentent une coloration de **type B** (cf figure 1), que ce soit avec le **Triton X100** ou la **digitonine**

À propos de ces résultats, laquelle ou lesquelles de ces propositions est (sont) correcte(s) :

- A) Les cellules du patient **NALD** sont altérées dans une voie d'importation des protéines peroxysomales qui est différente de celle affectée dans les cellules du patient **RCDP**
- B) Le patient **ZS1** présente des défauts au niveau de plusieurs voies d'importation des protéines peroxysomales
- C) La voie d'importation de la thiolase et de la catalase est identique
- D) La digitonine empêche l'importation de la thiolase dans les peroxysomes des cellules normales
- E) ABCD fausses

► Explications :

A) Ce résultat est possible car on observe des figures de fluorescence différentes chez les patients NALD et RCDP.

B) D'après les résultats précédents et ceux présentés ici, on voit bien un problème de localisation de ces protéines (thiolase, catalase et uricase) car nous sommes en présence après l'expérience d'une coloration de type B (avec coloration dans tout le cytosol et non à l'endroit où elle devrait être, c'est à dire au niveau des peroxysomes).

C) Nous ne pouvons dire que la catalase et la thiolase ont la même voie d'importation. Car lors de l'expérience sur la localisation de la catalase chez le patient RCDP nous la retrouvons bien au niveau des peroxysomes (coloration de type A), ce n'est pas le cas lors de l'expérience de démonstration de la localisation de la thiolase où nous obtenons une coloration de type B, c'est à dire entièrement cytosolique.

D) Si la digitonine empêchait l'importation de la thiolase dans les peroxysomes nous n'aurions que des colorations de type B. En l'occurrence, pour le patient NALD nous obtenons une coloration de type C, ce qui nous montre que la thiolase est dans les peroxysomes, leur intérieur n'étant pas accessible aux anticorps, la digitonine n'ayant pas perméabilisé la membrane peroxysomale.

- ▶ QCM 14 : Les séquences en acides aminés des polypeptides catalase, uricase et thiolase ont été déterminées. Elles sont très différentes les unes des autres l'exception d'un tripeptide de séquence SKL (Sérine-Lysine-Leucine) localisé à l'extrémité C-terminale des protéines catalase et uricase. Ce tripeptide est appelé PTS1. Il est absent de la thiolase. Ces observations ont conduit les chercheurs à étudier le rôle de PTS1 dans l'importation des protéines dans les peroxysomes. A cette fin, ils ont modifié la phase codante du gène déterminant la synthèse de la catalase en fusionnant la partie N-terminale de son ADNc à l'étiquette myc. Ce nouveau gène *myc-CAT* ainsi qu'une version délétée des trois derniers codons déterminant la synthèse du peptide SKL (*myc-CAT-SKL*) ont été introduits dans un vecteur permettant leur expression à partir du promoteur CMV. Les vecteurs recombinants ainsi obtenus s'appellent *CMV-myc-CAT* et *CMV-myc-CAT-SKL*. Ces constructions ont été transfectées dans des fibroblastes normaux et dans des fibroblastes provenant du patient ZS1. Des expériences de double immunofluorescence indirecte en utilisant du Triton X100 comme détergent et des anticorps primaires anti-myc révélés à la fluorescéine et anti-PMP70 révélés à la rhodamine ont été effectuées trois jours après les transfections. Les résultats après des expériences de microscopie et superposition des images des signaux fluorescents émis dans le rouge et dans le vert sont présentés dans le tableau III

ADN transfecté	Cellule transfectée	Type de signaux jaunes (cf. Fig 1 et 2)
CMV-myc-CAT	Normale	Type A
CMV-myc-CAT-SKL	Normale	Type C
CMV-myc-CAT	ZS1	Type C
CMV-myc-CAT-SKL	ZS1	Type C

Les résultats du tableau III :

- A) Montrent que la présence de PTS1 est nécessaire et suffisante pour le transport de la catalase du cytosol dans les peroxysomes
- B) Montrent que les fibroblastes du patient ZS1 sont incapables d'importer l'uricase dans les peroxysomes
- C) Indiquent que les protéines chimères myc-CAT sont exprimées dans les fibroblastes normaux et dans ceux du patient ZS1
- D) Suggèrent que PTS1 est impliqué dans l'importation des protéines peroxysomales
- E) ABCD fausses

- **QCM 14** : Les séquences en acides aminés des polypeptides **catalase**, **uricase** et **thiolase** ont été déterminées. Elles sont **très différentes** les unes des autres **l'exception d'un tripeptide de séquence SKL** (Sérine-Lysine-Leucine) localisé à l'extrémité C-terminale des protéines **catalase** et **uricase**. Ce tripeptide est appelé **PTS1**. Il est **absent de la thiolase**. Ces observations ont conduit les chercheurs à étudier le **rôle de PTS1** dans **l'importation des protéines dans les peroxysomes**. A cette fin, ils ont **modifié la phase codante** du **gène** déterminant la **synthèse de la catalase** en fusionnant la partie N-terminale de son ADNc à **l'étiquette myc**. Ce nouveau **gène myc-CAT** ainsi qu'une **version délétée des trois derniers codons déterminant la synthèse du peptide SKL** (**myc-CAT-SKL**) ont été introduits dans un vecteur permettant leur expression à partir du **promoteur CMV**. Les **vecteurs recombinants** ainsi obtenus s'appellent **CMV-myc-CAT** et **CMV-myc-CAT-SKL**. Ces constructions ont été transfectées dans des **fibroblastes normaux** et dans des fibroblastes provenant du patient **ZS1**. Des expériences de **double immunofluorescence indirecte** en utilisant du **Triton X100** comme détergent et des **anticorps primaires anti-myc** révélés à la **fluorescéine** et **anti-PMP70** révélés à la **rhodamine** ont été effectuées trois jours après les transfections. Les résultats après des expériences de microscopie et **superposition** des images des signaux fluorescents émis dans le rouge et dans le vert sont présentés dans le tableau III

ADN transfecté	Cellule transfectée	Type de signaux jaunes (cf. Fig 1 et 2)
CMV-myc-CAT	Normale	Type A
CMV-myc-CAT-SKL	Normale	Type C
CMV-myc-CAT	ZS1	Type C
CMV-myc-CAT-SKL	ZS1	Type C

Les résultats du tableau III :

- A) ~~Montrent~~ que la présence de PTS1 est nécessaire et suffisante pour le transport de la catalase du cytosol dans les peroxysomes
- B) ~~Montrent~~ que les fibroblastes du patient ZS1 sont incapables d'importer l'uricase dans les peroxysomes
- C) Indiquent que les protéines chimères myc-CAT sont exprimées dans les fibroblastes normaux et dans ~~ceux du patient ZS1~~
- D) **Suggèrent que PTS1 est impliqué dans l'importation des protéines peroxysomales**
- E) ABCD fausses

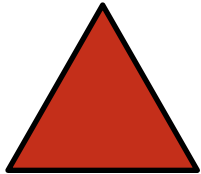
► Explications :

A) On ne peut ni montrer, ni démontrer mais que suggérer dans ce cas là, car on étudie une protéine chimère : CMV-myc-CAT

B) Dans un premier temps, on ne parle que de la catalase et non de l'uricase dans l'expérience. Deuxièmement on ne peut pourrât que le suggérer du fait que nous sommes aussi en présence d'une protéine chimère.

C) Ici, pour les patients ZS1 nous avons une coloration de type C, alors qu'il faudrait une coloration de type A (fluorescence dans le cytoplasme). Cet item est donc faux.

D) En effet, si on enlève SKL (= PTS1) chez une cellule normale on se retrouve avec une coloration de type C alors qu'avec SKL on a une coloration de type A.



Attention à bien différencier suggérer et démontrer !

- ▶ QCM 15 : Des gènes recombinants ont été construits dans lesquels la phase codante de la GFP est modifiée de telle sorte que les trois derniers acides aminés correspondent à la séquence SKL. Ce gène, appelé *GFP-PTS1*, est introduit en aval du promoteur CMV permettant son expression dans des cellules animales. Ce vecteur, appelé *CMV-GFP-PTS1* a été transfecté. Des expériences de double immunofluorescence indirecte en utilisant du Triton X100 comme détergent et des anticorps primaires anti-GFP révélés à la fluorescéine et anti-PMP70 révélés à la rhodamine ont été effectués trois jours après les transfections. Les résultats après des expériences de microscopie et superposition des images signaux fluorescents émis dans le rouge et dans le vert sont présentés dans le tableau IV

ADN transfecté	Cellule transfectée	Type de signaux jaunes (cf. Fig 1)
CMV-GFP	Normale	Type C
CMV-GFP-PTS1	Normale	Type A
CMV-GFP	ZS1	Type C
CMV-GFP-PTS1	ZS1	Type C
CMV-GFP	ZS2	Type C
CMV-GFP-PTS1	ZS2	Type C
CMV-GFP	RCDP	Type C
CMV-GFP-PTS1	RCDP	Type A
CMV-GFP	NALD	Type C
CMV-GFP-PTS1	NALD	Type C

Les données des tableaux III et IV :

- A) Suggèrent fortement que la protéine GFP peut être importée dans les peroxysomes
- B) Montrent que le patient RCDP est normal pour l'import des protéines contenant PTS1
- C) Démontrent que PTS1 est nécessaire à l'expression de la GFP
- D) Montrent que PTS1 est suffisant pour importer un polypeptide dans les peroxysomes
- E) ABCD fausses

- ▶ QCM 15 : Des **gènes recombinants** ont été construits dans lesquels la **phase codante de la GFP est modifiée** de telle sorte que les **trois derniers acides aminés** correspondent à la **séquence SKL**. Ce gène, appelé **GFP-PTS1**, est introduit en aval du promoteur CMV permettant son expression dans des cellules animales. Ce **vecteur**, appelé **CMV-GFP-PTS1** a été transfectée. Des expériences de **double immunofluorescence indirecte** en utilisant du **Triton X100** comme détergent et des **anticorps primaires anti-GFP** révélés à la **fluorescéine** et **anti-PMP70** révélés à la **rhodamine** ont été effectués trois jours après les transfections. Les résultats après des expériences de microscopie et **superposition** des images signaux fluorescents émis dans le rouge et dans le vert sont présentés dans le tableau IV

ADN transfecté	Cellule transfectée	Type de signaux jaunes (cf. Fig 1)
CMV-GFP	Normale	Type C
CMV-GFP-PTS1	Normale	Type A
CMV-GFP	ZS1	Type C
CMV-GFP-PTS1	ZS1	Type C
CMV-GFP	ZS2	Type C
CMV-GFP-PTS1	ZS2	Type C
CMV-GFP	RCDP	Type C
CMV-GFP-PTS1	RCDP	Type A
CMV-GFP	NALD	Type C
CMV-GFP-PTS1	NALD	Type C

- A) Suggèrent fortement que la protéine GFP ~~peut être importée dans les peroxysomes~~
- B) **Montrent que le patient RCDP est normal pour l'import des protéines contenant PTS1**
- C) ~~Démontrent que PTS1 est nécessaire à l'expression de la GFP~~
- D) ~~Montrent que PTS1 est suffisant pour importer un polypeptide dans les peroxysomes~~
- E) ABCD fausses

► Explications :

- A) Nous obtenons une coloration de type C, nous ne pouvons donc pas suggérer que CMV-GFP (et que donc la GFP) peut être importé dans les peroxysomes.
- B) Avec PTS1 on obtient bien une coloration de type A montrant que la protéine (ici GFP) est importée.
- C) PTS1 n'a pas de rôle dans l'expression de la GFP car la GFP a une fluorescence intrinsèque, indépendante de la séquence sur laquelle on la fixe.
- D) Nous sommes ici en présence de protéines chimères, nous ne pouvons donc ici que suggérer ce résultat.



FIN !!!