

ATTENTION !

Nous devons revoir cette correction avec notre cher Gilson Jeudi 3 novembre. Malheureusement, il fait pas cours. Alors pour pas vous faire attendre trop longtemps, on vous poste NOTRE proposition de corrections, sachant qu'on a quelques hésitations (vous allez voir). Faites nous part de vos remarques (gentiment ^^) on essaiera de vous répondre, et on pourra en faire part au prof mercredi prochain ! Voilou ! Travaillez bien !

Question 5 : D

Ce qu'il faut comprendre et retenir de ce texte de 10 lignes :

- Visualisation de **c-Myc** par des **anticorps primaires de souris**
- Visualisation de **H2A** par des **anticorps primaires de lapins**

- A. NON ! C'est toujours le même piège, on peut pas avoir des anticorps secondaires (= anticorps de souris anti-immunoglobuline de lapin) qui sont de la même espèce que les anticorps primaires de l'autre protéine qu'on veut visualiser.
- B. Non car les fluorochromes sont identiques
- C. Non plus ...
- D. OUI ! Les animaux et les fluorochromes concordent
- E. Non, ce sont les même fluorochromes

Question 6 : E

- A. Non ! Pas forcément. Ici la lignée COS-7 est une lignée de cellules rénales de singe, donc aucun intérêt de la résistance à l'antibiotique, ça pourra pas nous servir à sélectionner les cellules qui ont été transfectées
- B. Faux
- C. Non, si on en croit la ronéo 5 «**L'expression transitoire** : Donc notre gène étranger va être incorporé dans le noyau. Dans la **plupart du temps**, si un introduit artificiellement une molécule d'ADN, l'ADN va bien être incorporé dans le noyau, cependant, il ne s'insèrera pas au milieu du génome de la cellule hôte) et au bout de quelques divisions il va être perdu. Cependant, ces quelques divisions peuvent constituer un temps suffisant pour que l'expérimentateur puisse étudier l'effet de ce transgène, surtout au niveau de son expression. (L'expression, c'est la fabrication d'une protéine ou d'un ARN correspondant au gène qu'on étudie. [la protéine venant bien sûr de l'ARN]). Cette expression transitoire est **extrêmement utilisée** parce que c'est assez commode ! On prend n'importe quel ADN avec des signaux d'expression et on peut voir pendant quelques jours l'expression d'une protéine. Ça peut être suffisant pour faire des études de microscopie ou pour regarder l'effet immédiat d'un gène sur la physiologie d'une cellule.» Donc on a sûrement affaire à une **expression transitoire**. L'expression permanente est très très rare, (1/1000)

- D. Faux, elle peut, la preuve, on observe de la fluorescence !
- E. VRAI, d'après le texte de l'énoncé «10 % des cellules émettent une fluorescence correspondant à l'excitation de la GFP dans le noyau»

Question 7 : RIEN

Ce qu'il faut avoir compris : On fait un **FRAP** sur notre protéine nucléaire c-Myc-GFP

- A. Faux, **énergie inférieure et longueur d'onde supérieure**
- B. FAUX ! c'est la définition du **FRET** et pas du photoblanchiment. La ronéo 2 dit : « Le **photoblanchiment** (photobleaching) consiste à **irradier les molécules fluorescentes avec une lumière de très forte intensité**, on tue à la fluorescence de manière **irréversible**, la molécule existe toujours et garde ses propriétés biologiques, mais la fluorescence est irrémédiablement tuée.»
- C. Faux, au contraire, si la réapparition de la fluorescence est très rapide, c'est que les molécules bougent très vite, : c-Myc-GFP va vite
- D. Non pas du tout, ça peut être des protéines c-Myc-GFP qui étaient à un autre endroit du nucléoplasme, déjà traduites, et qui ont bougé ensuite, et une traduction c'est beaucoup trop lent !
- E. C'est n'importe quoi ...

Question 8 : CE

Ce qu'il faut avoir compris : On fait un **FLIP**. On a 2 cellules, L'irradiation se fait **en continu** dans le **cytoplasme** alors que la fluorescence est dans le noyau d'une seule des 2 cellules.

On observe une perte de fluorescence progressive au cours du temps dans le noyau de la cellule irradiée. On n'observe pas de perte de fluorescence dans le noyau de la cellule non irradiée.

- A. Non car il n'y a pas de perte de fluorescence (ou du moins de perte **significative**) dans le noyau de la 2ème cellule
- B. Non, dans le noyau !
- C. Oui car sur la courbe B, on voit que dès 1 minute on a plus que 60 % de fluorescence, donc il a fallu moins de 2 minutes pour la protéine pour sortir
- D. Non, c'est pas la durée de vie ! On étudie les mouvement de la protéine pas sa durée de vie
- E. **VRAI** ! Même si c'est absurde, et qu'on est quasi sur que c'est pas ce qu'il se passe en vrai, c'est COMPATIBLE !!!! **On va en parler avec Gilson quand même, mais à priori c'est bien juste**

Question 9 : ACE

- A. Vrai

- B.** Non car le nucléole est constitué d'une monocouche !! Piège méchant, donc pas possible de couper entre les 2 membranes ! La cryofracture est une méthode de choix pour visualiser les **organites** et le nucléole **n'est pas un organite**.
- C.** Oui, c'est la résolution maximale de la microscopie électronique
- D. Faux** c'est la définition de la microscopie à balayage
- E.** VRAI, c'est comme de l'immunofluorescence.

Question 10 : ABE

Ce qu'il faut avoir compris : On regarde des fibroblastes humains dans des bonnes conditions de culture.

On étudie l'expression de la β -galactosidase et la modification morphologique des fibroblastes (= 2 marqueurs de la sénescence) en fonction du nombre de division (= nombre de dédoublement de la population)

On crée plusieurs lignées :

- LF30-SVF : On attend 30 DP (dédoublements de population, considérez que c'est une échelle de temps) puis on met les cellules 5 jours sans SVF
- LF50-SVF : On attend 50 DP puis on met les cellules 5 jours sans SVF
- LF30-SVF+ : On attend 30 DP puis on met les cellules 5 jours sans SVF, puis on les remet 24 heures en présence de SVF
- LF50-SVF+ : On attend 50 DP puis on met les cellules 5 jours sans SVF, puis on les remet 24 heures en présence de SVF
- LF(hTERT) : Cellules transfectées avec le gène de la sous unité catalytique de la télomérase après 5 DP
- LF(AgT) : Cellules transfectées avec le gène de l'antigène T du virus oncogène SV40 après 5 DP
- LF(RasV12) : Cellules transfectées avec un vecteur exprimant RasV12 (version oncogène de Ras) après 12 DP
- LF(RasV12-hTERT) Exprimant RasV12 ET la télomérase après 12 DP
- LF(RasV12-AgT) Exprimant RasV12 ET gène de l'antigène T du virus oncogène SV40 après 12 DP

- A.** C'est vrai !
- B. VRAI !** Les cellules eucaryotes ont besoin de signaux pour se diviser
- C. FAUX !** A cause de la sénescence, les cellules humaines normales ne peuvent pas se diviser à l'infini
- D. FAUX !** On le voit en observant la lignée LF30-SVF (donc privée de sérum pendant 5 jours) et on voit qu'il n'y a que 5% des cellules sur lesquelles on observe les marqueurs de la sénescence.
- E. VRAI VRAI VRAI ET RE-RE VRAI !!!! +++**

Question 11 : BCD

- A.** Euh ... NON !
- B.** OUI car très riche en protéines
- C.** OUI pour la même raison
- D.** OUI !
- E.** NON !

Idem on va en parler avec Gilson, car on ne sait pas si on utilise le SVF pour l'apport en protéines ou seulement pour les facteurs de croissance. Donc c'est soit BCD, soit D.

Question 12 : CD

ATTENTION, on veut démontrer ! On va parler avec Gilson du problème démontre/suggère. Mais normalement ce qu'on a mis est bon, avec ce type d'expériences on peut faire des démonstration.

- A.** Là, on a juste à regarder les 5 premières colonnes du tableau, et on voit que c'est l'inverse, la taille des télomères diminue

LF	9	0	0	8,5
LF	12	0	0	8
LF	30	15	10	7
LF	55	80	80	5,7
LF	60	85	85	5

- B.** Non, là on regarde ça :

LF(hTERT)	30	0	0	8	47	40	13
LF(hTERT)	55	0	0	9	47	40	13

Et on voit que les proportions de cellules en G1/S/G2 sont les mêmes que pour les LF normales à ce stade de division, donc c'est faux

- C.** VRAI ! On peut démontrer car on sait que les cellules expriment les transgènes et que mis à part l'introduction du transgène dans la cellule, rien d'autre n'a été modifié. On voit que Quand la télomérase est exprimée les télomères sont plus grands que quand la télomérase n'est pas exprimée

LF	30	15	10	7
LF	55	80	80	5,7

VS

LF(hTERT)	30	0	0	8
LF(hTERT)	55	0	0	9

- D. Vrai** aussi car tous les marqueurs de la sénescence (**β gal et morphologie**) sont absents dans la cellules exprimant la télomérase
- E.** N'importe quoi !

Question 13 : DE

- A. Non, rien ne nous dit ça !
 B. NON ! La preuve, avec ça :

LF(RasV12)	12	80	85	8
------------	----	----	----	---

Les cellules sont très sénescents (80 et 85) et pourtant on a des télomères encore longs !

- C. Non, la preuve par ça :

LF(RasV12)	12	80	85	8	90	4	6
LF(RasV12-hTERT)	12	82	79	8	90	3	7

On voit que avec ou sans la télomérase; on est toujours bloqué en G1 dans le cycle cellulaire.

- D. VRAI
 E. VRAI ! Si on regarde toutes les cellules qui sont sénescents à au moins 80 %, elles ont toutes en commun d'avoir des très hauts pourcentages de cellules bloqués en G1.

Question 14 : AD

- A. *item bizarre, à vérifier, même si on aurait tendance à dire que c'est vrai car l'absence de facteurs de croissance empêche la division, et si il n'y a pas de division, il n'y a pas de senescence... mais item bizarre*
 B. Faux, on ne peut pas le démontrer, même si ça semble être vrai
 C. FAUX ! Déjà c'est pas très plausible parce que si il n'y a pas de division (et c'est le cas car il n'y a pas de facteurs de croissance et qu'on voit que le cycle cellulaire est bloqué) il n'y a pas de diminution de la taille des télomères. Et en plus il ne faut pas oublier que les lignées LF30 et LF55 sont restées 5 jours sans SVF avant qu'on fasse les observations pour les résultats du tableau. Donc en 5 jours, il n'y a pas eu de raccourcissement des télomères par rapport aux cellules avec SVF.
 D. (Nb : Stimulation mitogénique = SVF) VRAI, c'est ce qu'on observe dans la lignée LF
 E. On ne sait pas

Question 15 : BD

- A. Faux, (en fait c'est vrai, vous le verrez après, sauf que le tableau ne nous le dit pas)
 B. OUI
 C. Non, faites appel à vos connaissances, **la sénescence est un phénomène irréversible.** *Cependant, il faut aussi qu'on en discute avec*

Gilson, parce que le tableau pourrait nous faire penser à ça. On vous tient au courant

- D. VRAI ! Par exemple dans les cellules LF à 60 divisions, on a toujours stimulation mitogénique (car on a toujours du SVF) pourtant il n'y a plus de division, ça suggère bien que les inhibiteurs du cycle cellulaire sont suffisants pour contrebalancer ...
 E. FAUX, exemple les LF30-SVF qui sont **quiescentes**

LF30-SVF	30	5	5	7	90	0,5	9,5
----------	----	---	---	---	----	-----	-----

Question 21 : AD

- A. VRAI
 B. N'importe quoi !
 C. FAUX spécifique
 D. VRAI !
 E. FAUX, c'est le rôle de la pinocytose

Question 22 : D?

- A. Faux, c'est la phagocytose
 B. Faux, peut être stocké, ou il peut y avoir transytose ...
 C. FAUX, c'est du cours
 D. Faux, d'endocytose *idem, il faut qu'on en discute avec Gilson parce que on peut aussi penser aux vésicules stockées dans le transGolgi et sur la membrane plasmique interne avant d'être exocyté. A suivre.*
 E. Faux, par transytose, c'est à dire endocytose par récepteur interposé puis EXOCYTOSE

Question 23 : C

- A. Faux, c'est la définition **du lysosome**
 B. Faux, il **diminue** !
 C. VRAI !!!
 D. Faux, à un pH beaucoup plus acide!
 E. Non