

## Chapitre 4 : Les méthodes en biologie cellulaire

### Question 1 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. Un vecteur est un moyen de faire rentrer de l'information génétique dans le noyau d'une cellule hôte afin que cette information soit utilisée par la cellule ; les virus et les plasmides sont utilisés comme vecteurs.
- B. Pour des raisons éthiques, les cellules humaines ne sont jamais utilisées en biologie cellulaire.
- C. En transgénèse classique, on injecte de l'ADN linéaire dans un ovocyte fécondé.
- D. La recombinaison homologe a été développée grâce à un système de défense endogène des bactéries.
- E. Une souris chimère est une souris dont seulement une partie des cellules est porteuse d'une mutation.

### Question 1 – Correction : ACE

**A VRAI** Ce sont effectivement les deux grands moyens utilisés pour faire entrer de l'ADN dans une cellule pour que celui-ci soit pris en charge ; ils ont chacun leur avantage et le choix du vecteur dépend du but de l'expérience.

**B FAUX** Au contraire, les cellules humaines sont très utilisées en biologie cellulaire, car elles sont finalement les plus représentatives, à l'échelle de la cellule, de ce qui nous intéresse pour la clinique. On utilise notamment des types cellulaires particuliers (cellules pancréatiques, hépatiques...) ou des modèles de cellules cancéreuses. Attention, on parle ici d'expériences in vitro, la question éthique se pose quand on arrive au stade in vivo, c'est-à-dire au stade de l'organisme entier. C'est lors d'expériences in vivo qu'on se tournera vers des modèles animaux (souris, poissons, embryons de poulets...) ou la question éthique se pose évidemment également, mais qui sont tout de même très utilisés aujourd'hui.

**C VRAI** Il n'y a pas grand-chose à ajouter, c'est le principe de la transgénèse classique : on injecte de l'ADN linéaire dans une cellule et on espère qu'il sera intégré au génome (car ça se fait de manière aléatoire) à un endroit où il sera transcrit ET où il ne causera pas de dommages trop importants.

**D FAUX** C'est un mélange de deux notions. La méthode CRISPR-CAS9 utilise un système de défense endogène des bactéries : en effet, le principe de l'ARN guide (ARNsg) qui attire l'endonucléase CAS9 est un moyen développé par les bactéries pour se défendre de l'attaque d'un virus (lors d'une primo infection, l'ADN viral est intégré au génome de la bactérie qui produira, à partir de cette séquence, l'ARNsg correspondant lors d'infections suivantes → bim bam boom on recrute CAS9 et on dézingue le virus, et ce y compris dans les générations suivantes de bactéries -pas à savoir, pour votre culture G-). ATTENTION, il est possible d'utiliser la recombinaison homologe pour réparer une lésion induite par la méthode CRISPR-CAS9, cependant la recombinaison homologe elle-même est un **mécanisme mis en place par la cellule en cas d'erreur lors de la réplication de l'ADN** et permettant de combler un « trou » grâce à de l'ADN donneur (vous l'avez sûrement vu plus en détail en UE2 ;))

**E VRAI** Quand on fait de la transgénèse classique ou par recombinaison homologe, on utilise des cellules souches totipotentes – les fameuses cellules ES – porteuses de notre mutation après sélection, et on injecte ces cellules à un stade embryonnaire précoce, le blastocyste (ce qui est cool c'est que vous allez faire de l'embryo bientôt, vous allez tout comprendre). Le stade blastocyste est un stade pluricellulaire, ce qui signifie que vous ajoutez une cellule à un organisme – certes indifférencié – en cours de développement. Ainsi, cette cellule qui se multiplie au milieu des autres cellules non-mutées, va être à l'origine d'une certaine partie des cellules de notre organismes, mais pas de toutes : on aura un individu chimère. Si on veut obtenir un individu dont toutes les cellules portent la mutation, il faut croiser des chimères entre elles : si les cellules germinales de ces chimères portent la mutation, alors l'individu sera porteur de la mutation pour toutes ses cellules.

**Question 2 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :**

- A. L'utilisation d'un plasmide comme vecteur permet de produire une grande quantité de vecteur en peu de temps, grâce à la multiplication des bactéries.
- B. Pour qu'un vecteur soit pris en charge par les mécanismes de transcription endogènes de la cellule, il doit comporter un codon start et un codon stop.
- C. En biologie cellulaire, on priorise l'injection directe de protéines pour éviter le biais de synthèse induit par l'utilisation de vecteurs.
- D. La cytométrie de flux est une méthode quantitative et qualitative.
- E. Plus la taille d'un constituant cellulaire est grande, plus il faudra de cycles de centrifugation pour le récupérer.

**Question 2 – Correction : AD**

**A VRAI** C'est effectivement l'un des intérêts des plasmides : en insérant un gène d'intérêt dans ce brin d'ADN circulaire et en le réinjectant dans les bactéries, la multiplication des bactéries va permettre la multiplication du plasmide, et donc l'obtention d'une grande quantité de vecteur en peu de temps.

**B FAUX** Un vecteur devra effectivement comporter un codon start et un codon stop (s'il code pour une protéine), mais pour que l'**ARNm** produit soit reconnu par le système de **traduction**. Pour la **transcription** on a besoin d'un **promoteur**.

**C FAUX** Au contraire, il est rare d'injecter directement les protéines, pour plusieurs raisons : l'ADN est plus facile à produire, sa synthèse perdure dans le temps, et les mécanismes endogènes de la cellule prennent en charge les modifications post traductionnelle nécessaire au fonctionnement de la protéine.

**D VRAI** La cytométrie de flux permet à la fois d'observer les caractéristiques des cellules, de les trier, et de les quantifier (éventuellement en fonction de ces caractéristiques).

**E FAUX** Plus la taille d'un constituant cellulaire est petite, plus il faudra de cycles de centrifugation pour le récupérer. C'est logique, les constituants les plus lourds descendront plus vite.

### Question 3 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. Le SDS-PAGE permet la séparation de molécules en fonction de la charge.
- B. Le SDS permet de rompre les ponts disulfures.
- C. Le bleu de Coomassie permet de révéler les protéines totales.
- D. On peut révéler des protéines grâce à des anticorps sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide.
- E. Le Western Blot est une méthode quantitative qui permet de comparer les quantités de deux protéines différentes.

### Question 3 – Correction : C

**A FAUX** Au contraire, le SDS -PAGE permet de charger négativement toutes les protéines et ainsi de les séparer en fonction de leur masse cellulaire : en effet, on va ensuite appliquer un champ électrique dans lequel elles vont migrer (en direction du pôle + comme elles sont chargées -), plus elles sont lourdes et plus elles seront retenues et donc moins elles migreront.

**B FAUX** C'est le cas des agents dénaturants ; on parle alors de « conditions dénaturantes ». Le SDS, lui, permet uniquement la rupture des liaisons faibles (on s'était un peu embrouillé.e.s lors de la permanence, d'où ce rappel).

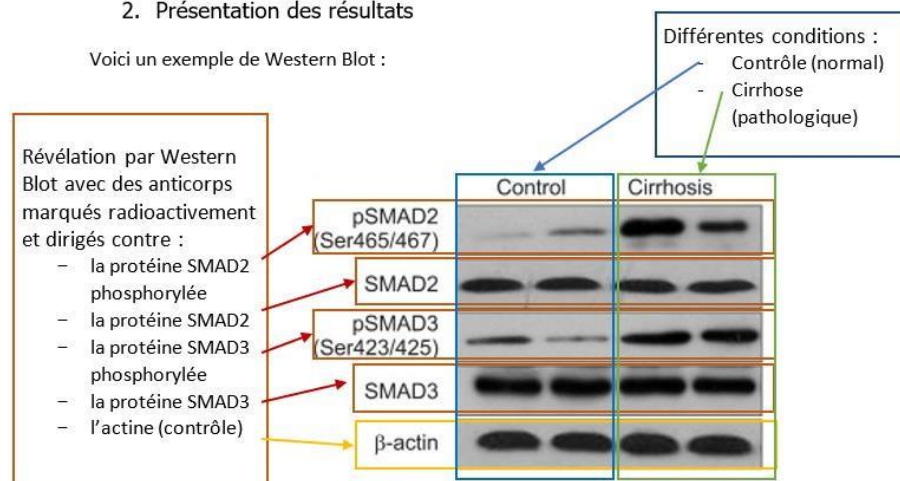
**C VRAI** Yes, contrairement au Western Blot dans lequel on va révéler uniquement les protéines qui nous intéressent grâce à des anticorps, le bleu de Coomassie, en se fixant sur toutes les protéines, permet de révéler les protéines totales, distribuées en fonction de leur poids moléculaire (après migration sur un gel).

**D FAUX** Les gels d'agarose ou de polyacrylamide sont trop fragiles pour ce genre de manipulation, c'est pourquoi on transfère nos protéines/ADN sur une membrane avant révélation.

**E FAUX** Le Western Blot est effectivement une méthode quantitative mais qui permettra uniquement de comparer les quantités d'une même protéine dans deux conditions différentes, autrement dit au sein d'une ligne mais pas d'une colonne.

#### 2. Présentation des résultats

Voici un exemple de Western Blot :



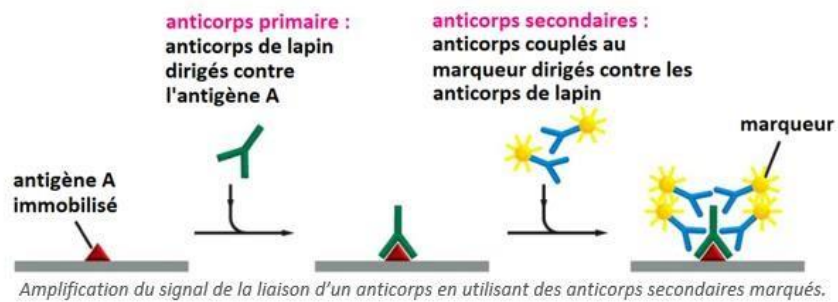
Dans cet exemple du poly, on pourra par exemple comparer les quantités de SMAD2 dans la condition normale (contrôle) et dans la condition cirrrose, et ce grâce à l'actine qui est notre témoin de charge, mais pas entre SMAD 2 et SMAD3 par exemple.

### Question 4 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :

- A. Les anticorps secondaires sont uniquement utilisés lorsque l'on cherche à amplifier un signal très faible, sinon cette technique est trop complexe et coûteuse.
- B. Un sérum d'anticorps polyclonal est spécifique d'un antigène.
- C. Dans l'ELISA indirect, le but est de doser un anticorps, alors que l'ELISA par immunocapture permet de doser un antigène.
- D. Une co-immunoprécipitation ne permet jamais de prouver une interaction directe
- E. Pour révéler la présence d'une protéine grâce à un anticorps, il est nécessaire de fixer et de perméabiliser nos cellules, sauf si ces dernières ont un domaine extra-membranaire.

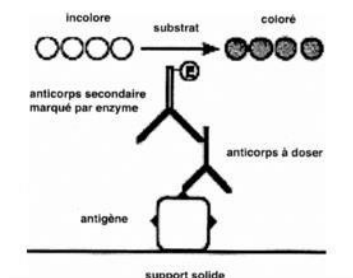
**Question 4 – Correction : BCE**

**A FAUX** Au contraire, l'utilisation des anticorps secondaires permet en général de gagner du temps et de l'argent : en effet, plutôt que d'avoir à coupler un anticorps monoclonal spécifique d'une protéine à un fluorochrome, on utilise des anticorps qui reconnaissent la partie Fc (spécifique de l'espèce) des anticorps de l'espèce chez qui on a produit les anticorps spécifiques de notre protéine : si on a un anticorps anti-X produit chez le lapin, il nous suffira d'injecter ces anticorps puis d'utiliser des anticorps anti-lapin fluorescent (que l'on peut produire en grande quantité) pour révéler la présence de notre protéine X :

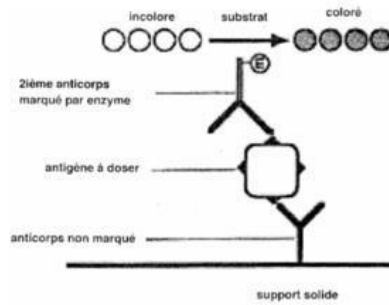


**B VRAI** Attention, un sérum d'anticorps polyclonal n'est pas spécifique d'un épitope, il est en revanche spécifique d'un antigène ;) Les anticorps monoclonaux, eux, sont spécifiques d'un seul épitope (molécule de surface) d'un antigène donné.

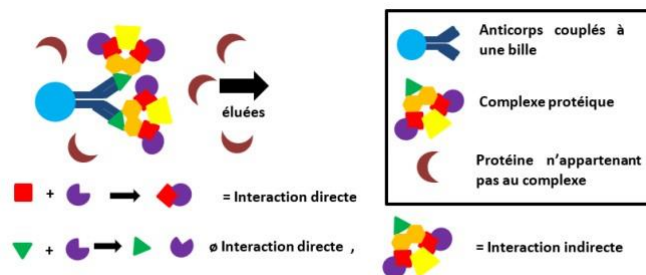
**C VRAI** En ELISA indirect, on fixe un antigène au fond d'une boîte et on quantifie les anticorps récupérés par cette antigène (utilisé en sérologie ou diagnostique de maladies auto-immunes)



En ELISA par immunocapture, c'est l'inverse, on fixe des anticorps et on dose les antigènes récupérés (grâce à des anticorps de révélation).



**D FAUX** En général, l'immunocapture ne permet pas de mettre en évidence une interaction directe mais seulement de prouver que deux protéines font partie d'un même complexe.



Cependant, si l'on effectue une immunocapture sur des protéines purifiées, et qu'on sait donc qu'il ne peut pas y avoir de protéine intermédiaire expliquant la présence de notre deuxième protéine, on peut alors conclure à une interaction directe (cf chapitre des méthodes pour plus de détails).

**E VRAI** Sauf si les protéines que l'on veut révéler sont extra-membranaire, l'utilisation d'anticorps de révélation nécessite de « trouser » la membrane (perméabiliser) afin de faire entrer nos anticorps dans la cellule. On fixe également la cellule afin de conserver son intégrité, ce qui revient également à la tuer.

**Question 5 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes :**

- A. En microscopie électronique, plus une structure est dense, moins elle laisse passer les électrons, et apparaîtra donc blanche
- B. En microscopie confocale, comme on réduit le flou par rapport à la microscopie à épifluorescence, la résolution peut être meilleure que 200nm.
- C. Le FRAP se réalise sur cellules fixées.
- D. La microscopie électronique se fait sur cellules fixées, donc mortes.
- E. La GFP est une protéine de fusion très utilisée en biologie cellulaire.

**Question 5 – Correction : D**

**A FAUX** + une structure est dense, moins elle laisse passer les électrons, et + l'image apparaîtra noire. Ce qui est dense apparaît donc noir en microscopie électronique.

**B FAUX** Attention, quelle que soit la situation, en microscopie optique, la résolution n'est jamais meilleure que 200nm !

**C FAUX** En FRAP, on visualise des mouvements de protéines, des synthèses. On travaille donc forcément sur des cellules vivantes. On prend donc des photos à intervalle de temps régulier, ou on réalise de la vidéomicroscopie. Imaginez qu'on ait fixé, donc tué, nos cellules dans cette expérience. Jamais on n'aurait observé un retour de fluorescence vu que tout aurait été figé.

**D VRAI** Cela est + explicite en histologie, mais il est bien de le savoir pour la biologie cellulaire. Pour rappel, en microscopie électronique, on n'éclaire pas l'échantillon avec de la lumière, mais on utilise un faisceau d'électron. Afin d'éviter l'interaction des électrons avec l'air, l'échantillon à observer est donc placé sous vide. Or le vide n'est pas une condition viable pour les cellules. On travaille donc avec des cellules fixées. De plus, parfois on est amenés à préparer l'échantillon avec des particules de métal lourd (car denses aux électrons) pour mieux visualiser certaines structures. Ce traitement n'est pas compatible avec la vie cellulaire.

**E FAUX** La GFP seule n'est pas une protéine de fusion. C'est du fait de ses propriétés fluorescentes qu'on la fusionne à d'autres protéines, par exemple une protéine X, et c'est là qu'on parlera de protéine de fusion X-GFP.

**Question 6 – Indiquez la ou les affirmation(s) correcte(s) :**

- A. CRISPR est une endonucléase découverte récemment et permettant de cibler et de modifier n'importe quel gène.
- B. On peut utiliser un virus pour injecter de l'ADN dans une cellule.
- C. En transgénèse classique, on ne peut pas contrôler le lieu d'insertion du gène dans l'ADN de la cellule hôte.
- D. Afin d'étudier l'effet du génotype sur le phénotype, on peut utiliser le principe de mutagenèse aléatoire suivi d'un séquençage de l'ADN.
- E. En cytométrie en flux, afin de déterminer en quelle phase du cycle cellulaire est notre cellule, on détecte la quantité d'ADN de la cellule qui passe devant le détecteur.

**Question 6 – Correction : BCDE**

**A FAUX** Ne lisez pas trop vite ;-) Dans la méthode CRISPR-CAS9, c'est CAS9 qui est l'endonucléase. "CRISPR" veut dire "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", soit "Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées", c'est-à-dire que CRISPR désigne des séquences d'ADN, pas une protéine.

**B VRAI** On a en gros 2 façons d'injecter du matériel génétique dans une cellule, deux façons qu'on appelle vecteurs : les plasmides ou les virus. Pour insérer le plasmide, on peut utiliser l'électroporation, la lipofection, la micro-injection ou le bombardement. Le principe du fonctionnement d'un virus est qu'il va chercher à insérer son matériel génétique dans les cellules qu'il infecte pour qu'il y soit répliqué et que la cellule infectée produise du virus.

**Récapitulatif :**

Insérer ADN dans une cellule ->

Vecteur : ● Plasmide

- Électroporation
- Lipofection
- Micro-Injection
- Bombardement

● Virus

**C VRAI** Effectivement, le lieu de l'insertion dépend du hasard.

**D VRAI** La mutagenèse aléatoire consiste en l'induction de mutations situées au hasard dans le génome, par exemple avec l'utilisation de rayons X. Après avoir induit ces mutations, on observe le phénotype obtenu, et on séquence le génome. On pourra donc potentiellement établir des liens entre certains gènes et la fonction de la protéine qu'ils codent. Prenons un exemple : imaginons que le séquençage après traitement aux rayons X montre que le gène A est muté. On observe sur le phénotype une anomalie au niveau du métabolisme du glucose. On pourra donc supposer que le gène A code pour une protéine dont la fonction est impliquée dans le métabolisme du glucose. Des expériences complémentaires permettront de le vérifier.

**E VRAI** On sait qu'en fonction de la phase dans laquelle se trouve une cellule, sa quantité d'ADN ne sera pas la même. Il y a une quantité  $n$  d'ADN en phase G1, une quantité intermédiaire en phase S lorsque la cellule est en pleine réplication, et enfin une quantité  $2n$  en phase G2/M. Si par exemple on marque l'ADN au DAPI (qui est un agent intercalant émettant de la fluorescence bleue), une cellule en phase G2 sera deux fois + fluorescente qu'une cellule en phase G1. Après passage des cellules devant le détecteur, elles vont donc être chargées positivement ou négativement selon l'intensité de fluorescence détectée et on pourra donc séparer les cellules selon la phase du cycle dans laquelle ils sont par l'intermédiaire de leur quantité d'ADN.

### **Question 7 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses**

**justes : AE**

Au sujet du matériel utilisé :

- A. L'enzyme transcriptase inverse est utilisée dans certaines méthodes comme la RT-CPR, cette enzyme existe dans les rétrovirus.
- B. La transgénèse par recombinaison homologue se réalise en injectant de l'ADN linéaire dans un ovocyte fécondé afin qu'il soit incorporé aléatoirement dans le génome.
- C. Il est possible de réaliser un KO en transgénèse classique.
- D. Un KO consiste à l'inactivation d'un gène par une lyse de l'ADN.
- E. Les gènes rapporteurs sont ces gènes facilement repérables microscopiquement et macroscopiquement, placés sous le promoteur du gène dont nous souhaitons connaître le lieu et le moment d'expression.

**A VRAI**

**B FAUX** cette définition est celle de la transgénèse classique. Dès qu'on retrouve cette notion d'incorporation aléatoire, il faut que ça nous fasse penser à la transgénèse classique. Cette méthode est rapide et peu onéreuse mais comme l'incorporation est aléatoire, le transgène se met un peu où il veut et donc il peut se retrouver dans des zones peu exprimées. En revanche, pour la transgénèse par recombinaison homologe, on va viser une région ciblée du génome. Il va y avoir l'utilisation d'un mécanisme (que vous verrez plus tard dans vos cours d'UE2) où la cellule va échanger ses portions d'ADN avec celles du transgène (pour la description du processus en détail, voir p.59 du poly).

**C FAUX** Le caractère aléatoire de la transgénèse classique rend le KO impossible.

**D FAUX** un KO consiste bien en l'inactivation d'un gène mais ce ne sera pas par lyse de l'ADN mais bien par une induction de codons stop précoces ce qui va induire la destruction de la protéine. La cellule n'aura pas de matériel génétique à disposition et elle va donc essayer de se débrouiller pour réparer l'ADN mais ne pourra pas utiliser la recombinaison homologe ce qui va décaler le cadre de lecture.

**E VRAI** On a comme exemple de gènes rapporteurs le gène de la fluorescence qui permet de positionner clairement le lieu d'expression.

**Question 8 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes : C**

Votre tuteur de bio cell a les idées un peu embrouillées, et n'arrive pas à remettre dans l'ordre les étapes de déroulement de la méthode CRISPR-CAS9. Heureusement, les petits P1, prêt à tout pour aider se proposent bien gentiment de l'aider :

1. Cas9 reconnaît la séquence cible par complémentarité avec l'ARN guide et la séquence PAM sert d'adaptateur.
2. L'ARNsg recrute la nucléase Cas9 via le tracrRNA.
3. Cas9 coupe les deux brins de l'ADN au sein de la séquence cible.
4. Formation d'un ARNsg (ARN single guide) constitué d'ARN complémentaire à la séquence cible (crRNA) ainsi que de tracrRNA.

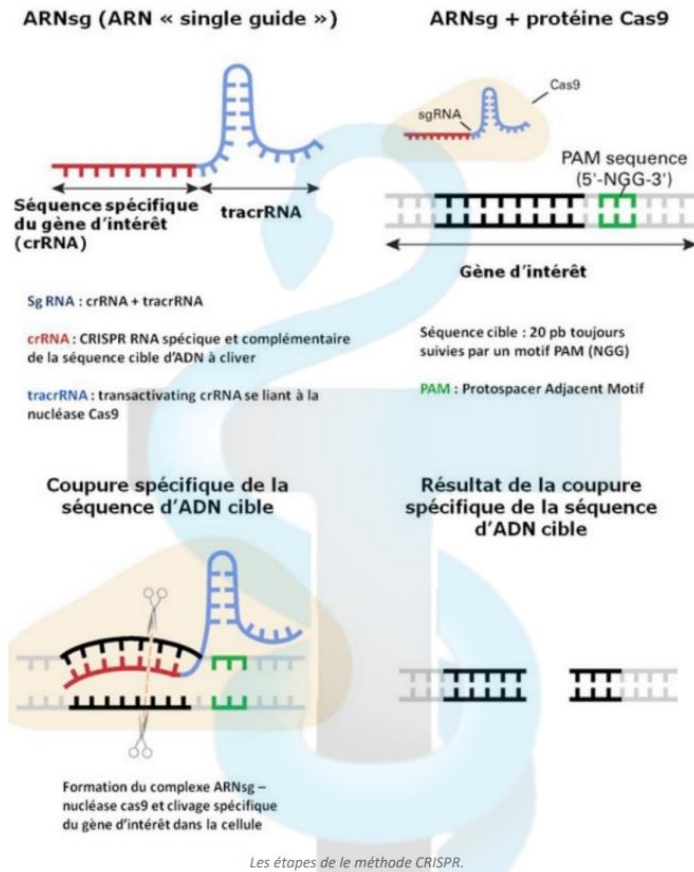
- A. 1234
- B. 1243
- C. 4213
- D. 2134
- E. 4123

**A FAUX**

**B FAUX**

**C VRAI** : parce qu'un schéma est toujours très efficace, je vous remets celui du cours pour que vous puissiez bien vous imaginer les différentes étapes.





ainsi nous avons :

- Formation d'un ARNsg (ARN single guide) constitué d'ARN complémentaire à la séquence cible (crRNA) ainsi que de tracrRNA ;
- L'ARNsg recrute la nucléase Cas9 via le tracrRNA ;
- Cas9 reconnaît la séquence cible par complémentarité avec l'ARN guide et la séquence PAM sert d'adaptateur (séquence située en aval de la séquence à sectionner et indispensable au fonctionnement de CAS9) ;
- Cas9 coupe les deux brins de l'ADN au sein de la séquence cible.

**D FAUX**

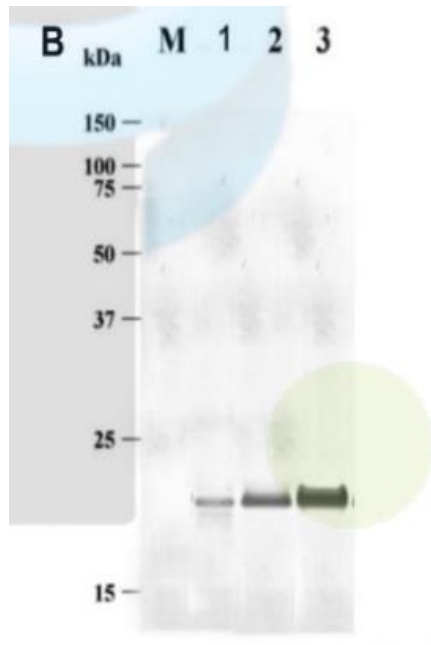
**E FAUX**

**Question 9 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes : BCDE**

Au sujet du Western Blot :

- Le WB permet de comparer les quantités de différentes protéines placées dans les mêmes conditions.
- Les colonnes correspondent à la lignée cellulaire et les lignes à la protéine.
- Il s'agit d'un SDS-PAGE électrotransféré sur une membrane, SDS pour dodécyl-sulfate de sodium et PAGE pour indiquer qu'il est réalisé sur gel de polyacrylamide.
- Dans un WB seules les protéines voulues sont révélées de manière spécifique grâce aux anticorps.
- Il doit y avoir un contrôle qui prouve qu'autant d'extraits protéiques ont été déposés dans chaque colonne.

**A FAUX** Attention, c'est l'inverse, le WB permet de comparer la MÊME protéine mais dans des conditions DIFFÉRENTES.

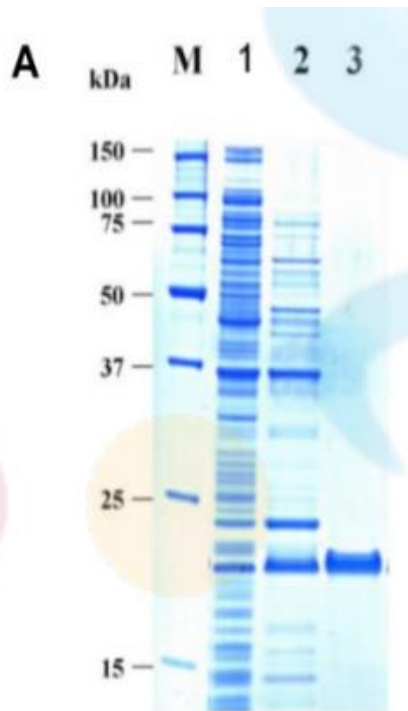


On peut voir ci-dessus un WB avec la même protéine et on observe les différences de résultat selon les conditions dans lesquelles la protéine a été placée.

**B VRAI** très important à comprendre, et je trouve que le schéma aide bien à la compréhension. On peut voir que c'est la même protéine avec les petits traits marquant le poids moléculaire de celle-ci et on peut voir qu'il y a différentes lignées cellulaires, la protéine a été placée dans différentes situations ce qui entraîne des variations au niveau des résultats.

**C VRAI** C'est tout à fait ça, le SDS va servir à uniformiser les charges des protéines qui deviennent toutes chargées négativement.

**D VRAI** C'est aussi un point important, et il ne faut pas confondre WB et SDS-PAGE. En effet, dans notre cas nous avons certainement d'autres protéines qui sont présentes et dans le cas du SDS-PAGE, elles seront mises en évidence grâce à des colorants comme par exemple le bleu de Coomassie. On obtient donc des résultats qui ressemblent à l'image ci-dessous.

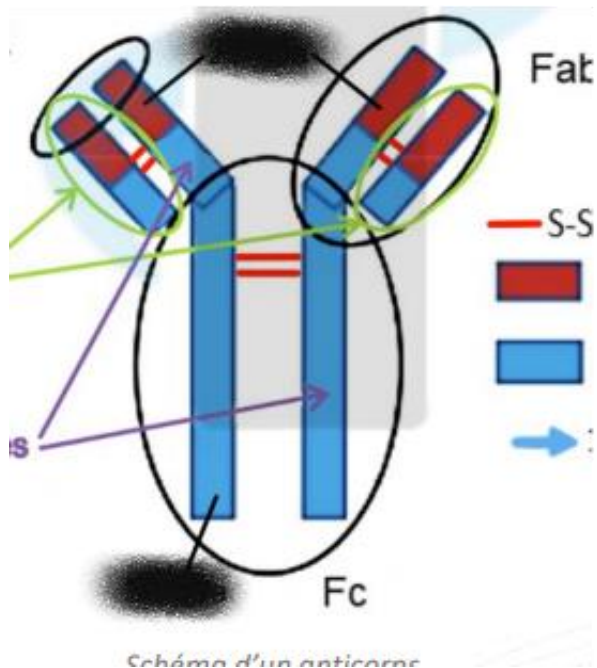


La différence avec le WB est assez visible où pour ce dernier, une seule protéine sera mise en évidence. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'autres protéines attention, seulement elles ne seront pas mises en évidence !

**E VRAI** le contrôle est fondamental dans la communication des résultats du WM. En effet, il permet de donner la quantité de la protéine dans des conditions précises, souvent les conditions normales en situation physiologique. Cela permet de savoir avec quoi nous allons comparer les résultats obtenus dans des conditions différentes.

**Question 10 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes : CD**

A partir du schéma ci-dessous :



- A. La partie bleue de l'anticorps correspond à la partie variable.
- B. La partie entourée en vert pèse 25Da.
- C. La partie en marron est spécifique à chaque anticorps.
- D. La notation Fc contient une séquence d'acides aminés spécifique d'une espèce.
- E. Les anticorps sont insensibles aux agents réducteurs.

**A FAUX** la partie variable de l'anticorps est la partie qui va reconnaître spécifiquement un certain antigène, il s'agit donc ici de la partie marron.

**B FAUX** le piège était pas sympa je l'avoue mais attention à l'unité ici on parle de 25kDa. Ca peut vous paraître pas cool mais soyez vraiment vigilant aux unités, c'est un piège qui peut tomber dans cette UE mais aussi dans d'autres !

**C VRAI** cf A.

**D VRAI**

**E FAUX** Nous pouvons voir sur le schéma la présence de ponts disulfures donc par définition, les Ac seront sensibles aux agents réducteurs comme par exemple, le bêta-mercaptoéthanol.

**Question 11 – Parmi les affirmations suivantes, cochez la ou les réponses justes : D**

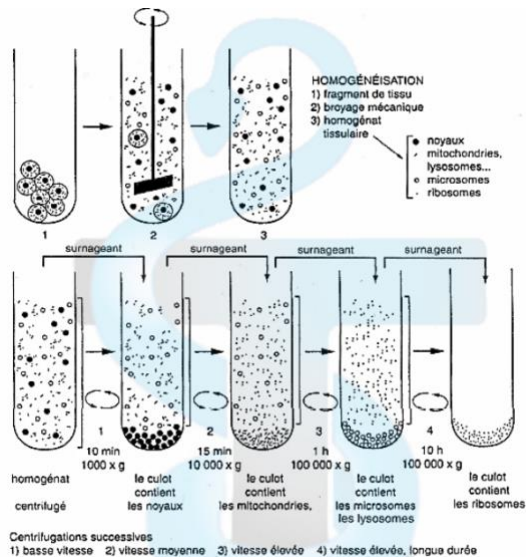
- A. Pour les méthodes de séparation, nous allons principalement utiliser des cellules entières.
- B. La centrifugation est une méthode qui permet de séparer tous les constituants cellulaires selon leur taille, leur forme, et leur granulosité comme pour la cytométrie en flux.
- C. Les plus petits constituants cellulaires pouvant être sédimentés et isolés par centrifugation sont les lysosomes.
- D. L'électrophorèse est une méthode fondée sur la migration différentielle des macromolécules sous l'influence d'un champ électrique, les molécules les plus lourdes migreront le moins vite.
- E. La présence de beta mercaptoéthanol permet une homogénéisation des charges des protéines qui seront donc toutes chargées négativement.

**A FAUX** Au contraire, nous allons plutôt utiliser des fragments cellulaires de cellules au préalable lysées. Sans cela, nous n'avons pas accès aux différents constituants cellulaires ce qui rend la séparation de ces derniers compliqués.

**B FAUX** A bien apprendre, mais facilement compréhensible, la centrifugation sépare les constituants selon leur taille et leur forme. En imaginant une centrifugeuse qui tourne

très vite, on comprend rapidement que la granulométrie n'entre pas en jeu dans la séparation.

**C FAUX** Je vous remet le petit schéma à bien apprendre.



On peut donc voir que les plus petits constituants cellulaires sédimentés par centrifugation sont les ribosomes (les chiffres ne sont pas à apprendre mais bien connaître l'ordre des constituants cellulaires du plus gros au plus petit).

**D VRAI** Totalement vrai, les grosses molécules seront plus gênées par les mailles du gel, elles se feront plus retenir et migreront donc moins vite.

**E FAUX** ce n'est pas du tout le rôle du beta mercaptoéthanol, celui-ci est un agent réducteur qui a pour rôle de casser les liaisons disulfures, en revanche c'est le dodécyl-sulfate de sodium qui va avoir le rôle d'uniformisation des charges.

## Question 12 – culture cellulaire : CDE

Au sujet des cultures :

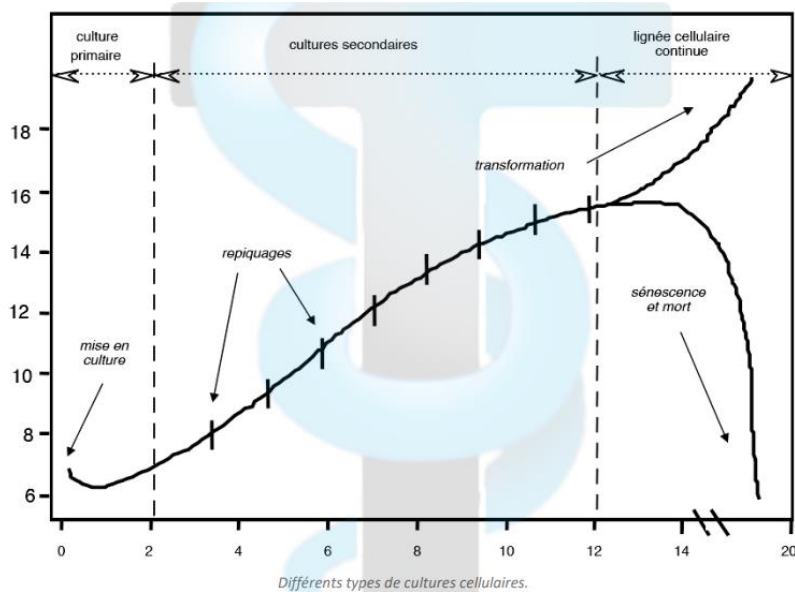
- A. Une cellule immortelle en biologie cellulaire est une cellule qui ne meurt jamais.
- B. Une cellule transformée devient indépendante du support mais elle reste toujours dépendante des facteurs de croissance trouvés dans le milieu de culture.
- C. Les cellules mises en culture vont se diviser jusqu'à ce que leurs télomères deviennent trop raccourcis ce qui induit la sénescence cellulaire.
- D. Les cellules immortalisées continuent de se développer pour former une lignée cellulaire continue.
- E. La plupart des cellules de culture se développent sur un support et vont se diviser en monocouche, la croissance en hauteur est réservée aux cellules transformées.

**A FAUX** Cela n'a pas forcément été précisé dans le cours mais cela n'a rien à voir. En effet, les cellules immortalisées vont accumuler de nombreuses mutations au cours de leurs divisions du fait de l'inhibition de la sénescence. Cela veut dire qu'elles vont beaucoup plus mourir que les autres mais elles ont, pour contrebalancer le problème, un potentiel proliférique très important ce qui aboutira au final à une augmentation importante du nombre de cellules et une culture qui prolifère abondamment.

**B FAUX** Ce sont des caractéristiques à bien retenir. Lorsqu'une culture devient immortalisée, elle devient indépendante du support et des facteurs de croissance, elle n'a plus besoin d'aide extérieure pour s'étendre et c'est pour cela qu'elles peuvent avoir une grande longévité.

**C VRAI** Les télomères sont les extrémités des chromosomes qui seront légèrement raccourcis à chaque cycle de division (vous reverrez le phénomène plus en détail, si vous ne l'avez pas déjà vu, dans vos cours d'UE2). Mais lorsque la cellule devient trop vieille, ces télomères vont finir par entièrement disparaître et lors des cycles de division suivants, ce sont des portions d'ADN qui vont être enlevées ce qui peut entraîner des mutations graves, donc la cellule va se mettre automatiquement en sénescence (mort programmée) pour éviter une accumulation de mutations.

**D VRAI** Apprenez bien ce schéma et vous saurez presque tout ce qu'il faut sur la partie culture cellulaire :



**E VRAI** C'est du cours.

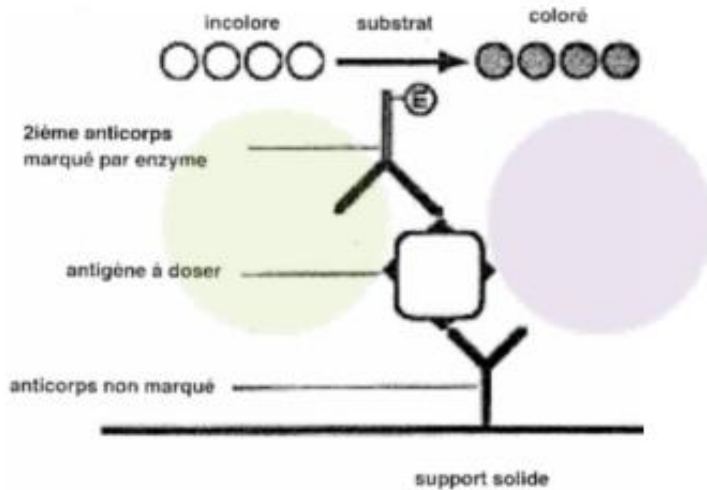
### **Question 13 – Les méthodes, il y a que ça de vrai : CD**

Au sujet des méthodes de biologie cellulaire :

- A. La co-immunoprécipitation permet de prouver une interaction directe entre deux protéines.
- B. La méthode ELISA par immunocapture permet de capturer et doser un anticorps.
- C. Pour produire ces anticorps secondaires anti-espèce, il suffit d'inoculer les anticorps visés à une autre espèce qui produit en retour des anticorps contre les anticorps qui lui ont été inoculés.
- D. La méthode FISH permet de montrer la localisation d'un gène lors de son expression par exemple.
- E. La colocalisation de protéines, pouvant être mise en évidence par microscopie à épifluorescence, implique donc une interaction entre elles.

**A FAUX** Attention, c'est primordial à comprendre, je le répète dans chacune de mes corrections donc je ne vais pas redétailler ici mais la co-immunoprécipitation permet uniquement de prouver une interaction entre les protéines d'un même complexe mais pour prouver que l'interaction est DIRECTE, il faudra utiliser la méthode FRET.

**B FAUX** C'est du cours, elle permet de doser un antigène, attention à ne pas confondre les techniques d'ELISA entre elles, je vous remets le schéma explicatif de la méthode par immunocapture :



**C VRAI** Je vous l'accorde, la phrase est barbare mais ce qu'il faut comprendre c'est qu'on va injecter des anticorps d'une espèce dans une autre espèce. Ces derniers vont être reconnus comme corps étrangers et l'espèce qui a été injectée va produire en retour des anticorps contre cette espèce. Cela va être utilisé dans les cas où l'on a besoin d'anticorps secondaires comme dans le cas d'une ELISA par sandwich par exemple.

**D VRAI** C'est une application possible de la FISH.

**E FAUX** Cela n'a rien à voir, deux éléments peuvent être au même endroit sans pour autant interagir. De plus, la microscopie à épifluorescence fait partie de la microscopie optique et a donc une limite de résolution de 200 nm. Cela veut donc dire que même si nous avons l'impression que 2 éléments se situent au même endroit, il y a potentiellement une distance de 200 nm entre eux ce qui rend l'interaction difficile.



## **Question 14 – Encore et toujours des méthodes : BCDE**

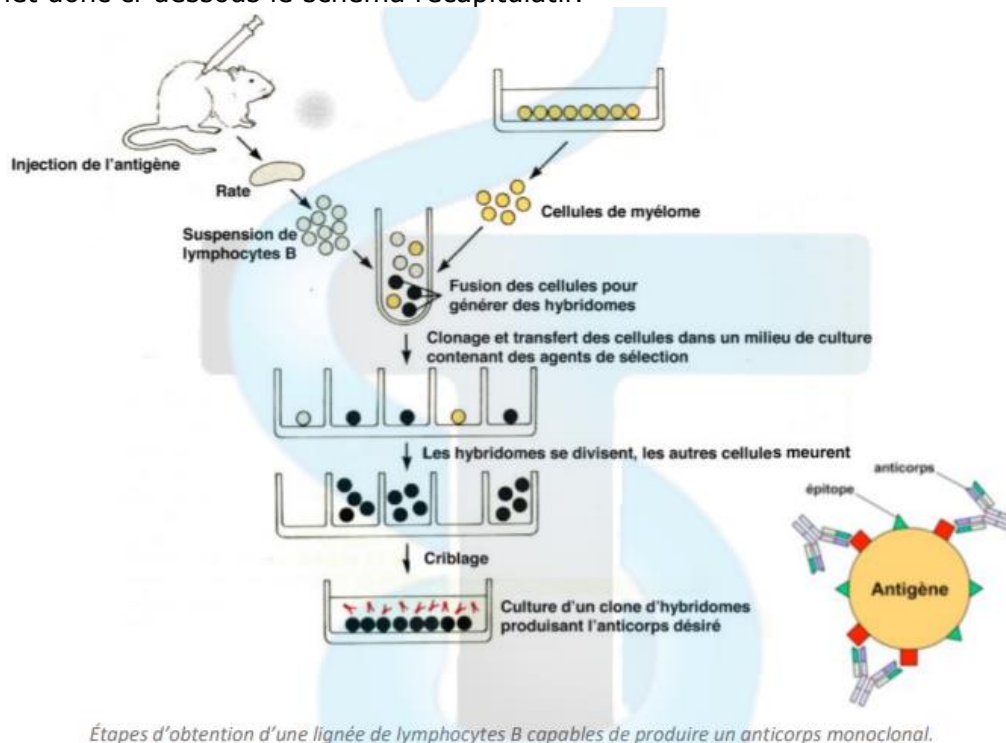
- A. La méthode FRET utilise des sondes d'acides nucléiques et permet donc de cibler des régions très précises de l'ADN.
- B. Mais non enfin, la méthodes FRET utilise des protéines de fusion pour son fonctionnement.
- C. Les bactéries et organiques sont détectables en microscopie optique.
- D. La production d'anticorps monoclonaux se fait à partir d'une colonie de cellules dérivant d'un même lymphocyte B.
- E. Pour la production d'un anticorps monoclonaux, nous avons besoin d'immuniser l'animal utilisé.

**A FAUX** Ce sont des questions de cours, maintenant vous devez parfaitement maîtriser toutes les techniques et savoir à quoi elles correspondent. La méthode FRET permet de démontrer une interaction directe entre deux protéines. La méthode décrite ici correspond à la FISH.

**B VRAI** En effet, la protéine sera fusionnée avec un marqueur fluorescent pour qu'une exploitation des résultats soit possible.

**C VRAI** C'est du cours, apprenez environ les ordres de grandeurs des différents constituants de la cellule pour avoir une idée de ce qui est détectable dans les différentes microscopies.

**D VRAI** Cette année, la production d'anticorps monoclonaux est à savoir et effectivement, on va utiliser un unique lymphocyte B qui va se dupliquer et nous allons donc obtenir de nombreux clones qui sont strictement identiques au clone initial. Je vous remet donc ci-dessous le schéma récapitulatif.



**E VRAI** Nous allons en effet injecter un antigène à l'animal qui va s'immuniser et donc produire un type de lymphocyte B en réponse à cette attaque qui reconnaîtra spécifiquement cet antigène. On immunise donc l'animal cf schéma item D

### Énoncé commun aux questions 15 et 16 :

Parmi les affirmations suivantes, cochez-la ou les réponse(s) juste(s) :

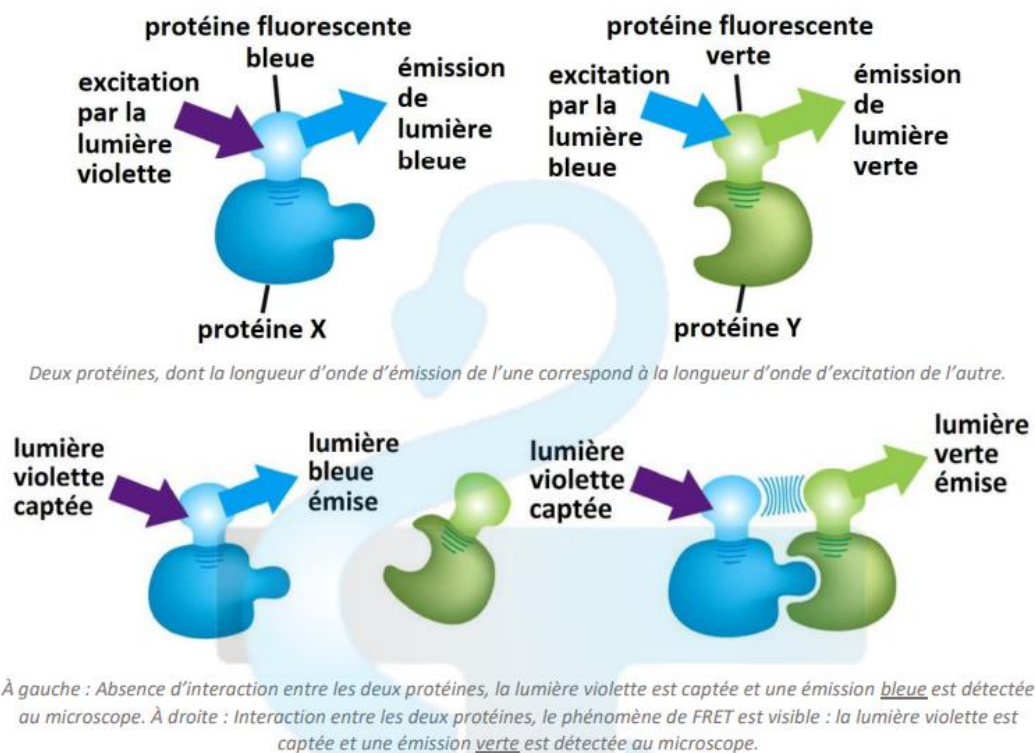
On étudie deux protéines de fusion, une protéine A qui absorbe du bleu et émet du vert et une protéine B qui absorbe du vert et émet du rouge. En éclairant notre échantillon en bleu, on obtient une image rouge, que peut-on en déduire ?

#### Question 15 – la réponse va te FRAPper : BE

- A. Cette méthode est appelée FRAP.
- B. Cette méthode est appelée FRET.
- C. Les deux protéines n'interagissent pas ensemble.
- D. On ne peut pas déterminer si les protéines interagissent ensemble à cause de la limite de résolution de la microscopie optique.
- E. Les deux protéines interagissent directement.

**A FAUX** La méthode de FRAP consiste à éteindre la fluorescence d'une protéine fluorescente en l'éclairant très fortement pour pouvoir étudier les facteurs cinétiques de la cellule, ce n'est donc pas du tout ce que nous avons ici.

**B VRAI** Il s'agit effectivement d'une méthode de FRET, nous allons ici chercher à démontrer une interaction DIRECTE entre des protéines en utilisant les propriétés fluorescentes des protéines. Ces protéines vont être excitées et émettre à des longueurs d'onde bien précises et spécifiques à chacune. Nous allons donc utiliser ces propriétés pour mettre en évidence cette interaction. Je vous rajoute un petit schéma explicatif :



**C FAUX** Nous pouvons voir que la protéine A absorbe du bleu et émet du vert, c'est-à-dire que si nous éclairons cet échantillon avec du bleu et que cette protéine n'interagit avec personne, elle émettra du vert que nous pourrons observer. Nous avons ensuite la protéine B qui absorbe du vert et émet du rouge. Si ces deux

protéines interagissent ensemble directement cela veut dire que la lumière émise par la protéine A qui est verte sera absorbée par la protéine B qui émettra donc de la lumière rouge. Ainsi, comme nous observons de la lumière rouge, cela nous montre que les 2 protéines interagissent directement.

**D FAUX** la limite de résolution n'a rien à voir dans cette technique. En effet, on ne cherche pas ici à mettre en évidence les protéines en elles-mêmes mais à vérifier si elles interagissent directement.

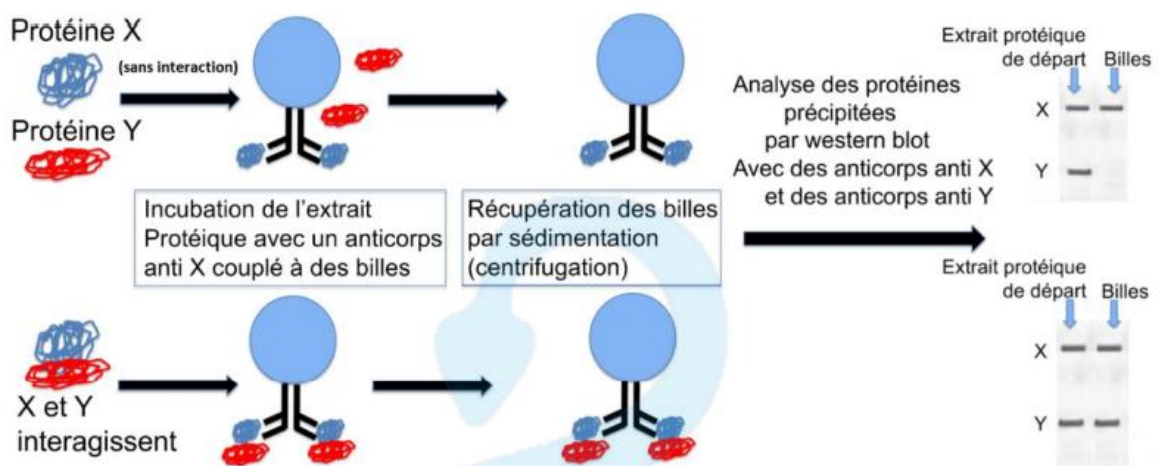
**E VRAI** Cf item C.

**Question 16 – EH OH c'est pas le Western ici : BCE**

- A. Les deux protéines interagissent indirectement.
- B. Le Western Blot du produit d'une co-immunoprécipitation est très pratique pour démontrer une interaction entre les protéines.
- C. Il est possible de démontrer une interaction entre ces deux protéines malgré la limite de résolution de la microscopie optique.
- D. Si ces protéines interagissent de manière directe, nous pouvons observer une émission verte.
- E. Réaliser une FRET après une co-immunoprécipitation permet de déterminer quel type d'interaction il y a entre les protéines.

**A FAUX** Cf QCM précédent.

**B VRAI** La co-immunoprécipitation permet la mise en évidence d'une interaction entre des complexes qui peut être facilitée par mise en évidence par Western Blot. En effet, lorsque les 2 protéines interagissent, elles seront liées ensemble et seront accrochées à la bille via l'anticorps, ce qui fait que sur migration avec Western Blot, nous allons retrouver les 2 protéines.



*Co-immunoprécipitation de protéines qui n'interagissent pas (haut) ou qui interagissent entre elles (bas) suivie d'un Western Blot révélant les protéines X et Y à partir des extraits protéiques ou de l'immunoprécipitation.*

**C VRAI** On ne cherche pas ici à observer les protéines en elle-même mais à démontrer leur interaction. Ainsi, effectivement, on ne distingue pas précisément les protéines mais on arrivera à les mettre en évidence sur Western Blot par exemple avec la présence de la bande correspondant à son poids moléculaire. Pour résumer, la limite de résolution n'est pas importante dans cette expérience car l'exploitation se fait sur des supports qui ne la prennent pas en compte.

**D FAUX** Cf QCM précédent.

**E VRAI** C'est exactement ça, en effet, la méthode de co-immunoprécipitation permet de mettre en évidence une interaction entre des protéines d'un même complexe mais on ne peut alors pas prouver si cette interaction est directe. Le FRET nous permettra donc de prouver si les 2 protéines interagissent directement.

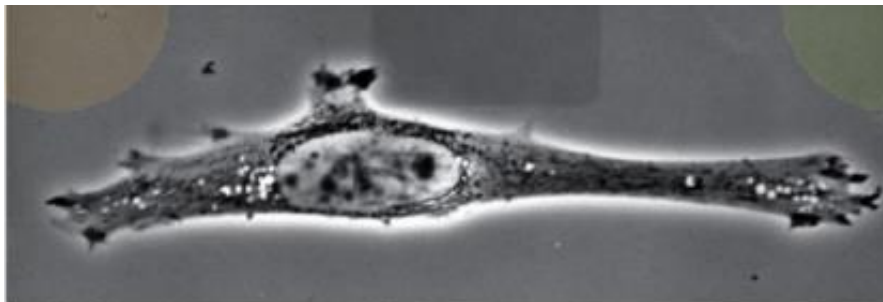
### **Question 17 – Drop the MIC-croscopie : BDE**

Au sujet de la microscopie :

- A. La limite de détection de la microscopie optique est de 200 nm.
- B. La microscopie à contraste de phase permet de mettre en évidence les contours de la cellule.
- C. Une des protéines phosphorescentes les plus courantes est la GFP (Green Fluorescent Protein), elle a été retrouvée chez des méduses fluorescentes et produit une lumière verte lorsqu'elle est illuminée par du bleu.
- D. Tout ce qui est plus petit que 200 nm en microscopie optique apparaîtra comme mesurant 200 nm.
- E. La taille minimale nécessaire à la détection est bien inférieure à celle de la résolution.

**A FAUX** Attention à ne pas confondre la limite de détection et la limite de résolution. La détection est ce que l'on va pouvoir voir même si nous ne distinguons pas les détails. Par exemple, lorsque vous regardez un bateau au large en tout petit, vous voyez juste une tache noire donc vous pouvez le détecter mais vous ne verrez pas les détails comme les personnes qui sont dessus. Pour la microscopie c'est pareil, faites attention à ne pas confondre les termes. Ainsi, la limite de **résolution** (plus petite distance entre deux éléments avant qu'ils n'apparaissent confondus) de la microscopie optique est de 200 nm mais la limite de détection est bien inférieure.

**B VRAI** C'est du cours, à ne pas confondre avec la microscopie à contraste interférentiel de Nomarski qui va plutôt chercher à faire ressortir les cellules en 3D. Je vous remets une image d'un résultat visible en microscopie à contraste de phase :



*Microscopie à contraste de phase.*

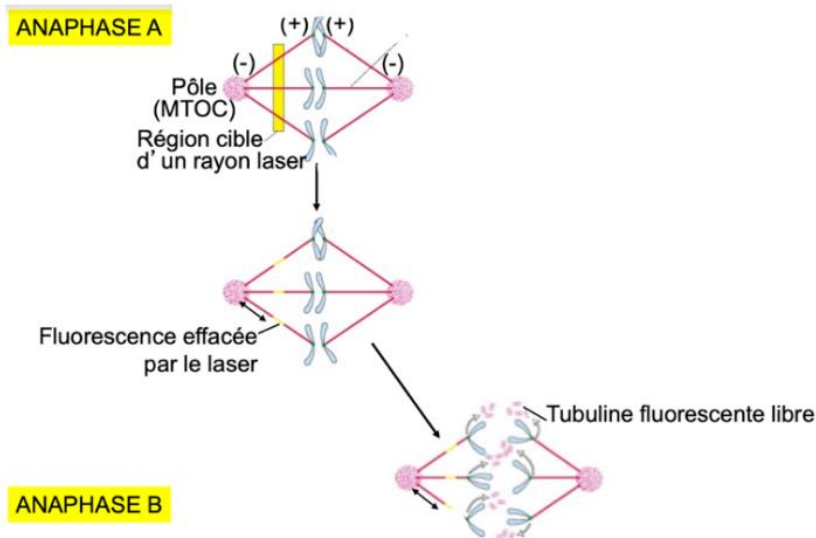
**C FAUX** Le piège n'était pas sympa c'est vrai mais il faut bien faire attention à tous les mots, la GFP est une protéine fluorescente et non pas phosphorescente, les 2 termes ne veulent pas dire la même chose. En effet, la phosphorescence c'est par exemple les petits bracelets que vous avez en soirée et qui brillent dans la nuit, ainsi il y a diffusion de lumière dans l'obscurité. Au contraire, la fluorescence ne rendra rien dans l'obscurité, c'est l'exemple de vos surligneurs stabilo bien aimés. Si vous regardez vos polys surlignés dans le noir, cela ne va pas ressortir du tout. Le reste de l'item était juste.

**D VRAI** Nous sommes ici dans le cas de la limite de résolution qui est de 200 nm, la microscopie ne pourra pas faire de résolution sur des molécules plus petites donc elles apparaîtront à la longueur la plus petite, autrement dit 200 nm.

**E VRAI** Cf item A.

**Question 18 – blanchir de l'argent c'est mal, photoblanchir une cellule c'est génial : BE**

A partir du schéma ci-dessous :



- A. Cette expérience correspond à un FRET.
- B. Cette expérience permet de mettre en évidence une dépolarisation au pôle positif
- C. Mais non, elle permet de mettre en évidence une dépolarisation au pôle négatif
- D. Le retour de la fluorescence dans cette technique est dû à la restitution par réparation de la fluorescence par les cellules, le photoblanchiment est donc un évènement réversible.
- E. Cette technique met en évidence des notions de cinétique au sein de la cellule comme par exemple la vitesse de synthèse ou de migration.

**A FAUX** Il faut faire attention à ne pas confondre les méthodes entre elles. Ici dans le schéma on a une fluorescence effacée par un laser ce qui correspond à une méthode FRAP.

**B VRAI** Nous allons donc « éteindre » la fluorescence ce qui va mettre en évidence une dépolarisation au pôle +. En effet, nous pouvons voir que la zone effacée ne bouge pas et que l'extrémité du côté des chromosomes se raccourcit ce qui veut dire qu'il y a dépolarisation, surtout que nous retrouvons par la suite de la tubuline fluorescente libre.

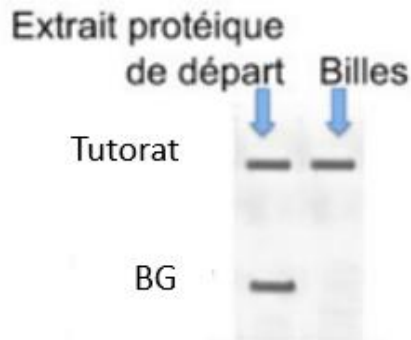
**C FAUX** Cf item B.

**D FAUX** Attention, un des points les plus importants à retenir dans la technique de FRAP est qu'il n'y a pas de réparation de la fluorescence, lorsqu'un élément est photoblanchi, ce n'est pas réparable, c'est un évènement irréversible. Le retour de la fluorescence est donc dû à une migration des constituants de la cellule qui n'auront pas été photoblanchis et qui seront donc encore fluorescent.

**E VRAI** C'est effectivement une des application du FRAP.

### Question 19 – les liaisons dangereuses : AE

Vous êtes en présence d'un mélange de 2 protéines tutorat et BG. Une immunocapture est réalisée pour ces 2 protéines et le résultat par WB vous est communiqué et, étant des pros de la matière, on vous demande de l'interpréter, voici les résultats ci-dessous :



- A. Il est possible que ces 2 protéines interagissent mais vous ne pouvez pas le prouver.
- B. Il est impossible que ces 2 protéines interagissent selon les résultats que vous observez.
- C. Ces 2 protéines interagissent directement.
- D. Grâce à ces résultats, nous pouvons en déduire que c'est la protéine BG qui est lié aux billes de révélation.
- E. Cette méthode utilise des anticorps.

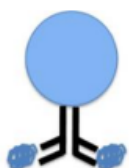
**A VRAI** La méthode d'immunocapture permet de démontrer si une interaction est directe ou non mais en revanche elle ne peut pas prouver si une interaction a lieu ou non. Dans le cas de notre expérience, nous pouvons voir que dans le culot de notre liquide où nous retrouvons normalement la bille liée à un anticorps qui est spécifique d'une des 2 protéines, ici, la protéine tutorat car nous pouvons voir qu'elle s'est fixée avec la bille dans la colonne de gauche. En revanche, pour la protéine BG, nous ne la retrouvons pas liée à la bille ce qui veut dire que ces 2 protéines n'interagissent pas ensemble et que donc la protéine BG ne s'est pas liée à la protéine tutorat. Cependant, il est totalement possible que ces protéines interagissent par le biais d'un complexe externe par exemple mais cela ne pourra pas être prouvé par l'immunocapture.

**B FAUX** Cf correction item A

**C FAUX** Cf correction item A

**D FAUX** Cf correction item A

**E VRAI** Effectivement, entre la bille et la protéine nous retrouvons un anticorps comme vous pouvez le voir grâce à l'image ci-dessous :



## **Question 20 – Allez, c'est bientôt les CT, il faut arrêter de glander : BCDE**

Vous observez une coupe tissulaire de glandes au microscope optique avec une coloration hématoxyline éosine :

- A. La limite de résolution de cette microscopie est de 200 nm.
- B. Les cellules que vous observez sont mortes car vous avez dû au préalable fixer votre échantillon
- C. Avec ce même microscope, 2 points séparés par une distance de 180 nm apparaîtront comme confondus.
- D. D. les bactéries et les organites pourront être distingués clairement grâce à cette technique
- E. Avec cette technique, une protéine de 190 nm pourra être détectée.

**A FAUX** Attention à bien regarder les unités, on parle ici d'une limite de résolution de 200 NM.

**B VRAI** En effet, les colorants utilisés comme celui ici, sont toxiques pour la cellule et il faudra ainsi fixer la cellule pour la coloration donc cela va induire la mort de la cellule. Nous regardons donc ici une cellule immobile

**C VRAI** C'est la définition littérale de la limite de résolution, nous sommes ici en dessous de la limite de résolution de la microscopie optique donc nous allons détecter ces éléments mais ils apparaîtront comme confondus.

**D VRAI** Les bactéries et organites sont de l'ordre du micromètre donc largement détectable.

**E VRAI** En effet, nous allons avoir ici une longueur en dessous de la limite de résolution, mais pas de beaucoup donc au-dessus de la limite de détection, en bref, la protéine sera détectée, mais nous allons voir un point flou et nous ne pourrons pas trouver sa taille réelle.

## **Question 21 – FISH and chips :**

- A. La souris est un animal massivement utilisé dans les laboratoires.
- B. Le dodécylsulfate de sodium est utilisé dans le SDS-PAGE pour charger les protéines négativement.
- C. Le soufre 35 est un radioisotope utilisé pour marquer les protéines et l'ADN.
- D. Nous pouvons utiliser des cellules vivantes dans la microscopie optique classique.
- E. Le retour de la fluorescence dans les zones photo blanchies dans la technique du FRAP est due à une réparation de la fluorescence chez les protéines touchées.

**A FAUX** Au contraire, l'utilisation des souris lors d'expériences est soumise à de nombreuses réglementations surtout au niveau de l'éthique et de la souffrance animale. Nous allons donc majoritairement utiliser des organismes simples et nous utiliserons la souris uniquement pour la validation.

**B VRAI**

**C FAUX** Non justement, le soufre va être utilisé car il peut marquer les protéines grâce aux méthionines et cystéines mais sans marquer l'ADN.

**D VRAI**

**E FAUX** Attention, ce retour de fluorescence est dû à la synthèse de nouvelles molécules fluorescentes ou à la diffusion de molécules non photoblanchies. Cela permet de mesurer

les paramètres cinétiques d'une protéine comme la mobilité, la vitesse de transport, le coefficient de diffusion, le temps de synthèse, etc.

**Question 22 – Travailles tes méthodes, ça fera plaisir à Gilles Rhodes :**

- A. La technique ELISA indirect permet le dosage d'un anticorps.
- B. La Co immunoprécipitation est incapable de prouver s'il y a une interaction directe entre 2 protéines d'un même complexe.
- C. La microscopie classique a une limite de détection de 200 nm.
- D. La technique FISH permet entre autres de mettre en évidence des régions précises de l'ARN et d'explorer des territoires d'expression de gènes.
- E. La technique FRET est incapable de prouver une interaction directe entre 2 protéines d'un même complexe.

**A FAUX** Elle permet le dosage d'un anticorps, par contre les techniques ELISA par immunocapture et en sandwich permettent le dosage d'un antigène.

**B VRAI** En effet, cette technique permet de prouver une interaction mais elle ne peut pas déterminer si cette dernière est directe ou non.

**C FAUX** Attention à ne pas confondre détection et résolution, 200 nm est la limite de **résolution** donc la plus petite distance séparant deux points en-dessous de laquelle ils apparaissent confondus.

**D VRAI** Cette technique est valable pour l'ADN et l'ARN et consiste à marquer par fluorescence des sondes d'acides nucléiques pour qu'elles aillent révéler une cible spécifique directement dans la cellule.

**E FAUX** au contraire, celle-ci permet de prouver une interaction directe contrairement à la co-immunoprécipitation.