****



Année Universitaire 2022 – 2023

Unité d’Enseignement 5

Annale CT 2021-2022

Correction détaillée

**Louisa DJELDJLI-NOIROT**

**Mattéo DURANTEL**

**Blanche JULLIEN DE POMMEROL**

**Correction rapide**

|  |  |
| --- | --- |
| **Questions** | **Réponses** |
| 1 | BDE |
| 2 | BCD |
| 3 | ABC |
| 4 | BCE |
| 5 | ABCD |
| 6 | AD |
| 7 | BDE |

**Correction DL :**

|  |  |
| --- | --- |
| **Questions** | **Réponses** |
| 1 | A |
| 2 | ABD |
| 3 | AD |
| 4 | ACE |
| 5 | ABC |

**Question 1 :**

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

1. L’épissage des ARN a lieu dans le cytosol.
2. Chez les eucaryotes la réplication est environ dix fois plus lente que chez les procaryotes.
3. Les granules interchromatiniens sont des constituants de l’hétérochromatine.
4. Les snoRNA sont impliqués dans la maturation des ARN ribosomiques.
5. Les modifications post-traductionnelles des histones se font surtout dans les parties N-terminales des histones.

**A FAUX** L’épissage a lieu dans le **noyau** ! La maturation de l’ARN en ARNm permet l’ajout d’éléments nécessaire ensuite pour la sortie du noyau (comme le **CBC**, la **PABP**, la **hnRNP** etc.).

**B VRAI** La vitesse de réplication chez les procaryotes est de **500** nucléotides par secondes pour **50** nucléotides par secondes chez les eucaryotes.

**C FAUX** Les granules interchromatiniens sont des structures qui possèdent une fonction d’épissage active. Ce sont des réserves de snRNP prêts à l’usage.

**D VRAI** Les snoARN sont des petits ARN nucléolaires qui vont effectuer des modifications chimiques sur l’ARN précurseur de 45S afin d’**attirer les enzymes modifiant l’ARNr** (notamment les snRNP) qui vont couper le 45S en 28S, 5,8S et 18S.

**E VRAI** Les histones ont leur partie N-term qui est en lien avec le milieu extérieur et qui est le siège de modifications (on retrouve des modifications covalentes réversibles notamment par les deux familles d’enzymes HAT et HDAC).

**Question 2 :**

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

1. Le nucléole constitue l'unité de base de la chromatine.
2. Les condensines et les cohésines contiennent des protéines smc.
3. La phase M comprend la mitose et la cytodiérèse.
4. La télophase est la dernière phase de la mitose.
5. La phase S est la phase au cours de laquelle les chromatides sœurs se séparent.

**A FAUX** ⚠️ C’est le **nucléosome** qui constitue l’unité de base de la chromatine ⚠️.

**B VRAI** Les condensines sont constituées d’un **dimère de Smc**. Les cohésines sont constituées de 4 sous-unités ; un **dimère de Smc** et un dimère de Scc.

**C VRAI** À bien retenir !

**D VRAI** La mitose est constituée de 5 étapes (dans l’ordre) : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l’anaphase et la **télophase**.

**E FAUX** La phase S est la **phase de réplication de l’ADN** (S pour synthèse de l’ADN). La phase durant laquelle les chromatides sœurs se séparent est l’anaphase.

**Question 3 :**

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

1. La chromatine est constituée d'ADN et de protéines qui lui sont associées dans le noyau.
2. Le nombre de chromosomes est très variable d'une espèce animale à l'autre.
3. Chaque région de la double hélice d'ADN qui produit une molécule d'ARN fonctionnelle constitue un gène.
4. Les complexes de remodelage de la chromatine permettent de transférer des séquences d'ADN d'un chromosome à l'autre.
5. La chromatine est dans son état le plus condensé au cours de la télophase.

**A VRAI** La chromatine a comme unité de base le nucléosome qui est une structure formée d’environ 150 pb et d’histones. Cet assemblage d’ADN et de protéines permet la condensation de l’information génétique.

**B VRAI** ⚠️ Attention, la quantité en ADN et le nombre de chromosomes ne témoigne pas de la complexité d’un organisme ⚠️ (ex *: un poisson rouge possède 100 chromosomes*).

**C VRAI** La définition d’un gène est l’« *ensemble des séquences d'acides nucléiques qui contiennent l'information pour la production régulée d'un ARN particulier* ».

**D FAUX** Les complexes de remodelage de la chromatine sont une machinerie de protéines capables de déplacer les **nucléosomes** afin de déplacer l’enroulement de l’ADN autour des nucléosomes et rendre ainsi accessibles certaines portions géniques.

**E FAUX** Le maximum de la condensation des chromosomes est atteint lors de la **métaphase**. Au contraire, lors de la télophase les chromosomes vont de décondenser pour retrouver leur état normal dans la nouvelle cellule créée.

**Question 4 :**

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

1. Il existe deux types d'ARN polymérase chez les eucaryotes pour la transcription dans le nucléole et la transcription dans le nucléoplasme.
2. Au cours de la transcription, les ARN polymérases progressent à plus de 10 nucléotides par seconde.
3. La coiffe des ARN messagers est reconnue par les facteurs d'amorçage de la traduction.
4. L’épissage alternatif des ARN ribosomiques participe à la formation des différentes sous unités du ribosome.
5. Le génome humain contient plusieurs centaines de répétitions des gènes codant pour les ARN ribosomiques.

**A FAUX** Il existe **trois types** : l’ARNpol I, l’ARNpol II et l’ARNpol III.

**B VRAI** *Pendant l’année 2021-22 il avait été dit que la vitesse de polymérisation était d’une centaine de nucléotides par seconde cependant cette année il faut retenir la vitesse de* ***20 nucléotides par seconde***.

**C VRAI** C’est un des éléments essentiels de la composition d’un ARNm sans quoi la traduction ne sera pas possible.

**D FAUX** La **maturation de l’ARN 45S** (et non pas son épissage) permet d’obtenir l’ARNr 18S, 5,8S et 18S par l’ARNpol I et L’ARNpol III permet d’obtenir l’ARNr 5S. L’assemblage de ces ARNr va former les différentes sous-unités des ribosomes.

Ce n’est pas un épissage alternatif (*L’épissage alternatif est un processus qui permet, à partir d’une séquence génomique unique, de produire plusieurs ARN messagers correspondant à des protéines distinctes*).

**E VRAI** Chez l'homme, il y a environ **300 à 400 répétitions d'ARNr**.

**Question 5 :**

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

1. Trois sortes de molécules d'ARN participent à la synthèse des protéines, par des fonctions différentes mais coopératives : ARNm, ARNr, ARNt.
2. Les ribosomes peuvent être libres dans le cytosol ou ancrés à la membrane du réticulum endoplasmique.
3. Dans la technique CRISPR/cas9, cas9 est une nucléase.
4. Les cellules iPS sont obtenues à partir de cellules différenciées qu'on reprogramme en cellules souche.
5. La cytométrie en flux permet de réaliser des extraits cellulaires.

**A VRAI** Les ARNr compose les ribosomes et constitue la partie catalytique de ceux-ci. Les ARNm sont le support de la synthèse de protéines et les ARNt transportent les acides aminés. Lors de la traduction ces trois sortes de molécules agissent de concert pour synthétiser des protéines.

**B VRAI** Les ribosomes qui sont ancrés à la membrane du RE définissent le RE granuleux.

**C VRAI** Cas9 est une **endonucléase**, elle est capable de couper au milieu de la chaîne.

**DVRAI** iPS (*induced pluripotent cell*) sont des cellules que l’on va prélever puis dédifférencier afin d’obtenir des cellules souches (*stem cells*).

**E FAUX** La cytométrie en flux est une méthode de séparation qui va fractionner un mélange en ses constituants. Dans la cytométrie, on ***part***d’extraits cellulaires obtenus en lysant les cellules.

**Question 6 :**

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

1. Un anticorps monoclonal provient d'un clone de lymphocyte B.
2. Dans une expérience d'immunofluorescence avec des anticorps primaires et secondaires, c'est l'anticorps primaire qui est couplé au fluorophore.
3. En microscopie photonique, le contraste de phase permet de visualiser plusieurs couleurs.
4. L’hybridation in situ permet de détecter soit l'ADN soit des ARN.
5. Les protéines de fusion fluorescentes sont obtenues par marquage chimique.

**A VRAI** Un anticorps monoclonal est issu d’un seul **clone** de lymphocyte B. Pour résumer, on injecte un antigène dans un organisme qui va développer une réponse immunitaire et va ainsi reconnaître cet antigène. Les différents lymphocytes ne vont pas reconnaître le même épitope et on aura donc des lymphocytes différents qui vont former des anticorps qui vont fixer des épitopes différents. Un **sérum monoclonal** correspond à un sérum contenant des anticorps qui reconnaissent le même épitope puisqu’ils viennent d’un même lymphocyte B.

**B FAUX** C’est l’anticorps secondaire sur lequel on va fixer le fluorophore.

**C FAUX** Le contraste de phase permet d’**ajouter** **du contraste** à une image et permet de mieux visualiser différents composants **sans** utiliser de coloration. On n’obtient pas de couleurs mais des nuances de gris.

**D VRAI** C’est une méthode qui consiste à marquer par fluorescence des sondes d’acides nucléiques pour qu’elles aillent révéler une cible spécifique directement dans la cellule. Cette sonde peut se fixer sur de l’**ADN et** de l’**ARN.**

**E FAUX** Pour créer des **protéines de fusion fluorescente**, on mélange la séquence codante de la **protéine à révéler** et celle d’une **protéine fluorescente**. Ce n’est pas chimique.

**Question 7 :**

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

1. Les filaments intermédiaires se situent entre les cellules épithéliales.
2. Le centre organisateur des microtubules contient deux centrioles.
3. Les filaments d'actine sont creux.
4. Les microtubules des asters sont reliés à la membrane plasmique par des dynéines.
5. Les dynéines sont des moteurs moléculaires.

**A FAUX** Les filaments intermédiaires se situent **dans** les cellules épithéliales.

**B VRAI** Ces deux centrioles sont perpendiculaires l’un par rapport à l’autre.

**C FAUX** Ce sont les microtubules qui sont creux.

**D VRAI** La dynéine va aller du + vers le moins et va donc avancer vers le MTOC. Comme elle est attachée à la membrane, elle va tirer le MTOC vers elle.

**E VRAI** Elles se déplacent le long des microtubules et permettent de déplacer des organites. Leur mouvement est permis par hydrolyse de l’ATP.

**DL**

Dans ce DL, les expériences de WB ne sont plus au programme de la PASS et les corrections qui sont proposées ne sont que des propositions faites par les tuteurs.

**Question 1 :**

On transfecte un vecteur d'expression de S1P1 dans des cellules HEK et on traite les cellules avec des concentrations croissantes de S1P, de sphingosine ou de FTYP. On lyse les cellules au bout de 30 minutes et on analyse les lysats par western blot en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre S1P1. Les membranes sont ensuite ré-analysées avec un anticorps anti-actine. La figure est représentative de 5 expériences indépendantes :



1. Les ARNm produits à partir d'un vecteur d'expression sont polyadénylés
2. Cette expérience montre que S1P1 et la bêta-actine ont environ le même poids moléculaire
3. L'anticorps anti-S1P1 n'est pas totalement spécifique car il génère plusieurs bandes dans un même extrait
4. Dans cette expérience, la sphingosine semble stimuler la synthèse de bêta-actine
5. Cette expérience montre que le composé FTYP a une meilleure affinité pour S1P1 que le Sphingosine-1-phosphate (S1P)

**A VRAI**

**B FAUX** il n’est pas possible de comparer le poids moléculaire de 2 protéines différentes sur un WB. Les images de WB sont en fait une succession d’images mises côte à côte, elles ne sont pas faites en même temps donc non comparables. Ici, l’actine est un témoin de charge l'intensité et l'épaisseur du trait d'actine donne une indication sur la quantité de protéine déposée dans le puits. Par exemple, sur les 2 premières lignes, on peut constater grâce à l'actine que tous les puits ont reçu à peu près la même quantité de lysat cellulaire. Mais à forte concentration de S1P on a moins de S1P1. Ce n'est pas parce qu'on en a moins mis, donc c'est à cause d'un effet dose dépendant du traitement avec le S1P.

**C FAUX** En effet, ici, le fait qu'il y ait plusieurs traits les uns sur les autres signifie que l'anticorps anti-S1P1 révèle des protéines de poids moléculaires différents. On peut donc imaginer que la protéine S1P1 n'est pas toujours complète et que parfois la protéine est coupée en deux ou en trois par exemple. Dans ce cas l'anticorps anti S1P1, qui détecte une partie de la protéine S1P1, détecte toujours la prot S1P1 mais plus ou moins complète et donc plus ou moins légère ce qui donnerait ces traits. A ce stade on ne peut pas affirmer que l'anticorps antiS1P1 détecte des protéines qui ne sont pas S1P1 et ce n'est donc pas totalement spécifique.

**D FAUX** En effet, dans cette expérience est justement que l’actine ne soit pas impactée et qu’elle serve de témoin.

**E FAUX** La seule chose que nous pouvons constater avec cette expérience c'est qu'avec du traitement S1P la quantité de S1P1 diminue petit à petit mais reste plus élevée que lorsque l'on traite avec FTYP. Il n'y a aucune notion d'affinité de S1P1 avec les traitements ici donc nous ne pouvons rien réellement démontrer.

**Question 2 :**

Pour comprendre les mécanismes de dégradation de S1P1, on traite les cellules transfectées par 250 nM de S1P ou de FTYP en présence d'un inhibiteur du protéasome. On utilise comme contrôle des cellules traitées seulement par l'inhibiteur du protéasome (C). On réalise une immunoprécipitation sur les extraits cellulaires en utilisant un anticorps anti-ubiquitine (Ub) et on analyse le produit de l'immunoprécipitation par western blot en utilisant un anticorps anti- ubiquitine (IB:Ub) ou anti-S1P1 (IB:S1P1). Une partie des extraits n'est pas immunoprécipitée (Input) et est analysée par western blot pour détecter S1P1 ou l'actine. La figure est représentative de 5 expériences indépendantes :



1. L'ubiquitine est constituée d'une chaîne polypeptidique.
2. Ces résultats montrent que l'inhibition du protéasome bloque la dégradation du récepteur S1P1 provoquée par FTYP.
3. Ces résultats montrent que l'inhibition du protéasome augmente la quantité du récepteur S1P1 présent dans la cellule.
4. Dans le WB #1, les bandes de tailles supérieures à 180 kDaltons détectées dans les extraits traités par FTYP correspondent à des formes polyubiquitinilées du récepteur S1P1.
5. Dans le WB #2, les bandes de tailles supérieures à 180 kDaltons détectées dans les extraits traités par S1P correspondent à des formes polyubiquitinilées du récepteur S1P.

**A VRAI**

**B VRAI** précédemment, nous avons pu voir qu'avec FTYP on a moins de S1P1. Ici dans le WB input on voit qu'entre le C (contrôle) et FTYP la quantité ne varie pas. La seule chose qui a changé avec l'expérience précédente c'est que nous inhibons le protéasome donc la dégradation ( et nous pouvons voir en plus qu'avec FTYP la prot S1P1 est très immunoprécipitée avec l'ubiquitine qui fait aussi partie de la voie de dégradation).

**C FAUX** Cette expérience ne nous montre pas qu’il y a une plus grosse quantité de protéines quand nous inhibons le protéasome par rapport à quand on ne l’inhibe pas car il n’y a pas de condition où on laisse le protéasome tel quel, il est toujours inhibé. Ainsi, nous n’avons pas de comparaison avec l'état normal, basal et nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion.

**D VRAI**

**E FAUX** Dans le WB2 on révèle l'ubiquitine, on ne sait pas quelles protéines sont associées à cette ubiquitine.

**Question 3:**

Pour suivre le récepteur S1P1 dans la cellule, on fusionne une GFP à son extrémité C-terminale cytosolique (S1P1-GFP). Les chercheurs sont intrigués par la présence de 5 sérines dans cette  région et les mutent en alanines (S1P1-S5A-GFP). Les cellules HEK transfectées sont traitées ou  non par S1P ou FTPY et fixées au bout de 30 minutes. On visualise la fluorescence par  microscopie confocale :



1. il n'a pas été nécessaire de perméabiliser les cellules pour détecter la GFP dans la  condition contrôle.
2. Dans la condition contrôle, la détection exclusive de la fluorescence à la membrane  plasmique suggère que S1P1-GFP pourrait ne pas être synthétisée au niveau du réticulum  endoplasmique.
3. après traitement par FTYP, S1P1-GFP n'est plus associée à un compartiment  membranaire.
4. la détection de S1P1-GFP par immunofluorescence après traitement par FTYP nécessiterait de perméabiliser les cellules.
5. S1P1 est ubiquitinilée sur au moins une des 5 sérines qui ont été mutagénisées dans  S1P1-S5A-GFP.

**A VRAI** Il n’y a pas besoin de perméabiliser des cellules lorsque des protéines de fusions fluorescentes sont utilisées.

**B FAUX** Toutes les protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique.

**C FAUX** Les

**D VRAI** Les

**E FAUX** L’ubiquitinilation se fait essentiellement sur des résidus lysines, ici les sériées ont été mutées en alanines donc pas d’ubiquitinilation.

**Question 4:**

Le récepteur S1P1 est couplé à une protéine Gi. La toxine pertussique catalyse l’ADP ribosylation de la sous-unité αi de Gi ce qui empêche l’échange du GDP par le GTP sur αi.

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

1. Gi est formée de 3 sous-unités.
2. le récepteur S1P1 activé stimule l'hydrolyse du GTP lié à la sous-unité αi.
3. Quand il est lié au Sphingosine-1-phosphate, chaque récepteur S1P1 peut activer plusieurs molécules Gi, ce qui permet d'amplifier la transduction du signal.
4. L'activation du récepteur S1P1 devrait augmenter la concentration d'AMPc dans les  lymphocytes.
5. La toxine pertussique provoque une augmentation de la concentration d'AMPc dans la  cellule.`

**A VRAI** La protéine Gi fait partie d’une des principales familles des protéines G, qui comportent trois sous-unités : alpha, béta et gamma.

**B FAUX** La sous unité alpha i de Gi est modifiée par une toxine : elle ne peut plus hydrolyser le GTP et reste constamment activée.

**C VRAI** Car le récepteur S1P1 est couplé à une protéine G, qui va elle-même ensuite diffuser dans la membrane et activer d’autres protéines G.

**D FAUX** Cf B : La sous-unité est constamment activée : le fait qu’il y ait un ligand qui active le récepteur ne va pas changer la concentration d’AMPc.

**E VRAI** Comme la sous-unité est active en permanence est pas seulement lorsqu’il y a un signal extérieur, on observe une augmentation de la concentration en AMPc dans la cellule en présence de toxine pertussique.

**Question 5:**

Indiquez la ou les affirmations correctes parmi les propositions suivantes :

1. L'adénylate cyclase est une protéine membranaire.
2. Les sérines présentes dans la queue cytoplasmique du récepteur S1P1 pourraient être  phosphorylées par la protéine kinase A.
3. Les sérines présentes dans la queue cytoplasmique du récepteur S1P1 pourraient être  phosphorylées par la protéine kinase C.
4. Le récepteur S1P1 pourrait s'autophosphoryler.
5. La protéine ras est une GTPase qui fait partie de la même famille de protéines que Gi.

**A VRAI** Elle est bien fixée à la membrane et Gs et Gi modulent son activité.

**B VRAI** La PKA (protéine kinase A) peut phosphoryler des résidus sérine et thréonine ce qui va moduler l’activité des effecteurs qu’elle phosphoryle.

**C VRAI** La PKC est une kinase donc elle joue bien un rôle de phosporylation, Les sérines sont des AA qui peuvent être phosphorylés donc la PKC pourrait en effet phosphorylé les sérines présentes sur la queue cytoplasmique du récepteur S1P1.

**D FAUX** Il a besoin d’une protéine kinase.

**E FAUX** Les protéines ras appartiennent à la super famille des GTPases sous forme monomérique (sont aussi inclues la famille Rho, la famille ARF, la famille Rab et la famille Ran). Les protéines Gi font partie de la grande famille des protéines G, qui sont elles des protéines trimériques.