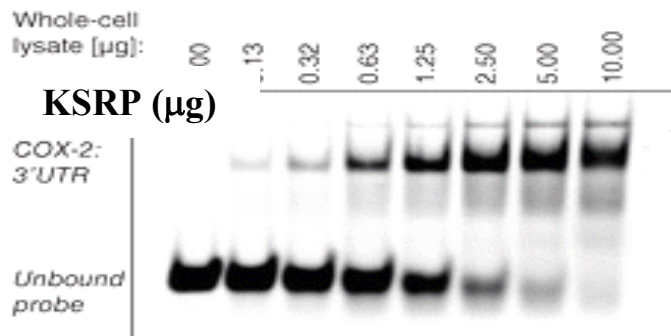


Exercice 1 (3 points) :

Classiquement la dégradation des ARN messagers était considérée comme une simple étape d'élimination des ARN. Les variations de quantités d'ARN messagers observées peuvent être dues pour la moitié d'entre elles à des altérations de la stabilité de ces ARNm. Dans cet exercice, nous souhaitons explorer la possibilité d'interaction entre KSRP (RNA Binding protéine) et l'ARNm COX2. Décrivez la méthode et interprétez les résultats.



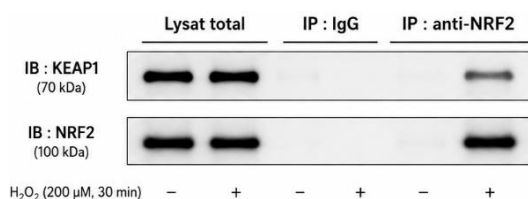
I- Décrivez la méthode (1.5pt)

- REMSA Interaction 3'UTR ou 5'UTR avec une protéine (0.5pt)
- Transcription in vitro 3'UTR COX2 avec U p32 (0.5pt)
- Protéine recombinante KSRP (0.5pt)

II- Interprétez les résultats (1.5pt)

- KSRP se fixe sur le 3'UTR de COX2 (0.75pt)
- Plus la concentration de KSRP augmente plus l'interaction est importante (0.75pt)

Exercice 2 (4 points) : Nrf2 est exprimé chez l'homme de manière ubiquitaire dans le poumon, mais principalement par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Nrf2 joue un rôle essentiel de protection contre le stress oxydant induit par les polluants environnementaux et les toxiques comme la fumée de tabac. La voie Nrf2/Keap1 est impliquée dans la réparation pulmonaire normale et pathologique qui s'accompagne d'une production importante de ROS. H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) est couramment utilisé comme agent de stress oxydatif pour étudier l'interaction NRF2-KEAP1.



Décrivez la méthode (2pt)

CO-IP protéine -protéine (interaction protéine -protéine. La **Co-IP (co-immunoprécipitation)** est une technique de biologie moléculaire utilisée pour **détecter et confirmer des interactions protéine-protéine** dans un extrait cellulaire, dans des conditions proches du physiologique. (0.75pt)

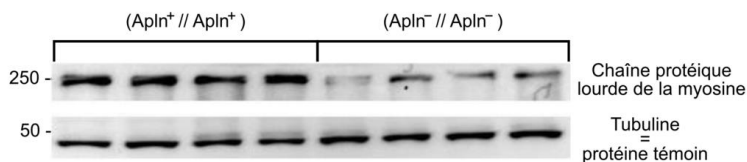
- **Lyse cellulaire douce** pour conserver les complexes protéiques (0.25pt).
- **Anticorps spécifique** dirigé contre la *protéine d'intérêt* (protéine « appât ») (0.25pt).

- **Précipitation** de l'anticorps avec des billes (agarose ou magnétiques) (0.25pt).
- Les **protéines partenaires** liées à l'appât sont co-précipitées (0.25pt).
- **Analyse** (souvent Western blot) pour détecter la/les protéine(s) partenaire(s) (0.25pt).

Interprétez les résultats (2pt).

- H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) est couramment utilisé comme agent de stress oxydatif pour étudier l'interaction NRF2-KEAP1, notamment en co-immunoprécipitation (Co-IP) (1 pt).
- Diminution de la Co-IP, car NRF2 se dissocie KEAP1(1pt)

Exercice 3 (3 points) : L'apeline, une molécule produite notamment lors de la contraction des muscles, pourrait déjouer la sarcopénie, c'est-à-dire la perte de capacités musculaires due à l'âge. La diminution des capacités musculaires due à l'âge, la sarcopénie, est l'une des causes de la perte d'autonomie des personnes âgées.



Document 1 : Électrophorèse de protéines musculaires de souris sauvages (Apln⁺//Apln⁺) et de souris homozygotes pour l'allèle mutant du gène APLN (Apln⁻//Apln⁻). Décrivez la méthode et interprétez les résultats

Décrivez la méthode (2pt)

Le document présente une électrophorèse suivie d'un immunoblot (Western blot) 0.5pt):

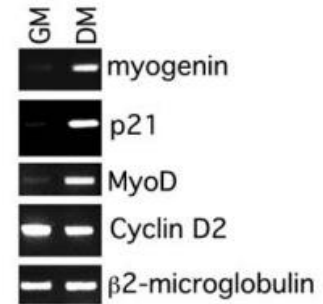
- Les protéines musculaires sont extraites chez deux types de souris :
 - souris Apln⁺/Apln⁺ (0.25pt)
 - souris Apln⁻/Apln⁻ (0.25pt)
 -
- Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel selon leur masse moléculaire :
 - en haut (~250 kDa) : chaîne lourde de la myosine, protéine majeure du muscle (0.25pt)
 - en bas (~50 kDa) : tubuline, utilisée comme protéine témoin (contrôle de chargement) (0.25pt).
- Des anticorps spécifiques (Chaîne lourde de la myosine (0.25pt) et tubuline (0.25pt) permettent de révéler ces protéines sous forme de bandes.

Interprétez les résultats (1 pt)

- **Chaîne lourde de la myosine (~250 kDa) :**
 - Chez les souris Apln⁺/Apln⁺, les bandes sont épaisses et bien marquées, indiquant une quantité importante de myosine (0.25pt).
 - Chez les souris Apln⁻/Apln⁻, les bandes sont nettement moins intenses, traduisant une diminution de la quantité de myosine (0.25pt).
 -
- **Tubuline (~50 kDa) :**
 - Les bandes ont une intensité comparable chez les deux types de souris (0.25pt).
 - Cela montre que la quantité totale de protéines déposées est identique dans chaque puits (0.25pt).

Exercice 4 (4 points) : Expression de s marqueurs myogéniques et des transcrits de contrôle dans des cellules C2C12 cultivées en GM ou en DM, analysée par PCR.

- GM (Growth Medium / milieu de croissance) : conditions qui maintiennent les cellules en phase de prolifération, non différenciées
- DM (Differentiation Medium / milieu de différenciation) : conditions qui induisent la différenciation des cellules en myotubes (cellules musculaires)



Décrivez la méthode (2.5 pt)

Des cellules musculaires murines C2C12 ont été cultivées soit en milieu de croissance (GM), soit en milieu de différenciation (DM).

- Après culture, l'ARN total a été extrait à partir des cellules (**0.5pt**), puis rétrotranscrit en ADNc (**0.5pt**).
- L'expression de différents gènes marqueurs de la myogenèse (MyoD, myogenin, p21, cycline D2 (**0.5pt**) ainsi que d'un gène de contrôle (β 2-microglobuline) a été analysée par PCR semi-quantitative (**0.5pt**).
- Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (**0.5pt**) et visualisés, permettant de comparer l'abondance relative des transcrits entre les conditions GM et DM

Interprétez les résultats (1.75 pt).

- Myogenin : son expression est faible ou absente en GM et fortement augmentée en DM, indiquant l'activation du programme de différenciation musculaire (**0.25pt**).
- p21 : l'expression est augmentée en DM par rapport au GM, traduisant l'arrêt du cycle cellulaire nécessaire à la différenciation(**0.25pt**).
- MyoD : le transcrit est détecté dans les deux conditions, ce qui est cohérent avec son rôle de facteur de transcription précoce impliqué à la fois dans la prolifération et la différenciation des myoblastes (**0.25pt**).
- Cycline D2 : fortement exprimée en GM et diminuée en DM, reflétant la sortie du cycle cellulaire lors de la différenciation (**0.25pt**).
- β 2-microglobuline : son expression est comparable entre GM et DM, confirmant une quantité similaire d'ARN et servant de contrôle interne (**0.25pt**).

Ces résultats montrent que le passage des cellules C2C12 du milieu de croissance au milieu de différenciation entraîne un arrêt de la prolifération et l'activation des marqueurs spécifiques de la différenciation musculaire, confirmant la validité du modèle expérimental (0.5pt).

Exercice 5 (6 points) :

La séquence présentée est celle d'une partie du gène de la myostatine humaine comprenant le promoteur et l'exon 1. On veut amplifier par PCR le fragment commençant 156 et se terminant 311 suivant la numérotation indiquée au-dessus du brin codant 3' – 5'.

1- Quelles amorces seront utilisées ? (1.5pt)

- Amorce sens (forward) : les bases **156 à 175 du brin codant**.
- Amorce antisens (reverse) : le reverse complément des bases **292 à 311 du brin codant**.

En lisant la séquence fournie, cela donne comme exemple de paires les plus directes :

- Forward: 5'-GAGGGGCTGTGTAATGCATG-3' (0.5pt)
- Reverse : 5'-GAGTGGAGGAGCTTTGGGTA-3' (0.5pt)
- $T_m F = 2 \times 9 + 4 \times 11 = 18 + 44 = 62^\circ C$; (0.25pt)
- $T_m R = 2 \times 9 + 4 \times 11 = 18 + 44 = 62^\circ C$ (0.25pt)

2- Quels sont les différents constituants nécessaires la réaction de classique) ?

Constituants nécessaires à une PCR classique (1pt)

Une réaction de PCR classique contient :

1. ADN matrice (génomique ou ADNc)
2. Deux amorces spécifiques (forward et reverse)
3. ADN polymérase thermostable (ex. Taq polymérase)
4. dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5. Tampon de réaction (pH optimal)
6. Mg^{2+} (cofacteur indispensable de la polymérase)
7. Eau stérile sans nucléase

3- Quelles sont les différentes étapes d'une réaction de (en temps réel et (en temps réel et classique) ? A quoi servent- elles ?

PCR classique et PCR en temps réel (qPCR) (1.5 pt)

Les étapes sont les mêmes, seule la détection diffère.

1. Dénaturation ($\approx 94-95^\circ C$)

- Sépare les deux brins d'ADN
- Rend l'ADN accessible aux amorces

2. Hybridation / Annéaling ($57^\circ C$)

- Les amorces s'hybrident à leurs séquences complémentaires
- La température dépend du T_m des amorces

3. Élongation ($\approx 72^\circ C$)

- La polymérase synthétise le nouveau brin
- Allongement à partir des amorces

Ces étapes sont répétées 30-40 cycles, ce qui entraîne une amplification exponentielle.

4- Comment peut-on mettre en évidence le produit de PCR (en temps réel et classique) ? (1pt)

PCR classique (0.5pt)

- Électrophorèse sur gel d'agarose
- Coloration (BET)
- Visualisation sous UV

- Comparaison avec un marqueur de taille

PCR en temps réel (qPCR) (0.5pt)

- Détection pendant l'amplification
- Deux méthodes principales :
 - Colorant intercalant (SYBR Green)
 - Sonde spécifique fluorescente (TaqMan)
- Résultat exprimé en Ct (Cycle threshold)

5- 5) Quelle est la taille attendue pour le produit de PCR (en temps réel et classique) ? (1 pt)

$$311 - 156 + 1 = 156 \text{ paires de bases}$$

PCR classique : 156 pb

PCR en temps réel : 156 pb

```

ttgtctcatcctaagttggaatataaaaagccacttgaatacagtataaa
ATGCAAAAACCTGCAACTCTGTGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATTGT
TGCTGGTCCAGTGGATCTAAATGAGAACAGTGAGCAAAAAGAAAATGTGG
AAAAGAGGGGCTGTGTAATGCATGTACTTGGAGACAAAACACTAAATCT
TCAAGAATAGAAGCCATTAAGATACAAATCCTCAGTAAACTTCGTCTGGA
AACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGTTATAAGACAACTTTTACCCAAAG
CTCCTCCACTCCGGGAACCTGATTGATCAGTATGATGTCCAGAGGGATGAC
AGCAGCGATGGCTCTTTGGAAGATGACGATTATCACGCTACAACGGAAAC
AATCATTACCATGCCTACAGAGTCTGATTTTCTAATGCAAGTGGATGGAA
AACCCAAATGTTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAAATACAATACAATAAA
GTAGTAAAGGCCCAACTATGGATATATTTGAGACCCGTCGAGACTCCTAC
AACAGTGGTTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCTATGAAAGACGGTA
CAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACT

```