

Master Neurosciences parcours régulier
Examen UE approches expérimentales avancées en biologie (session 1)
Mercredi 8 janvier 2025 14H00-17H00 Salle SDVE4

Durée de l'épreuve : 3h00.

Aucun document autorisé.

Les réponses non justifiées ne seront pas considérées.

L'examen est constitué de 3 parties composées d'exercices ou de questions de cours. Chaque partie constitue un sujet à rédiger sur une copie d'examen différente.

Les durées de chaque sujet sont précisées à titre indicatif.

Partie 1 : Travaux pratiques (Guillaume Drutel) (durée conseillée 30 min).

Des chercheurs étudient les effets de l'expression du gène Fosl1 dans des cellules PC12 traitées avec la forskoline (FSK) et le facteur de croissance des nerfs (NGF). Ils réalisent dans un premier temps l'extraction des ARN totaux qui sont repris dans un volume final de 30 µL. Les résultats de cette extraction sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1

A	B	C	D	E
SAMPLE	RNA concentration (ng/µL)	A260	Ratio A260/A280	RIN
CONT1	43,22	1,08	2,28	9,30
CONT2	47,57	1,19	2,08	9,90
CONT3	45,93	1,15	2,26	9,60
CONT4	43,24	1,08	1,72	9,70
FSK1	212,75	5,32	2,01	10,00
FSK2	95,00	2,37	1,91	9,80
FSK3	146,72	3,67	1,98	10,00
FSK4	94,32	2,36	1,99	10,00
NGF1	282,51	7,06	2,01	9,80
NGF2	204,72	5,12	1,97	10,00
NGF3	260,21	6,51	2,01	10,00
NGF4	31,45	0,79	2,15	9,60

- Préciser quelles sont les informations apportées par les colonnes C, D, et E. Quelle autre mesure aurait pu être rajoutée dans ce tableau 1 ?
- D'après les données du tableau 1 conserveriez-vous ces 12 échantillons pour une future étude d'expression des gènes ?
- Les chercheurs souhaitent réaliser la synthèse de l'ADNc. Ils décident d'utiliser pour cette synthèse une quantité de 1 µg d'ARN totaux. Quelle est l'étape à réaliser avant de procéder à cette synthèse ? Que devront décider les chercheurs ?
- Pour réaliser cette synthèse ils décident d'utiliser un mélange constitué d'amorces aléatoires et d'oligod(T). Vous préciserez l'intérêt d'utiliser un tel mélange.

Les chercheurs réalisent alors une expérience de qPCR et les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2

Sample	Primer	Gene Name X	Mean Ct X	HKG gene	HKG Ct	Mean HKG	deltaCt	Mean deltaCt
CONT1	R1388	Fosl1	26,8	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,12 22,25	20,2	6,6	6,8
CONT2	R1388	Fosl1	27,1	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,5 22,31	20,4	6,7	
CONT3	R1388	Fosl1	29,1	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	20,05 24,32	22,2	6,9	
CONT4	R1388	Fosl1	27,5	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,13 22,41	20,3	7,2	
FSK1	R1388	Fosl1	25,8	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,21 22,73	20,5	5,3	5,5
FSK2	R1388	Fosl1	25,6	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,55 22,7	20,6	5,0	
FSK3	R1388	Fosl1	25,9	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,18 21,98	20,1	5,9	
FSK4	R1388	Fosl1	25,8	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	17,96 21,91	19,9	5,9	
NGF1	R1388	Fosl1	22,9	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,17 22,46	20,3	2,6	2,8
NGF2	R1388	Fosl1	22,6	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,3 22,16	20,2	2,4	
NGF3	R1388	Fosl1	23,1	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	18,15 22,23	20,2	3,0	
NGF4	R1388	Fosl1	23,3	Sdha(R550) Rpl13a(R952)	17,97 22,11	20,0	3,3	

5. D'après les résultats du tableau 2 on observe pour l'échantillon CONT3 des valeurs de Ct des gènes de référence (HKG gene) plus élevées. Quelle peut-en être la raison ? Conseillerez-vous aux chercheurs d'éliminer cet échantillon de leur analyse ?
6. Sans réaliser aucun calcul vous préciserez dans quelle condition expérimentale ce gène est le plus exprimé.
7. Les chercheurs décident d'utiliser la formule $2^{-\text{deltaCt}}$ pour l'analyse de ces données. Quelle information peut apporter les valeurs ainsi obtenues ? Ce calcul est-il pertinent ? Si non précisez les différentes étapes de calcul que les chercheurs devront réaliser pour définir les effets de ces traitements FSK et NGF sur l'expression de ce gène.

FIN Partie I

Partie 2 : signalisation cellulaire (Guillaume Drutel) (durée conseillée 1h30).

Les récepteurs des cannabinoïdes (CB) appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, groupe 1 de la famille A, et sont couplés à des protéines G. Il existe 2 sous-types CB1 et CB2. Le profil d'expression du CB1 est extrêmement large (système nerveux central, tissus périphériques), celui du CB2 est restreint aux cellules du système immunitaire.

Dans cette étude les auteurs s'intéressent à la localisation cellulaire du récepteur CB1 dans des cellules HEK-293 dérivées de cellules embryonnaires humaines de rein. Afin de suivre cette localisation les auteurs réalisent une protéine de fusion CB1-eGFP associant le récepteur CB1 et la protéine eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein).

Dans une première série d'expériences les chercheurs mesurent la concentration intracellulaire d'AMPc. Les résultats sont présentés figure 1.

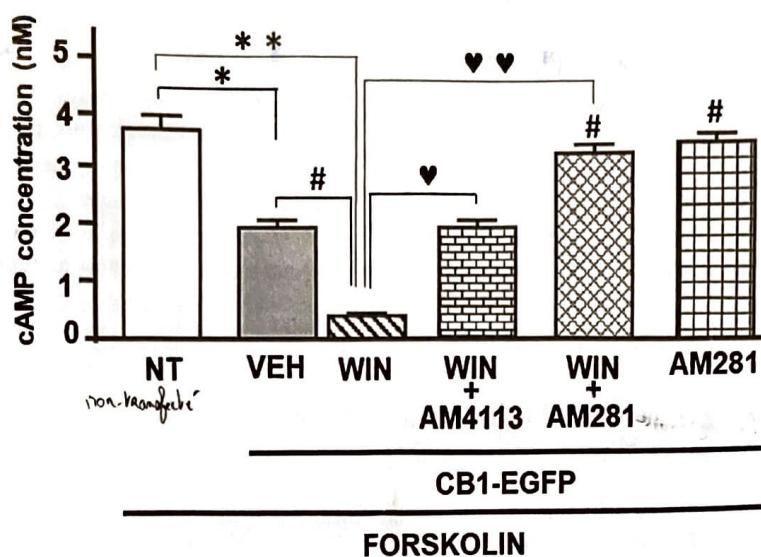


Figure 1. Mesure de l'accumulation d'AMPc dans des cellules HEK-293 non transfectées (NT) et transfectées avec un plasmide exprimant le gène codant pour la protéine de fusion (CB1-eGFP). Ces cellules sont pré-incubées 20 minutes à 37°C avec de la forskoline 10 µM en présence de l'agoniste WIN seul ou avec des ligands CB1, AM281 ou AM4113 ou de la solution solvant (vehicle (VEH)) utilisée pour dissoudre les ligands. (*p<0.05 et ** p<0.01 ; # p<0.05 par rapport à la condition VEH ; ♥ p<0.05 et ♥♥ p<0.01 par rapport à la condition de traitement WIN).

1. Analyser la figure 1 et proposer différentes hypothèses concernant i) le couplage de ce récepteur, ii) l'activité de ce récepteur, iii) la qualification des 2 ligands AM281 et AM4113 (agoniste, antagoniste neutre, agoniste inverse).
2. Quelle(s) expérience(s) complémentaire(s) (ajout d'une condition expérimentale ; réalisation d'une nouvelle transfection...) proposeriez-vous afin de compléter les résultats obtenus dans la figure 1 ?

Dans un second temps les auteurs s'intéressent à la localisation et au trafic cellulaire de ce récepteur CB1 en exprimant la protéine CB1-eGFP et en révélant la fluorescence par microscopie confocale (figure 2).

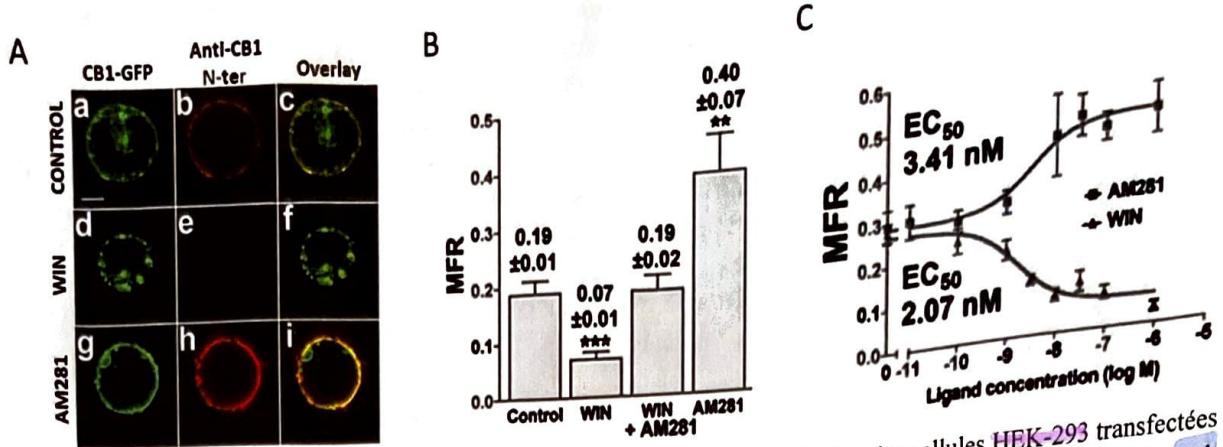


Figure 2. A. Révélation par microscopie confocale de la localisation de la protéine CB1 dans les cellules HEK-293 transfectées avec le plasmide exprimant CB1-eGFP et traitées pendant 3h avec un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide. a, d, g. Révélation de la protéine CB1-eGFP. b, e, h. Révélation du récepteur CB1 avec un anticorps primaire dirigé contre la partie N-Terminale du récepteur (Anti-CB1N-ter) et un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa568, émettant dans le rouge. c, f, i, superposition des images confocales obtenues en a et b, d et e, g et h respectivement. B. Quantification du ratio de fluorescence membranaire (MFR) qui représente le rapport s/c entre la fluorescence présente à la surface membranaire (s) et celle présente au niveau du cytoplasme (c). La fluorescence nucléaire est considérée comme du bruit de fond et est soustraite des valeurs de s et de c. La quantification est réalisée sur 145 cellules et les images obtenues en figure 2A sont représentatives de l'ensemble des cellules analysées. La quantification est réalisée après 3h d'incubation de WIN 300nM, AM281 7µM. C. Relation concentration-réponse des effets des ligands WIN et AM281 sur la distribution de la protéine CB1-eGFP. (** p<0.01, *** p<0.001 par rapport à la condition témoin (control)).

3. Les auteurs réalisent un traitement pendant 3 heures avec un inhibiteur de synthèse protéique. Que veulent-ils révéler ?
4. Expliquez les différences de localisation entre les images obtenues en a,d,g et celles en b,e,h (figure 2A). Que révèlent-elles ?
5. En tenant compte des résultats obtenus dans la figure 1 proposez une explication concernant les distributions cellulaires du récepteur CB1 observées en présence du ligand AM281.
6. D'après les résultats décrits figure 1, quelle pourrait être la distribution cellulaire du CB1 obtenue en utilisant le ligand AM4113 seul ?

Enfin dans une dernière série d'expérience les chercheurs précisent les mécanismes d'action observés en figure 2. Les résultats sont présentés figure 3.

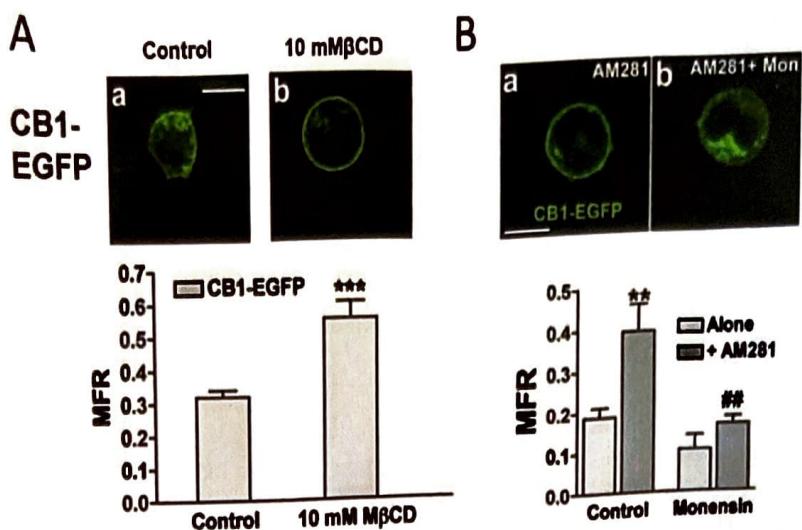


Figure 3. A) Effet d'un inhibiteur du processus d'endocytose associé à la clathrine, le methyl- β -cyclodextrin (M β CD), sur la localisation de la protéine CB1-EGFP. *** p<0,001 par rapport à la condition control. B) Effet d'un inhibiteur de recyclage membranaire, la monensine (Mon), sur la localisation de la protéine CB1-EGFP. Les cellules HEK-293 ont été traitées 3h00 avec 7 μ M de AM281 seul ou en présence de monensine 70 μ M. ** p<0,01 par rapport à la condition control (sans AM281 ni monensine). ## p<0,01 par rapport à la condition avec monensine mais sans AM281.

7. Quelles informations sont apportées par les résultats de la figure 3 ?
8. Proposez un schéma de conclusion intégrant les protéines potentiellement mises en jeu dans ce trafic cellulaire et illustrant les effets de l'agoniste WIN et de l'agoniste inverse AM281.

FIN Partie 2

Partie 3 Bioimagerie (Elena Avignone) (durée conseillée 1h00).

Question théorique (duré conseillée 15 minutes)

Cette partie théorique compare la constitution des microscopes utilisés dans les techniques de **microscopie multiphotons et confocale**.

Q1 Vous voulez ‘transformer’ un microscope **confocal** en **2 photons (2P)**. Quels éléments devez-vous changer et lesquels **pourriez-vous réutiliser**? (Pensez à tous les éléments d'un microscope de ce type nécessaire pour acquérir une image). Vous pouvez vous aider d'un dessin. Justifier vos réponses.

Q2 A l'aide d'un tableau listez les avantages et désavantages de la microscopie confocale par rapport au 2P.

Interprétation des figures (duré conseillée 45 minutes)

Des auteurs ont développé une nouvelle approche utilisant la technique de **FRET**. A l'aide de deux virus présentant deux promoteurs spécifiques, ils expriment 2 protéines de fusion : **NAP-a** constituée du domaine **transmembranaire** (TM) du récepteur au **PDGF** (PDGFR) et la protéine **fluorescente GFP** (expression spécifique au sein des membranes plasmiques des astrocytes) et **NAP-n** associant la protéine **neurexine-1** avec la protéine **mCherry** (expression spécifique au sein des membranes plasmiques des neurones présynaptiques).

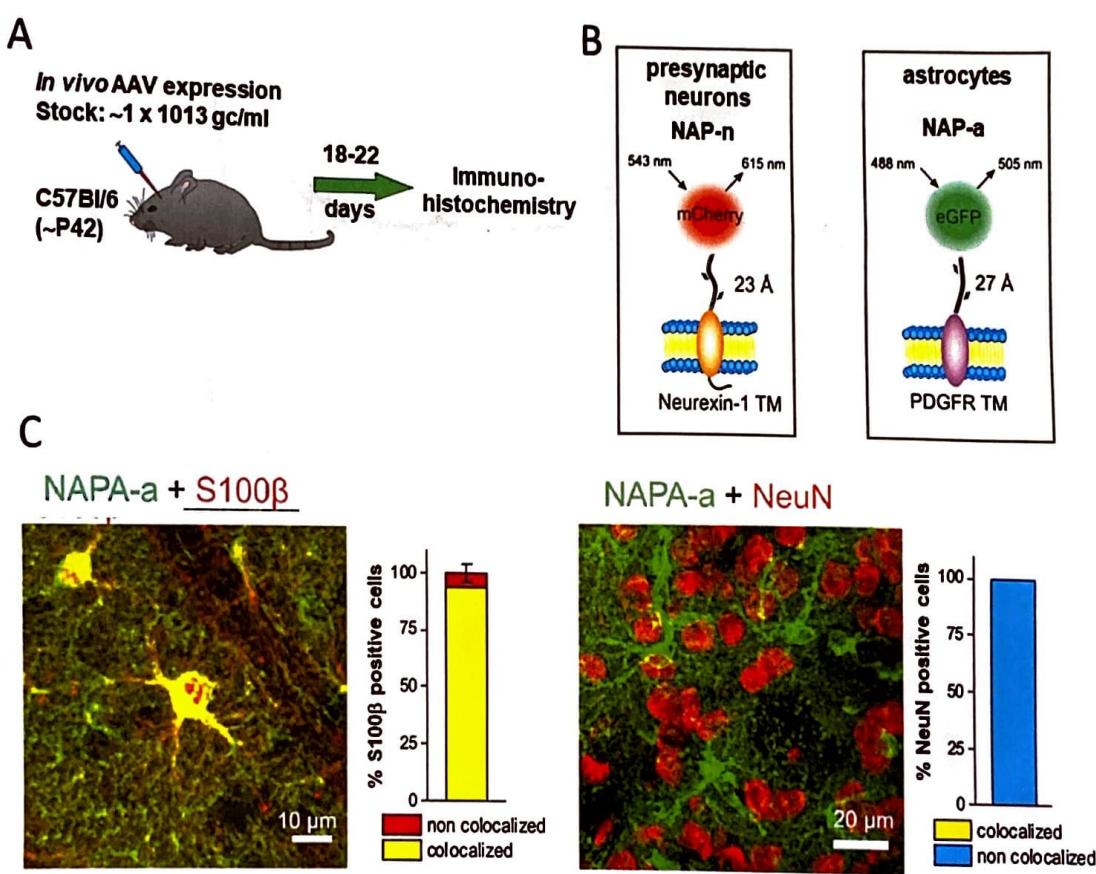


Figure 1 : Etude de la colocalisation à l'aide de la technique d'immunohistochimie sur du tissu fixé. S100 β , marqueur astrocytaire. NeuN marqueur neuronal.

Q3: A votre avis, quelle est la technique d'imagerie utilisée dans le panneau C ? Justifier votre réponse. (2 lignes max)

Q4: Quelle est le but de cette manip ? Quelle est la conclusion principale du panneau C ? (5 lignes max)

Q5 : mCHerry et eGFP sont des fluorophores utilisés pour le FRET. Rappelez la définition de FRET. Quelles sont les conditions pour que le phénomène se produise ? (4 lignes max)

Dans l'expérience illustrée dans la figure 2, ils comparent la colocalisation et le FRET entre les deux fluorophores au sein de différentes régions du striatum recevant des projections du cortex (corticostriatal), du thalamus (thalamostratial) ou de la substance noire (nigrostriatal) ou des projections locales (Collateral).

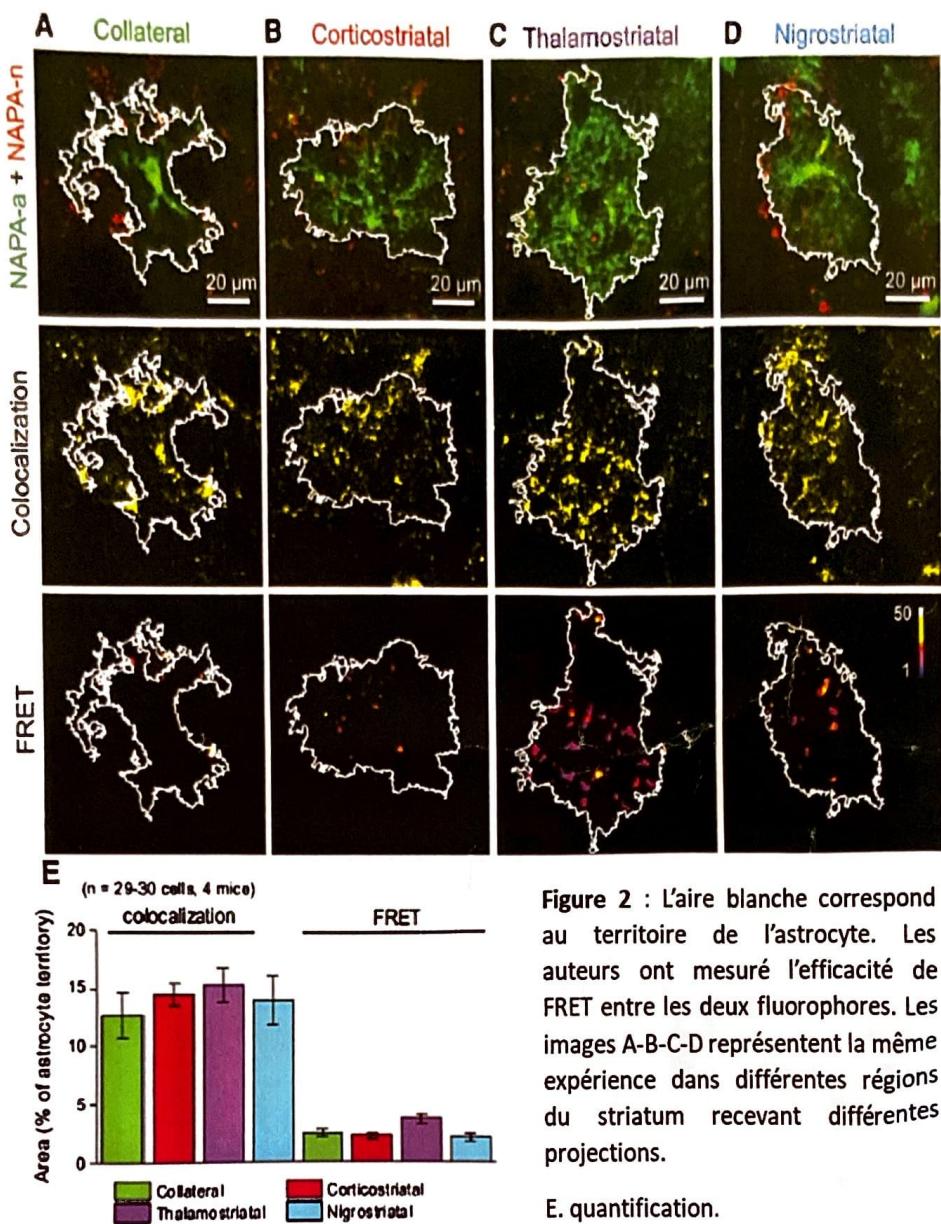


Figure 2 : L'aire blanche correspond au territoire de l'astrocyte. Les auteurs ont mesuré l'efficacité de FRET entre les deux fluorophores. Les images A-B-C-D représentent la même expérience dans différentes régions du striatum recevant différentes projections.

E. quantification.

Q6: Pourquoi l'aire où il y a du FRET est plus petite que celle où on observe la colocalisation ?

Q7: A partir d'un schéma de la synapse avec les 3 éléments (parties pré- et post-synaptique ainsi que l'astrocyte) illustrez les 3 cas différents (pas de colocalisation, colocalisation sans FRET, colocalisation avec FRET) en respectant les bonnes proportions. Pour vous aider vous utiliserez une barre d'échelle ainsi que la grille de pixels d'une image digitale.

Q8: Quelle est la nouveauté de la méthode développée dans le papier ?

BONUS : Décrivez le désavantage possible de cette technique

FIN