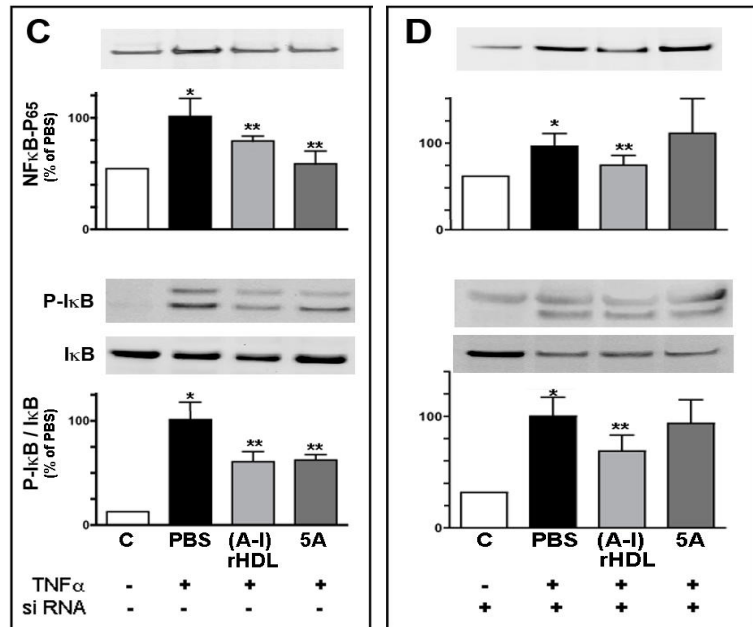


Nous savons que l'apoA-I et le 5A jouent un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'expression de VCAM1 au niveau de l'endothélium artériel. VCAM1 est une molécule d'adhésion permettant le recrutement des neutrophiles circulants dans l'intima/media artérielle. L'expression génique de VCAM1 est essentiellement régulée par le facteur de transcription NFκB. La grosse sous unité de NFκB (p65) est normalement retenue dans le cytoplasme par un inhibiteur IκB.



Les stimulus pro-inflammatoires activent une voie de signalisation intracellulaire qui permet la phosphorylation d'IκB (P-IκB), ce qui provoque une ubiquitination d'IκB et sa dégradation dans le protéasome. Nous avons traité des cellules endothéliales de carotides humaines (culture primaire) avec ou sans TNFα, cytokine pro inflammatoire, en présence soit d'A-I, soit de 5A, soit de tampon phosphate (PBS). L'expression de NFκB p65 est mesurée par western blot dans les extraits nucléaires des cellules. L'expression de IκB (total et phosphorylé) est mesurée dans le cytoplasme des cellules et le ratio entre P-IκB et IκB total est calculé. Cette expérience a été reproduite dans des cellules transfectées avec un siRNA inhibant l'expression d'ABCA1 [cadre de droite]. Après normalisation, * significativement différent de la condition contrôle (C), ** significativement différent de la condition PBS.

1. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- A. Le TNFα augmente l'expression de NFκB p65 dans les cellules.
- B. Le TNFα augmente la translocation nucléaire de NFκB p65.
- C. Dans cette expérience, le TNFα augmente vraisemblablement l'activité d'une kinase.
- D. La sous unité p65 se fixe vraisemblablement au promoteur de VCAM1.
- E. Le siRNA n'a pas d'effet sur la phosphorylation de IκB.

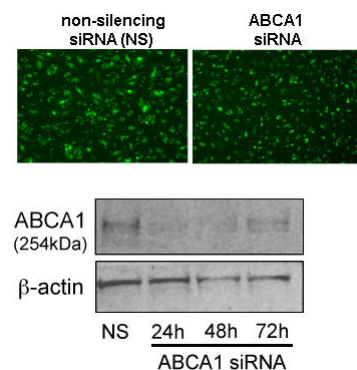
2. Parmi les propositions suivantes, laquelle ou lesquelles sont vraies ou fausses :

- A. Cette expérience indique que A-I et 5A ont des propriétés anti-inflammatoires.
- B. L'effet anti-inflammatoire de A-I nécessite l'expression du transporteur ABCA1.
- C. Ici, les effets du peptide 5A sont médiés par le transporteur ABCA1.
- D. L'expression de VCAM1 est corrélée positivement avec l'expression nucléaire de NFκB p65.
- E. Il n'est pas nécessaire de réaliser de contrôle de charge pour mesurer le ratio P-IκB/IκB.

3. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- A. P-IκB a un poids moléculaire vraisemblablement supérieur à celui de IκB.
- B. P65 est vraisemblablement transloquée dans le noyau via un pore nucléaire.
- C. Les effets anti-inflammatoires de A-I ne sont pas médiés par le transporteur ABCA1.
- D. Dans cette voie de signalisation anti-inflammatoire, ABCA1 est en amont de NFκB, lui-même étant en amont de VCAM1.
- E. Le TNFα est une protéine sécrétée.

Pour vérifier si l'expression d'ABCA1 est effectivement inhibée par le siRNA utilisé ci-dessus, les niveaux d'expression d'ABCA1 sont mesurés par western blot dans les cellules transfectées avec un siRNA non spécifique (NS) ou celles transfectées avec le siRNA spécifique d'ABCA1, 24h, 48h et 72h après transfection. Pour déterminer l'efficacité de transfection, nous avons utilisé des si-RNA fluorescents qui peuvent être visualisés dans les cellules 6h après transfection.



4. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

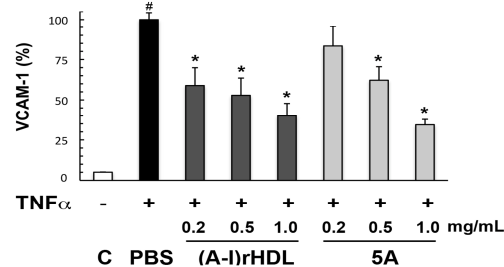
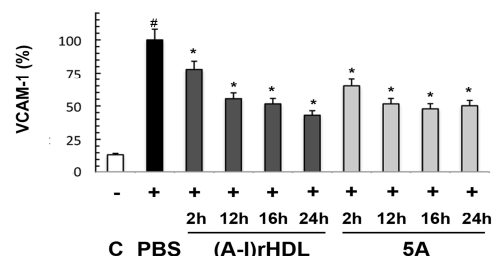
- A- L'expression du transporteur ABCA1 est visiblement diminuée dans les cellules transfectées avec le siRNA spécifique, 24h et 48h après transfection.
- B- Dans cette expérience on mesure l'expression génique endogène d'ABCA1
- C- L'efficacité de transfection correspond au pourcentage de cellules ayant intégré les siRNA et qui expriment la GFP.
- D- L'expression d'ABCA1 est inhibée par le siRNA spécifique, uniquement dans les cellules fluorescentes ou dans leurs cellules filles.
- E- Ici, la transfection des siRNA est transitoire.

5. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- A- Certains virus peuvent transfecter des cellules eucaryotes
- B- Il est possible de transfecter de l'ADN circulaire double brin dans des cellules eucaryotes
- C- Les siRNA transfectés sont double brin
- D- On peut surexprimer un transgène par transfection transitoire
- E- On peut modifier ponctuellement un plasmide par mutagenèse dirigée

Afin de déterminer en combien de temps et à quelles doses l'apoA-I et le 5A induisent leurs effets anti-inflammatoires sur l'expression de VCAM1, nous avons traité nos cellules endothéliales avec ou sans TNF α , en présence soit d'A-I, soit de 5A à différentes concentrations (0.2 – 1.0 mg/mL) et pendant des durées variables (2-24h). L'expression de VCAM1 est mesurée par cytométrie de flux sur cellules vivantes.

Significativement différent : # des cellules non stimulées avec du TNF (C) ; * des cellules stimulées non traitées (PBS).



6. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- Ici, on mesure l'expression de VCAM1 à la membrane plasmique.
- On a vraisemblablement utilisé un anticorps monoclonal couplé à un marqueur fluorescent et reconnaissant VCAM1 humain.
- Contrairement au 5A, l'apoA-I est efficace dès 0.2mg/mL
- Les effets anti-inflammatoires de l'apoA-I sur VCAM1 sont plus rapides que ceux du 5A
- 100% des cellules stimulées avec le TNF et non traitées (PBS) expriment VCAM1

7. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- On pourrait simultanément mesurer l'expression d'autres protéines membranaires à l'aide d'un second anticorps couplé à un marqueur fluorescent.
- Ici, le peptide 5A semble moins efficace que l'apoA-I.
- Il est possible de mesurer la concentration en apoA-I dans le milieu de culture par ELISA.
- Dans ces expériences, le peptide 5A pénètre dans les cellules
- On pourrait vraisemblablement diminuer les effets anti-inflammatoires du peptide 5A sur l'expression membranaire de VCAM1 à l'aide d'un siRNA

8. Parmi les propositions suivantes, lesquelles sont vraies ou fausses :

- Une protéine chimère X-GFP a un poids moléculaire supérieur à celui de la protéine X.
- Pour la microscopie confocale, on doit fixer les cellules avant de les perméabiliser.
- Un anticorps monoclonal est obtenu à partir d'un hybridome de souris.
- Un anticorps polyclonal est normalement obtenu en vaccinant un animal.
- Pour éviter les contaminations bactériennes en culture cellulaire on utilise des antibiotiques.