

AVANT PROPOS

Analyser et résoudre un problème de biologie cellulaire nécessite, tout d'abord, une bonne maîtrise des concepts généraux de cette science, ainsi qu'une claire compréhension de l'organisation cellulaire, de la structure et de la fonction des différents organites cellulaires. C'est afin de permettre aux étudiants de PACES/PASS, comme aux étudiants en 1^{er} et 2^{ème} cycle de sciences de la vie, d'acquérir et d'approfondir ces notions qu'a été proposé, dans un premier temps, un livre de cours intitulé « Biologie cellulaire et moléculaire de la cellule eucaryote », publié en 2007 chez Ellipses et dont une deuxième édition revue et augmentée, a été proposé en 2018. Ce livre a pour ambition de faire comprendre les fondements de la biologie cellulaire, en décrivant la vie d'une cellule complexe, la cellule eucaryote, par une approche à la fois descriptive et fonctionnelle, en s'appuyant sur la méthode expérimentale.

Dans ce livre d'exercices, une série de problèmes originaux, portant sur des expérimentations tirées de la littérature scientifique moderne, vous est maintenant proposée. Ces exercices couvrent des domaines variés de la biologie cellulaire, et permettront de mieux appréhender les mécanismes régulant le fonctionnement de la cellule eucaryote ainsi que l'implication des différents organites dans le métabolisme cellulaire.

La mise en place de la première année commune aux études de santé (PACES) avait déjà entraîné, dans les universités où le PCEM1 avait une forte dominante scientifique, une réduction du nombre d'heures de cours et de travaux dirigés dans les matières scientifiques, amenant au final, à une baisse du niveau de formation scientifique initiale. La nouvelle réforme des études de santé qui se met en place, avec, maintenant, une réduction drastique des heures d'enseignements scientifiques ne peut que conforter la nécessité d'un tel ouvrage dont l'objectif est de former les étudiants à une démarche scientifique et expérimentale.

Les exercices sont construits de manière à mettre l'étudiant dans une situation proche de celle de l'examen : Ils sont présentés sous forme de QCM, comme se présente l'examen de PASS/LAS, et sous forme de questions à caractère rédactionnel, encore utilisées dans de nombreux examens des filières scientifiques. Pour un «entraînement» efficace, nous encourageons l'étudiant en PASS/LAS à résoudre, dans un premier temps, l'exercice en répondant aux questions à caractère rédactionnel et seulement dans un deuxième temps, à répondre aux QCM.

Ces problèmes sont ensuite tous corrigés et commentés pour permettre à l'étudiant de bien appréhender le raisonnement et la démarche scientifique nécessaires à la résolution de l'exercice. En rappelant certaines limites méthodologiques, les réponses commentées attirent votre attention sur l'indispensable esprit critique qui doit accompagner l'analyse de données expérimentales.

L'objectif de cet ouvrage est de fournir à l'étudiant un outil lui permettant, en s'appuyant sur une démarche à la fois expérimentale et méthodologique, de vérifier l'acquisition et l'assimilation de ses connaissances en biologie cellulaire et de pouvoir ainsi aborder l'examen de façon plus sereine.

CC

JLL

Exercices - Enoncés

Exercice 1

- Echauffement -

Quelques exercices simples pour commencer avec des questions concernant principalement les méthodes d'étude.

On se propose d'étudier l'effet d'une nouvelle molécule récemment extraite d'une plante amazonienne, appelée provisoirement TF, sur les cellules HeLa.

QCM 1-1. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :

Les cellules HeLa sont :

- A/ des cellules sanguines
- B/ des cellules non adhérentes
- C/ des cellules cancéreuses
- D/ des cellules d'origine épithéliale
- E/ des cellules procaryotes

QCM 1-2. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :

Les cellules HeLa constituent :

- A/ Une lignée dérivée de rein de singe
- B/ Une culture primaire
- C/ Une culture secondaire
- D/ Une culture organotypique
- E/ Une lignée cellulaire immortelle

QCM 1-3. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :

La culture cellulaire nécessite :

- A/ Du sérum animal embryonnaire
- B/ Un milieu de culture acide (pH 5,0)
- C/ L'ajout d'une importante quantité de glucose, les cellules HeLa provenant d'une malade diabétique
- D/ L'addition d'anticorps fluorescents
- E/ Des facteurs de croissance

I - L'effet éventuellement cytotoxique de TF est d'abord testé en exposant les cellules HeLa à des concentrations croissantes du TF, de 10 à 100 µg/ml,

pendant 24, 48 ou 72 heures et en mesurant la viabilité des cellules à l'aide d'une technique de coloration vitale.

La figure ci-dessous exprime la viabilité cellulaire en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (100%) aux trois temps de contact.

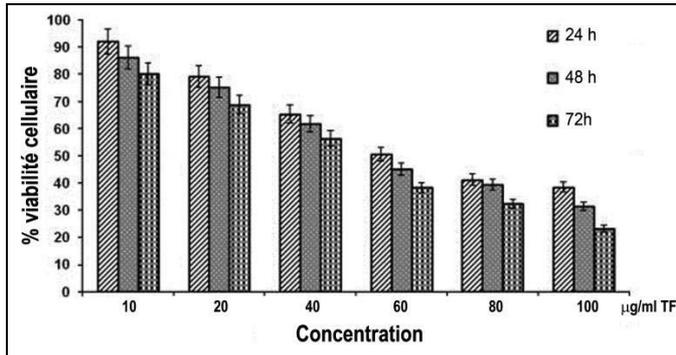


Figure 1.

QCM 1-4. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes : Concernant ce diagramme de viabilité (Figure 1) :

- A/ La viabilité des cellules HeLa varie selon les concentrations de TF
- B/ La concentration de TF correspondant à une mortalité cellulaire de 30% exactement à 48h est de 80 µg/ml
- C/ La viabilité cellulaire reste identique quelque soit le temps d'incubation avec la TF.
- D/ Après incubation avec un colorant vital, les cellules colorées sont les cellules mortes.
- E/ Une concentration de TF de 60 µg/ml réduit d'environ 50% la viabilité cellulaire à 24h

II - Afin de déterminer si TF est capable d'exercer une activité anti-proliférative des cellules HeLa, les cellules sont exposées pendant 24 heures à des concentrations de TF de 40, 60 ou 80 µg/ml, sont perméabilisées à l'aide d'un détergent doux puis, après marquage, analysées par cytométrie de flux en même temps que des cellules non traitées. Les courbes représentent les distributions d'intensité de fluorescence (abscisse) des cellules comptées (ordonnée).

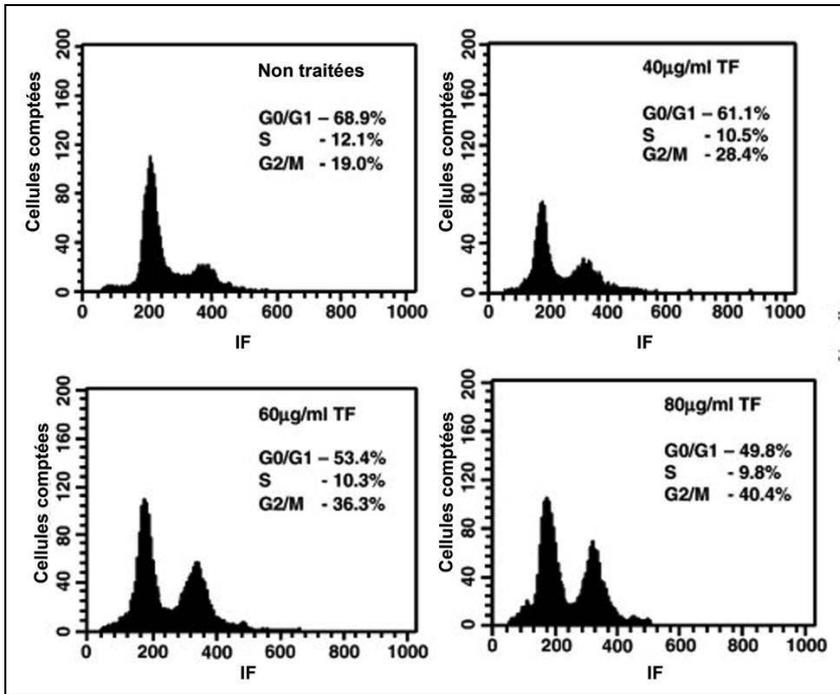


Figure 2.

QCM 1-5. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
La cytométrie de flux mise en oeuvre pour obtenir les graphes de la Figure 2,

- A/ Utilise comme marqueur de l'uracile radiomarqué au tritium
- B/ Permet ici une quantification relative de l'ADN cellulaire
- C/ Permet aussi le tri cellulaire
- D/ Utilise une technique de chimioluminescence
- E/ Ne fournit sur ces graphes aucune information sur la taille des cellules

QCM 1-6. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Quelle(s) technique(s) pourrai(en)t être mise en oeuvre pour étudier les variations quantitatives de l'ADN au cours du cycle cellulaire :

- A/ Microscopie à contraste de phase
- B/ Autoradiographie après incorporation de thymidine tritiée
- C/ Méthode TUNEL
- D/ Ultracentrifugation différentielle
- E / Microscopie électronique après cryofracture

**QCM 1-7. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
Concernant le cycle cellulaire des cellules HeLa :**

- A/ Sa durée est comprise entre 48 et 72 heures
- B/ La Phase G1 est toujours inférieure à S
- C/ La phase S est plus courte que G2
- D/ La phase M dure environ 1 heure
- E/ La durée de la phase S est une constante de l'espèce

**QCM 1-8. Parmi ces propositions, indiquez la ou les réponses (s) exactes :
D'après les résultats de la cytométrie de flux (Figure 2):**

- A/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en G0/G1
- B/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en phase S
- C/ Ces résultats favorisent l'hypothèse que TF bloque le cycle en G2/M
- D/ L'effet de TF est dépendant de sa concentration
- E/ l'interprétation de l'effet de la TF sur le cycle cellulaire impose de tester la concentration 100µg/ml

QCM 1-9. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ Le complexe cycline D-Cdk2 constitue le MPF
- B/ Le complexe cycline B-Cdk1 phosphorylé sur Cdk1 au niveau de thr14, tyr15 et thr161 est inactif
- C/ L'écartement des centrioles observé en G1 est provoqué par le complexe cycline B-Cdk1.
- D/ L'entrée en phase S est uniquement dépendante de la concentration du complexe B-Cdk2 dans la cellule
- E/ Le 2^e point de contrôle du cycle cellulaire est dépendant de l'activité de la polo-kinase (Plk1)

III – Afin d'examiner certains acteurs du cycle cellulaire, les cellules exposées à 40, 60 et 80 µg/ml de TF pendant 24 heures sont lysées et les extraits protéiques ainsi obtenus sont analysés par Western blot en comparaison avec des extraits cellulaires non traités (-). Sont examinées plus spécifiquement les protéines Cdc25C, cycline B, p21 et l'actine. Les intensités relatives des bandes par rapport aux cellules non traitées sont représentées sous forme d'histogramme

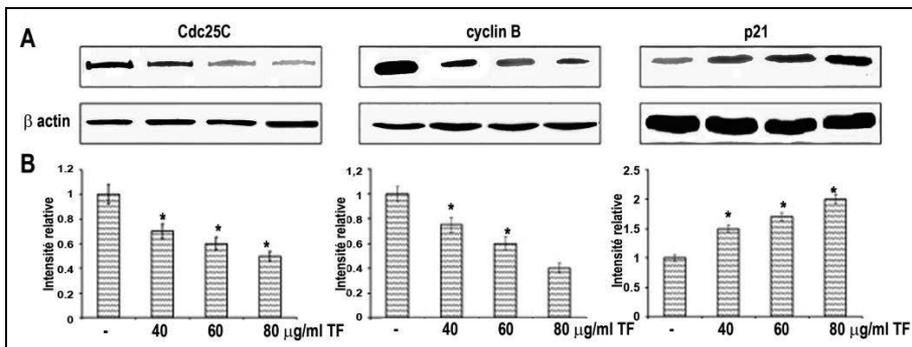


Figure 3. Western blot (de gauche à droite : non traitées (-) puis TF = 40, 60 ou 80 µg/ml)(A). Les histogrammes (B) représentant les mesures relatives des intensités des bandes du Western-blot situées immédiatement au-dessus pour Cdc 25C, cycline B et p21. L'intensité des bandes observées dans les cellules non traitées est considérée égale à 1, soit 100%. L'astérisque (*) signifie que la moyenne considérée est statistiquement différente de celle du témoin non traité (-).

QCM 1-10. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ Lors du Western blot, les protéines migrent sous l'effet d'un champ électrique à travers un gel de polyacrylamide puis sont transférées sur une membrane
- B/ Le Western blot est également une technique de séparation des acides nucléiques
- C/ Sous l'action du champ électrique et en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS), les protéines se déplacent vers l'anode
- D/ L'incubation de la membrane de transfert avec un anticorps spécifique de la protéine étudiée permet de visualiser sans étape ultérieure la protéine sous la forme d'une ou plusieurs bandes
- E/ La β -actine est usuellement utilisée comme témoin expérimental pour vérifier que la réalisation technique du western-blot s'est correctement déroulée

QCM 1-11. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :

- A/ p21 est une protéine intervenant lors du 1^{er} et du 3^e point de contrôle du cycle cellulaire
- B/ p21 est une protéine qui inhibe l'activité enzymatique des kinases dépendantes des cyclines
- C/ p21 déclenche la transcription du gène codant p53
- D/ En cas de retard de la réplication, l'entrée dans le noyau de Cdc25C est bloquée par la protéine 14-3-3 qui se fixe sur la serine 216 phosphorylée de Cdc25C
- E/ p21 permet d'accélérer l'hydrolyse de ras-GTP en ras-GDP

**QCM 1-12. Parmi ces propositions indiquez la ou les réponses exactes :
Concernant les résultats présentés dans les figures 3A et 3B :**

- A/ La quantité de cycline B est plus faible dans les cellules exposées à 80 µg/ml de TF qu'à 40 µg/ml
- B/ La quantité de p21 augmente dans les cellules en présence de TF
- C/ Ces résultats favorisent l'hypothèse d'une activation du premier point de contrôle du cycle cellulaire
- D/ Ces résultats contredisent l'analyse en cytométrie de flux de la figure BC2
- E/ Ces résultats ne contredisent pas l'hypothèse d'un blocage du cycle cellulaire à la transition G2/M

IV - Des cellules HeLa incubées pendant 48 heures avec de la TF à des concentrations de 40, 60 ou 80 µg/ml, puis, pendant la dernière heure, avec du *Mito Tracker*. Le *MitoTracker* diffuse passivement à travers la membrane plasmique de la cellule et s'accumule spécifiquement dans les mitochondries dont la chaîne respiratoire est fonctionnelle. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux afin de mesurer leur intensité de fluorescence. Les courbes représentent les distributions d'intensité de fluorescence (abscisse) des cellules comptées (ordonnée) aux différentes concentrations de TF testées.

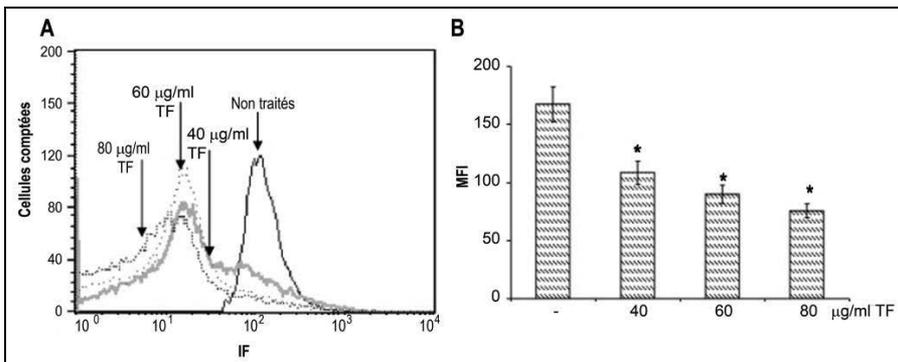


Figure 4. Intensité de fluorescence des échantillons cellulaires non traitées ou traités avec la TF à 40, 60 ou 80 µg/ml (A). Représentation des intensités moyennes de fluorescence (MFI) sous forme d'histogramme (moyenne de cinq expériences indépendantes) (B). (*): Moyenne statistiquement différente de celle du témoin non traité (-).