

Avertissement au lecteur

Cet ouvrage est complémentaire du deuxième tirage de la cinquième édition parue en 2012 du *Cours de Biologie Cellulaire* publié chez le même éditeur et à laquelle renvoient les numéros de chapitre et ceux des figures.

Il comporte cinq parties :

- des questions utilisées pour les enseignements dirigés (de 1 à 7) et qui suivent donc la progression de l'acquisition des connaissances en fonction des chapitres déjà traités en cours. Le dernier enseignement dirigé n° 7 fait appel à l'ensemble des connaissances acquises, même s'il traite aussi des données du dernier chapitre « Communication intercellulaire » du cours ; chaque question comporte de 5 (de A à E) à 10 propositions (A à J)
- huit exemples de questions d'examen qui explorent de manière transversale l'ensemble des données exposées ;
- le corrigé commenté des questions d'enseignement dirigé ;
- le corrigé commenté des quatre exemples d'examen ;
- les références bibliographiques des articles scientifiques utilisés pour certaines des questions ;
- l'annexe I explique comment sont publiés les résultats scientifiques ;
- l'annexe II donne une liste de sites web utilisés par l'auteur pour la préparation des questions.

Les modalités d'examen à la Faculté de Médecine de Marseille, fixées par le Conseil d'Administration, étaient, pour la discipline, 40 questions par QCM en 60 minutes, soit 1 minute 30 secondes par question ou encore 30 secondes par proposition de A à E.

Avec la mise en place de la réforme de la Première Année des Études de Santé, l'Unité d'Enseignement UE2 « La cellule et les tissus » regroupe les enseignements de Biologie Cellulaire (44 h), d'Histologie (20 h) et de Biologie du Développement et de la Reproduction (16 h).

L'examen comporte 22 questions de Biologie Cellulaire à traiter en 33 minutes.

Pour chacune des questions, une proposition au moins est exacte.

La notation utilisée est la suivante : 5 propositions vraies sur 5 valent 1 point, 4 sur 5 valent 0,5 point, 3 sur 5 valent 0,2 point.

Ces modalités sont spécifiques à notre faculté et diffèrent des modalités d'examen dans d'autres facultés. Ce point, et la diversité de la matière enseignée dans la même discipline dans d'autres facultés, sont deux facteurs qui limitent en partie l'intérêt d'un tel ouvrage s'il n'est utilisé que dans l'optique réductionniste de la préparation à l'examen.

Les questions posées sont de trois types

Un élément important dans le choix des questions est qu'elles permettent d'aborder les mécanismes cellulaires de grandes pathologies humaines, cancer, infections bactériennes et virales (SIDA...), maladies génétiques...

- Des questions basées sur les schémas de l'ouvrage de référence : elles permettent d'interroger les étudiants sur les notions les plus importantes qui sont résumées dans ces schémas. Pour ne pas pénaliser les étudiants en terme de temps, plusieurs questions sont posées pour chacun des schémas.

– Des questions basées sur des problèmes expérimentaux tirés de la littérature scientifique, avec un énoncé et plusieurs questions par énoncé, toujours pour ne pas pénaliser les étudiants en terme de temps. Les données de la littérature scientifique (voir Annexe I), dont les références sont données à la fin de l'ouvrage, sont soigneusement sélectionnées puis adaptées pour correspondre avec les notions les plus importantes que les étudiants doivent avoir mémorisées. Les énoncés sont souvent présentés sous la forme de schémas et/ou de tableaux.

La première justification de ce type de question est que la Biologie Cellulaire est une discipline expérimentale, notion qu'il n'est pas facile de faire passer lors des enseignements magistraux pendant lesquels, pour des raisons de temps, les données sont présentées de manière plutôt dogmatique.

Une deuxième justification est de faire prendre conscience aux étudiants du paramètre « temps » dans l'évolution des connaissances. Les données enseignées ne sont pas figées. Elles ont été établies à l'instant t à la suite d'une expérimentation et sur la base des connaissances du moment, puis vont être modifiées, parfois de manière considérable, à la suite d'expérimentations ultérieures. Cette vision historique de l'évolution des connaissances doit aussi faire partie de notre enseignement.

Une dernière justification est que cette démarche expérimentale, utilisée en Biologie Cellulaire comme dans toutes les disciplines biologiques, est très proche de la démarche du médecin qui examine un patient (analyse) puis pose un diagnostic (en s'aidant éventuellement d'investigations complémentaires) et propose un traitement (synthèse). L'exposé d'un protocole expérimental, celui des résultats obtenus, permettent de poser des questions concernant ce protocole, les résultats et leur interprétation et représentent aux yeux de l'auteur un excellent exercice pour les étudiants, qu'ils soient de futurs médecins ou qu'ils s'orientent vers d'autres filières.

– Enfin, le troisième type de question porte sur une protéine dont on doit déterminer l'organisation dans les membranes, l'état de glycosylation... Les étudiants sont placés dans les mêmes conditions que les chercheurs qui viennent de cloner une protéine et qui réfléchissent à ses caractéristiques en utilisant des programmes d'analyse disponibles en ligne sur des sites spécialisés du réseau Internet (voir Annexe II).

Il faut insister sur le fait que les données des programmes informatiques d'analyse des séquences peptidiques ne doivent être considérées que comme des hypothèses : les programmes répondent « site putatif » de phosphorylation, de glycosylation... Des programmes d'analyse différents donnent d'ailleurs des résultats différents pour une même protéine.

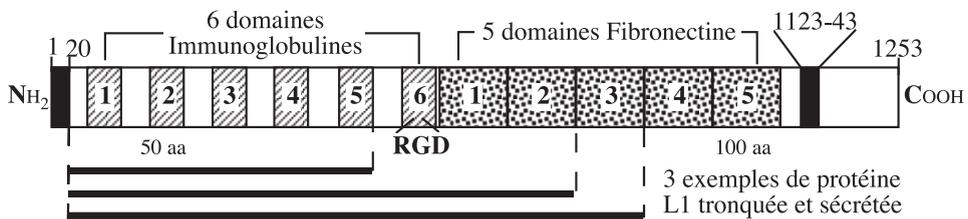
Ces hypothèses doivent impérativement être confirmées ou infirmées par des expériences. Par exemple, la présence de la séquence consensus de N-glycosylation « Asparagine-Sérine ou Thréonine » ne signifie pas obligatoirement que la protéine sera N-glycosylée dans les cellules, puisque la N-glycosylation ne se produit que dans la lumière du réticulum endoplasmique granulaire : pour être utilisable par les cellules, la séquence consensus doit donc être localisée dans la lumière de ce compartiment. Pourtant la « bonne » localisation du site consensus ne signifie pas obligatoirement que la protéine sera N-glycosylée par les cellules au niveau de cette séquence consensus.

Les questions des enseignements dirigés donnés en amphithéâtre comportent souvent plus de 5 items (de A à E) et peuvent être des questions ouvertes, sans patron de réponse, ce qui n'est pas le cas des questions d'examen.

➤ Questions n° 1/1 à 1/3 ⁷⁴ : La protéine L1

La protéine L1 a été clonée à partir du cerveau humain. L'analyse informatique de la séquence peptidique déduite de celle de l'ADNc donne les résultats suivants :

- 2 domaines de 20 résidus d'acides aminés hydrophobes : [1-20] et [1123-1143]
- 20 sites putatifs de N-glycosylation : 8 dans les 6 domaines immunoglobuline (Ig), 10 dans les 5 domaines fibronectine (Fn), 2 entre les résidus 1143 et 1253
- PM théorique : résidus [1-1253] = 140 kDa ; résidus [20-1253] = 137 kDa
- PM de la protéine purifiée de la membrane plasmique (MP) de neurones : 209 kDa
- PM de la protéine purifiée de la MP neuronale puis déglycosylée : 137 kDa
- Au cours de maladies (avec retard mental, hydrocéphalie et malformations cérébrales), des mutations du gène de L1 conduisent à la synthèse de protéines tronquées et leur sécrétion dans le milieu extracellulaire.



Question n° 1/1

La protéine L1 mature normale, dans la membrane plasmique...

- A. est glycosylée
- B. a une longueur de 1253 résidus
- C. possède 2 domaines transmembranaires
- D. son domaine cytosolique comporte 1220 résidus
- E. Le PM moyen d'une arborisation sucrée portée par L1 est de 4 kDa
- F. possède au moins 6 ponts disulfures
- G. La longueur de la région codante de son ARNm est 3759 nucléotides

Questions n° 1/2 à 1/3

Des fragments différents du domaine extracellulaire de la protéine L1 sont synthétisés par des cellules eucaryotes transfectées. Ces fragments sont ensuite fixés à la surface de puits de culture.

On mesure l'adhérence de cellules de mélanome humain à ces fragments de L1 (en présence ou non d'ions Ca^{++} dans le milieu d'incubation), en présence ou non d'anticorps (AC) bloquant les fonctions de différentes intégrines humaines, rajoutés en même temps que les cellules dans les puits de culture.

Exp N°	Domaines de L1: Ig : Immunoglobuline Fn : Fibronectine	± Ca ⁺⁺	% de cellules adhérant au puits ± AC bloquant la fonction des intégrines :				
			pas d'AC	β ₁	α _v β ₃	α _v	β ₁ + α _v
1	Ig1-2	non	25	?	?	?	?
2	Ig3-6/Fn1-5	non	1	1	1	1	1
3	Ig3-6/Fn1-5	OUI	75	60	30	30	1
4	Ig6 (RGD)	OUI	75	75	1	1	1
5	Ig6/Fn1-2	OUI	75	75	1	1	1
6	Ig6/Fn1-3	OUI	75	60	1	1	1

Question n° 1/2

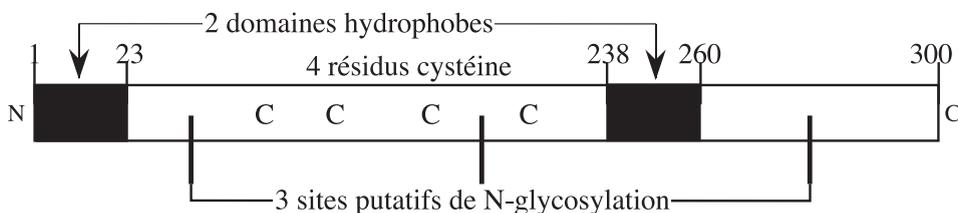
- Les cellules de mélanome humain expriment une CAM de la superfamille des Ig à leur surface
- Les cellules de mélanome humain expriment différentes intégrines à leur surface
- Les domaines Ig1 et Ig2 participent à l'adhésion L1-CAM Ig
- Les cellules de mélanome pourraient exprimer L1
- Des intégrines se fixent sur la molécule L1
- La cinétique de fixation des anticorps anti-intégrine à leurs cibles est plus rapide que la cinétique de fixation des intégrines à L1

Question n° 1/3

- La séquence RGD du domaine Ig6 est reconnue par l'intégrine α_vβ₃
- Une séquence non RGD est reconnue dans le domaine Fn3
- Une intégrine comportant la sous-unité β₁ se fixe au domaine Fn3
- Des intégrines se fixent au moins à 2 domaines de L1
- Expérience 1 : quel est le pourcentage de cellules fixées au puits de culture ?
- Les anomalies cérébrales observées lors des mutations du gène de L1 sont la conséquence de troubles de l'adhérence intercellulaire et à la matrice extracellulaire

↳ Questions n° 1/4 à 1/6 47

Une protéine de la membrane plasmique de cellules endothéliales a été clonée :



- 4 résidus cystéine (C), 3 sites putatifs de N-glycosylation
- Poids moléculaire (PM) théorique : [1-300] = 33 kDa, [23-300] = 30 kDa
- PM (électrophorèse) de la protéine purifiée à partir de la membrane plasmique : 43 kDa
 - après réduction des ponts disulfures : PM apparent (en raison de la modification de la conformation de la protéine) = 40 kDa
 - après action de glycosidases : 30 kDa

– Taille de l'ARN messager = 2100 nucléotides

Question n° 1/4

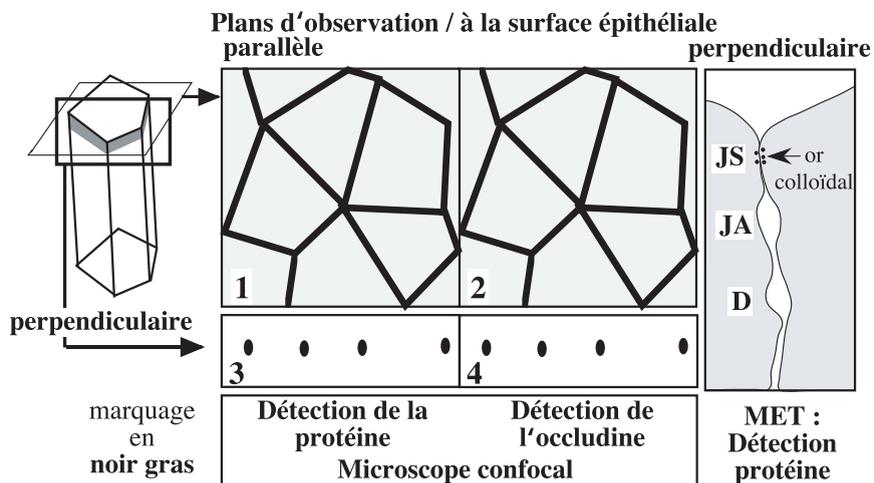
- A. La région codante de l'ARNm présente une longueur de 900 nucléotides
- B. L'ARNm présente une région non-codante plus longue que la région codante
- C. La protéine mature dans la membrane plasmique présente probablement 1 ou 2 ponts disulfures
- D. La protéine mature dans la membrane plasmique est glycosylée
- E. Le PM moyen d'une arborisation sucrée est de 4 kDa environ

Question n° 1/5

- A. La longueur de la protéine mature, insérée dans la MP, est de 300 résidus d'acides aminés
- B. La protéine mature, insérée dans la MP, possède deux domaines transmembranaires
- C. Un anticorps monoclonal ajouté au milieu de culture de cellules endothéliales et reconnaissant le domaine [50-100] marque la membrane plasmique des cellules
- D. Le même anticorps marque la membrane plasmique et le cytoplasme de cellules endothéliales en culture traitées par le mélange méthanol-acétone à -20°C
- E. La protéine pourrait appartenir à la superfamille des Immunoglobulines

Question n° 1/6

La localisation de la protéine est analysée dans des cellules épithéliales polarisées à l'aide d'un anticorps spécifique en microscopie confocale (fluorescence) et en microscopie électronique en transmission (MET, marquage à l'or colloïdal). Elle est comparée à celle de l'occludine :



- A. La protéine est localisée au pôle basal des cellules
- B. La protéine est colocalisée avec l'occludine
- C. La protéine est probablement colocalisée avec une claudine
- D. La protéine est probablement colocalisée partiellement avec des cadhérines
- E. La protéine appartient au desmosome

➔ Questions n° 1/7 à 1/9 ⁷⁷

Une nouvelle méthode biophysique (mesure de la capacitance de cellules en flux liquide) permet de mesurer la quantité d'ADN présent dans des cellules.

Cette quantité d'ADN est analysée en fonction de la phase du cycle cellulaire et du nombre de chromosomes :

	Cellules	Espèce	Phase du cycle	ADN (en pg)	Nombre de chromosomes
1	Hématie	homme	?	0	?
2	Hématie	poulet	?	2,5	78
3	Fibroblaste	rat	G1	5,5	42
4	Cellules de myélome	souris	G1	6	40
5	Fibroblaste	rat	G2	12	?
6	Cellules de myélome	souris	G2	12,3	?
7	Polynucléaire sanguin	homme	?	6	46

Question n° 1/7

- A. Nombre de chromosomes dans l'hématie humaine en 1 ?
- B. Dans quelle phase du cycle cellulaire se trouve l'hématie humaine ?
- C. L'hématie humaine comporte un noyau
- D. L'hématie humaine comporte des mitochondries
- E. Dans quelle phase du cycle cellulaire se trouve l'hématie de poulet en 2 ?
- F. L'hématie de poulet comporte un noyau

Question n° 1/8

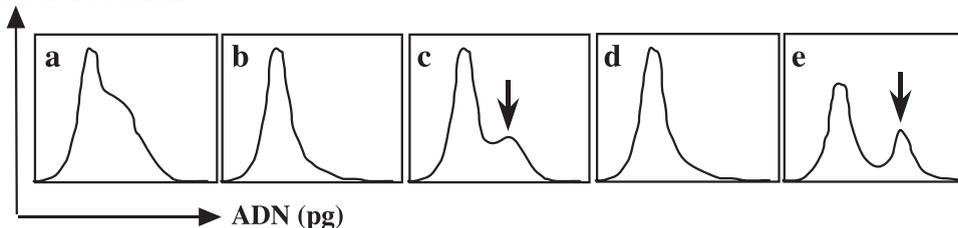
- A. Nombre de chromosomes dans les fibroblastes de rat en 5 ?
- B. Nombre de chromosomes dans les cellules de myélome de souris en 6 ?
- C. Pourquoi la quantité d'ADN des fibroblastes de rat en 5 est-elle légèrement supérieure à celle des mêmes cellules en 3 ?
- D. Dans quelle phase du cycle cellulaire se trouve le polynucléaire humain en 7 ?
- E. Les chromosomes du poulet sont plus longs que les chromosomes humains

Question n° 1/9

Les 5 graphes ci-dessus décrivent les variations de la quantité d'ADN dans des fibroblastes de rat au cours d'un seul cycle cellulaire.

Les cellules ont été synchronisées en 2 étapes : culture pendant 72 h dans un milieu sans sérum, puis culture dans un milieu avec sérum. Les cellules synchronisées sont toutes à la même phase du cycle.

Nombre de cellules

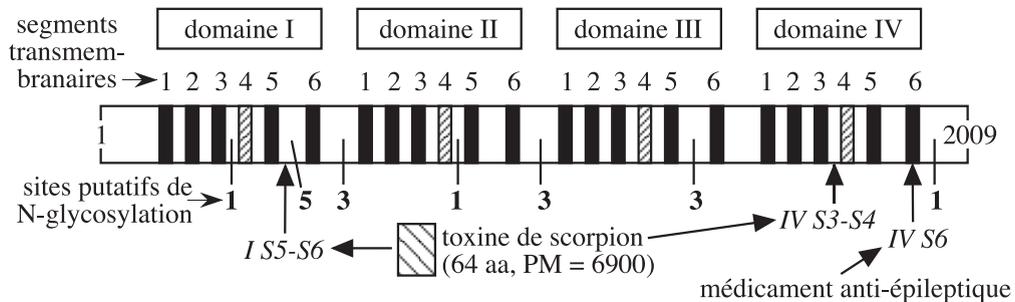


- A. Dans quelle phase du cycle se trouvent les cellules du pic en **b** et **d** ?
- B. Dans quelle phase du cycle se trouvent les cellules du pic fléché en **c** et **e** ?
- C. Pourquoi les cellules ont-elles été synchronisées ?
- D. Des facteurs du milieu extracellulaire participent au contrôle du cycle cellulaire
- E. Ranger les graphes dans l'ordre du cycle cellulaire

➔ Questions n° 1/10 à 1/11 ⁷⁹

La sous-unité alpha du canal sodium potentiel-dépendant humain SCN1A :

- 2009 résidus d'acides aminés
- PM théorique : 229 kDa, PM protéine purifiée de neurones : 260 kDa
- 4 domaines (I à IV) comportant 6 segments transmembranaires (S1 à S6) de environ 20 résidus d'acides-amino hydrophobes
- 17 sites putatifs de N-glycosylation
- Une toxine de scorpion (protéine de 64 résidus, PM 6900) se fixe en 2 endroits, entre les segments S5 et S6 (domaine I) et entre les segments S3 et S4 (domaine IV) avec perturbation (en quelques millisecondes) de la conductance sodique du canal
- Fixation de médicaments antiépileptiques sur 3 résidus d'acides-amino, au milieu du segment S6, domaine IV



Question n° 1/10 : Organisation de SCN1A dans la membrane plasmique de neurones

- A. SCN1A est N-glycosylée
- B. La toxine de scorpion agit sur la face cytosolique de SCN1A
- C. Tous les sites de N-glycosylation pourraient être occupés
- D. Au maximum 9 sites de N-glycosylation pourraient être occupés
- E. Les extrémités N- et C-terminales sont cytosoliques
- F. Le domaine IV est probablement au contact du domaine I
- G. La molécule de SCN1A est repliée sur elle même
- H. Les médicaments anti-épileptiques ne sont probablement pas des protéines

Question n° 1/11

Une mutation dans le segment S4 du domaine II ou du domaine IV cause le syndrome « Epilepsie généralisée avec crises fébriles plus » (GEFS+).

Deux caractéristiques fonctionnelles de SCN1A sont analysées en patch-clamp après injection, dans l'oocyte de Xénope, de l'ARNm normal et des 2 ARNm codant pour SCN1A porteur de l'une ou l'autre des mutations ponctuelles suivantes :

T875M : remplacement de l'acide aminé T en position 875 par l'acide aminé M
 R1648H : remplacement de l'acide aminé R en position 1648 par l'acide aminé H

	ARNm injecté	délai d'ouverture après fermeture (milliseconde)	caractéristique de la fermeture (unités arbitraires)
	normal	55 ± 20	100
IIS4	mutation T875M	47 ± 9	# 1000
IVS4	mutation R1648H	# 16 ± 9	100

T = Thréonine M = Méthionine R = Arginine H = Histidine # = différence significative / normal

- A. L'ovocyte de Xénope n'exprime pas de canal sodium endogène
- B. Les ARNm microinjectés sont traduits en protéines
- C. Les protéines SCN1A sont synthétisées dans le cytosol de l'ovocyte
- D. Les protéines SCN1A néosynthétisées empruntent la voie de sécrétion régulée
- E. La mutation dans le domaine II rend SCN1A plus excitable
- F. La mutation dans le domaine IV rend SCN1A moins excitable
- G. Les segments S4 des domaines II et IV jouent un rôle dans les caractéristiques du canal SCN1A
- H. Un même syndrome clinique peut être lié à des mutations différentes du même gène, mutations qui ont des conséquences fonctionnelles opposées

Question n° 1/12

La structure de deux récepteurs membranaires déduite de la séquence de leurs ARNm : ils présentent un domaine d'interaction avec les protéines G hétérotrimériques.

Récepteur n° 1 : le récepteur hCB1 a été cloné en 1991 à partir d'une banque de cDNA de neurones de cerveau humain. Il fixe les cannabinoïdes exogènes (le tétra-hydro-cannabinol, principe actif de la marijuana) et les cannabinoïdes endogènes (l'anandamide, dérivé de l'acide arachidonique) (« ananda » en sanscrit = béatitude, félicité...).

- PM théorique : 53 kDa, PM du récepteur purifié de neurones : 59 kDa
- 7 domaines hydrophobes d'une vingtaine d'acides aminés, 7 résidus cystéine (C), 2 sites putatifs de N-glycosylation,
- les agents réducteurs des ponts disulfures provoquent une baisse de l'affinité du récepteur pour ses ligands.

Récepteur n° 2 :

- 8 domaines hydrophobes (de 20 amino-acides environ)
- 4 sites putatifs de N-glycosylation
- 3 sites putatifs de phosphorylation par une protéine-kinase