
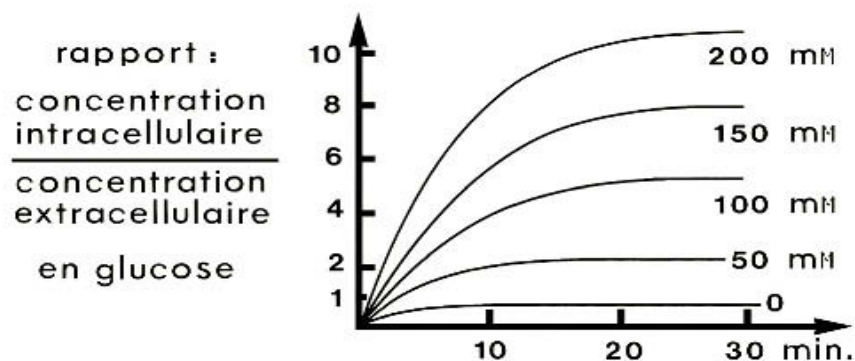
 Ecole Supérieure de Technologie Béni-Mellal		 جامعة السلطان مولاي سليمان Université Sultan Moulay Slimane
<b>Filière : Agro-industrie</b> <b>Année universitaire : 2021/2022</b>	<b>1<sup>ère</sup> année cycle DUT</b> <b>Module: Biologie Générale/ Microbiologie</b>	<b>Professeur: Khalid BOUTOIAL</b>
<b>TD 1 de Biologie Cellulaire</b>		

## EXERCICE 1

La perméabilité de la membrane apicale des entérocytes vis-à-vis du glucose est étudiée sur des fragments d'intestin grêle de Mammifère. L'épithélium intestinal est unistratifié et constitué en majorité de cellules absorbantes : les entérocytes.

Des fragments d'intestin grêle sont prélevés et maintenus en culture ; une solution de glucose radiomarké est introduite dans la lumière, puis la radioactivité intra-cellulaire est évaluée après des temps de mise en contact croissants.

L'influence de la concentration extracellulaire en  $\text{Na}^+$  (du côté apical des cellules) sur le transport du glucose a été étudiée ; les courbes suivantes traduisent les effets de concentrations croissantes en  $\text{Na}^+$  sur le rapport : concentration intracellulaire en glucose/ concentration extracellulaire (identique dans les diverses expériences) :



1. Quel est l'effet de la concentration en  $\text{Na}^+$  (mM) sur le transport du glucose ?
2. D'après l'analyse des valeurs obtenues pour le rapport des concentrations en glucose, que pensez-vous du mécanisme de transport de cette molécule ?

- Quel type de transporteur doit-on invoquer, dans une telle situation ?

Lorsque les fragments d'intestin sont mis en présence (du côté externe) de ouabaïne, un composé connu pour inhiber la pompe membranaire  $\text{Na}/\text{K}$  ATPase, on observe que la pénétration du glucose dans les entérocytes est très rapidement inhibée.

3. Quel lien établissez-vous entre cette dernière observation et le mécanisme de transport qui a été mis en évidence plus haut ?

## EXERCICE 2

Le Fer, comme de nombreux autres composés, circule dans le sang sous une forme liée à une protéine nommée **apotransferrine** ; le complexe formé avec le Fer (une molécule de protéine liée à deux ions  $\text{Fe}^{3+}$ ) porte le nom de **ferrotransferrine**.

1) Deux lots de cellules humaines en culture sont mis en présence, pendant 30 minutes et à 4 °C, de ferrotransferrine marquée soit grâce au Fer, soit dans sa partie protéique.

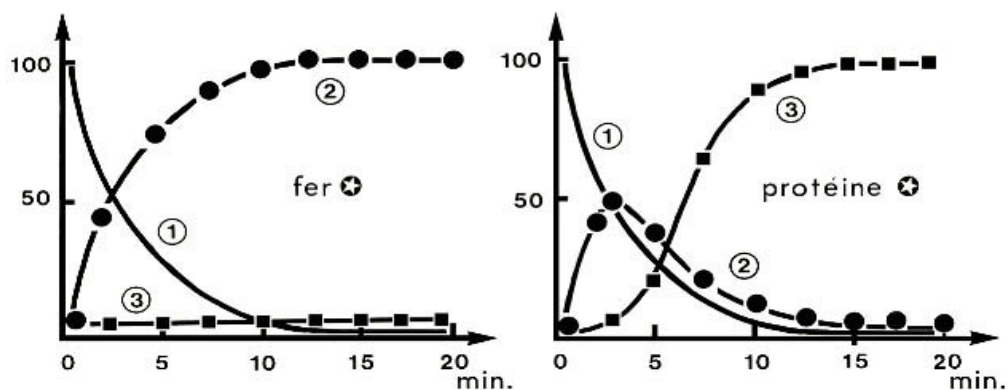
Après cette incubation, les cellules sont remises en culture dans un milieu neuf, dépourvu de fer et de ferrotransferrine, et à 37 °C.

2) Des prélèvements de cellules sont ensuite effectués dans les deux lots, au cours du temps (20 min), et deux types de mesures sont réalisés sur ces cellules :

– la radioactivité présente à leur surface (courbe 1), mesurée en décrochant le ligand de son récepteur grâce à une solution de force ionique élevée ;

– la radioactivité présente dans les cellules après ce traitement (courbe 2).

Simultanément, la radioactivité du milieu de culture est mesurée pendant toute la durée de l'expérience (courbe 3). Les graphes suivants montrent l'évolution de ces trois types de mesures, exprimées en %, au cours du temps.



1. Pour quelles raisons les cellules sont-elles d'abord mises à 4 °C, en présence de ferrotransferrine radioactive ?

2. Comment la radioactivité en surface des cellules évolue-t-elle au cours de ces deux expériences ? Comment interprétez-vous ces résultats ?

3. Comment la radioactivité associée au Fer et celle associée à la protéine évoluent-elles pendant les 3 premières minutes, dans les deux expériences ? Comment interprétez-vous ces résultats ?

4. Comment la radioactivité associée au Fer et celle associée à la protéine évoluent-elles au cours de la suite de l'expérience ? Comment interprétez-vous ces résultats ?

5. Pourquoi la radioactivité mesurée dans le milieu de culture évolue-t-elle différemment dans les deux expériences ? Quelle relation faites-vous avec les résultats analysés dans la question 3, après 5 min d'incubation des cellules ?

6. À partir de l'ensemble de ces données, schématiser l'histoire des récepteurs ainsi que celle de la ferrotransferrine au cours du processus d'endocytose du Fer.

### **EXERCICE 3**

Lorsque des dimères  $\alpha\beta$  de tubuline sont mis en solution en présence de GTP, à 37 °C, on peut observer au spectrophotomètre une variation importante de la diffusion de la lumière transmise à travers l'échantillon ; l'évolution au cours du temps (analyse cinétique) de cette diffusion est représentée dans le graphe 1.

De plus, lorsque le contenu du tube est analysé en microscopie électronique par la technique de coloration négative, on observe que cette variation est due à l'apparition de microtubules au sein de la solution.

1. Pourquoi l'apparition des microtubules peut-elle se traduire par une variation de la diffusion de la lumière ?

2. Comment appelle-t-on ce phénomène spontané d'apparition des microtubules ?

3. Comment peut-on expliquer la présence des trois phases vues dans la courbe ?

La concentration initiale en tubuline est un facteur important dans ce processus : la phase de plateau est atteinte d'autant plus rapidement (et sa valeur est d'autant plus faible) que cette concentration initiale est elle-même faible. Enfin, on montre qu'il existe encore de la tubuline libre dans le milieu, même quand le plateau est atteint.

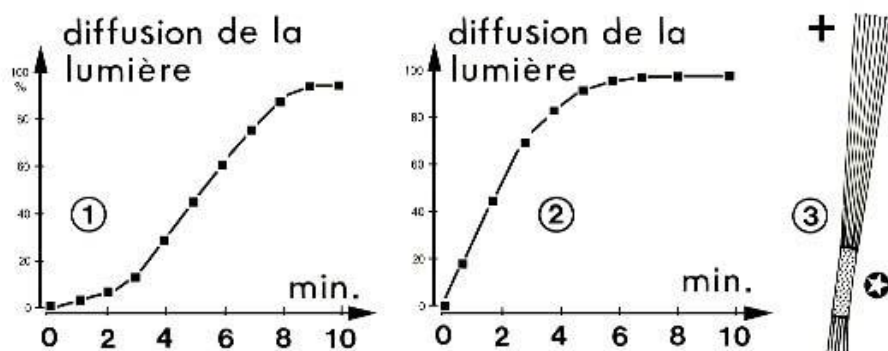
4. Comment interprétez-vous ces observations ?

Lorsque de courts fragments de microtubules ou de courts fragments d'axonèmes de cils ou de flagelles (amorces) sont introduits dans la solution de dimères, on obtient la cinétique représentée dans le graphe 2.

5. Après comparaison des deux courbes, proposez une interprétation pour ce fait.

Si l'on utilise des amorces « marquées » (étoile) de sorte qu'on puisse les reconnaître en microscopie électronique, on observe les images données dans la figure 3.

6. Quelle information peut-on tirer de cette dernière observation ?



### **EXERCICE 4**

Il est possible, au moyen d'un protocole de fractionnement cellulaire, d'obtenir une fraction hautement purifiée de noyaux intacts de cellules de foie de rat.

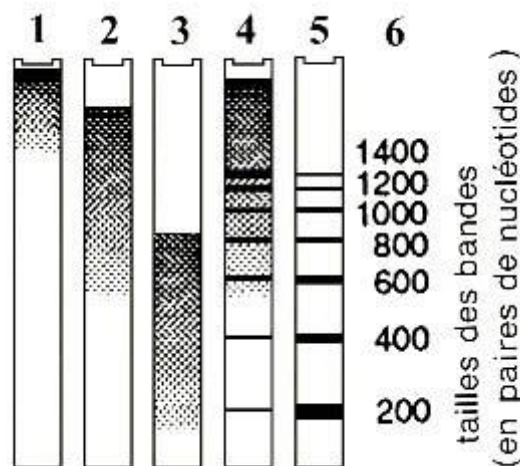
On peut ensuite les faire éclater délicatement en présence de détergents doux et en extraire la chromatine déroulée et dans un état de préservation optimal.

Cette chromatine est traitée de deux manières différentes :

- 1) après déprotéinisation (au moyen de protéases), l'ADN est extrait puis digéré par une ADNase bactérienne (extraite de *Micrococcus*) pendant 1 et 5 minutes ; enfin, l'ADN digéré est soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ;
- 2) la chromatine elle-même est traitée directement par l'ADNase, dans les mêmes conditions, puis déprotéinisée pour en extraire l'ADN ; ce dernier est soumis à l'électrophorèse comme dans l'expérience précédente.

Les résultats de ces électrophorèses sont donnés dans la figure suivante :

**canal 1** : ADN extrait, « nu » et non digéré ; **canaux 2 et 3** : ADN « nu » digéré (1 et 5 minutes) ; **canaux 4 et 5** : chromatine native digérée (1 et 5 minutes) ; **colonne 6** : taille des molécules, en nombre de paires de nucléotides (ou « bases »).



1. Quelles conclusions tirez-vous des expériences de digestion de l'ADN nu ?
2. Même question pour la digestion de la chromatine.

Lorsque la digestion est poursuivie, dans les deux expériences, jusqu'à 10 minutes, on observe les résultats suivants : pour l'ADN nu, on n'observe pratiquement plus d'ADN dans le canal, tandis que pour la chromatine, une seule et très grosse bande est observée à une position correspondant à une taille de 146 paires de nucléotides.

3. Comment interprétez-vous l'ensemble de ces résultats ?