

Devoir n°2 STS Bio Analyses et Contrôles 2ème année

6 mars 2006

Caractéristiques du cycle cellulaire des NIH 3T3

On se propose d'étudier certains paramètres du cycle cellulaire d'une lignée établie en culture, la lignée murine NIH 3T3. Afin de déterminer les caractéristiques du cycle cellulaire de cette lignée en culture différentes analyses sont réalisées.

1. Réalisation d'une courbe de croissance de la lignée NIH 3T3 dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF).(7 pts)

a/ expérience 1: On inocule 9 boîtes de culture avec 10000 cellules par mL de milieu de culture. Toutes les 24 heures on numère les cellules viables. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant:

t (jours)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[cellules] 10^4 mL^{-1}	1,05	1,2	1,5	2,8	5,2	9,6	18	23	24,5	25

Tracer la courbe représentant l'évolution de la culture au cours du temps en utilisant une représentation judicieuse. Analyser la courbe obtenue.

- b/ Déterminer graphiquement la vitesse de croissance spécifique en justifiant.
Quelle est la durée moyenne d'un cycle de division cellulaire dans ces conditions ?

2. Régulation et contrôle du cycle cellulaire des NIH 3T3 en culture.(11,5 pts)

3.1. Régulation du cycle cellulaire (4 pts)

expérience: Après synchronisation des cellules NIH 3T3, on ajoute pendant des durées variables du milieu contenant 10 % SVF. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 2.

addition de milieu contenant 10 % SVF pendant	lavage avec du milieu sans SVF	observation de la culture 10 heures après l'addition de SVF
1 heure	oui	pas cellules arrondies
3 heures	oui	pas cellules arrondies
4 heures	oui	pas cellules arrondies
5 heures	oui	toutes les cellules s'arrondissent
toute l'expérience	non	toutes les cellules s'arrondissent

a/ Pendant la période de traitement avec le SVF, dans quelle phase du cycle cellulaire se trouvent les cellules ?

b/ Analyser l'expérience proposée.

Quel événement critique du cycle cellulaire a lieu entre 4 et 5 heures dans l'expérience proposée ?

3.2. Contrôle de l'entrée et de la sortie de mitose (4 pts)

a/ l'entrée en phase M est déclenché par l'activation de MPF (M-phase promoting Factor).

Rappeler

- la structure de MPF

- la nature de son activité biologique
 - ses principales cibles cellulaires expliquant son importance dans l'entrée en phase M.
- b/ L'inactivation de MPF est responsable de la sortie de phase M.
Comment est réalisée l'inactivation de MPF ?

3.3. Schéma récapitulatif (3,5 pts)

Placer sur un schéma de cycle cellulaire

- les 4 phases principales,
- les acteurs du contrôle,
- les 3 niveaux de contrôle et régulation analysés ici.

3. Synthèse des immunoglobulines en culture.(11,5 pts)

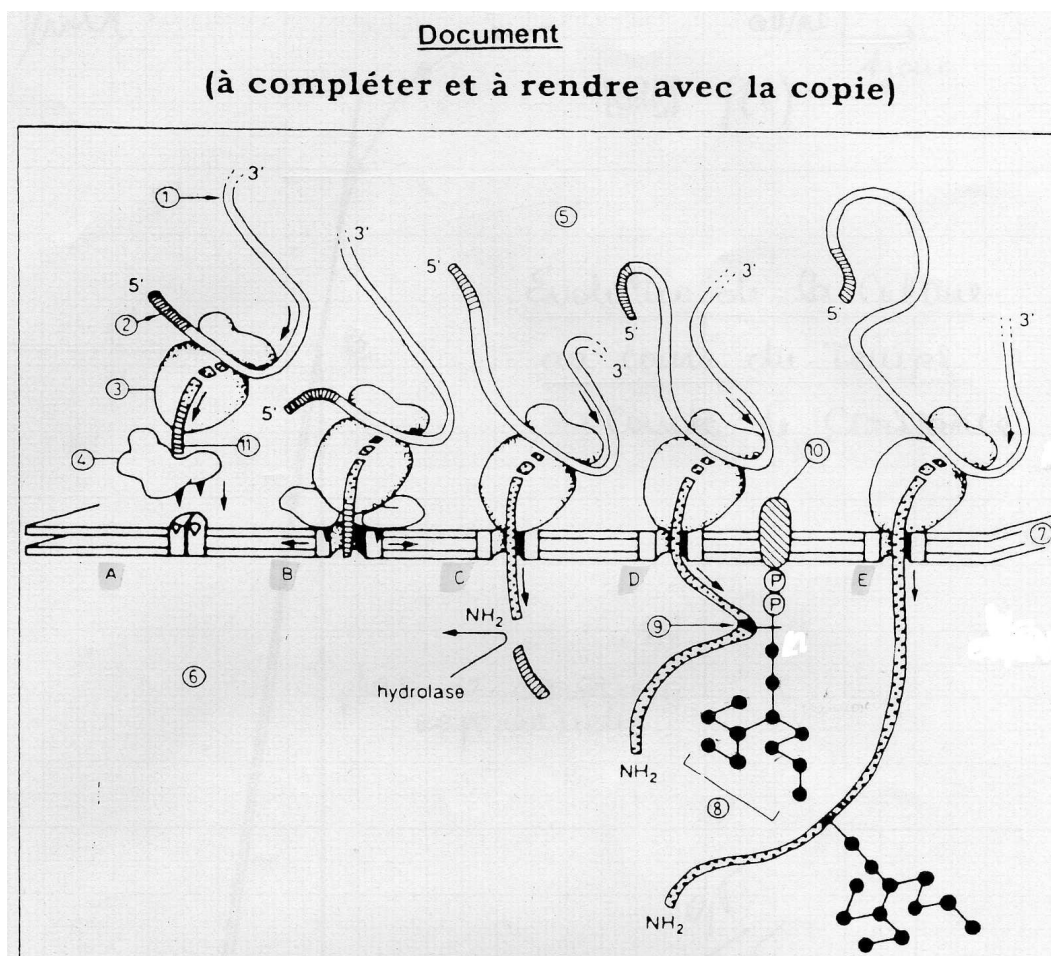
Les immunoglobulines synthétisées par ces cellules sont destinées à être sécrétées

3.1. Indiquer sur le **Document fourni** les légendes correspondant aux numéros de 1 à 11 et donner un titre au schéma présenté (ce document est à rendre avec la copie).

3.2. Décrire la succession des événements qui se produisent de A à E.

3.3. Quelles chaînes peptidiques de l'immunoglobine sont synthétisées comme indiqué sur le schéma proposé? Justifier la réponse.

3.4. Quelle transformation post traductionnelle doivent - elles encore subir pour la formation des domaines?



Correction DS 2 6 mars 2006

1.

a) On trace $\ln[\text{cellules}] = f(t)$ afin de linéariser la phase exponentielle
graphe : titre / axes identifiées avec unités / échelle / lissage de la courbe

Les différentes phases : (à repérer sur le graphe)

- **0 ; 3j** : phase de **latence**. adaptation au milieu de culture (sortie de phase G0).
- **3j ; 7j** : phase de **croissance exponentielle** (multiplication max)
- **7j ; 10 j** : phase **stationnaire** : équilibre de prolifération

b) Détermination de μ max entre 4 jours et 6 jours (phase expo) par la détermination de la pente de la représentation précédente

$$\mu \text{ max} = 0.62 \text{ j}^{-1}$$

Détermination de la durée de cycle cellulaire revient à déterminer le temps de doublement de la population dans l'hypothèse où la croissance est synchrone (on fait cette hypothèse pour le calcul)

$$G = \ln(2) / \mu \text{ max} = 1.125 \text{ j soit 27 heures}$$

2.

2.1.

a) Pendant la phase de traitement par le SVF, les cellules entrent dans le cycle cellulaire mais se trouvent en G1

-> phase durant laquelle les cellules sont sensibles aux facteurs de croissance pour pouvoir franchir le point START.

b) Les cellules sont au départ synchronisées en G0. Après 5 h de traitement au SVF, on provoque un changement de comportement :

-> les cellules s'arrondissent (sans passées en suspension) donc entrent en mitose.

Il faut donc 5 heures pour que les cellules progressent vers M : elles passent le point START.

2.2.

a) - MPF hétéro dimère constitué d'une kinase (cdk) et d'une SU régulatrice spécifique de chaque phase (cycline)

- activité kinase : phosphorylation de diverses protéines

- cibles lors de l'entrée de phase M : phosphorylation histone H1 (augmentation condensation ADN), phosphorylation de la lamina nucléaire (désorganisation de l'enveloppe nucléaire).

b) La sortie de mitose se fait par dégradation de la cycline par le système l'Ubiquitine / Protéasome
-> protéolyse.

2.3. Schéma récapitulatif

- 4 phases G1, S, G2, M et éventuellement la sortie vers G0

- Acteurs du contrôle : MPF et SPF

- Points de contrôle : point START (fin de G1), entrée de phase M et sortie de phase M.

3.

3.1. **titre** : Synthèse et glycosylation d'une chaîne peptidique dans le RER

1. ARN m	7. membrane du RER
2. séquence codant le peptide signal	8. résidu glucidique
3. ribosome	9. site de glycosylation
4. SRP	10. dolichol
5. cytosol	11. peptide signal
6. lumière du RER	

3.2.

A : Début de la traduction et reconnaissance du peptide signal par la SRP (arrêt de traduction).

B : Fixation du ribosome sur le RER.

C : Reprise de la traduction et clivage du peptide signal par la peptide signal hydrolase.

D : Fixation d'un oligosaccharide au niveau de Asn : glycosylation de la chaîne

E : Fin de la synthèse et translocation.

3.3. Uniquement les chaînes lourdes dans leurs domaines constants subissent les glycosylations car seules ces chaînes portent des motifs glucidiques.

3.4. Formation de ponts disulfures intracaténaux et intercaténaux.