

# Séance de Révision de Biologie Cellulaire

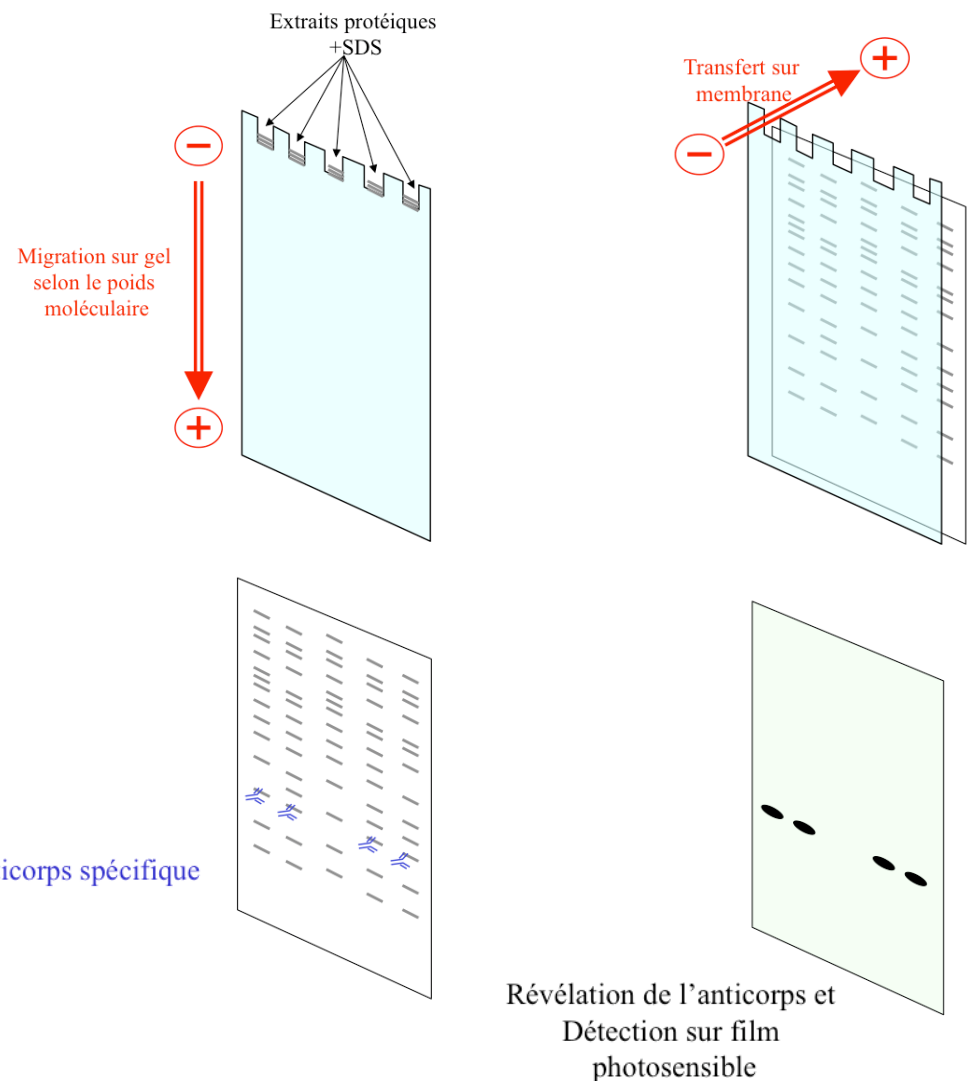
Point récapitulatif sur l'immunoprécipitation (=immunoblot) :

- 1- on place des extraits de protéine sur un gel de SDS-PAGE (= SDS + Polyacrylamide), les protéines vont elles aussi contenir du SDS afin de les dénaturer
- 2- on va appliquer une différence de potentiel sur le gel qui va entraîner la migration des protéines à travers celui-ci, les protéines vont migrer uniquement en fonction de leur poids moléculaire ceci pour 2 raisons :
  - le SDS va les **dénaturer**, ce qui fait qu'elles ne migreront pas en fonction de leur forme
  - Le SDS va les **charger** – ce qui empêche les protéines de migrer en fonction de leur charge car elles seront toutes chargées en excès négativement.

Remarque : Les chaînes des différents complexes protéiques habituellement liées par des ponts disulfures, sont aussi séparées par ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol ou d'un autre agent réducteur.

- 3- On transfère tout ça par électro-transfère sur une membrane où les protéines seront accessibles à une détection qui va être spécifique via un anticorps
- 4- Révélation grâce à un révélateur de la position des cibles de ces AC.

Anticorps spécifique



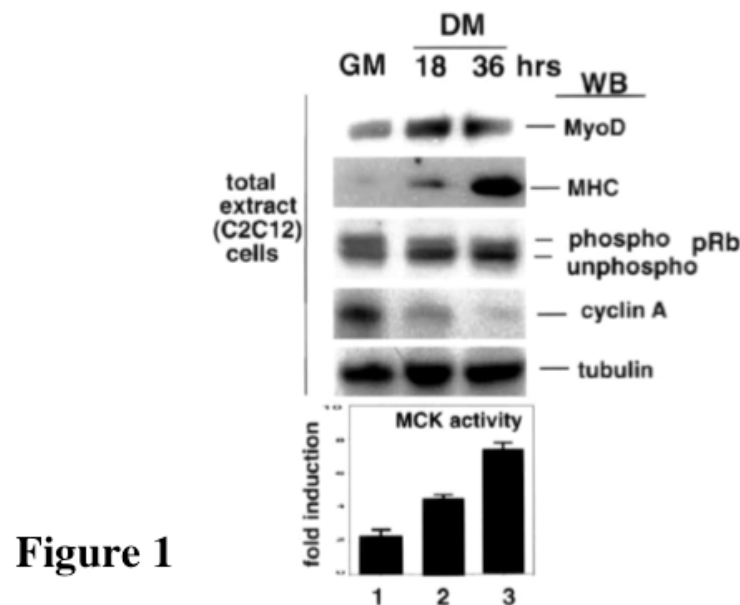
### Expérience tirée d'un annale de Lyon du Pr.Ottaviani

Lors de la mise en place du muscle squelettique les myoblastes, cellules précurseurs des fibres musculaires, fusionnent entraînant la formation de myotubes qui sont des cellules multinucléées. Au cours de ce processus, les myoblastes vont sortir définitivement du cycle cellulaire, réprimer l'expression des gènes responsables de sa progression et exprimer le programme de différenciation, comportant de nombreux gènes spécifiques. Deux familles de facteurs de transcriptions sont responsables de l'activation de ces gènes ; celles de MyoD et MEF2. Des coactivateurs transcriptionnels tels que les acétyltransférases p300/CBP et P/CAF se fixent à ces protéines lors de la différenciation. Mais dans les myoblastes on les trouve associées à des désacétylases. Or on trouve aussi parmi les facteurs importants pour le bon déroulement de la différenciation musculaire la protéine du rétinoblastome (pRb) connue chez la plupart des types de cellules pour son contrôle de la progression du cycle cellulaire. pRb aussi peut s'associer à des désacétylases d'histones. Puri P.L. et collaborateurs en sont ainsi venus à étudier les changements qui s'opèrent pour ces protéines lors de la transition entre prolifération et différenciation musculaire chez la souris.

Des myoblastes de souris (C2C12) sont cultivés en milieu de croissance (GM, contenant 20% sérum fœtal bovin) ou en milieu de différenciation (DM, contenant 2% sérum de cheval) pendant 18h ou 36h. On prépare alors des extraits cellulaires totaux qui sont analysés par la technique de l'immunoblot (que l'on appelle aussi Western Blot, WB) quant à la présence de diverses protéines : le facteur de transcription MyoD, la chaîne lourde de la myosine (MHC), la protéine du rétinoblastome pRb, la cycline A, et la tubuline. On mesure de plus dans ces extraits l'activité de la

créatine kinase du muscle (MCK), spécifiquement exprimée lors de la phase tardive de la différenciation du muscle squelettique, tout comme la MHC.

Les résultats expérimentaux sont présentés sur la figure 1.



**Figure 1**

### Question 1 : Propositions concernant la figure 1 :

- A- La tubuline est un contrôle qui permet de vérifier que les disparités observées ne sont pas dues à des différences de quantités totales de protéines déposées sur le gel.
- B- Les variations de la quantité de cycline A entre les différentes conditions démontrent qu'elles correspondent à différentes phases du cycle cellulaire.
- C- L'accroissement de la quantité de MyoD en DM concorde avec l'augmentation de l'expression de MHC, de la déphosphorylation de pRb et de l'activité MCK.

- D- Ces résultats démontrent que l'augmentation de l'activité MCK est responsable de la déphosphorylation de pRb.
- E- La tubuline est spécifiquement exprimée uniquement dans les cellules musculaires.

Réponse : AC

Item A : L'**intensité de la tubuline** est relativement similaire dans chacune des pistes et dans toute l'introduction on ne vous a pas évoqué la tubuline comme ayant une quelconque spécificité par rapport à la différenciation musculaire, or dans la fibre musculaire on s'attend plutôt à trouver des fibres d'actines et de myosines. Comme les chercheurs essayent de toujours mettre la même quantité de produits d'extrait totaux et qu'on retrouve **ici** la même quantité de tubuline, elle est donc bien ici un **témoin de charge** qui montre que chacune des pistes a été chargée avec une quantité équivalente de matériel.

Item B : Effectivement la cycline A varie au cours du cycle cellulaire, mais est-ce sa seule source de variation ?

**Non**, effectivement on pourrait dire que ces variations pourraient indiquer qu'on est dans différentes phases du cycle cellulaire, mais on ne vous a pas spécialement parlé du cycle cellulaire non plus ni de synchronisation des cellules dans une phase particulière du cycle. **En culture**, toutes les cellules sont généralement dans des phases différentes du cycle parce qu'elles ne sont pas synchronisées, donc en soi on ne s'attend pas à voir toutes les cellules dans une même phase, à moins qu'elles ne soient plus du tout en prolifération. Donc à priori **ici** des cellules sont un peu dans toutes les phases. Ici, comme on vous l'a dit dans l'introduction, ces cellules vont commencer à se différencier donc arrêter de proliférer, vu qu'elles vont arrêter de

proliférer elles vont certainement arrêter aussi d'exprimer les cyclines, donc c'est probablement uniquement à cause de ces cellules là perdent l'expression des cyclines, suite à l'exposition au milieu de différenciation.

⇒ **On ne peut pas le démontrer car on a une autre explication possible qui est la diminution de production des cyclines car les cellules vont rentrer en phase de différenciation**

Item C : Ici il fallait voir que pRb est en plus grande proportion déphosphorylée que phosphorylée au cours de la différenciation, ce qui est concomitant à l'expression du marqueur MHC et de l'expression d'une activité MCK, on vous a aussi dit que ces protéines étaient des facteurs de la différenciation, ces deux événements concordent donc bien ensemble

Item D : En effet l'accroissement de la quantité de MyoD en DM est concomitante de la déphosphorylation de pRb mais ce n'est pas parce que deux événements se passent en même temps qu'il existe forcément un lien de causalité direct entre les deux et même si c'était le cas, ce n'est pas cette expérience qui permet de le dire, ici vous voyez une variation suite à ce changement de condition, vous pouvez **suggérer l'hypothèse** qu'il existe un lien entre les deux événements mais à priori vous ne pouvez pas le démontrer, il aurait fallu manipuler par exemple l'expression de la MCK et regarder l'effet sur la déphosphorylation de pRb

Item E : La tubuline n'est **pas spécifiquement exprimée** uniquement **dans les cellules musculaires** car quelque soit le stade de différenciation on retrouve la même quantité d'expression, de plus vous avez vu en cours que la **tubuline est**

**composée de microtubules** qui sont présents de manière complètement ubiquitaire.

On réalise alors sur ces extraits cellulaires une immuno-précipitation (IP) avec des anticorps dirigés contre une désacétylase d'histone de type I (HDAC1, **A**) ou contre pRb (**B**). Les extraits totaux, immuno-précipitats et surnageants (SN) sont alors analysés par immunoblot. Les résultats sont présentés par la figure 2.

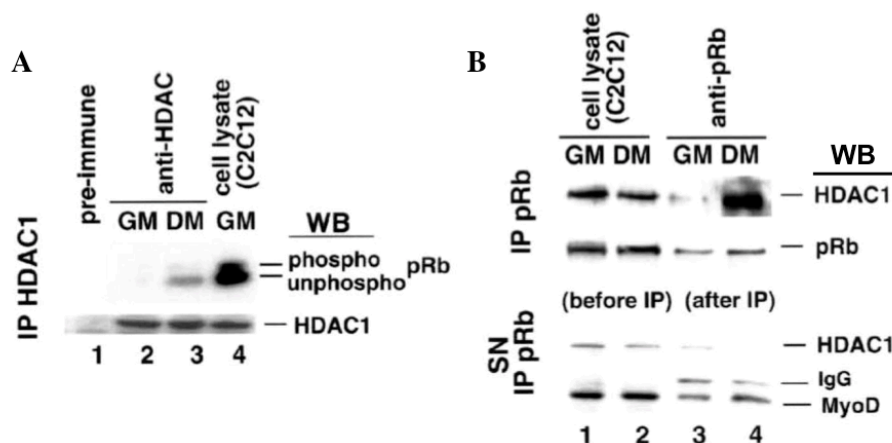


Figure 2

Rappel : Une **immuno-précipitation** c'est quoi ?

On va prendre dans un extrait où les conditions (**contrairement à l'immunoblot**) ne sont **pas dénaturantes**, car l'immuno-précipitation va tenter de démontrer l'existence d'une interaction entre une protéine et autre chose.

En général on place un AC dans l'extrait qui va venir se fixer sur sa protéine cible, on rajoute ensuite des billes qui elles vont spécifiquement venir fixer les AC que vous avez rajouté du coup

vosre protéine cible et quoi que ce soit qui est accroché à votre protéine se retrouvent accrochés à l'AC qui est lui même accroché aux billes, on centrifuge le tout pour que les billes descendent au fond du tube et on enlève le surnageant pour obtenir l'immuno-précipitat

Interprétation : On a présence **dans l'extrait total**, de pRb phosphorylé et déphosphorylé, mais lorsqu'on **immuno-précipite par HDAC1** vous n'obtenez rien en terme de pRb dans le **milieu de croissance** (GM) mais vous en obtenez un petit peu essentiellement déphosphorylé dans le **milieu de différenciation** (DM), alors que les deux versions étaient présentes dans l'extrait total. La conclusion que vous tirez de ça sur une analyse simple c'est que **si vous avez pRb dans l'immuno-précipitat c'est que celui-ci a été en interaction avec quelque chose qui a été immuno-précipité** aussi, cela peut être quelque chose de non spécifique (lié aux AC ou aux billes), c'est pour ça qu'on a ce contrôle pré-immune pour savoir si de manière non spécifique on ne descend pas la protéine quand même. En **milieu de croissance** (GM) on ne retrouve **pas** de pRb qui a été immunoprécipité avec HDAC1 et en **milieu de différenciation** (DM) vous en avez, ce qui veut dire que **HDAC1 et pRb sont en interaction lors de la différenciation mais pas lors de la croissance**.

**Question 2 : Propositions concernant la figure 2 :**

- A- Tout comme l'immuno-précipitation, l'immunoblot est généralement réalisé dans des conditions non dénaturantes pour les protéines.
- B- L'immuno-précipitation permet souvent de purifier des complexes protéiques.

- C- Ces résultats suggèrent que HDAC1 est préférentiellement liée à pRb dans sa forme déphosphorylée en GM comme en DM
- D- Les résultats des figures 2A et 2B sont contradictoires.
- E- La figure 2B démontre que pRb forme aussi un complexe avec MyoD.

Réponse : B

Item A : L'immunoblot est réalisé dans des conditions dénaturantes (utilisation de SDS)

Item B : C'est le but d'une immuno-précipitation

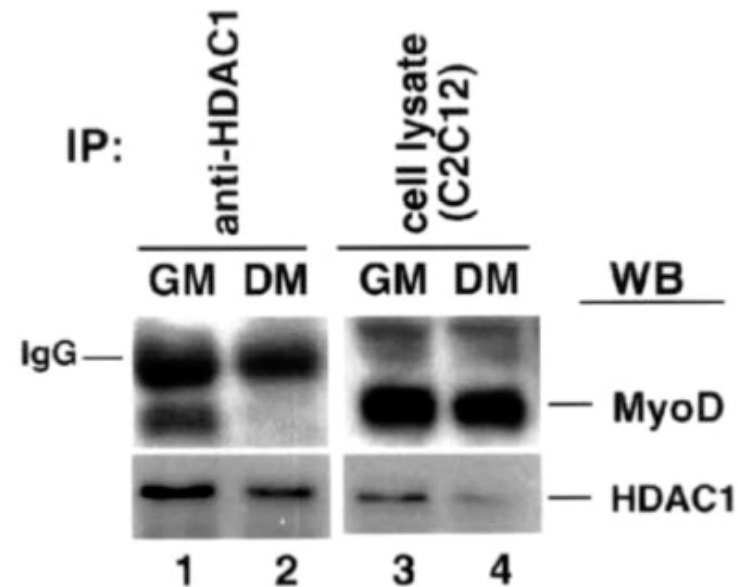
Item C : Si HDAC1 était **préférentiellement lié** à pRb dans sa forme déphosphorylée en GM comme en DM, on la précipiterait dans les 2 cas **or** sa forme déphosphorylée n'est immuno-précipitée **que** dans le milieu de différenciation (DM)

Item D : Dans la figure 2B, on peut voir que **dans le lysat cellulaire**, que les cellules soient en milieu de croissance ou de différenciation, il n'y a pas de différence sur la quantité globale de HDAC1 lorsqu'on l'immuno-précipite cette fois-ci par pRb. L'idée ici c'est qu'on a attrapé le complexe par une protéine au début et que dans cette 2<sup>ème</sup> expérience on l'attrape de l'autre côté par l'autre protéine (pRb), vous voyez que **dans l'extrait** on a à peu près la même quantité de pRb que de HDAC1, par contre quand vous êtes dans le **milieu de croissance** (GM) vous n'avez **pas** d'interaction entre HDAC1 et pRb par contre vous avez une interaction entre HDAC1 et pRb dans le **milieu de différenciation** (DM), c'est exactement la même situation que vous aviez précédemment. L'idée c'est que **dans le surnageant**

vous devriez voir à priori l'inverse de ce qu'il va se passer dans l'immunoprécipitat, ici vous voyez une diminution de HDAC1 car celui-ci a été retrouvé dans le culot en interaction avec pRb, ce que vous voyez en plus ici c'est les IgG qui sont les AC utilisés pour l'immuno-précipitation.

Item E : On ne regarde MyoD que dans le surnageant et non pas dans l'immuno-précipitat donc on n'a aucune preuve que MyoD forme un complexe avec pRb, la figure 2B ne le démontre en aucun cas.

*On procède ensuite de même mais on recherche cette fois-ci la présence de MyoD après immuno-précipitation par HDAC1. La figure 3 présente les données obtenues.*



**Figure 3**

Interprétation : Dans le lysat cellulaire on semble perdre un peu d'expression de HDAC1 en milieu de différenciation par contre vous ne détectez MyoD que dans l'immuno-précipitat du milieu de croissance et pas dans celui de différenciation, ce qui sous-entend qu'à l'inverse de pRb, on a très certainement une interaction entre HDAC1 et MyoD en milieu de croissance et non pas en milieu de différenciation.

**Question 3 : D'après les résultats des figures précédentes :**

- A- L'ensemble de ces résultats démontre que MyoD, pRb et HDAC1 forment un complexe ternaire en conditions de prolifération.
- B- La figure 3 démontre que HDAC1 et MyoD ne sont pas liées lors de la différenciation.
- C- Les résultats suggèrent que HDAC1 est préférentiellement liée à MyoD dans les myoblastes et à la forme phosphorylée de pRb dans les myotubes.
- D- On peut supposer que l'activité désacétylase de HDAC1 est responsable de la répression de l'expression des gènes spécifiques du muscle squelettique dans les myoblastes.
- E- On ne peut pas exclure que l'activité désacétylase de HDAC1 n'ait aucun rôle dans la différenciation musculaire.

Réponse : BDE

Item A : Ces résultats ne le **démontrent pas**, il aurait fallu une immuno-précipitation de MyoD, pRb en même temps

Item B : On ne repère **pas** de MyoD immuno-précipité avec HDAC1 en **milieu de différenciation** donc il n'y a **pas** d'interaction entre les deux

Item C : On pourrait se dire que c'est le cas mais si on revient sur la partie avec pRb (figure 2), celui-ci est lié à HDAC1 dans le milieu de différenciation, tandis que HDAC1 est lié à MyoD dans le milieu de croissance, mais pour autant on ne peut pas considérer que les cellules qui sont en soit encore des myotubes, donc à priori on ne peut pas aller aussi loin dans l'interprétation des données

Item D : Avec vos connaissances vous pouvez dire que c'est exact car vous voyez bien une interaction entre MyoD et HDAC1 lors de la croissance et on vous a énoncé que MyoD est un facteur de différenciation donc tant que la différenciation n'est pas induite, à priori on s'attend à ce que la MyoD ne soit pas exprimé et donc que les gènes sous sa dépendance soient majoritairement désacétylés (rappel : les gènes désacétylés favorisent la chromatine de conformation fermée), on peut donc supposer que c'est cette activité désacétylase de HDAC1 qui va permettre la non expression des gènes du programme de différenciation lorsque vous êtes en croissance

Item E : Aucun résultat ne nous permet de l'exclure

*On réalise maintenant dans les cellules en GM et en DM des immuno-précipitations de MyoD et pRb que l'on analyse par immunoblot et dont on mesure l'activité désacétylase sur des protéines histones acétylées purifiées. On traite aussi certaines fractions avec de la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des désacétylases. Les résultats sont présentés en figure 4.*

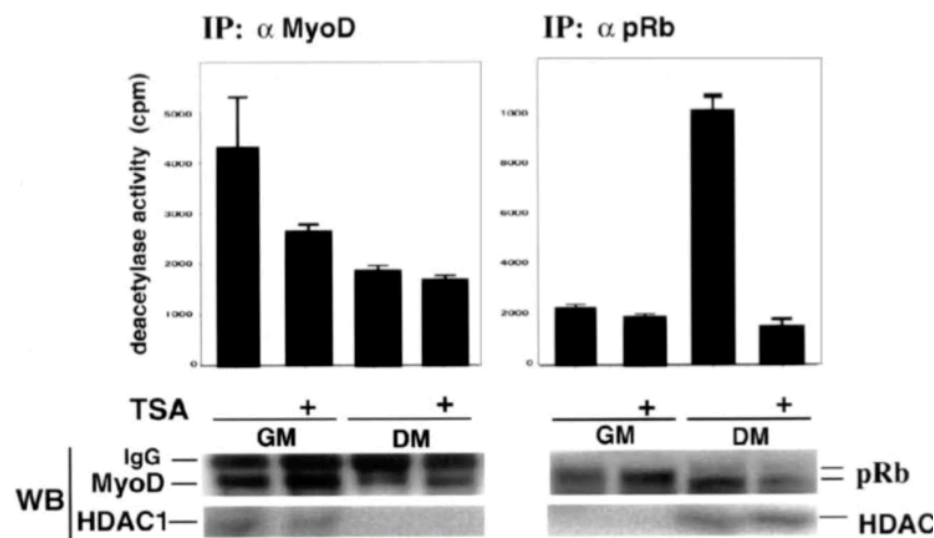


Figure 4

Interprétation : Sur IP :  $\alpha$ MyoD on a une activité désacétylase plus importante dans les **conditions de croissance**, qu'on réduit avec la TSA alors que le **peu** qu'on mesure vous ne le réduisez quasiment pas avec TSA dans la version **milieu de différenciation**, ce qui veut dire à priori que **la désacétylation qui a été mesuré ici n'était pas directement lié à l'activité de ces enzymes là** (MyoD et HDAC1). A l'inverse pour **pRb** on voit qu'on a une **forte activité désacétylase uniquement** dans le **milieu de différenciation** et qu'on peut la faire quasiment intégralement disparaître avec le TSA. De plus dans l'IP de MyoD et de pRb vous voyez que vous ne détectez HDAC1 avec MyoD que dans le milieu de croissance, et avec pRb que dans le milieu de différenciation.

#### Question 4 : Propositions concernant la figure 4 :

- A- La TSA diminue la quantité d'histones acétylées.
- B- Ces résultats démontrent que HDAC1 perd son activité désacétylase en présence de MyoD lors de la différenciation ainsi qu'en présence de pRb lors de la prolifération.
- C- L'activité désacétylase est associée à MyoD dans les cellules en GM et avec pRb dans les cellules en DM.
- D- Ces résultats démontrent que l'association de HDAC1 à MyoD ou pRb est nécessaire à son activité.
- E- N'excluent pas que l'activité désacétylase soit liée à une autre protéine que HDAC1.

Réponse : CE

Item A : Au contraire car TSA inhibe les désacétylase donc elle maintient le taux d'histones acétylés

Item B : Il n'y a pas de mise en présence de MyoD et de pRb en cours de prolifération dans l'expérience

Item C : On a effectivement ce **passage de HDAC1 de MyoD en croissance à pRb en différenciation** ce qui est logique puisqu'**en croissance on inhibe le programme de différenciation de MyoD donc HDAC1 est sur MyoD et en période de différenciation on inhibe le programme de prolifération donc HDAC est sur pRb**.

Item D : Pour pouvoir démontrer cela il aurait fallu réaliser une expérience mesurant l'activité de HDAC1 sans être associé aux deux autres facteurs

Item E : En effet vous retrouvez une activité désacétylase de base **indépendante** de HDAC1 et de l'effet de la TSA qui reste déjà dans tous les cas, les variations qu'on voit manifestement sont liés à HDAC1 mais il y a une part de l'activité désacétylase qui est manifestement lié à autre chose donc on n'exclut pas qu'il y ai une autre protéine que HDAC1 qui soit responsable au moins d'une part de cette activité désacétylase

*Les protéines pRb et HDAC1 marquées par une étiquette Flag sont alors exprimées dans un système baculovirus (Flag-Rb et Flag-HDAC1) et la protéine MyoD marquée par un motif poly-histidine dans un système bactérien (His-MyoD). Ces protéines sont purifiées par affinité et la formation de complexes est testée in vitro par incubation de diverses combinaisons deux à deux de purifiats suivie d'une immuno-précipitation de HDAC1 et d'une analyse par immunoblot.*

*Les résultats sont présentés en figure 5.*

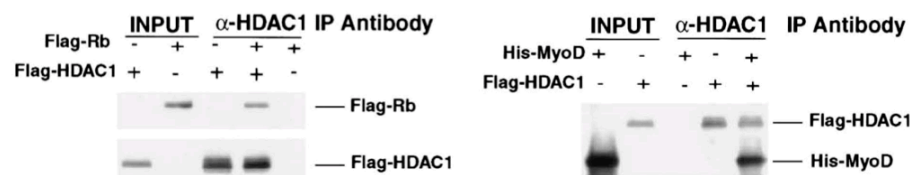


Figure 5

Interprétation : On n'est plus du tout dans des extraits cellulaires totaux où il peut y avoir pleins d'autres protéines, on travaille seulement avec les protéines étudiées tel que c'est indiqué. Dans ce type de figure ce qu'on appelle **input**, c'est l'ensemble de ce qu'on a mis dans le tube de départ lorsqu'on a voulu déclencher la réaction (équivalent du lysat) et l'anti-HDAC1

(alpha-HDAC1) c'est ce qu'on a récupéré après immunoprécipitation.

Quand on immunoprécipite l'input de départ avec HDAC1, si on avait que HDAC1 et bien on retrouve que lui (jusque là tout va bien), si on a les 2 ensembles, on détecte à la fois HDAC1 et pRb, si on met pRb on ne détecte rien. Ça veut dire qu'avec l'AC anti-HDAC1 on ne descend pas pRb de manière non spécifique mais uniquement parce que pRb est en interaction avec HDAC1.

#### **Question 5 : Propositions concernant la figure 5 :**

- A- Tester une interaction in vitro permet de déterminer si celle-ci est directe en s'affranchissant de l'ensemble des autres protéines cellulaires.
- B- Ces résultats n'excluent pas que l'anticorps dirigé contre HDAC1 puisse se lier à Flag-Rb
- C- Les résultats obtenus concordent avec ceux des expériences précédentes.
- D- Ces résultats démontrent que Flag-Rb et His-MyoD peuvent se lier directement à Flag-HDAC1
- E- Ces résultats n'excluent pas la formation d'un complexe ternaire entre les trois protéines étudiées.

Réponse : ACDE

Item A : C'est la raison pour laquelle on a fait cette expérience, dans les expériences précédentes on ne pouvait pas exclure que MyoD et HDAC1 soient en interaction ensemble mais par une protéine qui fasse l'adaptateur entre les deux car on avait toutes les protéines de la cellule étaient présentes, ici cela montre que les protéines sont bien en interaction une à une

Item B : Il l'exclut puisque le témoin le montre, l'AC anti-HDAC1 **en présence** de Flag-Rb **ne fait pas** descendre Flag-Rb, on peut donc exclure qu'il y a une interaction non-spécifique entre l'AC anti-HDAC1 et Flag-Rb

Item C : On voit effectivement les complexes MyoD-HDAC1 et pRb-HDAC1 qu'on avait vu dans les expériences précédentes

Item D : On met ici en évidence une interaction directe

Item E : On ne peut pas l'exclure car on n'a pas essayé de les mettre toutes les 3 ensembles

*On procède de même en combinant les trois protéines purifiées. L'analyse par Immunoblot et la proportion de Flag-Rb liée à Flag-HDAC1 dans les différentes conditions sont données par la figure 6.*

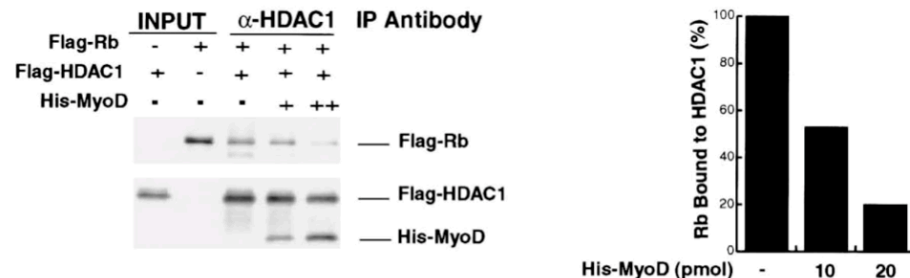


Figure 6

Interprétation : Vous voyez que plus on rajoute de MyoD plus la quantité de pRb immunoprécipité par HDAC1 diminue

**Question 6 : Les résultats présentés ici :**

- A- Confirment l'existence d'un complexe ternaire.
- B- Démontrent que MyoD dégrade pRb.

C- Démontrent que l'affinité de MyoD pour HDAC1 est plus forte que celle de pRb pour HDAC1.

D- Démontrent que MyoD et pRb sont compétiteurs dans l'interaction avec HDAC1.

E- N'excluent pas la présence d'autres protéines dans les complexes formés in vivo.

Réponse : DE

Item A : Lorsque vous rajoutez le 2<sup>ème</sup>, l'autre se détache, vous avez très certainement une **compétition** entre les 2 et donc pas un complexe ternaire

Item B : Vous n'avez aucune preuve de la dégradation de pRb, vous voyez juste qu'il n'est pas précipité par l'expérience

Item C : Vous n'avez aucune information sur les quantités précises de MyoD et de pRb qui sont utilisées et pour mesure une affinité il faut des valeurs quantitatives et donc avoir les concentrations précises des protéines

Item D : Plus vous rajoutez de l'un et plus l'autre disparaît

Item E : Il peut y avoir d'autres protéines qui joueront un rôle avec ces complexes

Questions de cours :

**Question n°1 : Peut on considérer que le Knock-Down inhibe l'expression des gènes ou simplement la réduit ?**

Tout dépend de ce que l'on entend par le sens d'inhiber, si on parle d'inhibition total ça peut être le cas mais ce n'est pas le plus courant. Lors d'un KD on va avoir un ARNi qui va cibler l'expression du transcrit en le faisant détruire par la cellule mais il peut y en avoir toujours un petit peu qui passe, ça dépend de l'efficacité de votre système de KD, en général on choisit si possible le meilleur, mais il y a des cas où il vaut mieux ne pas avoir le système le plus efficace en KD car si vous voulez travailler sur des réductions de l'expression de la protéine qui ne sont pas des disparitions complètes de son existence et qui peuvent être liées à une pathologie, certaines pathologies n'ont pas forcément besoin que la protéine soit totalement absente, il suffit simplement que son expression soit diminuée (ex : cancer), c'est parfois plus intéressant d'avoir quelque chose de plus doux dans la réduction d'expression. **KD on réduit (éventuellement totalement) alors que le KO on est sûr de casser totalement l'expression.**

**Question n°2 : Les protéines G peuvent-elles fonctionner avec de l'ATP et non du GTP ?**

Le Pr.OTTAVIANI n'en sait rien, mais il dit qu'il faut comprendre que les petites protéines G trimériques et les protéines G Ras ne sont **pas les mêmes** et ne font **pas** partis de la **même famille** mais qu'il ne trouve pas intéressant de poser des questions sur ça.

**Question n°3 : Faites vous une distinction entre l'hétérochromatine et la chromatine hyper-condensée ?**

Non, le Pr.OTTAVIANI considère que c'est plus le domaine du Pr.Gilson que du sien.

**Question n°4 : Un petit récap. sur les homéogènes ?**

C'est pas le « dada » du Pr.OTTAVIANI, pour lui c'est plus du développement que réellement de la Biologie Cellulaire, il ne compte pas aller spécialement sur le sujet des homéogènes, il veut juste que vous ayez les bases c'est à dire qu'il existe des principes de régulation, les homéogènes c'est juste le cas d'étude qui a été utilisé pour comprendre un principe d'organisation d'expression des gènes qui est éventuellement valable pour d'autres type de gène. Il vous interrogera plus sur le principe derrière les choses que sur le point de détail qui n'a pas forcément d'intérêt à être retenu à moins qu'il ait éventuellement dit que c'était quelque chose d'important.

**Question n°5 : Peut on démontrer qu'une protéine hybride X-GFP et bien présente à un endroit et seulement suggérer que cette protéine X est présente à cet endroit là ?**

**Oui**, lorsqu'on voit la protéine X-GFP à un endroit on ne peut pas exclure que la protéine X n'était pas mal localisée à cause de la GFP (à moins qu'on fasse une expérience qui montre que ça ne la modifie pas)

**Question n°6 : Faites vous une distinction entre prométaphase/métaphase en ce qui concerne les complexes condensine, cohésine...?**

La prométaphase elle se caractérise par la disparition de l'enveloppe nucléaire suite à la condensation des chromosomes (qui se fait en prophase) qui est l'élément clef, la métaphase elle va revenir à aligner les chromosomes sur l'équateur. Il n'iras pas vous piègez sur ce genre de question, ça reste à savoir (il ne vous piègeras pas sur le moment précis mais peut vous interroger sur l'action de ces complexes)

**Question n°7 : Quelle est la nature de l'ADN du nucléole ?**

Sur une définition purement visuelle on aurait tendance à dire que dans le nucléole on a de l'**hétérochromatine** mais sur une définition fonctionnelle c'est faux, on a certes une zone avec de l'ADN très condensé mais est une **zone très active donc inverse de l'hétérochromatine**.

**Question n°8 : Est-ce que les procaryotes ont un semblant de cytosquelette ?**

Il pense que oui, il doit exister des protéines ayant une fonction similaire au cytosquelette mais considère que c'est une question peu intéressante car n'ayant aucun rapport avec vos études médicales, par contre le fait que des procaryotes puissent détourner le cytosquelette des eucaryotes (Listeria) qui augmente leur pouvoir de virulence, est important à savoir

**Question n°9 : Doit-on considérer que la télophase fait partie de la cytosinèse ou de la caryocinèse ?**

En soit la caryocinèse qui est la séparation du matériel nucléaire, au moment de la télophase à priori est fini puisque les 2 pool de K sont déjà aux 2 pôles de la cellule, par contre ce que la

télophase va réaliser et se par quoi elle va se terminer est la cytosinèse.

**Question n°10 : Comment peut on situer l'espace pariétal ?**

Tout dépend de la paroi considérée, l'espace pariétal d'une bactérie qui a une paroi et bien c'est l'espace qui se trouve autour de la membrane plasmique de cette bactérie (plutôt à l'extérieur), c'est l'espace qui va être au contact de la paroi ou entre la paroi et autre chose.

**Question n°11 : Est-ce que les AG insaturés rigidient ou fluidient la membrane?**

Les AG insaturés ont tendance à la **fluidifier** en créant plus d'espace entre les phospholipides, par contre souvent ces espaces créés pouvaient permettre l'insertion de cholestérol qui lui a tendance à **rigidifier** les parois.