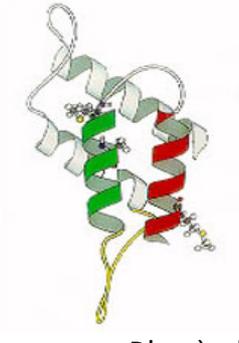
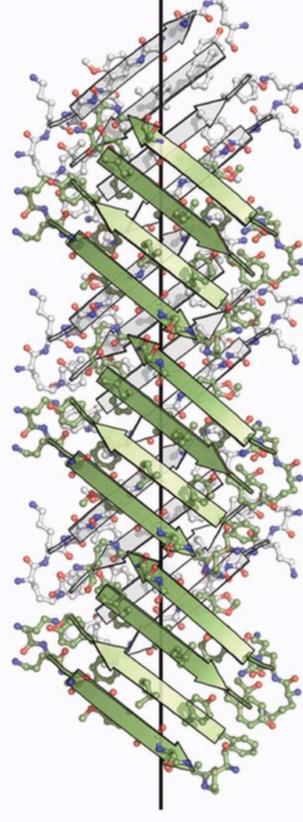


**Livret d'exercice n°4**  
**La structure des protéines**

**Thème 1 : la protéine prion**

La protéine prion ou Prp est une protéine synthétisée par les neurones des animaux : elle existe alors sous une forme cellulaire normale en position membranaire, forme dite Prp<sub>c</sub>. Elle existe aussi sous une forme pathogène dite Prp<sub>sc</sub> (sc pour scrappy), forme responsable des encéphalopathies spongiformes : la Prp<sub>sc</sub> s'agrège à plusieurs pour former des baguettes dans le cytosol des neurones, ce qui entraîne leur mort. Les versions Prp<sub>c</sub> et Prp<sub>sc</sub> de la protéine prion possèdent la même séquence.

Etude structurale comparée : les structures secondaires remarquables et quelques chaînes latérales ont été représentées.

Modèle de Prpc	Modèle de Prpsc
	
D'après des données cristallographiques	
	<p style="text-align: center;">Un modèle d'agrégat (modèle informatique)</p> 

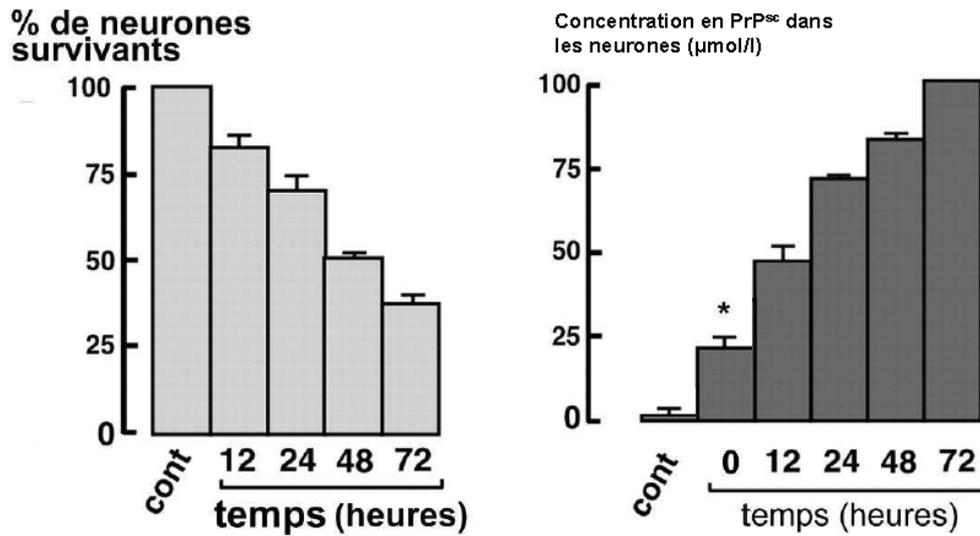
La version Prp<sup>sc</sup> est résistante à la chaleur et à l'attaque de nombreuses protéases dont la protéase PK.

Etude de la pathogénicité de Prp<sup>sc</sup>

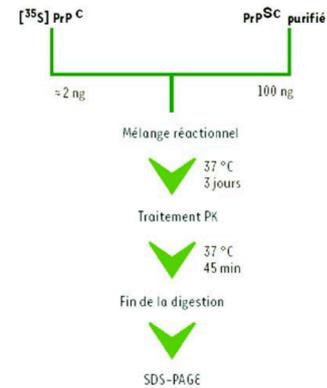
A- On réalise un test de l'effet de PrP<sup>Sc</sup> sur une population de neurones cultivés in vitro. On ajoute au milieu de culture 20 μmol/l (μM) de PrP<sup>Sc</sup>. On mesure le pourcentage de neurones survivants, par rapport au nombre de cellules comptées dans les cultures témoin (cont, sans ajout de PrP<sup>Sc</sup>). Les mesures sont réalisées en fonction du temps, après l'injection (en heures).

B- Parallèlement, on réalise un dosage des protéines prions présentes dans les cellules nerveuses en culture. On mesure la concentration en PrP<sup>Sc</sup> dans les neurones (indistinctement vivants et morts) au cours du temps avant et après l'injection de PrP<sup>Sc</sup> (20μM).

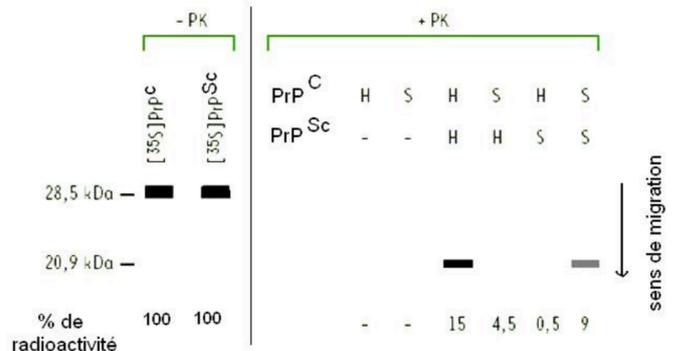
Cont : mesure avant injection de PrP<sup>Sc</sup> . (\*) ou t=0: mesure juste après injection de PrP<sup>Sc</sup>.



C- On réalise une incubation in vitro de protéines Prpc radioactives et de Prpsc froide, de souris et de Hamster. Après 3 jours de contact, le mélange de protéines est traité à la protéase PK puis est soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes : l'électrophorèse est finalement révélée par autoradiographie. On réalise aussi un témoin avec une électrophorèse de protéines Prpc et Prpsc natives.



A. Principe de l'expérimentation



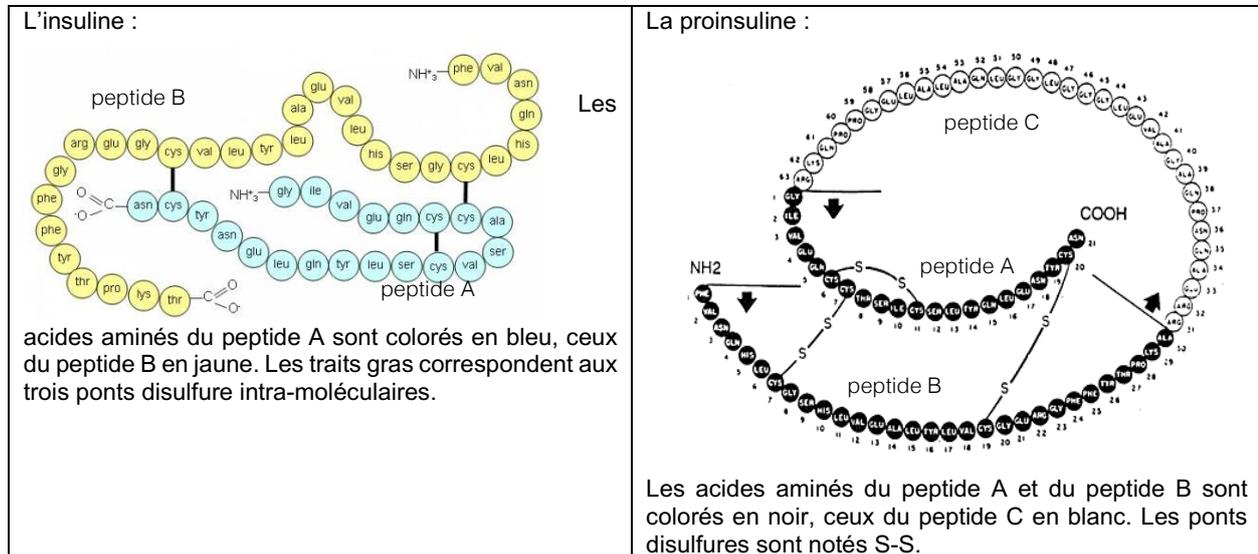
B. Schéma des résultats de l'électrophorèse

## Thème 2 : le polypeptide insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique produite par les cellules endocrines du pancréas. Elle est constituée de 51 acides aminés répartis en deux chaînes, dites peptide A et peptide B. Elle est issue de la transformation d'un précurseur protéique, la proinsuline.

**Objectif : décrire les différents niveaux de structure de l'insuline et ses variations.**

### Insuline et proinsuline



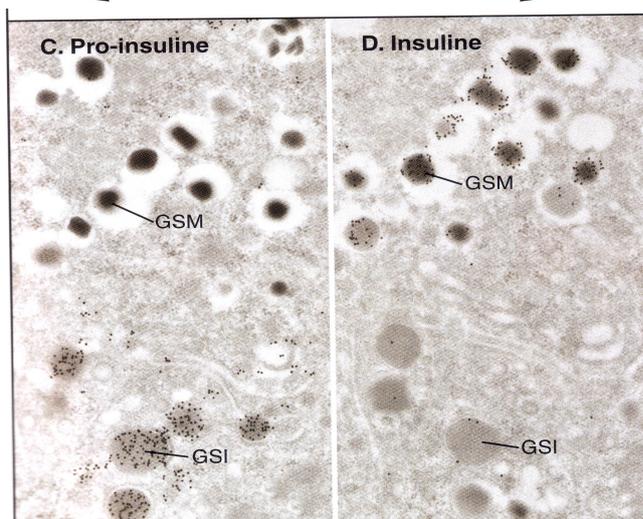
#### Document 1

Structure primaire et ponts disulfures de l'insuline (à gauche) et de la proinsuline (à droite).

Afin de localiser insuline et proinsuline dans les cellules endocrines des îlots de Langerhans, on fait réagir des anticorps dirigés spécifiquement contre l'une ou l'autre de ces molécules. Ces anticorps sont marqués à l'or : l'or apparaît comme des petits points noirs et nets sur les électronographies. On ne montre ici qu'une portion de la cellule endocrine.

avec des anticorps reconnaissant la proinsuline

avec des anticorps reconnaissant l'insuline



#### Document 2

Légende : GSI = grain de sécrétion immature ; GSM = grain de sécrétion mature  
grain de sécrétion = vésicule d'exocytose

Les enzymes PC2 et PC3 sont des enzymes exprimées spécifiquement dans les cellules endocrines du pancréas, que l'on

trouve dans les vésicules d'exocytose. Ces enzymes ne sont pas produites dans certaines cellules cancéreuses dérivées du pancréas. On utilise, dans cette expérience, des cellules malignes en culture, issues de tumeurs pancréatiques, dépourvues des enzymes PC2 et PC3, pour étudier le rôle biologique de ces 2 enzymes.

On réalise 3 lots de cellules cancéreuses en culture :

- le lot a, des cellules malignes non modifiées ;
- le lot b dans lequel le gène de l'enzyme PC2 est surexprimé (par ajout d'une séquence d'ADN codant l'enzyme PC2) ;
- le lot c dans lequel le gène de l'enzyme PC3 est surexprimé (par ajout d'une séquence d'ADN codant l'enzyme PC3).

Chaque lot est cultivé cinq minutes avec de la leucine radioactive puis est transféré dans un milieu sans radioactivité pendant une heure.

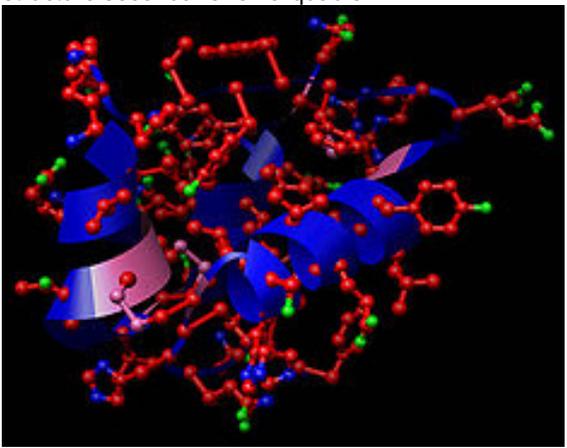
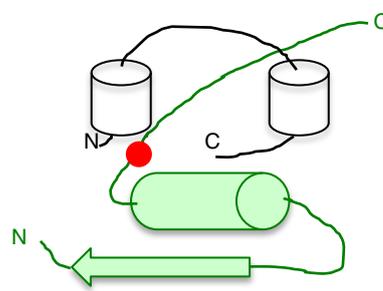
Après ce traitement chaque lot de cellules est broyé et filtré : le filtrat est déposé au sommet d'une colonne de chromatographie. La colonne expulse une fraction de 1 mL par minute, dans laquelle la radioactivité est dosée : on en déduit la quantité d'insuline et de proinsuline radioactive.

	Mesure de la radioactivité expulsée par la colonne de chromatographie (cpm) Précision : 10%	
	Proinsuline	Insuline
Lot a	4000	10
Lot b	2000	1900
Lot c	1500	2500

Document 3

### Les diverses structures tridimensionnelles de l'insuline

Grâce à des expériences de cristallographie, on propose deux modèles structuraux de l'insuline. Le document 4 présente la structure tridimensionnelle de l'insuline extraite du sang. Dans le sang, l'insuline est dissoute et présente une concentration de l'ordre de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> ; le sang a un pH de 7,4. Le document 5 présente la structure tridimensionnelle plus volumineuse de l'insuline extraite des vésicules d'exocytose pancréatiques matures, dans lesquelles le pH est légèrement inférieur à 7.

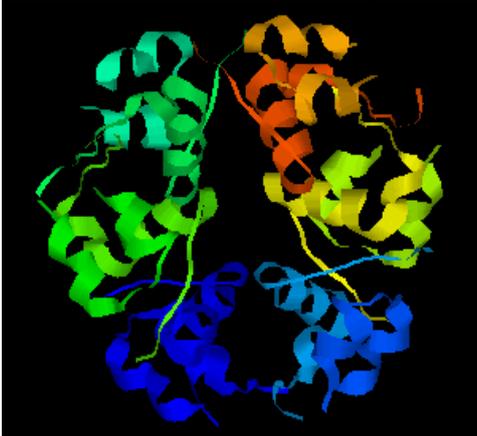
<p>4A- Sur cette représentation on montre à la fois la position des radicaux et les zones adoptant une structure secondaire remarquable</p>  <p>ruban bleu : structures secondaires          boule rouge : atome de carbone des chaînes latérales          boule verte : atome d'oxygène des chaînes latérales          boule bleue : atome d'azote des chaînes latérales</p>	<p>4B- Représentation simplifiée : seule les structures secondaires remarquables sont indiquées.</p>  <p>Le peptide B est en vert, le peptide A en noir. La boule rouge correspond à la position de la glycine 8 du peptide B. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont précisées.          Un cylindre représente une hélice <math>\alpha</math> et une flèche un feuillet <math>\beta</math>.</p>
--	---

Document 4

Structure tridimensionnelle de l'insuline sanguine

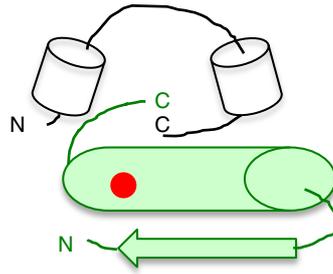
5A- Représentation simplifiée mettant en valeur les structures secondaires, sans montrer les chaînes latérales.

Les rubans épais de diverses couleurs correspondent aux structures secondaires remarquables.



5B- Détail d'un protomère.

Le code couleur est celui du document 4 B.



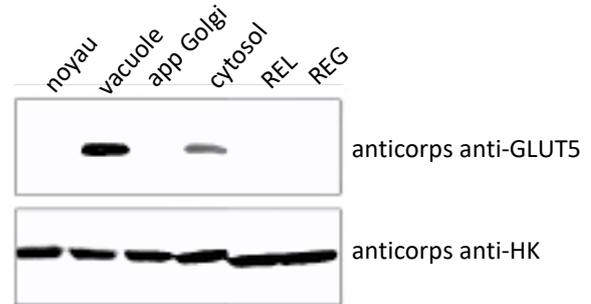
**Document 5**

Structure tridimensionnelle de l'insuline extraite des vésicules d'exocytose pancréatique : un assemblage de protomères.

### Thème 3 : étude la protéine membranaire GLUT-5, un transporteur de fructose

#### 1- Localisation de GLUT-5

Par ultracentrifugation d'un broyat de cellule du parenchyme foliaire, on récupère des lots de protéines de différents territoires cellulaires. Ces lots de protéines sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis sont transférés sur membrane avant d'être mis en contact avec un anticorps radioactif anti-GLUT-5 ou avec un anticorps anti-hexokinase<sup>1</sup>. Le western-blot est révélé par une autoradiographie.



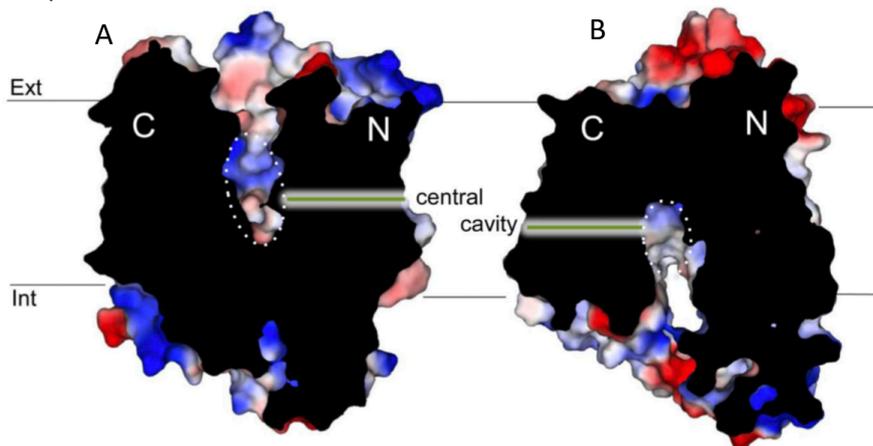
#### Analyser et interpreter

#### 2- Modèle structural

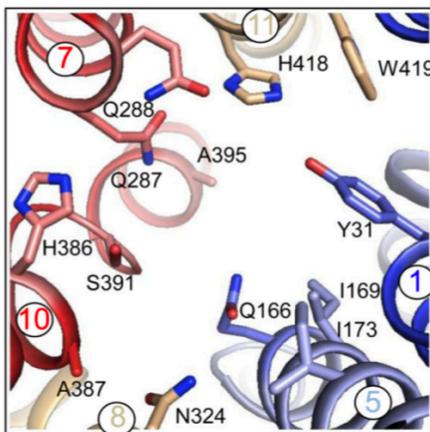
Des expériences de cristallographie ont permis de déterminer la forme globale de la protéine GLUT-5 et de son site de liaison. Des comparaisons de séquences avec les autres transporteurs de la famille GLUT permettent de repérer des acides aminés potentiellement importants dans le travail de la protéine.

#### Document 2.1 : modèle structural de la protéine GLUT-5

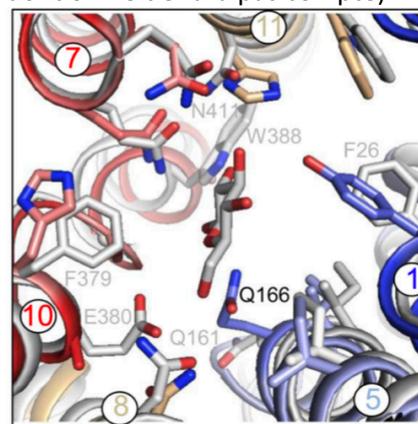
2.1.a Forme d'ensemble de la protéine GLUT-5 en absence de ligand. Deux formes sont obtenues : conformation ouverte sur l'extérieur en A ou ouverte sur l'intérieur en B. C et N désignent les extrémités de l'unique chaîne protéique.



2.1.b-Détail du site de liaison en absence de ligand  
Vue de dessus, en conformation ouverte sur l'extérieur.



2.1.c- Détail du site de liaison en présence de D-fructose. Vue de dessus, en conformation ouverte sur l'extérieur (surimposé au site de GLUT-1 en gris, dont on ne tiendra pas compte)



<sup>1</sup> hexokinase (HK) : enzyme n°1 de la glycolyse, présente dans toutes les cellules en concentration identique

Décrire par quelques adjectifs ou expressions la forme d'ensemble de la protéine GLUT-5 (sans rédiger ni justifier)

Encadrer le ligand sur l'image .Identifier le ligand. Quelles chaînes latérales pourraient d'après ce modèle participer à la fixation du ligand ?

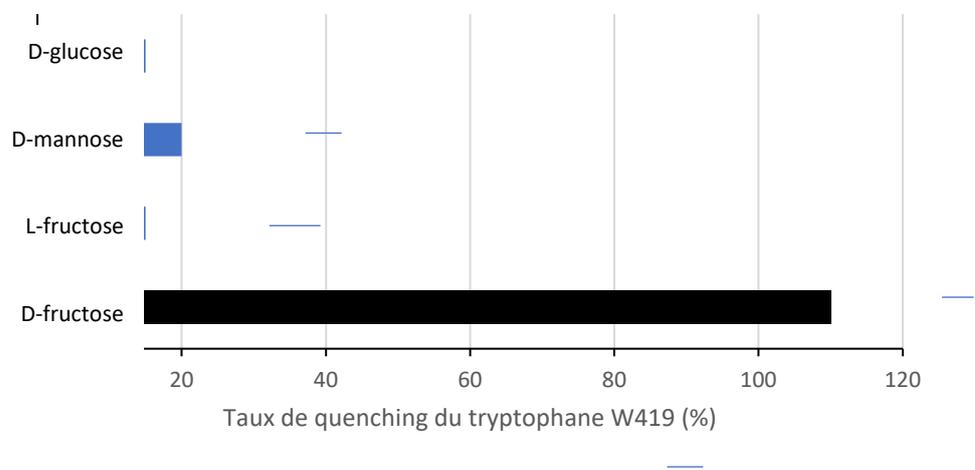
Quelles liaisons pourrait concerner le résidu d'acide aminé W419 ?

Document 2.2 : importance du résidu tryptophane W419

W419 est le seul tryptophane du site de liaison. Cet acide aminé est conservé chez tous les membres de la famille des protéines GLUT.

Le tryptophane est un acide aminé qui absorbe la lumière ultra-violette à 295 nm et émet ensuite un rayonnement à 338 nm ; lorsque cet acide aminé établit un contact avec une autre molécule le rayonnement émis diminue : on parle de « fluorescence quenching ». Plus le quenching est fort, plus le tryptophane établit de contact.

On évalue le quenching en présence de divers oses. Les barres indiquent les écarts-types.



Analyser et interpréter l'histogramme.

Document 2.3 : importance du résidu Glutamine Q166

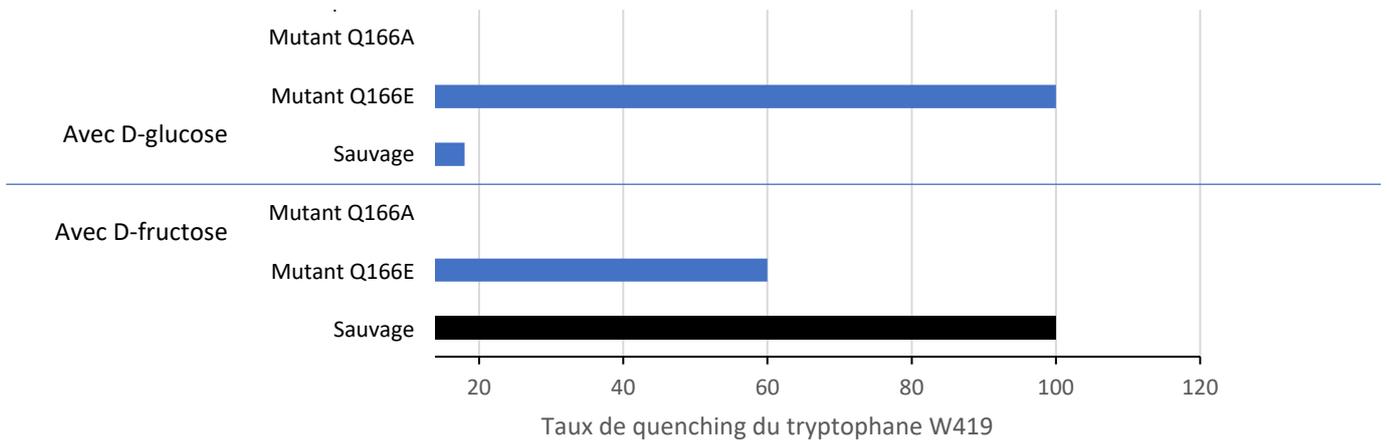
Le résidu Glutamine Q166 est un résidu dont on ne retrouve pas d'équivalent dans le site de liaison des autres transporteurs GLUT.

Pour étudier sa fonction on réalise des versions mutantes de la protéine GLUT-5 : dans le mutant Q166E on remplace Q166 par une asparagine ; dans le mutant Q166A on remplace Q166 par une alanine.

On suit alors, pour différentes protéines GLUT-5 sauvages ou mutantes, le quenching du tryptophane W419 en présence de D-fructose ou de D-glucose.

Formulaire : quelques acides aminés (lignée L)

Alanine	Asparagine	Glutamine
<chem>CC(N)C(=O)O</chem>	<chem>NC(=O)CC(N)C(=O)O</chem>	<chem>NC(=O)CCC(N)C(=O)O</chem>



*Analyser et interpréter cet histogramme, en utilisant le formulaire fourni.*