

Livret d'exercice n°8
Echanges de matière à l'échelle cellulaire

Exercice 1

La famille des protéines Sweet (pour Sugars Will Eventually be Exported Transporters) regroupe des transporteurs membranaires de glucides. Elle compte dix-sept membres identifiés chez les plantes, qui montrent jusqu'à 80% d'homologie de séquence. Sweet17 a été localisé dans le tonoplaste des cellules végétales.

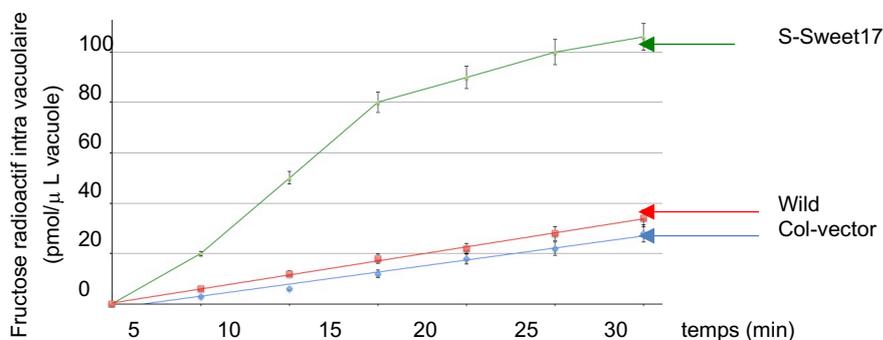
Transport de fructose dans des vacuoles isolées

Des vacuoles isolées de cellules de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (plante modèle) sont incubées dans une solution de fructose marqué au ^{14}C , de concentration $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Cette solution ne contient pas d'ATP.

On utilise diverses souches d'*Arabidopsis* :

- S-Sweet17 est une souche transgénique qui surexprime Sweet17, grâce à l'ajout d'une version supplémentaire du gène sous la dépendance d'un promoteur fort. Cette version est apportée par un plasmide vecteur.
- Wild est une souche sauvage
- Col-Vector est une souche sauvage qui reçoit un vecteur plasmidique n'apportant aucun transgène.

On mesure la quantité de fructose radioactif présent dans la vacuole au cours du temps.



Document 1

Quantité de fructose présent dans les vacuoles des trois souches en fonction du temps d'incubation. Les barres d'erreur représentent les écarts-types sur 30 mesures.

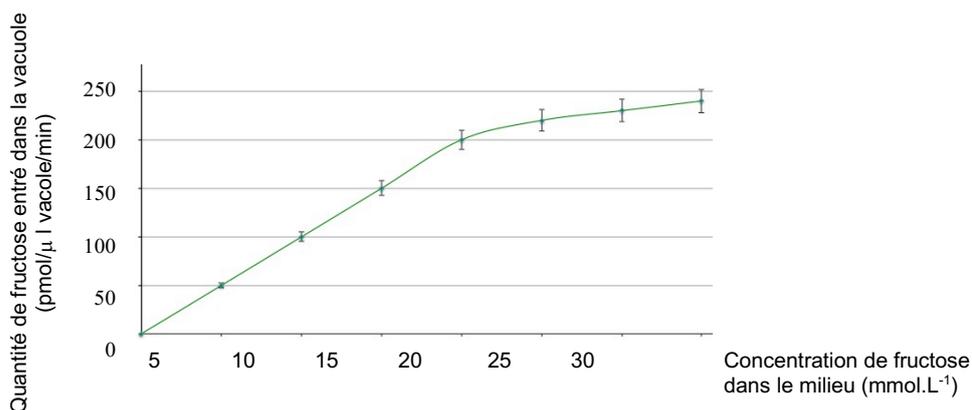
Q1 : que montrent les témoins Wild et Col-Vector ?

Q2 : découpez la courbe concernant S-Sweet17 en domaines ; interprétez les domaines de la courbe.

Q3 : que déduire de l'absence d'ATP du milieu expérimental ?

Q4 : pourquoi faire l'expérience sur des vacuoles isolées ?

Pour des vacuoles issues de la souche S-Sweet17 et incubées avec différentes concentrations en fructose, on mesure la quantité de sucre entrant par unité de temps ; on obtient la courbe cinétique suivante :

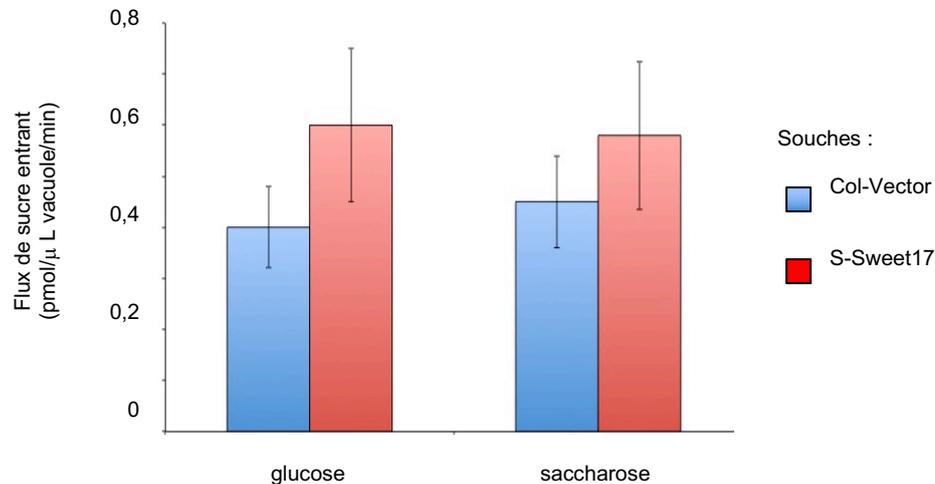


Document 2
 Flux entrant de fructose selon la quantité de fructose à l'extérieur de la vacuole de la souche transgénique

Q5 : découper la courbe du document 2 en domaines ; expliquer chaque domaine.

Transport de glucose et de saccharose dans des vacuoles isolées

Des vacuoles isolées de souches 35S-Sweet17 et de souche Col-Vector sont incubées en présence de glucose ou de saccharose radioactif, de concentration $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. La quantité de sucre entrant dans la vacuole est mesurée après 1 minute d'incubation : on calcule alors le flux moyen par minute.



Document 3

Flux moyen de glucose ou de saccharose. La valeur de l'histogramme donne la valeur moyenne du flux par minute, établie sur la première minute de l'expérience. Les barres d'erreur représentent les écarts-types sur 30 mesures.

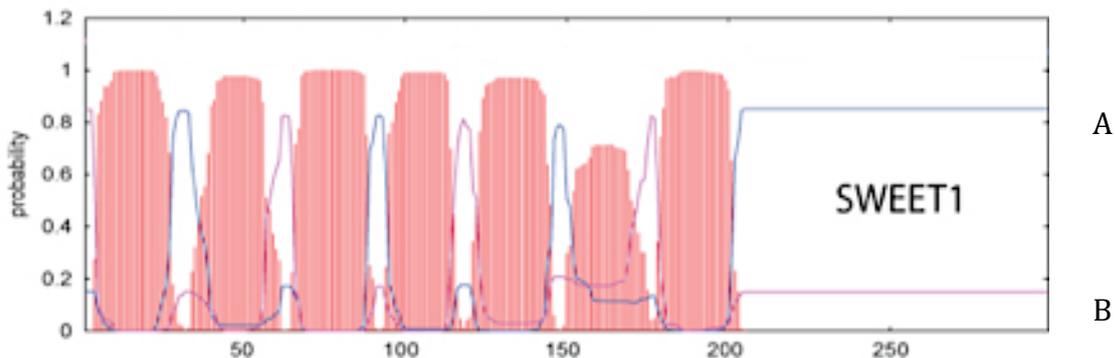
Q6 : comparer les quatre colonnes de l'histogramme.

Q7 : comparer les barres de l'histogramme avec le flux de fructose lu sur le document 2.

Q8 : que déduire de ces comparaisons ?

Profil d'hydropathie

L'analyse de la séquence et de l'hydropathie de la protéine Sweet17 par un logiciel permet de prédire sa forme tridimensionnelle.



Les territoires grisés donnent la probabilité d'avoir un domaine transmembranaire ; la courbe A donne la probabilité d'avoir un domaine cytosolique et la courbe B donne la probabilité d'avoir un territoire extracellulaire.

Q9 : proposer un modèle structural orienté de la protéine Sweet17

Q10 : en une phrase, résumer l'ensemble des propriétés de la protéine Sweet17 mises en évidence dans cette étude.

Exercice 2

On souhaite déterminer le mode d'internalisation des peptides par des cellules en comparant le flux entrant de deux substances :

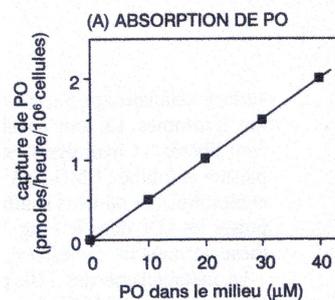
- EGF (epidermal growth factor)
- PO (peroxydase du raifort)

Expérience 1.1 : on incube des cellules soit avec 40 nmol.L^{-1} d'EGF marqué à l'iode radioactif, soit avec $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PO.

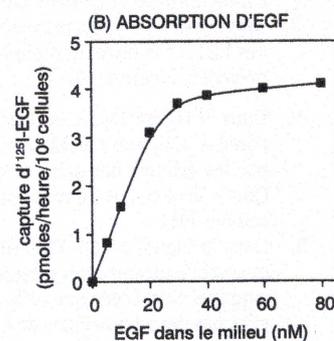
Au bout de trente minutes, on fixe les cellules et on révèle l'activité de la PO avec un substrat coloré ; on révèle l'EGF par autoradiographie.

On trouve les deux peptides dans des petites vésicules de 20 nm de rayon, mais la concentration en EGF dans les vésicules est élevée alors que la concentration en PO dans les vésicules est très faible.

Expérience 1.2 : on incube des cellules avec des quantités variables de PO et on mesure la quantité de PO captée par les cellules



Expérience 1.3 : on incube des cellules avec des quantités variables d'EGF et on mesure la quantité d'EGF captée par les cellules



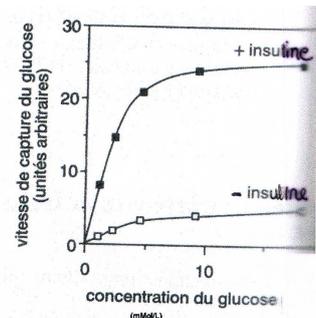
Q : identifier la voie d'entrée des deux peptides étudiés.

Exercice 3

L'insuline est une hormone hypoglycémisante dont le rôle sur le foie est de privilégier le stockage de glucose sous forme de glycogène. On désire étudier son effet sur les cellules adipeuses dont la fonction est la réserve énergétique sous forme de triglycérides.

Expérience 2.1 : on mesure la vitesse de capture du glucose par des cellules adipeuses témoins et des cellules adipeuses incubées avec de l'insuline

Q : comparer le flux de glucose dans les deux conditions expérimentales



Q : analyser ces résultats expérimentaux et expliquer la différence de flux de glucose observée précédemment

Expérience 2.2 : pour mesurer la concentration en glucose-perméase dans les membranes des cellules témoins et des cellules incubées avec de l'insuline, on fournit aux cellules un analogue radioactif du glucose, la cytochalasine B tritiée. Puis on sépare par ultracentrifugation la membrane plasmique, la membrane des organites et le cytosol. On estime la radioactivité dans les membranes plasmiques et les endomembranes des cellules.

Quantité de transporteur du glucose associé à la membrane plasmique et aux endomembranes en présence et en absence d'insuline

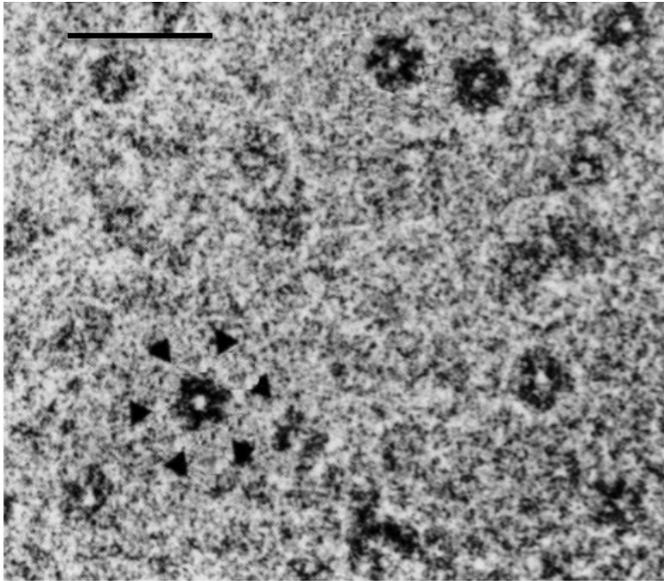
Fraction membranaire	³ H-Cytochalasine B liée cpm/mg	
	Cellules non traitées (- Insuline)	Cellules traitées (+ Insuline)
Membrane plasmique	890	4 480
Endomembranes	4 070	480

Exercice 4 : les jonctions gap

adapté à partir du sujet B du concours Agro-Véto 2005

Document 4-1 : observation au microscope électronique à transmission de jonctions gap purifiées.

La barre d'échelle mesure 20 nm

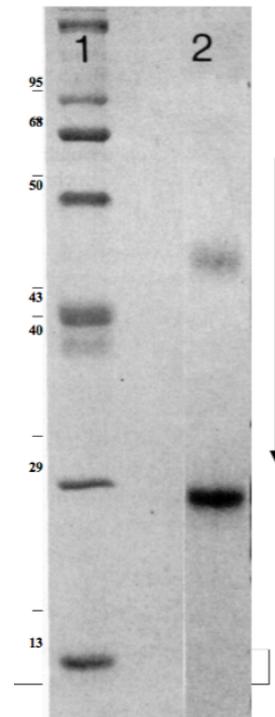


Jonctions gap purifiées et fixées dans la glace, observées en MET
Les aspects structuraux notables d'un connexon sont indiqués par des triangles noirs

Q : Analysez les documents 1 et 2 pour déterminer la structure tridimensionnelle des jonctions gap

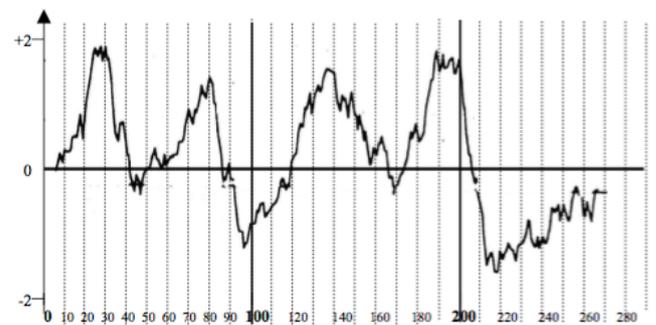
Document 4-3 : profil d'hydrophatie d'une sous-unité de la jonction gap.

On rappelle que l'index d'hydrophatie est calculé en tenant compte de la l'hydrophatie d'un segment de 20 acides aminés et est positif pour les territoires hydrophobes.



Document 4-2 : électrophorèse de jonctions gap purifiées, en conditions dénaturantes (système SDS-Page)

La colonne 1 contient des protéines de taille connues (en KDa) ; la colonne 2 contient les jonctions gap ; la flèche indique le sens de migration.



L'index d'hydrophatie est reporté en ordonnées. La position dans la séquence est reportée en abscisses.

Q : Interprétez ce profil d'hydrophatie.

Document 4-4: localisation par rapport à la membrane plasmique des portions extra-membranaires des sous-unités de jonction gap.

On injecte à un lapin des peptides de synthèse, dont la séquence est identique à la portion de la sous-unité de jonction gap de cellule de rat comprise entre l'acide aminé n°6 et l'acide aminé n°17. On récupère au bout de six jours dans le sang du lapin des anticorps dirigés spécifiquement contre le peptide de synthèse. Ces anticorps sont notés A6-17.

On prépare de même les anticorps :

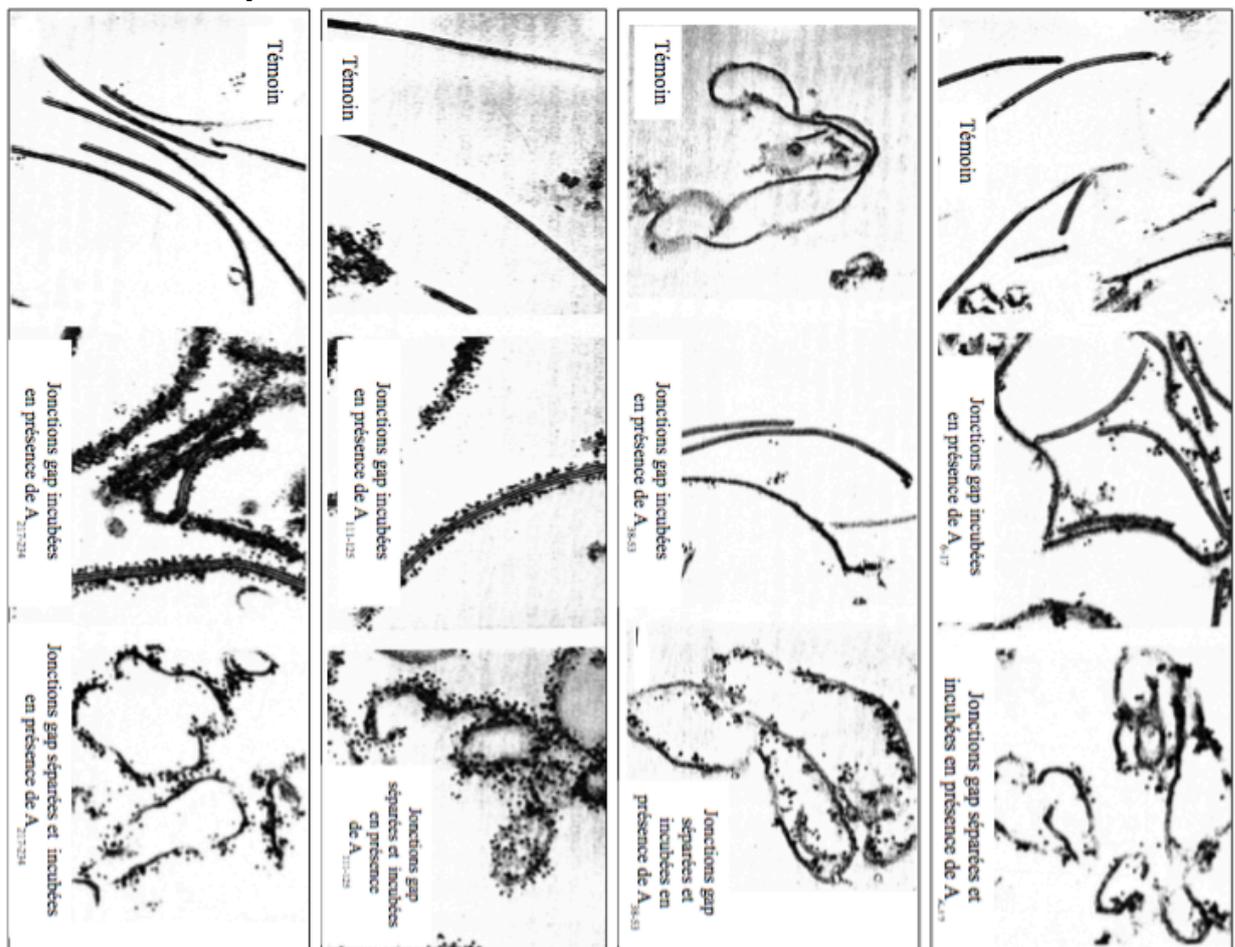
- l'anticorps A38-53 est dirigé spécifiquement contre la portion de sous-unité de jonction gap comprise entre l'acide aminé 38 et l'acide aminé 53
- l'anticorps A111-125 est dirigé spécifiquement contre la portion comprise entre l'acide aminé 111 et l'acide aminé 125
- l'anticorps A217-234 est dirigé spécifiquement contre la portion comprise entre l'acide aminé 217 et l'acide aminé 234

Ces anticorps sont tous marqués à l'or colloïdal, repérable en microscopie électronique sous forme de points sombres.

Des portions de membrane de rat, contenant des jonctions gap de rat intactes et complètes, sont réparties en plusieurs lots :

- des lots témoins
- des lots incubés pendant deux heures avec respectivement les anticorps A6-17, A38-53, A11-125 ou A217-234.
- des lots traités à l'urée concentrée (ce qui sépare les deux membranes mais conserve l'intégrité de chacune) puis incubés pendant deux heures avec respectivement les anticorps A6-17, A38-53, A11-125 ou A217-234.

On observe ensuite les portions de membranes en MET.

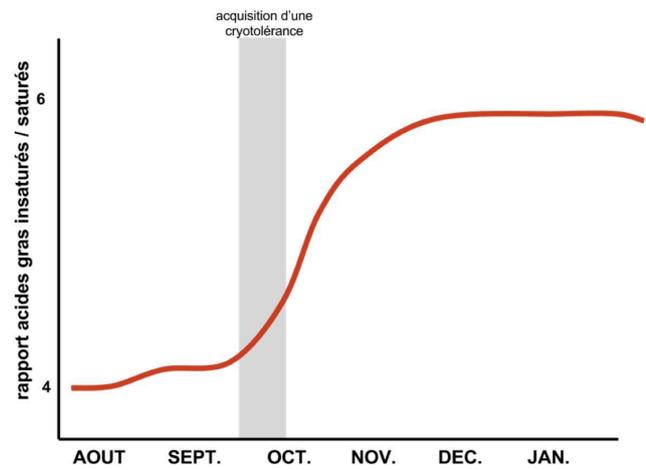


Q : Interprétez ces résultats pour déterminer la localisation par rapport à la membrane plasmique des portions extra-membranaires des sous-unités de jonction gap. Proposez un schéma.

Exercice 5

La figure suivante présente les variations du rapport acides gras saturés/acides gras insaturés des lipides membranaires de larve de l'insecte *Eurosta solidaginis* (espèce du continent nord-américain) au cours des saisons.

- Quelle est l'information essentielle ? Comment l'interprétez-vous ?



Exercice 5 : caractérisation des canaux ioniques de la membrane plasmique des cellules sensorielles auditives de rongeurs.

adapté d'après Chabbert and others, J.Physiol,553.1, 2003 ; Gang et al., AJREGU 298, 2009

Les rats naissent sourds. Au cours des deux premières semaines de leur vie, on assiste à une maturation de l'appareil auditif, avec notamment une évolution de la nature des canaux ioniques présents dans la membrane plasmique des cellules sensorielles. Ces cellules sensorielles ne sont pas des neurones et ne sont pas excitables mais sont associées à des neurones sensitifs.

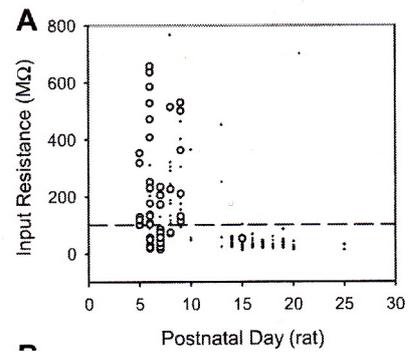
L'âge des rats est indiqué comme suit : P0 est le jour de la naissance ; P1, P2, P3 ... P20 désignent les jours 1, 2, 3...20 de l'animal.

Document 5-1 : caractérisation de canaux potassiques

5-1-A Mesure de la résistance membranaire au potassium.

On mesure chez des jeunes rats l'évolution de la résistance membranaire à l'ion potassium dans la membrane des cellules sensorielles auditives.

Chaque cercle et chaque point correspondent à la mesure sur une cellule.

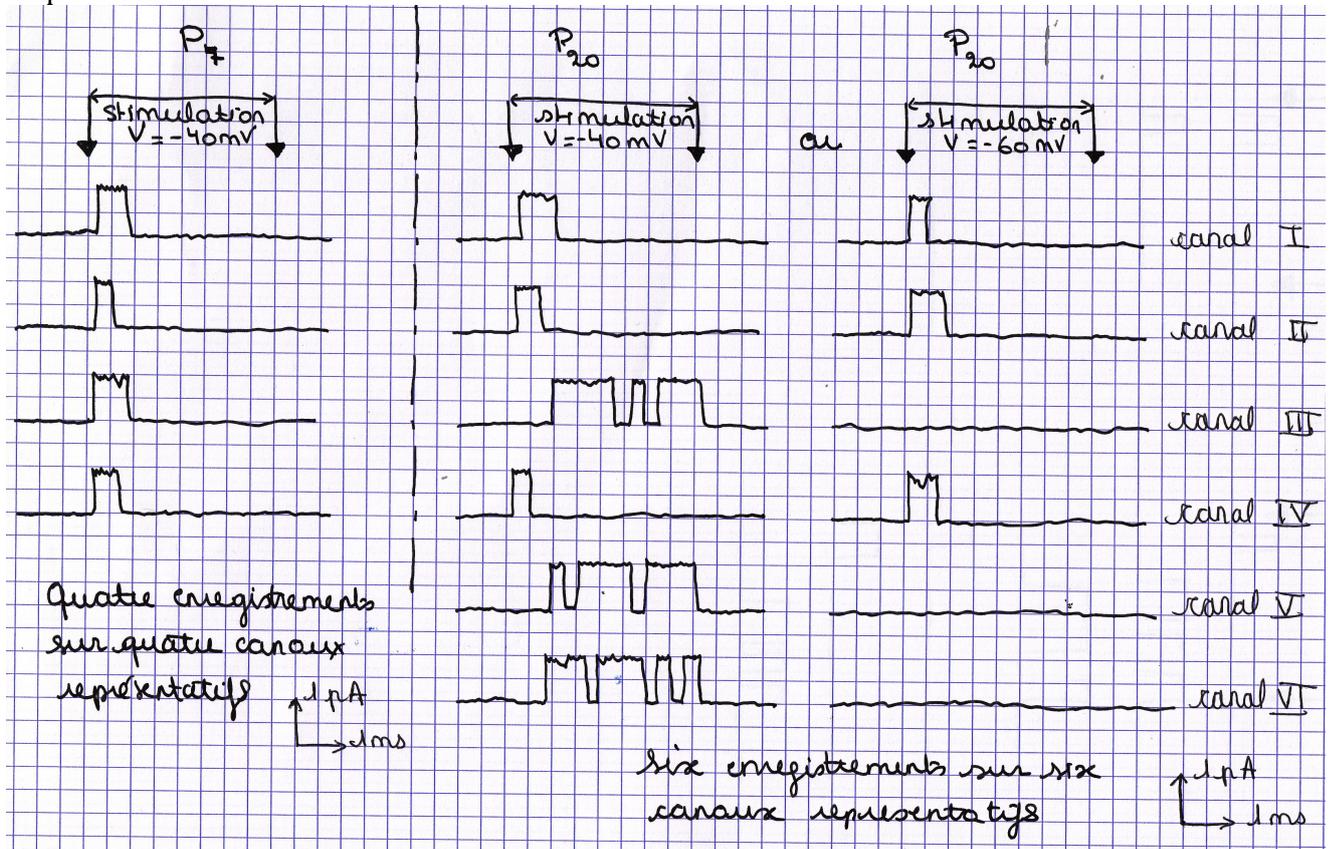


5-1-B Expérience de patch-clamp sur canaux potassiques isolés.

On mesure sur canaux isolés le courant potassique associé à une stimulation de la membrane par un voltage imposé.

Pour un rat à P7, tous les canaux testés montrent la même réponse lors d'une stimulation à -40 mV : 4 enregistrements sont présentés.

Pour un rat à P20, on présente la réponse de 6 canaux lors de deux stimulations, à -40 et -60mV respectivement.



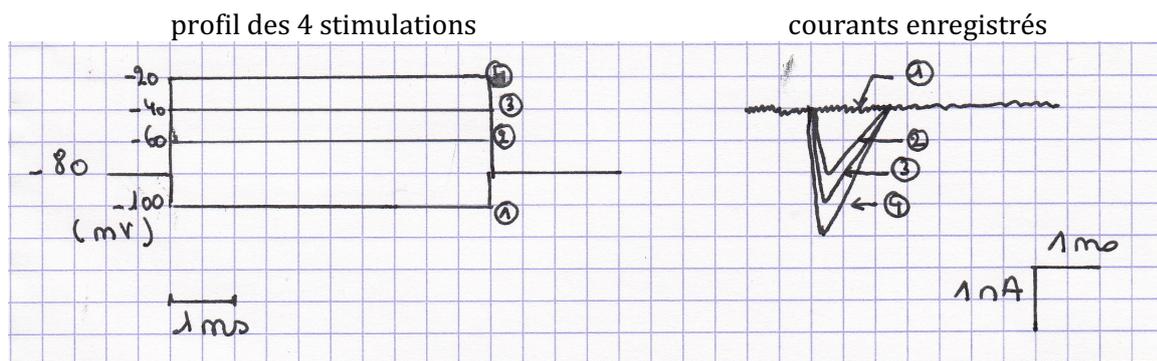
Q : Etudiez la réponse des canaux potassiques à P20 et caractérissez le ou les canaux potassiques de la membrane plasmique d'une cellule sensorielle à vingt jours.

Q : En utilisant les documents 15-1-A et 15-1-B, déterminez l'évolution de la composition membranaire en canaux potassiques.

Document 5-2 : caractérisation de canaux sodiques sur cellule entière

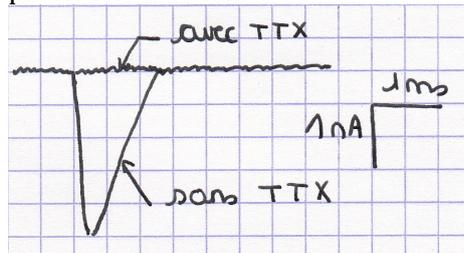
5-2-A On étudie les courants transmembranaires de cellules sensorielles de l'oreille de rat de 1 jour par un patch clamp en configuration cellule entière.

On impose à la cellule en patch-clamp divers voltages, de -100 à -20 mV, et on mesure le courant sodique transmembranaire.

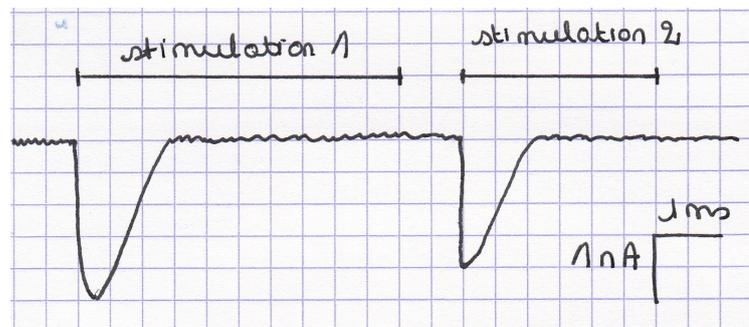


Q : Interprétez les résultats de cette expérience.

5-2-B- L'expérience est répétée pour une stimulation à -20 mV, avec et sans tétrodotoxine (TTX). La TTX est connue pour inactiver spécifiquement les canaux sodiques neuronaux responsables des potentiels d'action.



5-2-C- L'expérience est répétée en enchainant deux stimulations : une première stimulation de 5 ms à -20 mV et une seconde de 3 ms à -20 mV

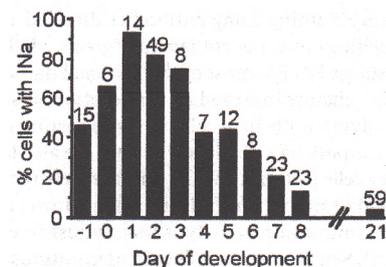


5-2-D- évolution de la conductance au sodium au cours du temps.

On estime la proportion de cellules sensorielles de l'oreille montrant une conductance au sodium sensible à TTX.

Le jour 0 est le jour de la naissance.

Les valeurs notées sur les barres d'historgramme représentent le nombre de cellules testées.

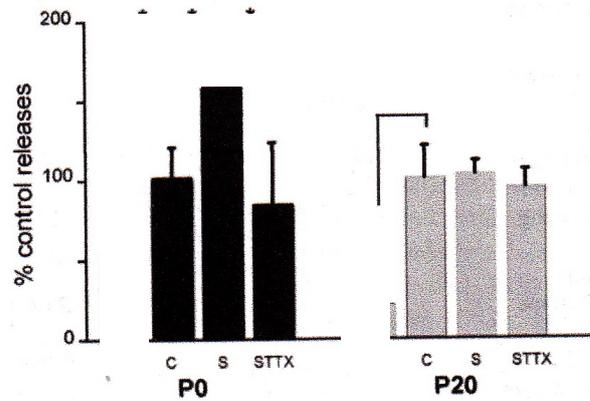


Q : Interprétez les documents 5-2B, 5-2-C et 5-2-D et déterminez trois propriétés des canaux sodiques étudiés.

Document 5-3 : libération de la neurotrophine BDNF par les cellules sensorielles de l'oreille.

BDNF est un polypeptide stimulant la croissance et la survie des neurones ainsi que la synaptogenèse.

On quantifie chez le rat la libération de BDNF par les cellules sensorielles de l'oreille, au jour 0 et au jour 20, dans des cellules au repos (lot C), dans des cellules stimulées électriquement (lot S) et dans des cellules stimulées électriquement et traitées à la TTX (lot STTX). La libération de BDNF est exprimé en pourcentage de la libération en conditions standards.



Q : Interprétez les résultats de cette expérience.

Q : Construisez un schéma bilan présentant l'évolution de la composition membranaire en canaux ioniques dans les cellules sensorielles de l'oreille du rat.