

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
EXAMEN DE RATRAPAGE
A. VERDIER

Conditions d'examens

Documents **X** **Non autorisés**
Calculatrice **X** **Non autorisée**

Remarques particulières

Etre concis et clair.

Exercice 1 (1h15)

La synthèse de la glycoprotéine G du virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) peut être effectuée dans un système de traduction *in vitro* auquel sont ajoutés des oses et des vésicules provenant du réticulum endoplasmique rugueux (REG). Ces microsomes rugueux sont traités à la RNase. Le système est initié par addition de l'ARNm codant pour cette glycoprotéine G.

Expérience 1 : Plusieurs expériences sont menées en parallèle, dans lesquelles l'ARNm codant pour la glycoprotéine G est traduit en présence de méthionine (Meth*) ou de mannose (Man*) radioactifs, en présence ou en absence de microsomes rugueux. Ces vésicules, provenant du REG, ont préalablement été traitées à la RNase. A la fin du temps nécessaire à la traduction totale de l'ARNm (soit 15 min), les préparations sont traitées ou non à la trypsine (protéase). Toutes ces différentes modalités expérimentales sont précisées dans le tableau 1.

Tableau 1 :

Echantillon	A	B	C	D	E	F	H	Glycoprotéine extraite à partir de la particule virale
Méth*	+	0	+	+	0	+	0	
Man*	0	+	0	0	+	0	+	
Microsomes rugueux	0	0	0	+	+	+	+	
Traitement trypsine en fin de traduction	0	0	+	0	0	+	+	
Pôle – G (69kDa)								—
G1 (67kDa)								
G'1 (64 kDa)								
Pôle + Go (63kDa)								
	—							

- 1/ Quelles informations apportent les expériences A, B, C, D et E ?
- 2/ En considérant les expériences F et H, indiquez ce que représente G'1 par rapport à G1. Ce résultat expérimental vous permet-il de localiser G1 par rapport à la double couche lipidique constitutive du REG ?
- 3/ Ces résultats vous permettent-ils de préciser la localisation cellulaire des enzymes de glycosylation responsables ici de l'apparition de G1 ?
- 4/ Le polypeptide de G1 est-il identique à G0 ?
- 5/D'après vos connaissances, pouvez-vous expliquer la plus faible migration électrophorétique de la glycoprotéine mature, c'est-à-dire celle extraite du virus ?
- 6/ Afin de ne pas alourdir le début du texte de ce problème, une précision expérimentale n'a pas été donnée : 2min après l'introduction de l'ARNm, l'expérimentateur a ajouté un inhibiteur de la traduction au contenu de chacun des tubes de réaction. A votre avis, pourquoi une telle précaution a-t-elle été prise ?
- 7/ Faites un schéma représentant les formes de G0, G1 et G'1 en les situant par rapport aux vésicules microsomaux. Le domaine du polypeptide qui porte les chaînes oligosaccharidiques sera signalé par une flèche.

Nous venons de voir que cette glycoprotéine était transloquée à travers la membrane du REG. Le problème est maintenant de déterminer quand se fait cette translocation par rapport aux différentes étapes de sa synthèse.

Expérience 2 : Une série d'expériences est menée de la même façon que celles présentées en D et F du tableau 1, à la différence que les microsomes rugueux ne sont pas présents dans le milieu réactionnel au moment où on ajoute d'ARNm, mais ajoutés à différents temps après le début de la traduction. Dans tous les cas, 15min plus tard, le milieu réactionnel est, comme pour les expériences D et F traité ou non par de la trypsine puis soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS d'une autoradiographie (tableau2).

Tableau 2 :

Addition des microsomes temps après l'addition de l'ARNm	De 0 à 3 min		De 3 à 15 min	
Traitement trypsique en fin de traduction	0	+	0	+
Molécules obtenues	G1	G'1	G0	aucune

8/ L'insertion du polypeptide dans les membranes peut-elle s'effectuer à partir d'un polypeptide totalement traduit (translocation post-traductionnelle) ?

9/ Jusqu'à quelle longueur maximale le polypeptide en cours d'élongation peut-il encore être inséré dans les membranes ? Cette longueur sera évaluée en nombre d'acides aminés, sachant que la traduction des 511 acides aminés constituant G0 demande 15 min dans les conditions utilisées pour ces expériences.

On a pu montrer que la glycoprotéine G contenait 2 chaînes oligosaccharidiques complexes qui s'associent au polypeptide au niveau du REG. Cette fixation ne se fait pas au hasard, mais au niveau d'un acide aminé spécifique (l'asparagine), lorsqu'il occupe une position particulière dans la séquence d'acides aminés.

Expérience 3 : L'expérience suivante a été entreprise afin de déterminer à quel niveau de la chaîne polypeptidique se fixent ces 2 chaînes oligosaccharidiques.

Le protocole de cette expérience est semblable à celui subi par les échantillons D et E de l'expérience 1, sauf qu'à différents temps après le début de la traduction, les microsomes présents dans le milieu réactionnel sont solubilisés par un détergent. Ce traitement ne perturbe pas la traduction des ARNm, qui se poursuit donc après solubilisation des membranes. Les produits synthétisés sont analysés 15min après le début de la traduction. Les résultats des différents autoradiogrammes sont présentés dans le tableau3.

Tableau 3 :

Solubilisation des microsomes : temps exprimé en minutes après l'addition de l'ARNm	De 0 à 5		De 5 à 10		de 10 à 15	
Précurseur radioactif dans le milieu réactionnel	Meth*	Man*	Meth*	Man*	Meth*	Man*
Pôle - G1 (67 kDa)					—	—
G'1 (65.5 kDa)			—	—		
Pôle + Go (63kDa)	—					

Seule la position des bandes est représentée dans ce tableau.

10/ Que représente G''1 ? On précise que cette bande apparaît aussi nettement que Go et G1 lorsque le précurseur radioactif est de la méthionine, alors que dans le cas d'un marquage au mannose elle est moins intense que G1.

11/ Les résultats présentés tableau 3 vous permettent-ils de déterminer l'emplacement des 2 chaînes oligosaccharidiques sur la chaîne polypeptidique contenue dans la forme G ? Considérons maintenant la glycoprotéine G insérée dans la membrane plasmique de la cellule infectée :

- Les acides sont numérotés de 1 à 495 ;
- Les acides aminés de 447 à 466 sont hydrophobes ;
- Les positions 163 et 320 sont occupées par des asparagines

12/ a- précisez à combien de nucléotides correspond la séquence signal de l'ARNm codant pour la glycoprotéine G.

b-que représente le domaine 447 à 466 ?

c- sur laquelle des faces, cytoplasmique ou externe de la membrane plasmique se trouvent localisées les chaînes oligosaccharidiques ? A laquelle des faces de la membrane du REG correspond-t-elle ?

d- l'information concernant les acides aminés 163 et 320 pourrait-elle être en accord avec votre réponse de la question 10 ?

e-précisez laquelle des extrémités du polypeptide est située sur la face externe de la bicouche lipidique. Indiquez la longueur du domaine extracellulaire.

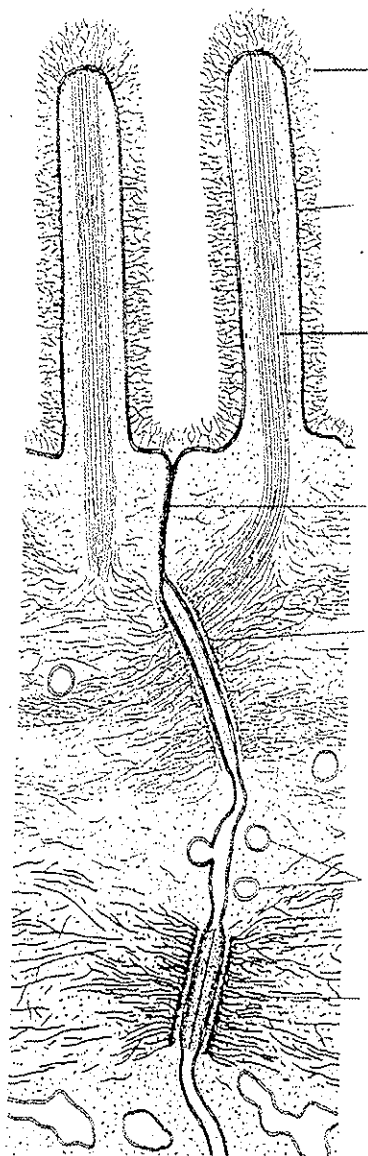
13/ En utilisant les renseignements apportés par les réponses précédentes, représentez la glycoprotéine G insérée dans la membrane plasmique de la cellule infectée.

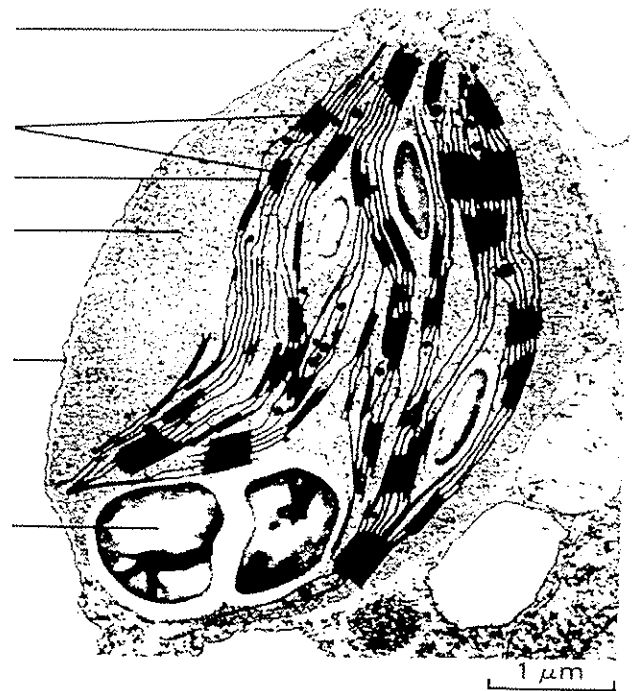
Question 1 (20 min) :

A l'aide d'un schéma, décrivez la composition de la vacuole et expliquez son rôle dans le fonctionnement cellulaire.

Question 2 (10 min) :

Veillez légendez les schémas suivants :





Question 3 (15 min) :

Expliquez ce que sont les prions et leur mode de fonctionnement.