

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
EXAMEN 2
A. VERDIER

Conditions d'examens

Documents

Autorisés

X **Non autorisés**

Calculatrice

X **Non autorisée**

4 opérations autorisée
tout type autorisée

Remarques particulières

Prenez bien en compte les temps conseillés. Utilisez également des schémas.
Soyez concis et clairs.

Rendre la page 3 avec la copie !

Exercice 1 (10 points) :

Synthèse des protéines lysosomales : la cathepsine.

La cathepsine D est une glycoprotéine phosphorylée, de masse moléculaire de 30 kDa, localisée dans la lumière du lysosome. Cette enzyme soluble a un rôle endoprotéasique. Elle représente moins de 0.1% de l'ensemble des protéines cellulaire, mais 11% de l'ensemble des enzymes lysosomales.

D'après vos connaissances :

- 1/ Sur quel type de ribosomes les enzymes sont-elles synthétisées ?
- 2/ Quel est le devenir immédiat du produit de traduction ?
- 3/ Quelles transformations ultérieures subit ce produit de traduction ? Dans quel compartiment ont lieu ces modifications ?
- 4/ Quelle est la fonction du mannose en position (6 Man-6-P) ?

Des expériences de synthèse *in vitro* et *in vivo* ont permis d'étudier la biosynthèse de la cathepsine D.

Synthèse *in vitro*

Les ARNm totaux extraits de fibroblastes (c'est un type de cellule fusiforme) en culture sont traduits *in vitro* dans un système acellulaire de synthèse, en présence ou en absence de ribosomes issus du réticulum endoplasmique rugueux -REG-, et avec de la méthionine ³⁵S pour marquer les produits de traduction.

On dispose par ailleurs d'anticorps polyconaux (anti 30kDa) dirigés contre la forme mature de l'enzyme, présente uniquement dans les lysosomes.

En fin de traduction, ces anticorps sont ajoutés au milieu réactionnel afin d'immunoprécipiter toute molécule synthétisée qui présenterait des analogies de structure avec l'enzyme mature. Les immunoprécipités obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium (SDS) et un agent réducteur, le mercapto-2-ethanol (celui-ci, en rompant les liaisons disulfure permet de libérer les polypeptides éventuellement impliqués dans une structure quaternaire).

L'autoradiographie des gels met en évidence :

- absence de ribosomes du REG, la synthèse d'une molécule de 45kDa
- en présence de ribosomes du REG, la synthèse d'une molécule de 53kDa

Synthèse *in vivo*

Expérience 1. : Différents lots de fibroblastes en culture subissent un marquage bref (pulse) par la méthionine ^{35}S suivi d'une chasse (en absence de radioactivité) ; à différents temps de chasse, des cellules sont prélevées, broyées et les homogénats cellulaires sont mis en présence des anticorps polyclonaux anti-30kDa. Les immunoprécipités obtenus sont analysés par électrophorèse en conditions réductrices sur gel de polyacrylamide – SDS, suivie d'une autoradiographie.

Les autoradiogrammes révèlent, en fonction du temps de chasse, l'apparition initiale dans les cellules d'une molécule de 53kDa, qui disparaît en même temps qu'une molécule de 47 kDa apparaît, laquelle disparaît, laquelle disparaît à son tour tandis qu'une molécule de 30 kDa s'accumule.

6/ Les molécules de 53, 47 et 30 kDa apparues dans les cellules ont-elles des éléments de structure communs ? Pourquoi ?

7/ Que pouvez-vous en déduire concernant les relations entre ces différents molécules, en fonction du temps et au sein, de la cellule ?

Expérience 2. : Le même type d'expérience que la précédente est effectuée, mais avec du ^{32}P et du mannose ^3H . On constate que les formes 53, 47 et 30 kDa sont glycosylées et phosphorylées. De plus, on a déterminé que la phosphorylation concerne le man-6-P.

8/ D'après vos réponses aux questions 1-4, ce résultat était-il prévisible ?

Les molécules de 45 kDa et 53 kDa sont appelées respectivement pré-procathepsine D et procathepsine D. D'autres types d'analyses ont permis de déterminer que :

- La molécule de 53 kDa a 20 acides aminés de moins à l'extrémité NH_2 par comparaison avec la forme 45 kDa ;
- La molécule de 47 kDa possède 339 acides aminés ; elle a perdu 44 acides aminés du côté NH_2 par comparaison avec la molécule de 53 kDa ;
- La molécule de 47kDa possède la même séquence à l'extrémité NH_2 qu'un fragment de 15 kDa non détecté dans cette expérience avec l'anti-30kDa. Le fragment de 15 kDa possède 97 acides aminés et une chaîne oligosaccharidique ;
- La forme mature de l'enzyme de 30kDa possède 242 acides aminés et une chaîne oligosaccharidique.

9/ En tenant compte de ces informations et des résultats des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo*, schématisez les différentes formes présentées par la cathepsine D au cours de sa maturation (masse moléculaire moyennée d'un acide aminé : 11 Da).

10/ Pourquoi n'a-t-on pas détecté la forme de 15kDa dans les produits de traduction avec le protocole utilisé ?

Exercice 2 (4 points) :

Détaillez la composition et le rôle de la matrice extracellulaire des cellules animales.

Exercice 3 (4 points) :

En prenant l'exemple d'un bactériophage, expliquez à l'aide de schémas le cycle de reproduction d'un virus.

Exercice 4 (2 points) :

Légendez et commentez cette figure :

