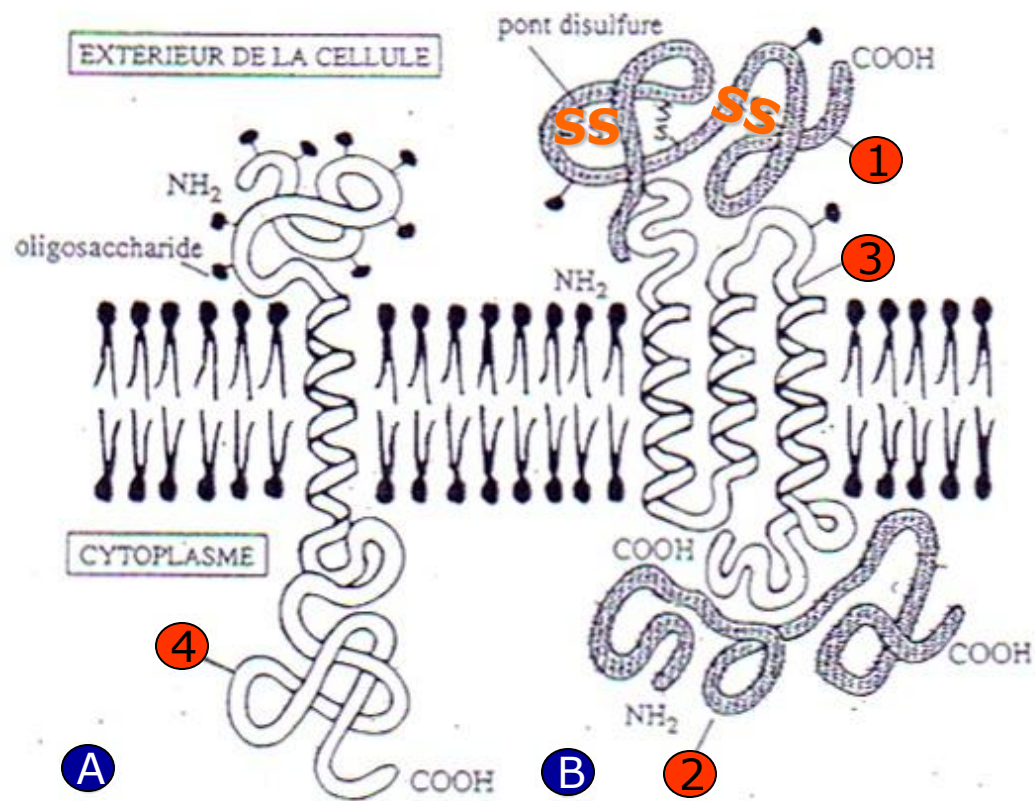


Exercice 1



	ProtA	ProtB	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3	Peptide 4
cytoplasmique	-	-	-	-	-	-
membranaire	oui	oui	oui	oui	oui	oui
périphérique	-	-	oui	oui	-	-
intrinsèque	oui	oui	-	-	oui	oui
transmembranaire	oui	oui	-	-	oui	oui

b)

	Peptide 1	Peptide 2	Peptide 3	Peptide 4
Pont S-S	oui	-	-	-
glycosylé	oui	-	oui	oui

c) pour les différents peptides composant la protéine B, utiliser leur position finale et leurs modifications post-traductionnelles éventuelles pour proposer leur mode de traduction et d'adressage. Quelles sont donc les différentes étapes de l'assemblage de la protéine B?

Peptide 2: ni ponts S-S, ni glycosylation

⇒ synthèse dans cytoplasme + adressage post trad

Peptide 1,3,4: ponts S-S + glycosylation

⇒ synthèse niveau du REG + adressage co trad

Étapes adressage:

- Peptide 3 : p mb intrinsèque
⇒ synthèse au niveau du REG avec insertion dans la membrane du REG (3 séq topogènes)
⇒ adressage via REG/Golgi (pas d'étiquette) avec vésicule de transport
- Peptide 1 : peptide mb périphérique extra-cellulaire
⇒ synthèse au niveau du REG, libéré dans lumière du REG
⇒ adressage via REG (Golgi (pas d'étiquette) avec vésicule de transport qui fusionne avec membrane plasmique
⇒ libéré dans matrice extracellulaire, y diffuse jusqu'à entrer en contact avec peptide 3, s'y fixe.
- Peptide 2 : peptide membrane intracellulaire
⇒ synthèse dans cytoplasme , libéré dans cytoplasme
⇒ diffuse jusqu'à entrer en contact avec peptide 3, s'y fixe.

Exercice 2

Les virus sont des parasites intracellulaires, c'est à dire qu'ils ne peuvent se répliquer que dans une cellule.

Le virus de la stomatite vésiculaire(VSV) est un virus de l'enveloppe. Les particules virales quittent la cellule infectée par bourgeonnement au niveau de certaines régions de la membrane plasmique où se sont préalablement concentrées les protéines virales nouvellement synthétisées. La **synthèse des protéines de l'enveloppe virale** s'effectue donc selon des modalités **semblables** à celles suivies par **les protéines constitutives de la membrane plasmique** de la cellule hôte.

Expérience 1: Des cellules animales en culture sont infectées par du VSV. De la méthionine ^{35}S est ajoutée au milieu de culture recouvrant le tapis de cellules infectées. Quelques heures après le début de l'infection, on recueille:

- D'une part les **particules virales libérées dans le milieu de culture**;
- D'autre part les **cellules par simple grattage du fond des boîtes de culture**.

Ces deux échantillons sont mis en **suspension** dans une solution contenant un **détergent** afin d'en solubiliser les constituants. Ces préparations sont analysées par **électrophorèse** en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). Les gels sont ensuite colorés par un **colorant spécifique des protéines et autoradiographiés**.

La coloration des gels correspondant aux particules virales révèle 5 bandes toutes les 5 visibles en autoradiographie.

a) Interprétez ce résultat

- particule virale contient 5 protéines de masses moléculaires \neq
- ces p ont été synthétisées dans la cellule infectée

Sur l'autoradiographie du gel correspondant aux cellules infectées, on n'observe que ces 5 mêmes bandes, alors que la coloration du gel révèle des dizaines de bandes.

b) Ce type d'infection virale conduit plus ou moins rapidement à la mort des cellules. Quel effet ce type d'infection virales exerce-t-il sur le métabolisme cellulaire?

- autoradiographie du gel ne révèle que 5 p virales; comme p cellulaires non radioactives \Rightarrow elles n'ont pas été synthétisées après la pénétration du VSV dans la cellule au moment où l'on a ajouté le précurseur radioactif au milieu de culture.
- ce type d'infection \Rightarrow inhibition de la synthèse des protéines cellulaires \Rightarrow mort des cellules infectées

Expérience 2: Le protocole de cette expérience est le même que précédemment, mis à part que le précurseur **radioactif est un ose** (glucosamine ^3H ou mannose ^3H) et que seules les particules virales sont analysées. L'autoradiographie et la coloration du gel révèlent qu'une seule bande correspondant à l'une des 5 protéines précédemment observées.

c) Quels sont les constituants de cette molécule que nous nommerons « G »?

G=glycoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique à laquelle sont associées des chaînes oligosaccharidiques

Les polysomes cytoplasmiques sont soit libres dans le cytoplasme, soit associés au réticulum endoplasmique granulaire (REG). Le problème est de déterminer au niveau de quel type de polysome sont synthétisées les protéines virales.

Expérience 3: Trois heures après infection de cellules en culture par du VSV, de la **méthionine ^{35}S ou du mannose ^3H** sont ajoutés pendant une **brève période** de 5min au milieu de culture des cellules infectées. Les cellules sont immédiatement lavées puis broyées, à partir de cet homogénat cellulaire, la **fraction correspondant au REG** (microsomes rugueux) est purifiée. Après solubilisation par un détergent, cette fraction subit une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS suivie d'une autoradiographie. Sur l'autoradiographie, quel que soit le marqueur radioactif utilisé, on ne détecte qu'une seule bande correspondant à la glycoprotéine virale.

d) Précisez le lieu de synthèse des différentes protéines constitutives du VSV.

Seule la glycop. G est trouvée au niveau des microsomes rugueux (ribosomes du REG), elle est donc synthétisée au niveau des polysomes liés au REG. Quant aux 4 autres p virales, elles sont synthétisées au niveau des polysomes (ribosomes) libres.

Les cellules infectées par le VSV constituent un excellent modèle pour l'étude de la synthèse et des modifications post-traductionnelles des glycoprotéines.

e) D'après les résultats précédents, pouvez-vous préciser les avantages de ce système.

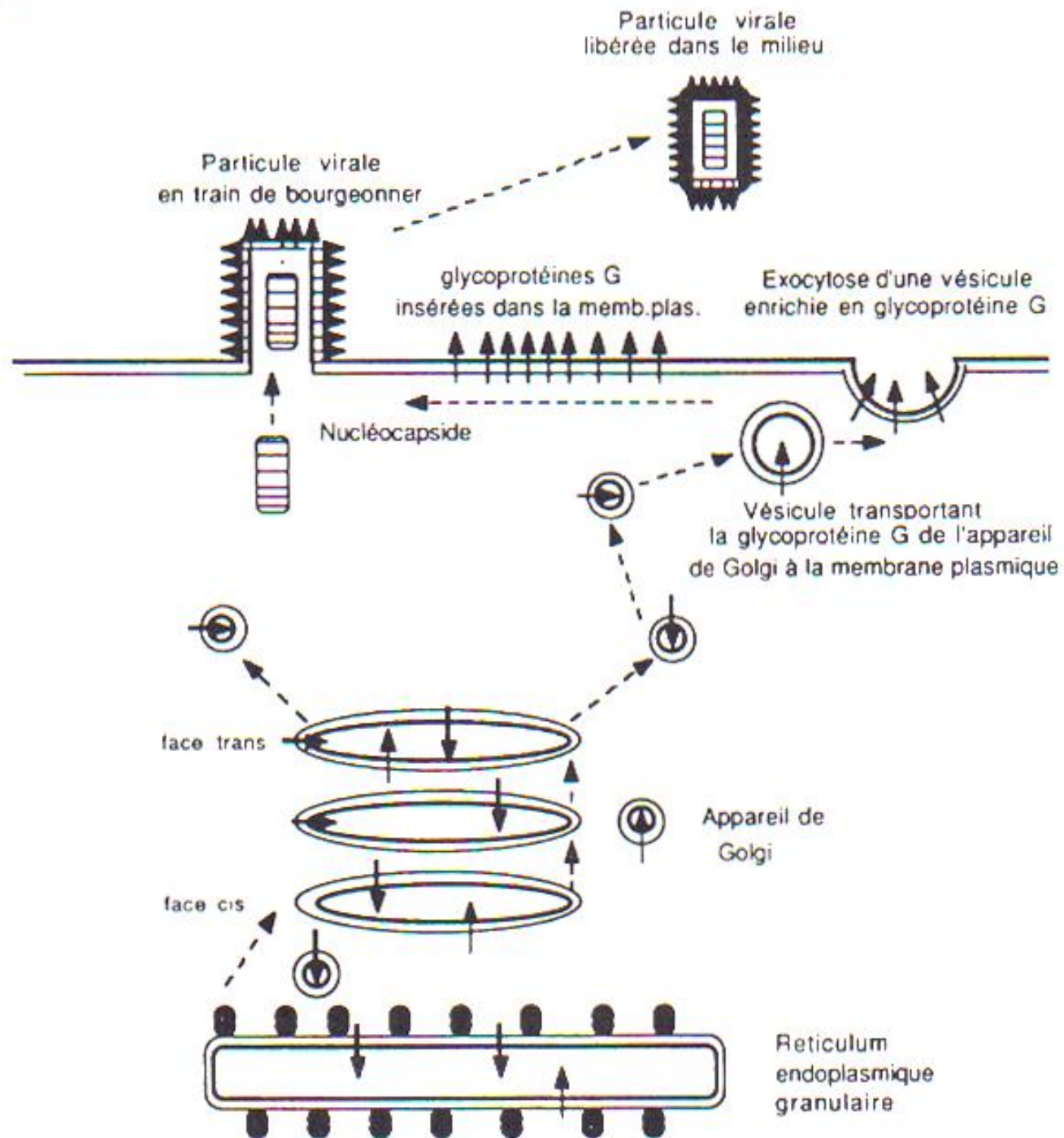
dans ces cellules: pénétration VSV \Rightarrow inhibition de la synthèse des p cellulaires. Les aa radioactifs ajoutés au début de l'infection ne risquent pas d'être incorporés dans les p cellulaires ce qui facilitera grandement l'étude de la synthèse des p puisque seules les quelques protéines virales synthétisées dans la cellule seront radioactives

+ le génome de VSV ne code que pour 1 glycop. Donc seule celle ci sera synthétisée au niveau du REG et transportée jusqu'à la mb plasmique de la cellule infectée. On pourra donc suivre ses modifs post traductionnelles

f) *In vivo*, dans quels compartiments cellulaires retrouverait-on la glycoprotéine G avant que le VSV ne quitte la cellule?

Le VSP quitte la cellule par bourgeonnement à partir de la mb plasmique des cellules infectées. Pour l'atteindre, la G est passée du REG à l'appareil de Golgi puis dans des vésicules d'exocytose

g) Faites un schéma représentant le cheminement intracellulaire de la glycoprotéine virale depuis son lieu de synthèse jusqu'à son intégration dans l'enveloppe de la particule virale. La glycoprotéine sera représentée par une flèche dont la pointe indiquera l'extrémité N terminal du polypeptide.



Exercice 3

On s'intéresse à la traduction d'un ARNm isolé de cellules de souris, en cherchant à déterminer la taille et la localisation de la protéine codée par cet ARNm.

Pour cela, on réalise la **traduction *in vitro*** de cet ARNm, en mettant dans un tube à essai tout ce qui est nécessaire: ribosomes, ARNt, ATP, acides aminés, enzymes, facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction. Dans ces tubes, on ajoute également des **vésicules de REG purifiées**. On **ajoute l'ARNm au temps 0**, et on laisse la traduction se dérouler durant 20 min.

A l'issue de cette réaction, on traite certains tubes par un détergent qui détruit les membranes biologiques, puis on ajoute éventuellement une protéase qui hydrolyse toutes les protéines en petits peptides ou en acides aminés.

Enfin, on analyse tous les tubes pour détecter la présence éventuelle d'une protéine traduite et pour déterminer sa masse moléculaire (MM).

a) Les différentes conditions expérimentales et les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

tube	1	2	3	4	5
REG	-	-	+	+	+
détergent	-	-	-	-	+
protéase	-	+	-	+	+
MM de la protéine détectée (en kDa)	21	-	19	19	-

Analysez ces résultats.

1: p21= taille totale de la protéine codée par l'ARNm

2: p21 digérée par la protéase

3: p19 + détergent = perte du p21 signal lors de l'entrée dans le cytoplasme

4: p19 p21 + détergent = p19 libéré par protéase

5: p19 digérée par protéase: dégradation de la mb du REG, p19 libre dans le tube

b) Quel pourrait donc être le compartiment de destination de la protéine codée par cet ARNm ?

P libérée dans la lumière du REG: sécrétée, lysosomes, vacuoles, Golgi, RE

c) On complique un peu l'expérience en réalisant maintenant des tubes où le REG est rajouté soit en début d'expérience soit à la fin des 20 min de traduction. Le détergent n'est par contre jamais ajouté. Les résultats sont les suivants :

tube	6	7	8	9
moment d'ajout du REG	début	début	fin	fin
protéase	-	+	-	+
MM de la protéine détectée (en kDa)	19	19	21	-

Qu'en concluez-vous ?

p19 libérée dans la

p21 donc avec peptide signal

p21 n'a pas été transférée dans le REG

le transfert dans REG et l'excision du peptide signal se font qu'en début de traduction mais pas une fois la protéine traduite (repliement de la p? signal caché???)

d) On traite maintenant le REG par un tampon de forte force ionique, ce qui a pour effet de détacher les protéines périphériques. Pourquoi ?

Les p périphériques sont liées par des liaisons faibles entre aa hydrophiles (liaisons H ou ioniques). Si tampon avec bq d'ions, les p périph vont faire des liaisons avec les ions plutôt qu'avec les p intrinsèques.

e) Dans les tubes sont ajoutés soit le REG après traitement par ce tampon, soit la solution de protéines périphériques recueillies, soit les deux. Les résultats sont les suivants :

tube	10	11	12	13	14	15
REG après traitement par tampon	+	+	-	-	+	+
protéines périphériques recueillies	-	-	+	+	+	+
protéase	-	+	-	+	-	+
MM de la protéine détectée (en kDa)	21	-	21	-	19	19

Les p périphériques et p intrinsèques du REG nécessaires aussi que la p21 entre dans le F

L'association mb du REG + p périphériques se reforme spontanément et redevient fonctionnelle pour transférer la p21 et exciser le peptide signal \Rightarrow il faut des p mb intrinsèques et périphériques

f) On teste maintenant des portions de REL. Les résultats sont les suivants :

tube	16	17	18	19
REL	+	+	+	+
protéines périphériques du REG	-	-	+	+
protéase	-	+	-	+
MM de la protéine détectée (en kDa)	21	-	21	-

Qu'en concluez-vous ?

p21 n'entre pas dans le REL
peptide signal
les p nécessaires au transfert sont
spé au REG

Il manque les p mb intrinsèques \Rightarrow pas de transfert

Exercice 4

On s'intéresse à la synthèse de la glycoprotéine G du virus de la Stomatite Vésiculaire à partir de son ARNm. Cette synthèse s'effectue dans un système de traduction *in vitro* similaire à celui décrit dans l'exercice 3 contenant en plus divers monosaccharides. De plus, on ajoute dans certains tubes des vésicules de REG purifiées, de la méthionine radioactive. Après 20 min de traduction, les différents tubes réalisés sont traités ou non par une protéase. On détecte ensuite uniquement les molécules radioactives produites, et on détermine leur masse moléculaire (MM)

Les différentes conditions expérimentales et les résultats obtenus sont les suivants :

tube	1	2	3	4	5	6
REG	-	-	+	+	+	+
Met radioactive	+	-	+	-	+	-
mannose radioactif	-	+	-	+	-	+
protéase	-	-	-	-	+	+
MM de la molécule radioactive obtenue (kDa)	56	-	60	60	58	58

1;2: la p produite sans REG n'est pas

3;4: avec REG, la p est glycosylée ⇒ + lourde ⇒ p60

5: la p 60 est partiellement dégradée par la protéase

6: la glycosylation n'est pas touchée ⇒ elle est coté REG dégradée

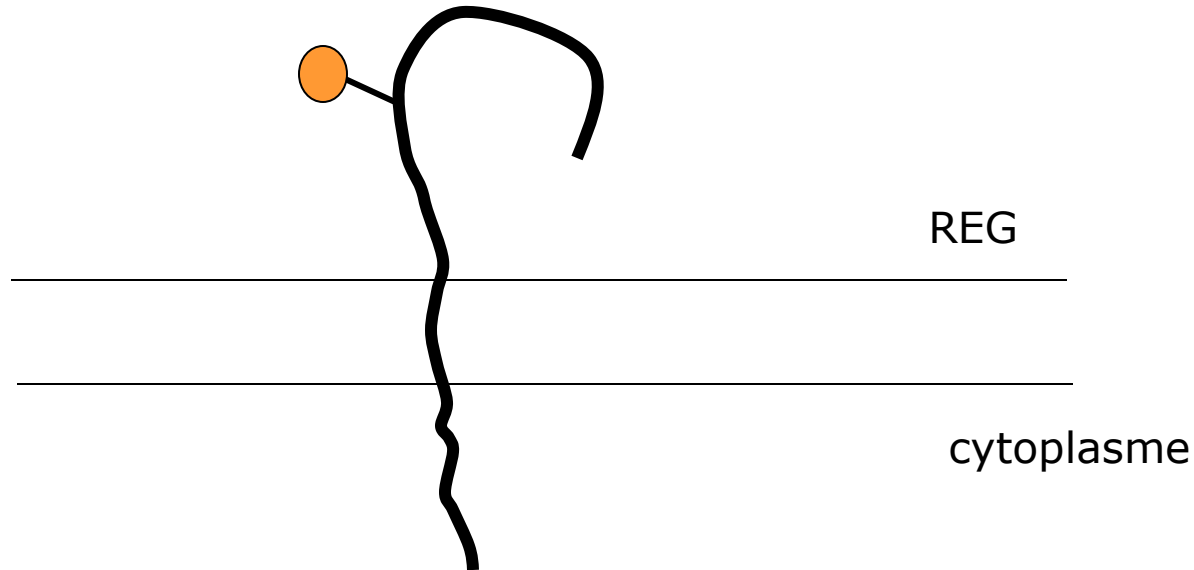
les p56 et p60 (c'est-à-dire de MM) la molécule p58 ? Comment se situe

donc la protéine p60

p56: p sans glycosylation mais avec peptide-signal

p60: p avec " " mais sans " "

p58: p avec " " mais sans partie cytoplasmique



b) De quel type de glycosylation s'agit-il ici ?

enzyme de glycosylation dans REG \Rightarrow liée à N

c) La glycoprotéine extraite à partir de la particule virale (et non pas obtenue dans le système de synthèse *in vitro*) a une MM de 62 kDa. Comment expliquez-vous la différence avec la molécule p60 obtenue dans le système *in vitro* ?

p62: + lourde car glycosylation complétée dans Golgi?

d) Afin de déterminer à quel niveau de la chaîne peptidique se fait la glycosylation, une expérience complémentaire est réalisée. Le protocole de départ est identique, mais on ajoute en cours d'expérience un détergent qui provoque la destruction des vésicules de REG, sans perturber cependant le déroulement de la traduction en cours. La protéase n'est jamais ajoutée en fin d'expérience. Les résultats sont les suivants :

tube	7	8	9	10	11	12
REG	+	+	+	+	+	+
Met radioactive	+	-	+	-	+	-
Man radioactif	-	+	-	+	-	+
ajout du détergent (en min après le début de l'expérience)	5	5	10	10	15	15
MM de la molécule radioactive obtenue (kDa)	54	-	57	57	60	60

A quoi correspond p54 ? Et p57 ?

Sachant que la traduction complète des 511 acides aminés codés par l'ARNm demande 15 min dans les conditions de cette expérience, quelles seraient les différentes positions de glycosylation dans la chaîne peptidique ?

7;8: après 5 min de traduction, la p n'est pas encore glycosylée mais

9;10: après 10 min de traduction, la p glycosylée mais pas aussi lourde que normale

11;12: après 15 min de traduction p

⇒ 2 Oligosaccharides accrochés un après 5 min l'autre après 10 min

⇒ 511 aa en 15 min = 34 aa /min

D'où 1^{ère} glycosylation entre 5-10min = aa 170-341

2^{ème} glycosylation entre 10-15min = aa 341-511

e) La glycoprotéine G extraite du virus est constituée de 495 acides aminés. Comment expliquer la différence avec la valeur de 511 acides aminés donnée ci-dessus ?

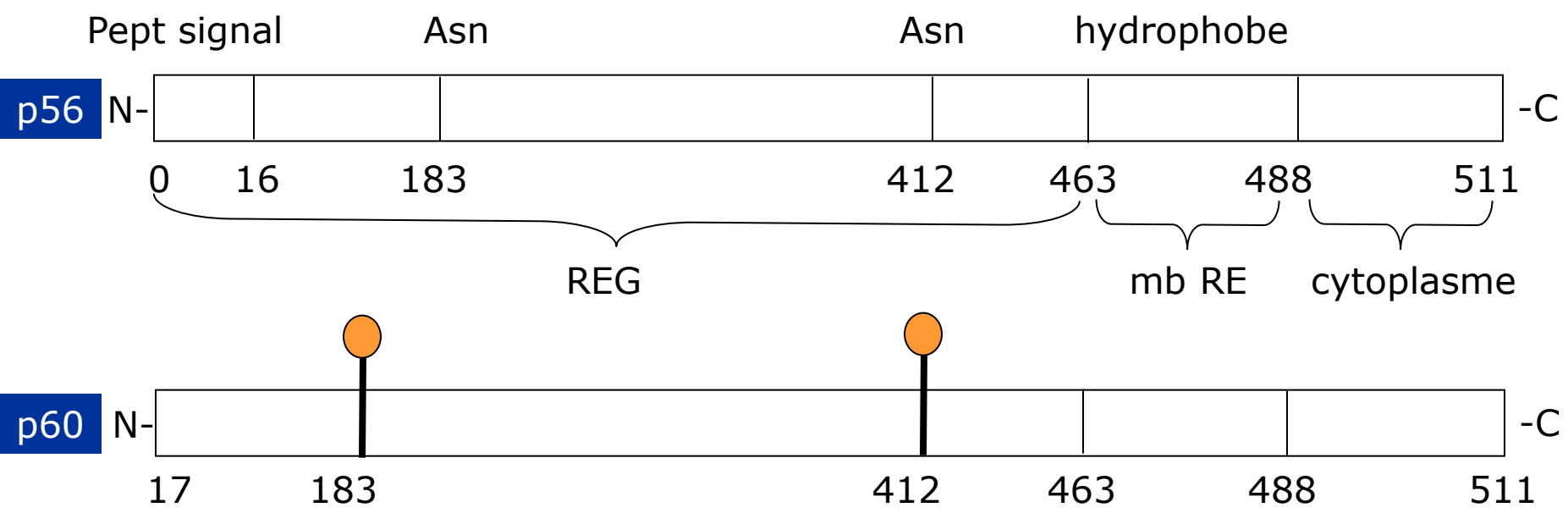
⇒Perte du peptide signal (16aa)

f) L'étude de la séquence primaire de cette glycoprotéine G montre que les acides aminés 463 à 488 sont hydrophobes et que les positions 183 et 412 sont occupées par des asparagines.

Représenter par un schéma la structure détaillée de p56, en indiquant les positions des acides aminés remarquables ainsi que les extrémités de la chaîne peptidique. Quelle serait donc la longueur du domaine cytoplasmique ? Sachant qu'en moyenne un acide aminé a une MM de 110 Da, cela est-il compatible avec les résultats obtenus précédemment ?

Faire un deuxième schéma représentant maintenant p60, après sa traduction/glycosylation dans le REG. Les informations du premier schéma seront reprises, et la position de la membrane du REG sera indiquée.

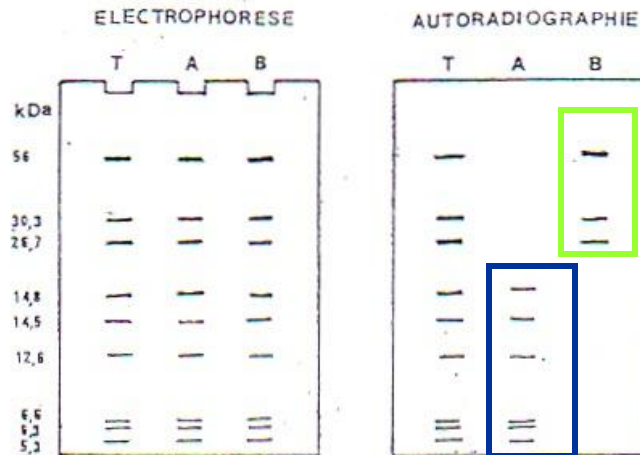
Domaine cytoplasmique: coté C terminal ⇒ 489-511 d'où 23aa ⇒2.5kDa, compatible avec différence entre p58 et p60
Glycosylation sur Asn 183 et 412



Exercice 5

La cytochrome oxydase est une enzyme située dans le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, où elle assure le transfert final des électrons vers l'oxygène. Cette enzyme est en fait un complexe formé de 9 protomères différents. On souhaite déterminer dans quels compartiments cellulaires ils sont synthétisés. Pour cela, on étudie des cellules de Levure, que l'on cultive dans 3 conditions différentes. Le lot témoin (T) reçoit un mélange l'acides aminés marqués radioactivement, afin de permettre la détection des protéines qui viennent d'être synthétisées. Le lot A reçoit en plus du chloramphénicol, une molécule qui bloque sélectivement le fonctionnement des ribosomes de type procaryote (ribosomes bactériens, mitochondriaux ou chloroplastiques). Le lot B reçoit lui en plus de la cycloheximide qui bloque sélectivement le fonctionnement des ribosomes de type eucaryote (ribosomes cytoplasmiques).

a) Après 2 jours de culture, les cellules de ces 3 lots sont lysées, les mitochondries sont isolées, puis traitées par un détergent pour détruire leurs membranes, ce qui permet de rendre soluble la cytochrome oxydase et de la purifier. Les différents protomères sont séparés par électrophorèse (en fonction de leur masse moléculaire) puis on détermine par autoradiographie quelles bandes sur le gel d'électrophorèse contiennent de la radioactivité. Les résultats sont les suivants :



Synthétisés par rib cytopl. ⇒ codés dans le noyau

Synthétisés par rib mitochond. ⇒ codés dans mitochondries

Dans quels compartiments cellulaires ces différents protomères sont-ils synthétisés ? Par conséquent, quelle est la localisation de l'information génétique correspondante ?

b) Une 2^{ème} expérience est réalisée : des cellules sont à nouveau mises en culture suivant les 3 conditions décrites précédemment, puis les cellules sont broyées après 2 ou 4 jours de culture et l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase est dosée :

nombre de jours de culture	2 jours			4 jours		
lot	T	A	B	T	A	B
activité de la cytochrome oxydase	++++	+	+	++++	-	-

Comment expliquer que l'activité ne devienne pas complètement nulle dans les lots A et B après 2 jours ?
Comment expliquer que l'activité devienne complètement nulle dans les lots A et B après 4 jours ?
Ces résultats sont-ils compatibles avec les précédents ?

Lot A et B après 2j ou 4 j: grosse perte d'activité de la cytochrome oxydase \Rightarrow synthèse non complète \Rightarrow compatible avec a)

Lot A et B après 2j : activité non nulle car il reste de l'enzyme active synthétisée avant l'ajout de l'inhibiteur

Lot A et B 4 j: activité nulle car toute l'enzyme synthétisée avant ajout de l'inhibiteur est maintenant dégradée \Rightarrow 1/2 vie courte

c) Une 3^{ème} expérience est ensuite réalisée : à l'issue de 2 jours de culture dans les 3 conditions, les cellules sont préparées pour analyse en microscopie électronique afin de déterminer la localisation cellulaire des protéines radioactives synthétisées. Les résultats sont les suivants :

lot	T	A	B
radioactivité dans le cytosol	++++	++++	-
radioactivité dans les mitochondries	++++	++	+

Quelles sont les protéines radioactives dans les 2 compartiments analysés du lot **T** ?

Comment expliquer la présence de protéines radioactives dans les mitochondries du lot **A** ?

Comment expliquer l'absence totale de protéines radioactives dans le cytosol du lot **B** ?

Comment expliquer la faible quantité de protéines radioactives dans les mitochondries du lot **B** ?

Ces résultats sont-ils compatibles avec les précédents ?

p radioactives du lot T:

ds cytopl = ttes les p cytopl. synthétisées par les rib-cytopl.

ds mitoch = ttes les p mitoch synthétisées par les rib cytopl. + rib mitoch

p radioactives dans mitoch du lot A = p mitoch synthétisées par les rib cytopl puis importées

Pas de p radioactives dans cytopl du lot B = car pas de transfert de p synthétisées dans mitoch puis importées dans cytopl.

peu de p radioactives dans mito du lot B = car peu de p codées et traduites dans mitoch