

Devoir surveillé de SVT n°2*Biologie*

Durée de l'épreuve : 2 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt un professeur surveillant qui vérifiera et éventuellement remplacera le sujet.

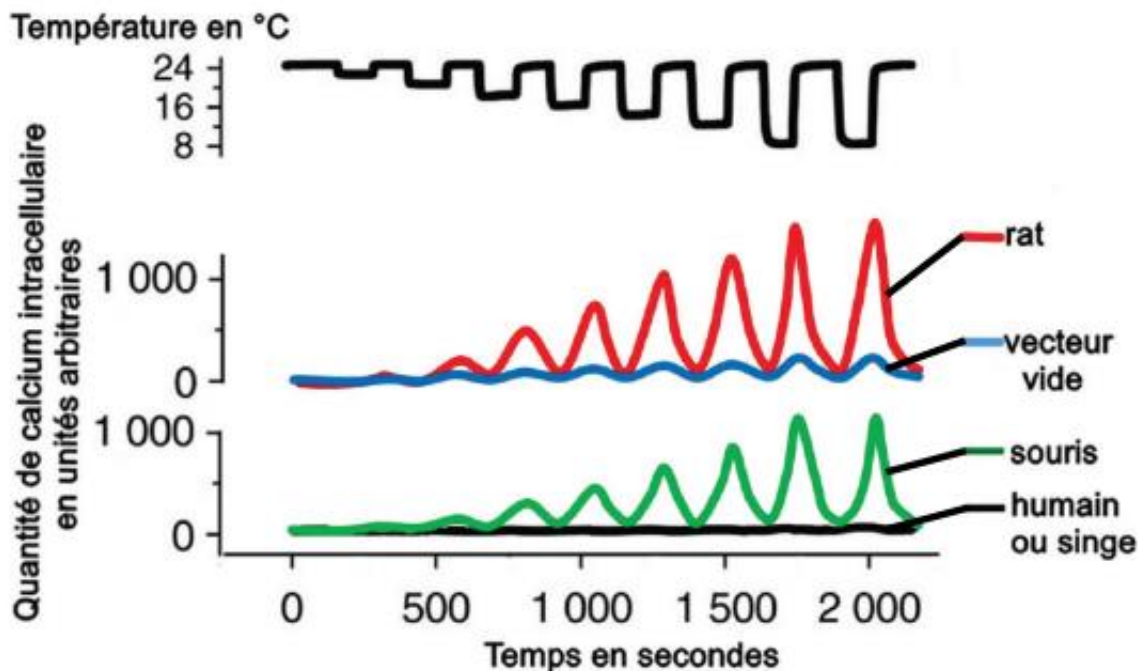
- Les numéros des questions et des documents étudiés seront clairement indiqués sur la copie.
- Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation à partir de l'analyse des documents proposés, en vous aidant de vos connaissances et en adéquation avec les consignes explicites propres à chaque question. Les réponses seront précises, concises et structurées.
- Le plus grand soin sera apporté à la présentation et à l'orthographe, ainsi qu'à la clarté et à la concision de vos réponses. Aucune abréviation non conventionnelle ne sera utilisée sans que n'en soit mentionnée la signification.

Les deux thèmes du sujet sont indépendants.

A - Fonctionnement du canal TRPA1 chez les rongeurs et les primates

Le canal ionique TRPA1 a été découvert chez certaines espèces comme étant un récepteur au froid, qui laisse entrer du calcium dans les neurones sensoriels. Cette étude a pour but d'étudier le fonctionnement et le rôle de ce canal chez différentes espèces animales.

On a introduit, dans des cellules non neuronales en culture, le gène du récepteur TRPA1 de différentes espèces. Les espèces étudiées sont le rat, la souris, le singe rhésus et l'homme. Le gène est transféré au sein d'un vecteur qui permet son expression et la traduction de la protéine. On insère dans certaines cellules le vecteur «vide» sans le gène *TRPA1*. La quantité de calcium intracellulaire est mesurée grâce à une molécule qui est fluorescente en présence de calcium. On refroidit les cellules par paliers, en partant d'une température de 24°C pour terminer à 8°C.



Document 1.1 Évolution de la quantité de calcium intracellulaire en fonction de la température, dans des cellules exprimant le récepteur TRPA1 de différentes espèces, ou ayant reçu un vecteur vide.

Les résultats pour les primates (humain ou singe) sont les mêmes.

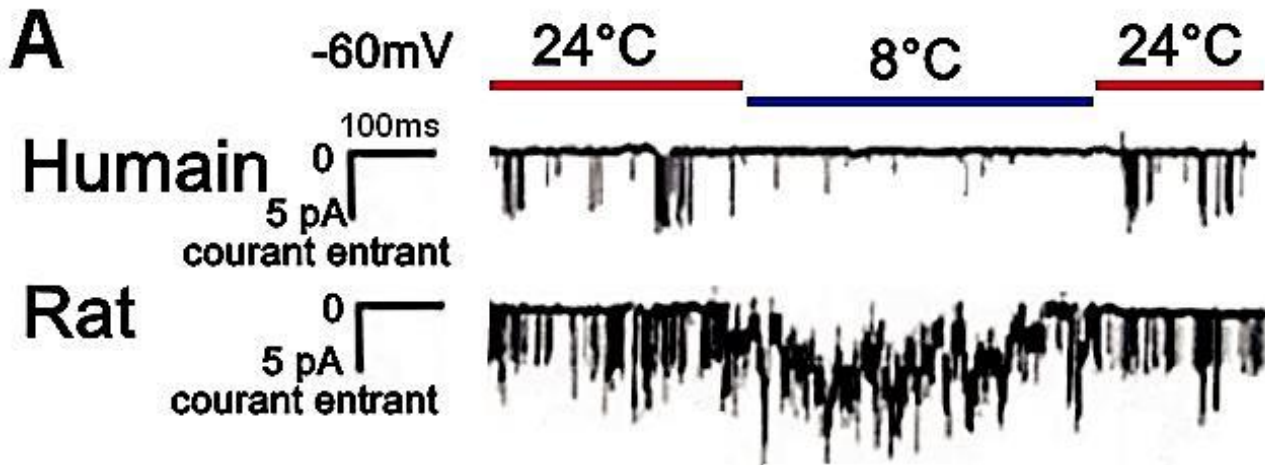
Question 1.1a. En 5 lignes maximum, expliquer le rôle du vecteur vide dans cette expérience.

Question 1.1b. À partir du document.1.1, déterminer le(s) rôle(s) du récepteur TRPA1 chez les rongeurs et les primates. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour expliquer la différence entre ces deux groupes ?

Les résultats de l'expérience précédente ne permettent pas de conclure sur l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire. En effet, ce dernier peut provenir soit d'une entrée de calcium dans la cellule à partir de l'extérieur, soit d'une libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique. Il est donc nécessaire de compléter ce travail.

On réalise sur les membranes plasmiques des mêmes cellules que précédemment, des enregistrements en voltage imposé, par la méthode de patch-clamp. Le voltage est fixé à -60mV durant toute la durée de l'expérience, et on fait varier la température, de 24 à 8°C. On mesure alors l'intensité du courant ionique entrant à travers un fragment de la membrane (document 1.2A), ce qui permet de quantifier la probabilité d'ouverture des canaux ioniques membranaires à une température donnée (document 1.2B).

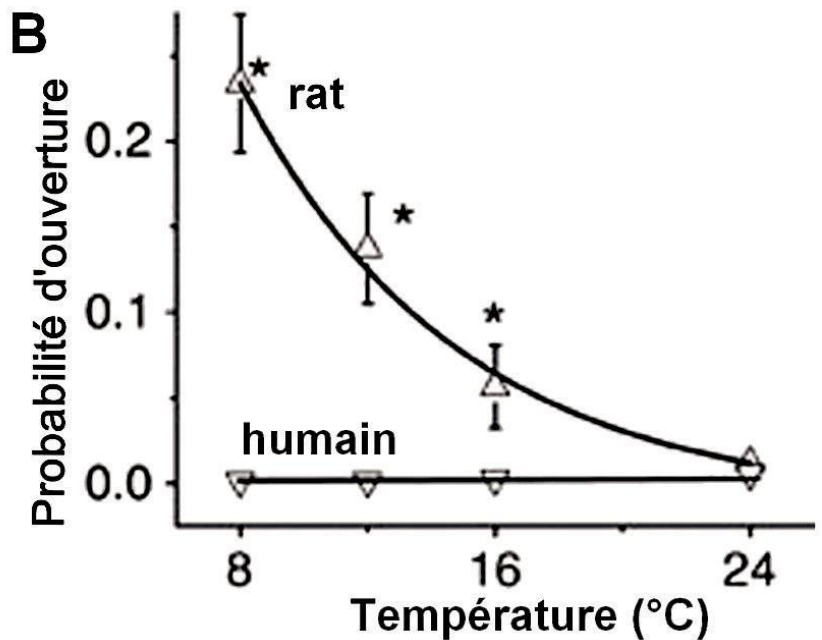
Question 1.2. À l'aide du document 1.2 proposer un mécanisme expliquant les différences entre rat et humain observées dans le document 1.1



Document 1.2A. Enregistrement en patch clamp de cellules exprimant le récepteur TRPA1 de rat ou humain, à 24 ou 8°C. Les courants sont en picoampères (pA), et le temps en millisecondes.

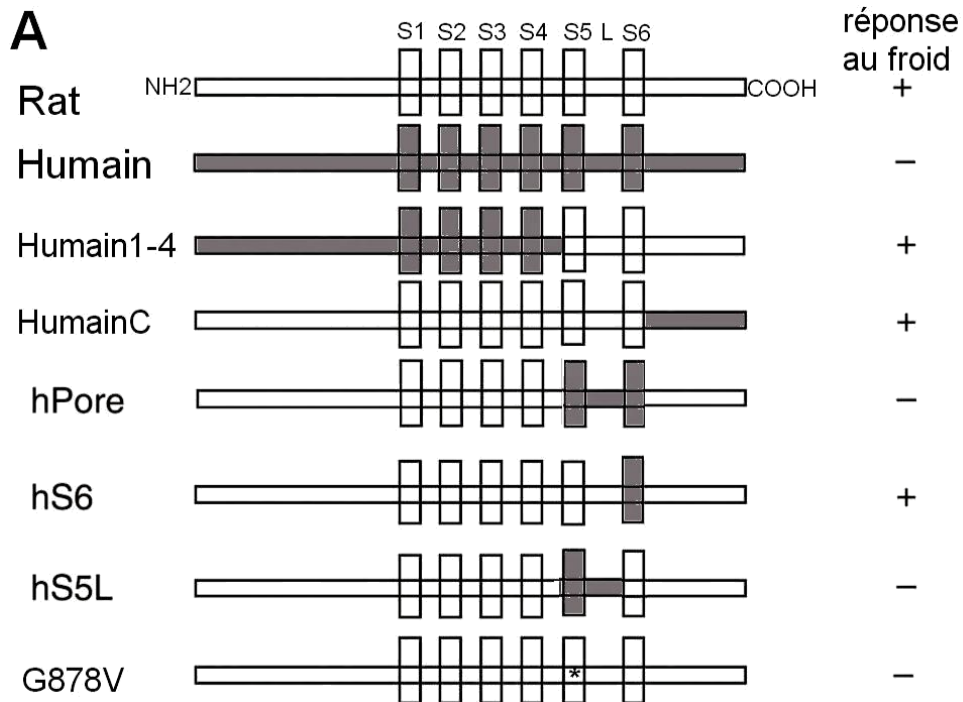
Document 1.2B. Probabilité d'ouverture des canaux en fonction de la température (de 8 à 24°C). Ce graphique a été construit à partir de nombreux tracés comme celui de la figure A.

Les barres sont des écarts-types et les étoiles signalent des différences statistiquement significatives entre le rat et l'humain.

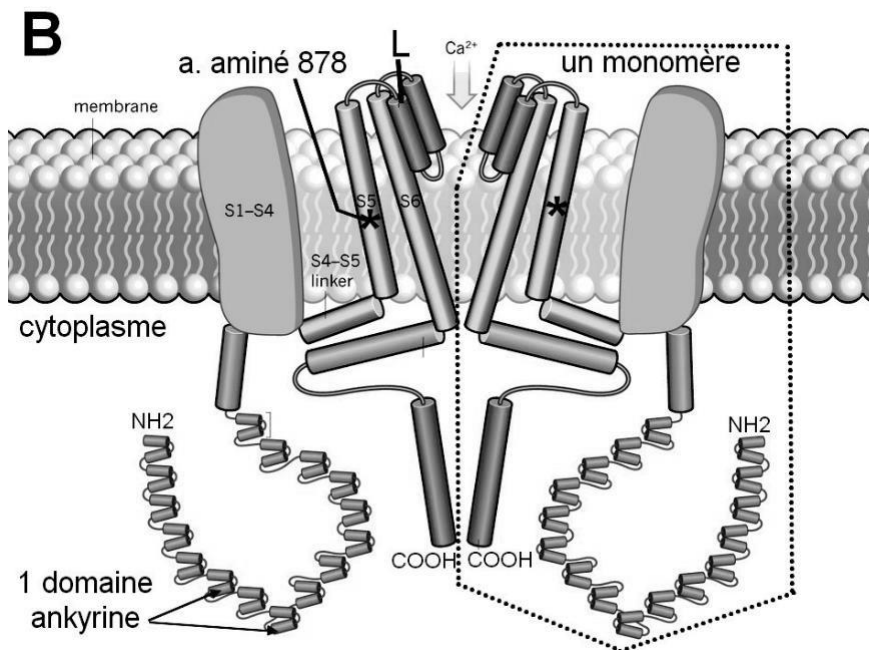


On a construit des protéines chimères comportant des portions de séquences du récepteur de rat et des portions de séquence du récepteur humain. On a par ailleurs séquencé les deux récepteurs et on a mis en évidence une mutation sur l'acide aminé 878. Chez le rat, cet acide aminé est toujours le glutamate (G), alors que chez l'homme c'est la valine (V). Pour chacune de ces protéines (chimère ou mutée), on teste sa réponse au froid. Les résultats sont donnés dans le document 1.3A. La localisation de ces séquences dans le récepteur est précisée dans le document 1.3B.

Question 3. Analyser chaque construction du document 3A afin de déterminer quelle partie de la protéine est responsable de la réponse au froid. Proposer une hypothèse sur le fonctionnement des canaux TRPA1 du rat, en utilisant la figure 3B.



Document 1.3A. Réponse au froid, mesurée par la même technique que précédemment. Cette réponse existe (+) ou non (-) pour des protéines TRPA1 chimères, contenant des séquences de rat (en blanc) et des séquences humaines (en gris), ou une mutation ponctuelle (*). S désigne une hélice alpha transmembranaire. L est la zone de lien entre les hélices 5 et 6. G878V désigne la mutation de l'acide aminé 878, qui est normalement un glutamate chez le rat, en une valine.



Document 1.3B. Structure du récepteur TRPA1.

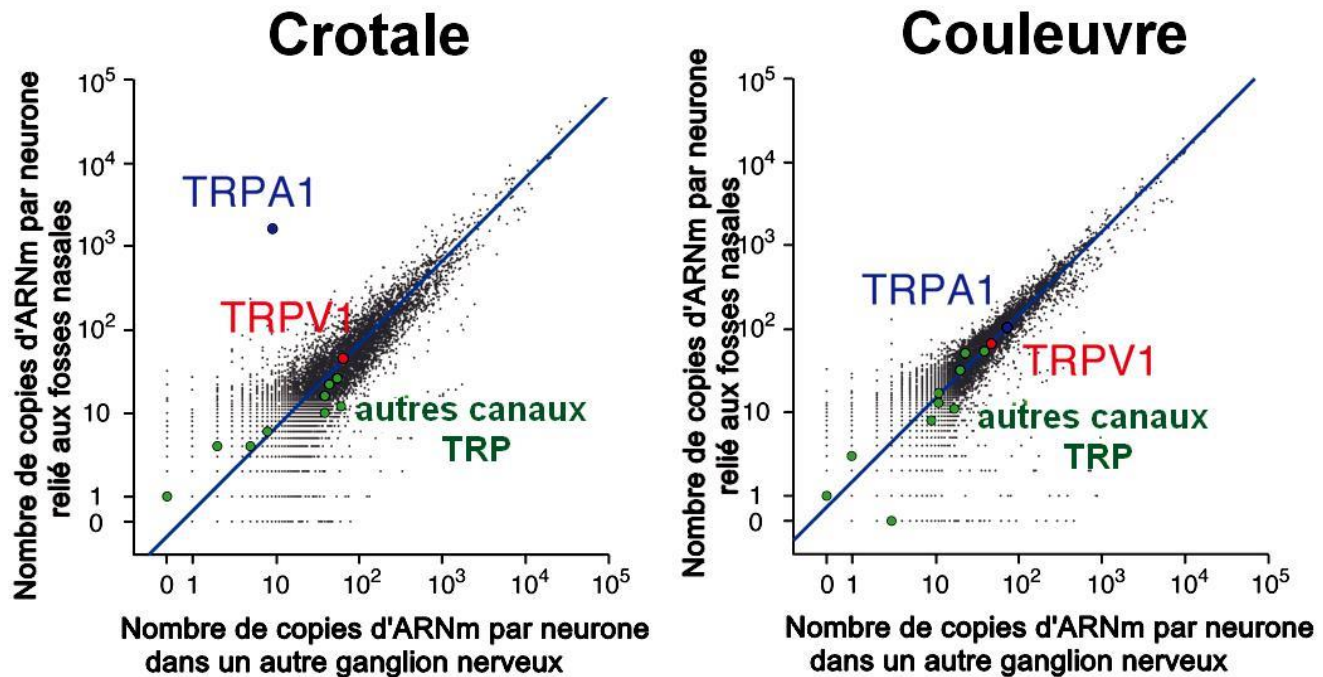
Le récepteur TRPA1 est un dimère formé de deux sous-unités identiques. Les hélices alpha S1 à S4 ne sont pas dessinées séparément. La séquence L (lien entre les hélices 5 et 6) est la même que celle du document 1.3A. L'étoile désigne l'acide aminé 878 de l'hélice S5.

B - La détection des infrarouges chez les serpents et le canal TRPA1

Certains serpents, comme le crotale, peuvent détecter les proies à « sang chaud » grâce à un organe sensible aux infrarouges (IR). Les couleuvres, elles, n'ont pas cette capacité. Il a été démontré chez d'autres espèces que les serpents, que des canaux de type TRP jouent un rôle important dans la perception de la chaleur.

Deux hypothèses pourraient expliquer une perception différente chez ces deux serpents : soit ils produisent des canaux différents, soit ils expriment les mêmes canaux mais avec des niveaux d'expression différents.

Pour répondre à cette question, des chercheurs ont analysé l'ensemble des ARNm (transcriptome) de neurones. Ils ont comparé le transcriptome des neurones reliés aux fosses nasales sensibles ou non aux infrarouges, au transcriptome d'autres neurones sans lien avec cette fonction.



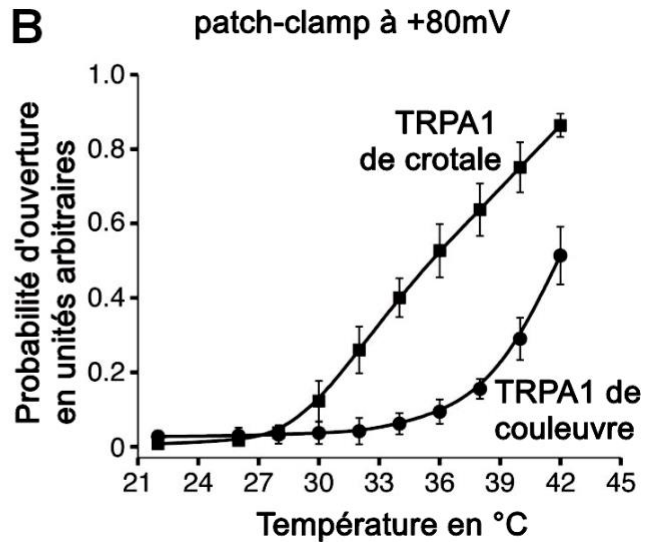
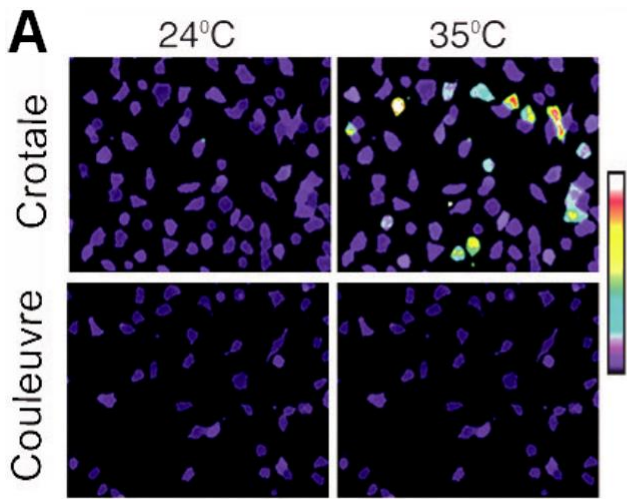
Document 1.4. (document reproduit sur l'annexe en couleur).

Comparaison du nombre de copies d'un même ARNm par neurone sensoriel des fosses nasales sensibles ou non aux infrarouges et dans un autre type de neurones, chez le crotale et la couleuvre.

TRPA1 (en bleu) comme TRPV1 (en rouge) sont des canaux TRP, mais il en existe encore d'autres (en vert).

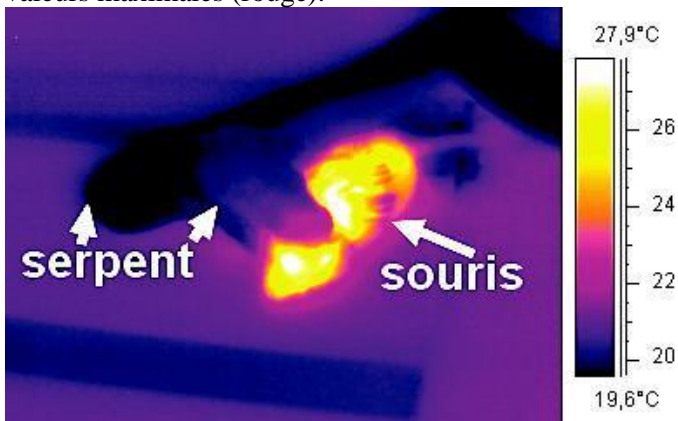
Question 1.4. Montrer comment les résultats du document 1.4 valident l'une des deux hypothèses évoquées précédemment.

Comme dans la partie précédente, on fait s'exprimer dans des cellules non neuronales les gènes codant les canaux TRPA1 de crotale ou de couleuvre. Les cellules ont été remplies avec un composé fluorescent en présence de calcium. Par ailleurs, on mesure en patch-clamp les courants entrants dans ces cellules, pour différentes températures.



Document 1.5A. (document reproduit sur l'annexe en couleur).
Fluorescence proportionnelle à la quantité de calcium dans des cellules exprimant le canal TRPA1 de crotale ou de couleuvre, pour différentes températures. La quantité de calcium est convertie en un code couleur, allant d'une quantité indétectable (violet), jusqu'aux valeurs maximales (rouge).

Document 1.5B. Courant enregistré en patch-clamp à partir de ces cellules exprimant l'un ou l'autre des canaux TRPA1.



Document 1.5C. (document reproduit sur l'annexe en couleur).
Photographie avec une caméra infrarouge d'un serpent attrapant une souris, avec à droite la correspondance entre les couleurs de la photographie et les températures.

Question 1.5a. En quoi la fonction de cette protéine chez les serpents est-elle différente de celle des rongeurs ?

Question 1.5b. Laquelle des deux hypothèses évoquées précédemment est validée par les documents 15-A et 15-B ? Conclure sur la validité des deux hypothèses.

Question 1.5c. En vous appuyant sur le document 1.5C, expliquez en quoi les canaux TRPA1 peuvent contribuer à un comportement de prédation différent chez le crotale et la couleuvre, sachant que crotale et couleuvre consomment tous les deux des rongeurs.

THÈME 2. QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DES PRIONS

Le terme de prion fut introduit pour la première fois en 1982 par Stanley Prusiner et correspond à l'acronyme de *PR*oteinaceous *IN*fectious *ON*ly *P*article (particule protéique infectieuse), abrégés PrP. Les prions se distinguent très nettement des agents infectieux conventionnels comme les bactéries, les virus. Pour l'ensemble de ses travaux, Prusiner a obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1997.

Les prions de mammifères sont les agents responsables des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prion. Parmi les EST les plus connues, on peut citer chez l'homme les différentes formes de la maladie de Creutzfeld-Jakob, l'insomnie fatale familiale (IFF), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), le Kuru et chez l'animal, la tremblante du mouton et de la chèvre (scrapie en anglais), l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).

L'ensemble de ces maladies se caractérise par une dégénérescence du système nerveux central liée à la propagation et la multiplication des prions chez l'hôte infecté. D'un point de vue anatomo-pathologique, on observe ainsi au niveau de l'encéphale la formation de vacuoles (donnant un aspect spongieux au cerveau, d'où le nom de spongiforme dans EST), une mort des neurones, une gliose (multiplication des cellules gliales entourant les neurones) et l'accumulation d'une protéine de l'hôte, une forme anormale de la protéine prion.

A. Nature et propriétés des prions

Les premiers travaux de Stanley B. Prusiner ont consisté à déterminer la nature de l'agent infectieux de la tremblante. Sur le modèle du hamster, les travaux ont consisté à mesurer le pouvoir infectieux de l'agent en déclenchant la maladie par inoculation de l'agent purifié et traité. Le tableau du document 2.1 ci-dessous récapitule certains de ces traitements et leurs résultats.

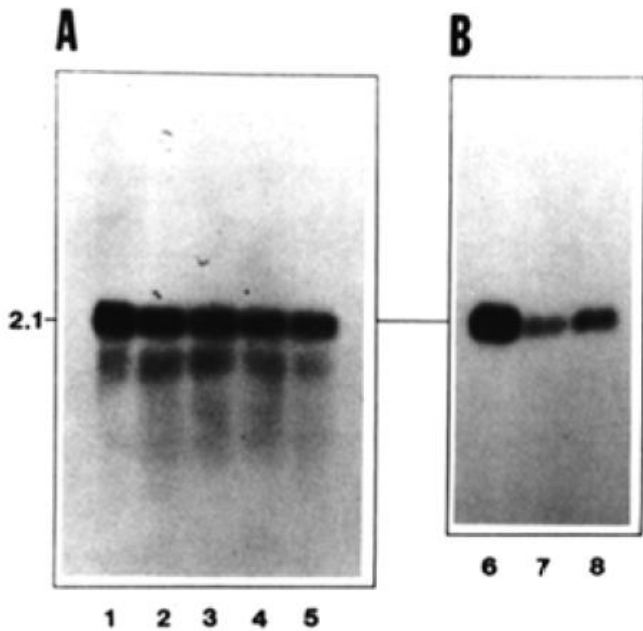
Traitement de l'agent de la tremblante		Propriétés infectieuses
Digestion par des protéinases	Protéinase K, trypsine	non
Détergents	SDS (Sodium dodécyl sulfate)	non
Ions	Forte concentration de Na ⁺ , K ⁺	non
Dénaturants	Urée	non
Solvants organiques	Méthanol, éthanol	non
Digestion par des nucléases	Ribonucléases Désoxyribonucléases	oui
Irradiation aux UV (254 nm)		oui

Document 2.1. Effets de différents traitements sur les propriétés infectieuses de l'agent de la tremblante
(D'après *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*, S.B. Prusiner, *Science*, 1982)

Question 2.1 À l'aide du document 2.1, et en précisant l'effet des différentes substances utilisées, émettre des hypothèses sur la nature et les propriétés de l'agent de la tremblante".

On purifie les ARNm totaux de cerveaux sains et de cerveaux infectés par la tremblante à différents moments après l'inoculation. Une électrophorèse suivie d'un *northern blot* avec l'ADNc PrP marqué au ³²P et d'une autoradiographie est réalisée. Les résultats sont présentés sur le document 2.2.

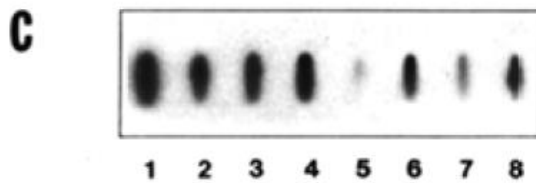
Question 2.2 Quelles informations sur l'expression du gène PrP sont fournies par le document 2.2 ? Conclure.



A. Analyse par *northern blot* des ARN de cerveau.
 Puits 1 : ARNm extraits de hamster non inoculés âgés de 40 jours.
 Puits 2 à 5 : ARNm extraits d'hamster infectés par la tremblante après 24 heures, 20 jours, 40 jours et 60 jours d'inoculation.

Les ARN situés sous la bande à 2.1 kb sont attribués à une dégradation de l'échantillon.

B. Analyse par *northern blot* des ARNm de différents organes d'animaux non infectés : cerveau (puits 6), cœur (puits 7) et poumons (puits 8).

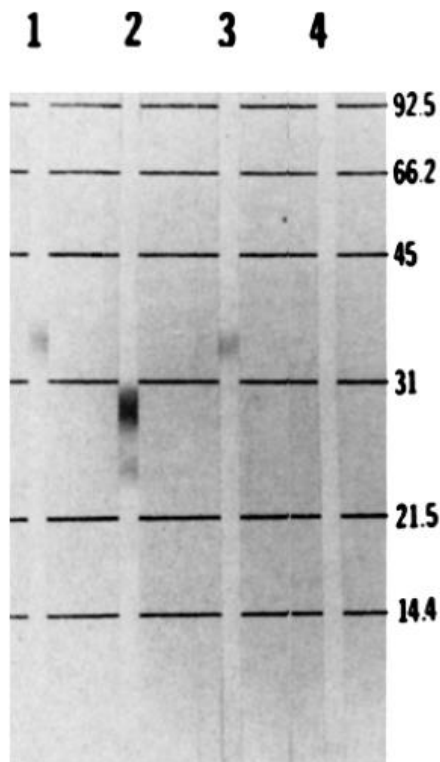


C. Analyse par *northern blot* des ARNm de différents organes d'animaux infectés : du cerveau (puits 1), du cœur (puits 2), des poumons (puits 3), du pancréas (puits 4), du foie (puits 5), de la rate (puits 6), des testicules (puits 7) et des reins (puits 8).

Document 2.2. Détection des transcrits ARNm de hamster sains et infectés par la tremblante
 (D'après *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*, Oesch et al., Cell, 1985)

La purification de l'agent de la tremblante dans des cerveaux de hamster infectés met en évidence une protéine dont le poids moléculaire (PM) apparent est de 27 à 30 kDa ($1 \text{ kDa} \approx 1 \text{ kg.mol}^{-1}$). Cette protéine notée PrP 27-30 est en quantité très importante dans les cerveaux infectés mais elle existe également avec un PM de 33 à 35 kDa dans les cerveaux sains (PrP 33-35).

L'analyse de la quantité de PrP 27-30 a été faite par *immunoblot* avec ou sans digestion à la protéinase K dans des cerveaux de hamsters infectés et sains. Le *western blot* est visualisé par des anticorps anti-PrP 27-30. Le sarkosyl (Sodium lauroyl sarcosinate) est un puissant détergent ; à ce titre, il désorganise les membranes. Les résultats sont présentés dans le document 2.3.



Colonnes 1 et 2 : extraits de cerveaux infectés.
 Colonnes 3 et 4 : extraits de cerveaux sains.
 La digestion par la protéinase K est montrée sur les puits 2 et 4.

Les *western blots* sont conduits avec un anticorps anti PrP 27-30.
 La quantité de protéines déposée est la même dans tous les puits.

Document 2.3. *Immunoblots* d'extraits traités au sarkosyl de cerveaux contrôle et de cerveaux d'hamster infectés par la tremblante
 (D'après *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*, Oesch et al., Cell, 1985)

Question 2.3. Interpréter les résultats du document 2.3. Quelle différence fondamentale apparaît dans le comportement de PrP 33-35 de cerveaux sains et infectés ?

Les travaux suivants sont réalisés chez des hamsters inoculés ou non avec l'agent de la tremblante. L'inoculation est intracérébrale et les cerveaux de hamster sont collectés à partir de hamsters sacrifiés après 60 jours d'infection ou à partir de cerveaux de hamsters non infectés de même âge.

Les cerveaux sont broyés puis homogénéisés et l'homogénat est fractionné par centrifugation différentielle à 4°C pendant 60 minutes. La présence de PrP est testée dans les fractions par un anticorps anti PrP 27-30 sur des échantillons de volume identique des différents culots et surnageants. La présence (+) ou l'absence (-) de PrP est notée. Les résultats sont présentés dans le document 2.4.

	PrP 33-35	PrP 27-30
Homogénat	+	+
Culot (1000 × g)	+	+
Surnageant (1000 × g)	+	+
Culot (10,000 × g)	+	+
Culot (100,000 × g)	+	+
Surnageant (100,000 × g)	-	-

Document 2.4. Présence de PrP 33-35 et PrP 27-30 dans le fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle de cerveaux de hamsters infectés par la scrapie

(D'après *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*, Meyer et al. PNAS, 1986)

Informations supplémentaires importantes

- PrP 33-35 a été mise en évidence dans tous les culots de centrifugation obtenus à partir de cerveau de hamsters infectés par l'agent de la tremblante et de hamsters non infectés mais elle est absente du surnageant obtenu à haute vitesse.

- La concentration de PrP 33-35 dans les cerveaux infectés par l'agent de la tremblante est augmentée de 5 à 10 fois, 60 jours après l'inoculation intracérébrale, en comparaison avec les cerveaux non infectés.

Question 2.4a. Qu'est-ce qu'une centrifugation différentielle ? Qu'obtient-on aux différentes étapes et à la fin du protocole ?

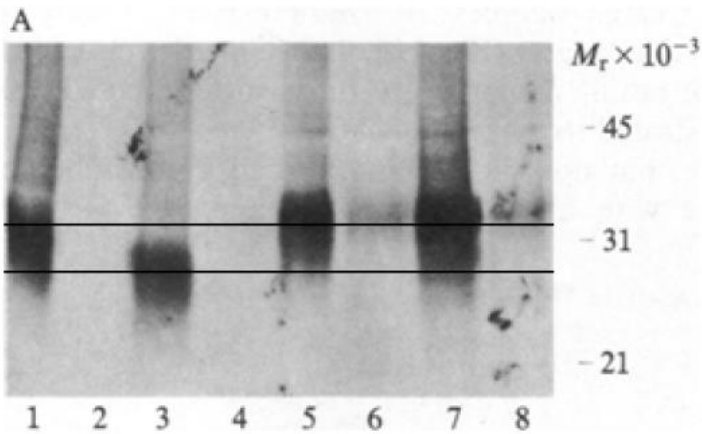
Question 2.4b. Analyser les données du document 2.4 ; préciser notamment la localisation sub-cellulaire de la protéine PrP.

On montre que des cerveaux de hamster infectés par la scrapie contiennent des protéines prions notées PrP 33 -35^{Sc} (ou plus simplement PrP^{Sc}). Or une protéine similaire notée PrP 33 - 35^C (ou plus simplement PrP^C) est trouvée dans des cerveaux sains.

On cherche à savoir dans quelles proportions PrP^{Sc} et PrP^C sont présentes grâce à des *immunoblots* de différents extraits de cerveaux de hamsters infectés de scrapie ou non. La révélation se fait grâce à des anticorps anti-PrP (document 2.5).

Question 2.5a Analyser les résultats du document 2.5

Question 2.5b Proposer un schéma bilan précisant la localisation et le rapport entre les différentes protéines PrP.



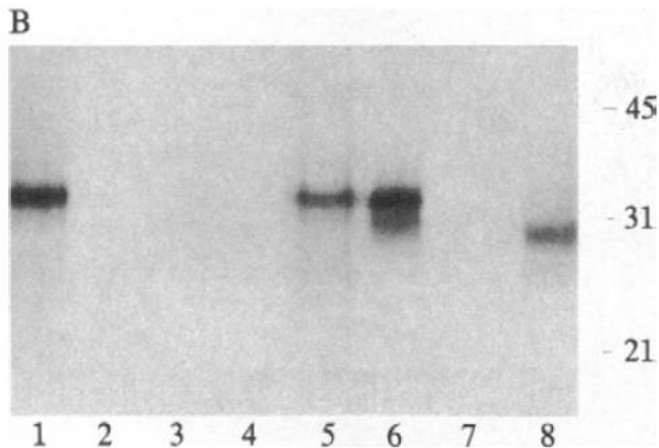
A. Immunoblot de la PrP.

Les échantillons des puits 1 à 4 ont été digérés 30 minutes avec la protéinase K à 100 µg / mL. Les échantillons 5 à 8 n'ont pas été traités à la protéinase.

Puits impairs : échantillons obtenus à partir de hamsters infectés de scrapie.

Puits pairs : échantillons obtenus à partir de hamsters non infectés.

Le sarkosyl a été ajouté aux aliquotes des fractions microsomales 1, 2, 5 et 6.



B. Les petites particules cytoplasmiques sont extraites au détergent sarkosyl puis les échantillons sont analysés par *immunoblot*. Le surnageant et les culots obtenus par centrifugation prolongée sont testés.

Puits 1 à 4 : échantillons obtenus à partir d'animaux non infectés.

Puits 5 à 8 : échantillons obtenus à partir d'animaux infectés.

Puits 1 et 5 : surnageant, sans protéinase K.

Puits 2 et 6 : culot, sans protéinase K ajoutée.

Puits 3 et 7 : surnageant digéré par la protéinase K.

Puits 4 et 8 : culot digéré par la protéinase K.

Document 2.5. Analyse de la PrP^C ou PrP^{Sc} des extraits de cerveaux de hamsters infectés ou non infectés
Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

(D'après *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*, Meyer et al. PNAS, 1986)

B. Organisation moléculaire et conversion PrP^C en PrP^{Sc}

Le gène *PrP* est entièrement codant et sa taille est de 720 nucléotides. On montre par ailleurs que PrP 27-30 possède 142 acides aminés.

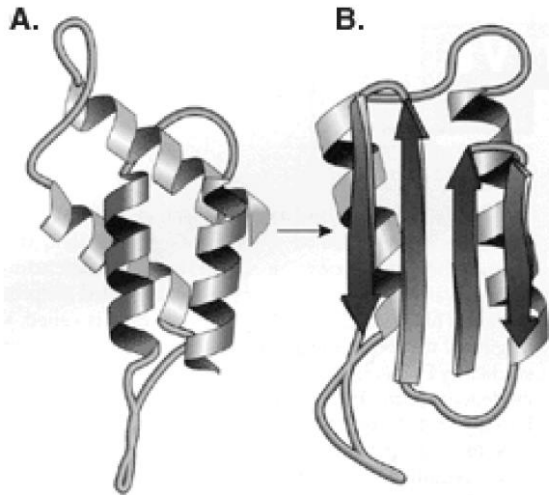
Question 2.6. Que pouvez-vous dire de la protéine codée par le gène *PrP* ? Qu'en déduisez-vous sur la protéine PrP 27-30 ? On rappelle que le PM moyen d'un acide aminé est de 110 Daltons.

PrP^C et PrP^{Sc} présentent la même structure primaire. Des études de spectroscopie ont permis de déterminer la structure secondaire des protéines prions PrP^C, PrP^{Sc} et PrP 27-30. Le contenu en structures secondaires est donné dans le document 2.6A. La conformation est donnée dans le document 2.6B.

Structure	PrP ^C	PrP ^{Sc}	PrP 27-30
Hélice	42	30	21
Feuillet	3	43	54
Coude	32	11	9
Boucle	23	16	16

Document 2.6A Proportions en structures secondaires mesurées par spectroscopie (en pourcentage)

(D'après *Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*, Pan et al., PNAS, 1993)



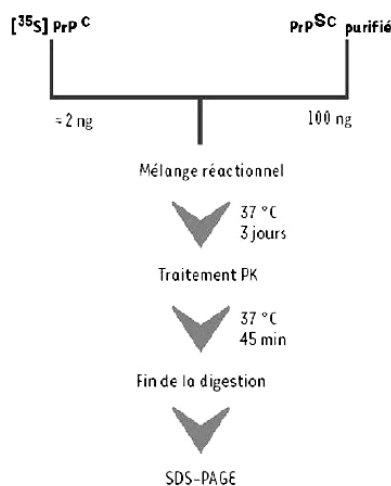
Document 2.6B. Structures tertiaires de la PrP^C (en A) et de la PrP^{Sc} (en B)

La structure tertiaire de la PrP 27-30 n'est pas encore bien connue, elle est particulièrement difficile à établir.

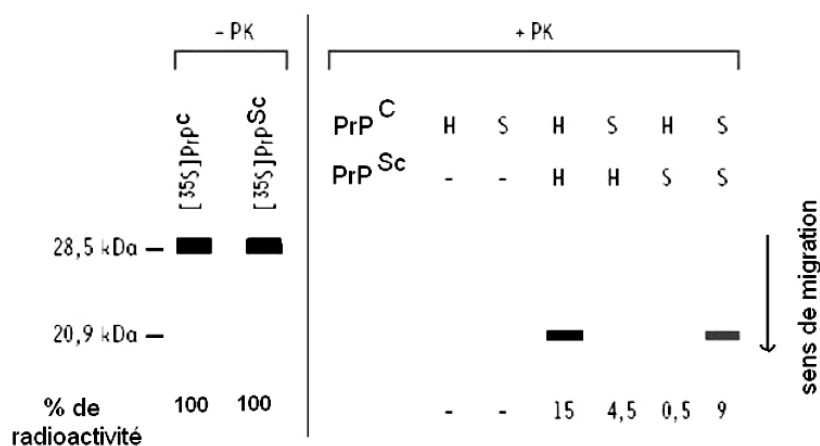
Question 2.7 À l'aide des documents 2.6A et B, préciser comment sont organisées PrP^C, PrP^{Sc} et PrP 27-30. Relier les conclusions issues de la question 2.5b aux conformations de PrP^C, PrP^{Sc} et PrP 27-30.

En 1996, le groupe de B. Caughey a pu mettre en évidence la relation entre PrP^C et PrP^{Sc} in vitro dans un système acellulaire. La réaction utilise de la PrP^{Sc} résistante à la protéinase K, extraite et purifiée de cerveaux d'animaux infectés, et de la PrP^C marquée au ³⁵S radioactif. Après incubation de plusieurs heures, le mélange réactionnel est soumis à une digestion par la protéinase K puis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le principe de l'expérience et les résultats sont présentés dans le document 2.7. Dans ces conditions expérimentales, PrP^C et PrP^{Sc} ont un poids moléculaire de 28,5 kDa. La digestion par la protéinase K (notée PK) produit une protéine de 20,9 kDa.

Question 2.8. Que montrent les résultats du document 2.7 ? Conclure sur les particularités de la multiplication de l'agent infectieux de la tremblante.



A. Principe de l'expérimentation



B. Schéma des résultats de l'électrophorèse

Document 2.7. Principe (en A) et schéma des résultats de l'électrophorèse après autoradiographie (en B)

En B : à gauche, résultats de l'électrophorèse de PrP^C et PrP^{Sc} marquées au ³⁵S ; à droite, résultats de l'électrophorèse de différents mélanges de PrP^C et de PrP^{Sc}.

Mélanges réalisés en présence de PrP de hamster (H) ou de souris (S) ou en l'absence de PrP (-).

Le pourcentage de radioactivité indique le pourcentage de radioactivité dans la bande marquée par rapport à la quantité de PrP^C radioactive au départ.

(Résultats simplifiés, d'après La protéine prion : structure, dynamique et conversion in vitro, J. Torrent, M/S 2002)

FIN DE L'ÉPREUVE