

## Correction du devoir surveillé de SVT n°2

### Biologie

#### THÈME 1. ÉTUDE DU RÉCEPTEUR AU FROID TRPA1

**Q1a.** Le vecteur vide est un **témoin négatif** qui permet de s'assurer que la seule présence du vecteur n'influe pas sur le paramètre mesuré (la quantité de calcium intra cellulaire)

**Q1b.** Le document 1 montre que la quantité de calcium intra cellulaire augmente transitoirement (pendant environ 250 secondes, soit 4 minutes) lorsque les cellules sont refroidies, sauf si le gène introduit par le vecteur est celui du récepteur TRPA1 d'un primate. Ce récepteur est bien un **canal calcique**. La concentration intracellulaire du calcium est corrélée à l'amplitude du refroidissement ; le canal TRPA1 permet de **coder l'amplitude de la variation thermique**.

Puisque ces effets ne sont pas observés avec les récepteurs des primates, on peut émettre l'hypothèse que cette perte de fonction est due à une **mutation**.

**Q2.** Le document 2A montre que le passage à une température de 8°C augmente les courants ioniques transmembranaires **seulement pour les cellules exprimant le récepteur de rat**. Donc les récepteurs TRPA1 de rat s'ouvrent quand ils sont exposés à 8°C mais pas les récepteurs humains.

Le document 2B permet de généraliser ce résultat : plus la température est basse plus la probabilité d'ouverture du récepteur TRPA1 de rat est élevée alors que le froid est sans effet sur le récepteur humain.

Cette expérience permet de conclure que le calcium dont la concentration intracellulaire augmente au froid est au moins en partie **d'origine extracellulaire** ; il confirme la **perte de fonction de canal ionique réglé par la température du récepteur TRPA1 humain**. Lors de l'expérience du document 1, les canaux ioniques TRPA1 de rat et de souris voient leur probabilité d'ouverture augmenter lorsque les cellules sont placées au froid : il s'ensuit une entrée de calcium dans la cellule, dont l'intensité est corrélée à l'amplitude de la baisse de température, ce qui augmente la concentration intracellulaire.

**Q3.** Sur le document 3A, on cherche à repérer les domaines dont la réponse au froid est identique à celle des récepteurs de rat (témoin positif) alors qu'elle est absente pour les récepteurs humains (témoins négatifs). Il s'agit des récepteurs notés « Humain 1-4 », « HumainC » et « hS6 ». Ces protéines chimères ont en commun d'avoir une **hélice S5 de rat**. **C'est donc dans ce domaine que se situe la mutation à l'origine de l'inactivation du récepteur humain**. Par ailleurs, la protéine de rat porteuse de la mutation G878V de l'hélice S5 ne répond pas au froid : c'est donc la **mutation de l'acide aminé 878** (glutamate chez le rat, en valine) qui est la cause de l'absence de réponse de la protéine humaine TRPA1 au froid.

Le document 3ment B montre que les hélices S5 et S6 ferment le canal au sein de la protéine. On peut formuler l'hypothèse qu'à basse température, il se produirait un **changement de conformation de S5** dépendant du glutamate qui ouvrirait le canal et permettrait ainsi un courant entrant de  $Ca^{2+}$ .

**Q1.4.** On identifie les mêmes ARN de protéines TRP chez les crotales et les couleuvres (TRPA1 et TRPV1) ; cependant la mention « autres canaux TRP » n'est guère précise. Ce résultat semble **invalidier l'hypothèse de canaux différents** chez les deux serpents.

Les points situés sur la droite bleue représentent les ARN qui sont autant transcrits dans les neurones reliés aux fosses nasales, sensibles ou non aux infrarouges, que dans les autres neurones. Le gène du canal TRPA1 est davantage transcrit dans les neurones reliés aux fosses nasales des crotales que dans les autres neurones, alors qu'une telle différence n'est pas constatée chez la couleuvre. On peut donc valider l'hypothèse selon laquelle les deux serpents **expriment les mêmes canaux mais avec des niveaux différents** : chez les couleuvres, les neurones insensibles aux IR ne surexpriment donc pas TRPA1 contrairement à ce qui se passe chez les crotales. **Cela suggère un rôle de TRPA1 dans la perception des IR.**

**Q1.5a.** D'après le document 1.5A, la quantité de calcium intracellulaire augmente dans environ 1/3 des cellules exprimant le canal TRPA1 chez le crotale, lors d'une exposition à une température de 35°C, mais pas chez les couleuvres. Sur le document 1.5B, on constate que la probabilité d'ouverture des canaux calciques est une fonction affine de la température entre 28°C et 42°C, alors qu'un tel effet n'est observé chez la couleuvre qu'à partir de 34°C.

**Ainsi, chez le crotale, la protéine TRPA1 répond à une élévation de température alors que chez les rongeurs, elle répond aux basses températures.**

**Q1.5b.** Les résultats du document 1.5A sont compatibles avec l'hypothèse d'une moindre expression du gène codant le canal TRPA1 chez la couleuvre, ce qui conduirait un moindre influx de calcium dans les cellules. Cependant, le document 1.5B semble bien montrer que les récepteurs TRPA1 des crotales n'ont pas les mêmes propriétés que ceux des couleuvres, et qu'ils en sont par conséquent différents. En résumé, **les deux hypothèses mentionnées pourraient être toutes les deux valides.**

**Q1.5c.** Sur le document 1.5C, on constate que la région de la souris atteint des températures de 26°C à 28°C, températures pour lesquelles la probabilité d'ouverture des canaux de crotale est augmentée (0,1 contre 0) alors que celle des canaux de couleuvre est toujours nulle. Ainsi, le crotale peut détecter ses proies à distance en percevant les IR qu'elles émettent alors que **la couleuvre utilise sans doute d'autres canaux pour le faire (vue, odorat, etc).**

## THÈME 2. QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DES PRIONS

**Q2.1.** Les traitements qui hydrolysent ou dénaturent les protéines, annulent le pouvoir infectieux du prion, alors que les traitements qui hydrolysent ou lèsent les acides nucléiques ne le changent pas. On peut donc faire l'hypothèse que **le prion est une protéine.**

**Q2.2.** La révélation du *northern blot* utilise l'ADNc *Prp* : elle révèle donc spécifiquement les ARN codant la protéine PrP.

La comparaison des pistes du gel A montre qu'il n'y a pas de différence entre les cerveaux non infectés et infectés ; leurs cellules transcrivent toutes l'ARNm *Prp* de façon importante. Les gels B et C montrent que le gène *Prp* est transcrit dans les cellules de tous les organes, infectés ou non, à un niveau moindre que dans celles du cerveau. On peut donc en conclure que l'expression du gène *PrP* est **ubiquiste, non modifiée par la maladie et plus importante dans le cerveau que dans les autres organes.**

**Q2.3.** Les **pistes 1 et 3** montrent la présence d'une protéine d'environ 35 kD qui est reconnue par l'anticorps anti-PrP 27-30 : il doit s'agir de la **protéine PrP 33-35** dont la quantité semble identique dans les cerveaux sains et dans les cerveaux infectés. Dans les cerveaux sains (piste 4), cette protéine est complètement détruite par la protéinase K. Cependant, d'après la **piste 2**, dans les cerveaux infectés, en présence de protéinase K, l'*immunoblot* ne révèle plus la protéine PrP 33-35 mais une quantité importante de **PrP 27-30**. On peut alors proposer une interprétation selon laquelle, chez les individus infectés, la protéine PrP 33-35 serait remplacée par la protéine PrP 27-30 à la suite de **modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles différentes chez les individus sains et infectés.**

**Q2.4a.** La centrifugation différentielle permet de séparer les différents constituants d'une cellule ou d'un tissu à l'aide de **plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante**. Dans chaque cycle de centrifugation, les constituants les plus massifs (par exemple les membranes) sédimentent et forment un **culot** au fond du tube. Tous les autres constituants (pour lesquels l'accélération a été trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou pour lesquels le temps de centrifugation a été trop court) restent dans la fraction liquide appelée alors **surnageant** ou **homogénat**. On récupère alors séparément le surnageant et le culot ce qui revient à avoir séparé les constituants qui les composent. Le surnageant peut alors être soumis à un nouveau cycle de centrifugation avec une accélération plus grande.

**Q2.4b.** La PrP est toujours localisée dans les culots ; elle n'est jamais retrouvée dans le surnageant. Ce n'est donc pas une protéine soluble ; elle est **localisée dans les membranes**, chez les individus sains comme les malades.

**Q2.5a.** L'énoncé ne précise pas le degré de spécificité de l'anticorps utilisé pour révéler l'électrophorèse. Il s'agit probablement d'un anticorps anti-PrP qui reconnaît toutes les formes de cette protéine.

**Gel A.** Les échantillons provenant de hamsters infectés ne montrent pas de différence selon qu'ils ont ou non été traités par la protéinase K : **la protéine PrP 33-35 qu'ils contiennent n'est donc pas hydrolysable par la protéinase K.** On peut donc conclure qu'il s'agit là d'une propriété de la PrP 33-35<sup>Sc</sup>.

À l'inverse, en présence de protéinase, chez les animaux sains, **la protéine PrP 33-35 qu'ils contiennent est totalement dégradée** (ce qui est en accord avec les résultats du document 2.3). Donc la protéine PrP 33-35<sup>C</sup> est sensible à la protéinase K. donc suite à l'infection, **la protéine PrP 33-35<sup>C</sup> serait remplacée par une forme différente, PrP 33-35<sup>Sc</sup>, insensible à l'action de la protéinase K.**

Le traitement au sarkosyl ne montre pas d'effets nets. Le gel B permet alors de préciser ces résultats.

**Gel B.** Le traitement au sarkosyl permet de dissocier les membranes et donc de faire passer les protéines qu'elles contiennent dans le surnageant. On explique ainsi les résultats des pistes 1 et 5 : la protéine PrP est révélée dans le surnageant des échantillons obtenus à partir d'animaux infectés ou non.

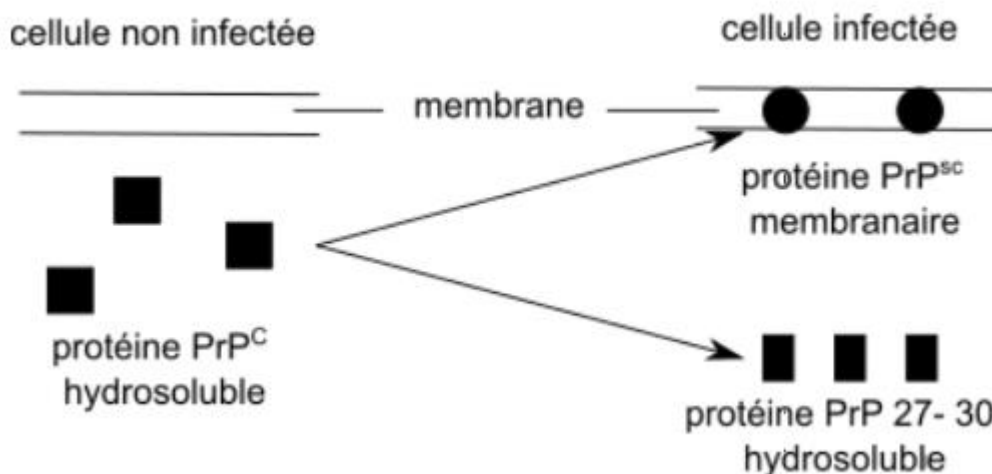
La comparaison des pistes 2 et 6 montre que cette solubilisation est totale pour les extraits de cerveaux sains (pas de PrP 33-35 révélée dans le culot) mais pas pour les extraits de cerveaux infectés : **la protéine PrP 33-35<sup>Sc</sup> n'est donc pas totalement solubilisée par le détergent**, elle reste largement présente dans les membranes contrairement à la forme PrP 33-35<sup>C</sup>.

Les comparaisons 1/3 d'une part et 5/7 d'autre part montre que les protéines PrP 33-35, quelle qu'en soit la forme, sont hydrolysées par la protéinase K lorsqu'elles sont dans le surnageant. En revanche, la comparaison des pistes 6 et 8 montre que **l'insertion dans la membrane protège largement la protéine PrP 33-35** des individus infectés (donc la protéine PrP 33-35<sup>Sc</sup>) de la dégradation par la protéinase K.

En résumé, l'infection s'accompagne du **remplacement de la forme PrP 33-35<sup>C</sup> hydrosoluble, par une forme PrP 33-35<sup>Sc</sup> localisée dans les membranes.**

**Q2.5b.** En combinant les réponses aux questions 2.3 et 2.5, on conclut que lors de l'infection une double modification du protéome se produit : la protéine PrP est remplacée d'une part par une forme plus petite PrP 27-30, hydrosoluble, d'autre part une forme membranaire PrP 33-35<sup>Sc</sup>. Le lien entre ces deux modifications reste à préciser.

#### Schéma bilan



**Q2.6.** La protéine PrP comporte  $720 / 3 = 240$  acides aminés puisque le gène est entièrement codant. Le PM de cette protéine serait alors de  $240 \times 110 = 26\,400$  Daltons  $\approx 25$  kD, PM très différent de celui de PrP<sup>Sc</sup> ou PrP<sup>C</sup> (33 à 35 kD). Si le gène reste entièrement codant après l'infection, on en déduit également que la protéine PrP 27-30 provient d'une **modification post-traductionnelle** de la PrP, par une protéolyse de  $240 - 142 = 98$  acides aminés.

**Q2.7.** La protéine PrP<sup>C</sup> ne présente presque **pas de feuillets  $\beta$**  ; sa structure secondaire est donc très différente de celle de PrP<sup>Sc</sup> alors que, d'après le tableau 2.6A, la protéine PrP 27-30 présente des structures secondaires voisines de celle de PrP<sup>Sc</sup>, et doit donc adopter **une conformation assez proche**.

En confrontant ces conclusions aux précédentes, on met ainsi en évidence le lien direct entre la conformation et la sensibilité aux protéinases (comme la protéinase K) ainsi qu'avec l'activité biologique de la protéine.

**Q2.8.** La partie gauche du document 2.7B est un témoin négatif qui permet de repérer l'intensité de la radioactivité mesurée sur chaque forme de PrP en l'absence de protéinase.

Pour analyser la partie droite du document 2.7B, on numérottera les pistes de 1 à 6 de la gauche vers la droite.

Les pistes 1 et 2 confirment qu'en l'absence de PrP<sup>Sc</sup>, la PrP<sup>C</sup> de hamster ou de souris est détruite par la protéinase K (PK). En revanche, en présence de PrP<sup>Sc</sup> de la même espèce, toute la PrP<sup>C</sup> n'est pas dégradée (15 % est préservée chez le hamster et 9 % chez la souris). L'effet de « protection » est moindre si les deux protéines associées ne viennent pas de la même espèce.

Donc **la présence de la protéine PrP<sup>Sc</sup> protège la protéine PrP<sup>C</sup>** de la digestion par la protéinase K. Si l'on considère que la protection contre la protéinase vient d'un changement de conformation et qu'il est propre à la protéine PrP<sup>Sc</sup>, on peut en déduire que la protéine PrP<sup>C</sup> se transforme en PrP<sup>Sc</sup> au contact de celle-ci.

**Ainsi, l'agent infectieux de la tremblante se propage notamment en induisant une conformation anormale des protéines PrP normalement présentes dans les cellules.**