

**TP SV
D2****LES PROTEINES - 2**

COURS : SV-D-2.4 TP : SV-D2, SV-E, SV-F1, SV-F3



L'étude des biomolécules fait partie du domaine généralement désigné par le terme de « biologie moléculaire ». On regroupe sous le terme très général de « Biologie Moléculaire » toutes les techniques biologiques consistant en l'analyse et l'exploitation des molécules biologiques. On peut distinguer des techniques d'analyse (électrophorèse, chromatographie, etc.) visant à déterminer la composition d'un milieu ou à étudier une molécule donnée, et des techniques de génétique moléculaire visant à l'étude et à l'exploitation (y compris modification) de l'ADN (ou de l'ARN). Ces dernières techniques, de génétique moléculaire, seront abordées dans les TP de génétique moléculaire (SV-F1 et SV-F3)) : nous nous limiterons donc ici aux protéines.

L'objectif du TP est ici d'aborder quelques méthodes d'analyse des structures protéiques, en relation avec leurs fonctions.

Programme officiel :

Analyser des résultats expérimentaux utilisant des techniques d'extraction et de purification de protéines comme la chromatographie d'affinité
 Analyser des données expérimentales sur les interactions entre une protéine et un ligand
 Exploiter des données de modélisation moléculaire
 Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de mutagenèse et de transgénèse

Compétences :

Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes (transgénèse, mutagenèse dirigée et aléatoire, northern blot, hybridation *in situ*, utilisation de gène rapporteur, puce à ADN, PCR et RTPCR)
 Exploiter des données utilisant des méthodes d'étude des protéines : chromatographie d'affinité
 Exploiter des données de modélisation moléculaire

1. Les chromatographies : séparations selon les affinités relatives à des solvants

Voir poly 1 - préparation

2. Etude d'interactions protéines – ligand en visualisation moléculaire

2.1.Principe général

Les études cristallographiques permettent de déterminer la structure tridimensionnelle des protéines. Elles peuvent concerner des protéines seules, des enzymes complexées avec un analogue de substrat ou un inhibiteur, des monomères seuls ou des associations de protéines, etc.

Ces structures 3D sont visualisables grâce à des logiciels d'imagerie moléculaire. Nous allons utiliser ici le logiciel **LibMol**, qui est accessible en ligne et téléchargeable gratuitement :

<https://libmol.org/>

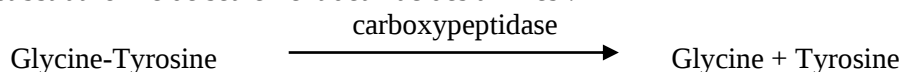
Il est aussi possible d'utiliser le logiciel Rastop, qui est un peu moins intuitif que LibMol, mais parfois un peu plus puissant. *Au concours, les candidats peuvent librement choisir entre ces deux logiciels : tout ce qui est demandé lors des TP est donc obligatoirement réalisable avec les fonctionnalités de LibMol.*

Ces structures 3D correspondent à des fichiers textes, respectant le format PDB (*Protein Data Bank*) : ces fichiers indiquent en particulier la position dans un système de coordonnées de chaque atome, en précisant à quel résidu (par exemple acide aminé) il appartient, ainsi qu'à quelle chaîne.

2.2.Etude d'un site actif : la carboxypeptidase

On étudie ici l'enzyme carboxypeptidase : Il s'agit d'une enzyme dont la fonction consiste à hydrolyser l'extrémité des chaînes polypeptidiques du côté C-terminal, en se fixant préférentiellement sur les acides aminés terminaux présentant une chaîne latérale très volumineuse (ici la tyrosine).

Par exemple, avec un substrat formé de seulement deux acides aminés :



🔗 **Chercher** l'enzyme « carboxypeptidase », et **charger** le fichier de l'enzyme bovine avec substrat.

🔍 **Observer** l'aspect général de la protéine.

🔍 Cliquer sur le nom de la protéine et **consulter** les informations de sa fiche sur la librairie de molécules et sur la base de donnée PDB. Vérifier en particulier qu'il ne s'agit a priori pas d'une protéine transmembranaire.

🔍 **Sélectionner** le substrat et l'afficher en rouge

🔍 **Observer** les acides aminés du site actif, et observer les liaisons faibles qui pourraient **expliquer** la reconnaissance du substrat par l'enzyme.

2.3. Observation de changements de conformation

On se propose d'observer deux changements de conformation : un ajustement induit (sur l'hexokinase) et une transition allostérique (sur l'ATCase).

⇒ hexokinase

L'hexokinase catalyse la réaction : $\text{Glucose} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucose-6-P} + \text{ADP}$

🔗 Charger la molécule **1IG8.pdb**

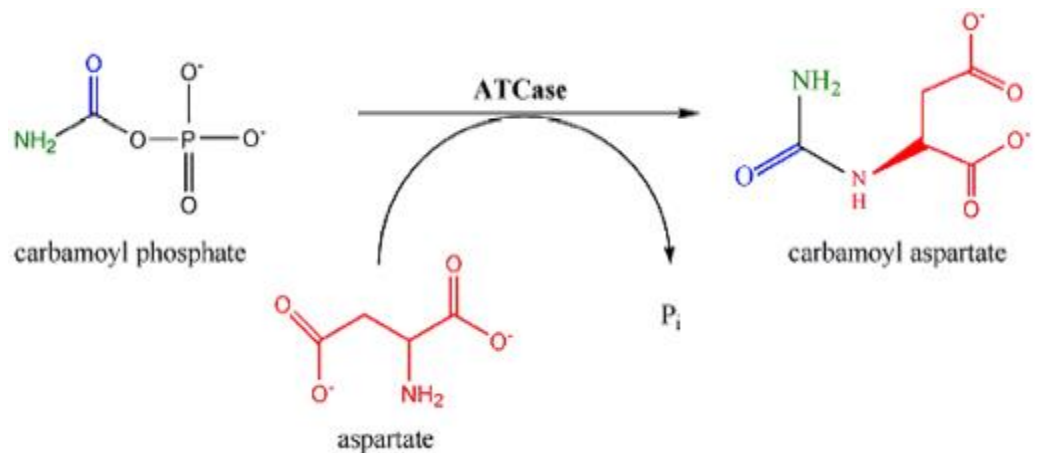
🔍 **Observer**. Prendre une **image** sous une orientation adaptée. Faire une **mesure** de « l'ouverture » de l'enzyme.

🔗 Charger la molécule **1BDG.pdb**

🔍 Observer et **comparer** avec la conformation précédente (en particulier de « l'ouverture » de l'enzyme).

⇒ ATCase

L'ATCase, ou Aspartate-transcarbamylase catalyse la réaction :



Cette enzyme est formé de :

- Deux trimères de sous-unités catalytiques (soit 6 sous-unités C)
- Trois dimères de sous-unités régulatrices (soit 6 sous-unités R)

🔗 Charger la molécule **1ROB.pdb** (forme R)

🔍 **Observer**. Prendre une **image** sous une orientation adaptée.

🔗 Charger la molécule **1RAA.pdb** (forme T)

🔍 Observer et **comparer** avec la conformation précédente.

3. Etude d'interactions protéines – ligand : le complexe ES

Le complexe ES correspond à l'association entre une enzyme (= protéine) et son substrat (qui est donc son ligand).

3.1. Equation de Michaelis-Menten

Voir poly 1 - préparation

3.2. Exercices

EXERCICE 3**COMPARAISON DE DEUX SUBSTRATS ; UTILISATION DE L'ÉQUATION DE MICHAELIS-MENTEN**

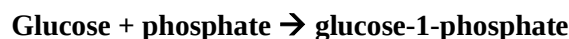
L'hexokinase catalyse la phosphorylation du **glucose et du fructose** par l'ATP. Toutefois, le **K_m** du glucose est égal à **0,13 mmol/L** alors que celui du fructose est de **1,3 mmol/L**. on suppose que ces deux substrats ont le **même V_{max}** et que l'enzyme présente une cinétique hyperbolique, telle que définie par l'équation de Michaelis-Menten (*équation (14) dans la première partie du TP*).

- 1) **Calculez** la vitesse initiale normalisée de la réaction pour chaque substrat quand $[S]_0 = 0.13$ ou 1.3 ou 13 mmol/L.
- 2) Pour quel substrat l'hexokinase manifeste-t-elle la **plus grande affinité** ?

EXERCICE 4**COMPARAISON DE DEUX ENZYMES PARTAGEANT UN MEME SUBSTRAT**

L'hexokinase et la **glucokinase** sont deux enzymes qui catalysent la même réaction sur le même substrat : la phosphorylation de la molécule de glucose. Une phosphorylation consiste en un transfert d'un groupement phosphate sur une molécule.

C'est le cas de la réaction :



Cette phosphorylation empêche le glucose qui pénètre dans la cellule depuis le milieu intérieur de ressortir de la cellule.

On compare la vitesse initiale de la réaction de phosphorylation du glucose quand la réaction est catalysée par l'hexokinase (vitesse V) et quand elle est catalysée par la glucokinase (vitesse V'). (u.a. = unités arbitraires)

Tableau de résultats :

Concentration en glucose en mmol.L ⁻¹	0.05	0.1	0.5	1	5	10	15	150	500	1500
V (u.a.)	0.15	0.20	0.27	0.29	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
V' (u.a.)	0.01	0.01	0.03	0.06	0.25	0.4	0.5	0.91	0.97	1

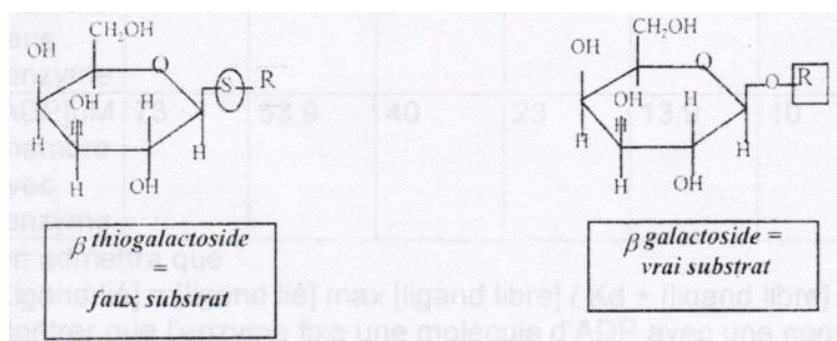
- 1) **Tracez** les courbes de la vitesse en fonction de la concentration en substrat pour les deux enzymes.
- 2) **Comparez** les vitesses initiales des deux réactions catalysées par chacune des deux enzymes pour une concentration en substrat de 0.5 mmol/L, proche des conditions physiologiques.
- 3) **Déterminez graphiquement** V_{max} et K_m pour l'hexokinase et la glucokinase.

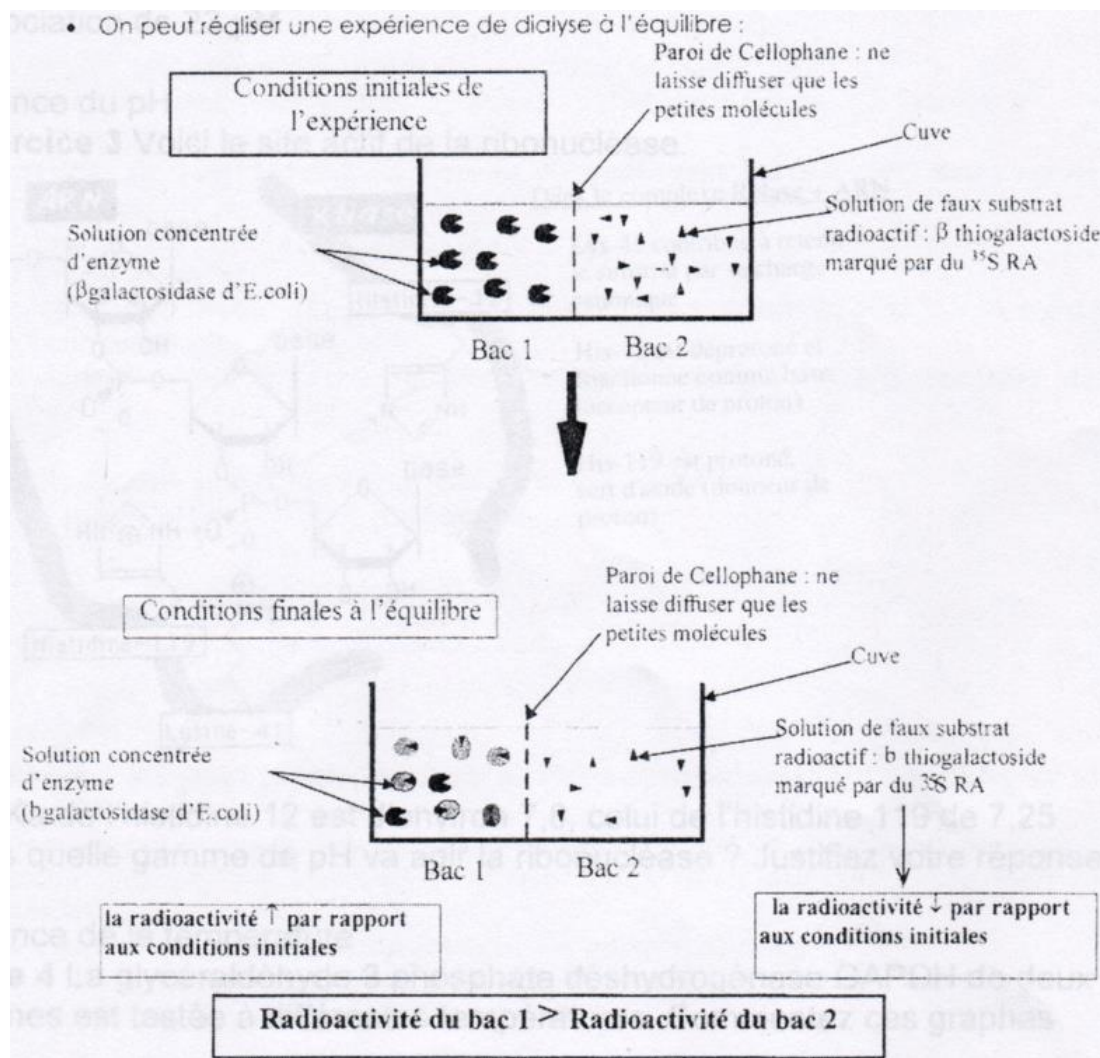
4. Etude d'interactions protéines – ligand par dialyse à l'équilibre

4.1. Principe de la technique

On cherche à mettre en évidence la formation d'un **complexe enzyme-substrat** (complexe ES) par **marquage et dialyse à l'équilibre**.

On se propose d'étudier ici cette dernière technique : la β -galactosidase catalyse l'hydrolyse de la liaison osidique des β -galactosides. On dispose ici d'un « faux substrat », un **β -thiogalactoside, reconnu par l'enzyme mais non hydrolysé** :





➔ Montrez que ces résultats sont en faveur de la formation d'un complexe enzyme-substrat.

4.2.Exercice d'application

EXERCICE 5

DIALYSE A L'EQUILIBRE ET CALCUL D'UN K_D

La fixation de l'ADP radioactif sur la sous-unité catalytique F1 de l'ATPsynthase d'*E. coli* a été mesurée par dialyse à l'équilibre (cf. technique présentée dans l'exercice 2 du premier polycopié).

On a mis dans une des chambres de l'appareil 4 μM de l'enzyme purifiée et dans l'autre de l'ADP à différentes concentrations. Après équilibre on a prélevé de part et d'autre de la membrane de dialyse une quantité de la solution et on a mesuré la concentration d'ADP :

[ADP] en μM dans la chambre sans l'enzyme	70	51.1	37.5	21.1	12.5	8.9	5.3	2.6
[ADP] en μM dans la chambre avec l'enzyme	73	53.9	40	23	13.9	10	6	3

On admettra que :

$$[\text{Ligand lié}] = \frac{[\text{Ligand lié}]_{\text{max}}[\text{Ligand libre}]}{K_d + [\text{Ligand libre}]}$$

1) Montrez que l'enzyme fixe une molécule d'ADP avec une constante de dissociation de 23 μM .

5. Etude d'interactions protéine – ligand et biologie moléculaire

Diverses techniques permettent de mettre en évidence une interaction entre protéine et un ligand, ou plus spécifiquement entre une protéine et une autre protéine.

Ces interactions sont très importantes au niveau cellulaire, car permettant l'activation de protéines, ou plus simplement des associations nécessaires à la réalisation de la fonction biologique de la protéine.

5.1. Co-immunoprécipitation

Voir TP D1

On réalise la précipitation d'une protéine spécifique par incubation avec des anticorps la reconnaissant, puis on recherche la présence d'une autre protéine, « captée » par la protéine précipitée.

5.2. Mutagenèse

La mutagenèse consiste en la production d'une mutation dans l'ADN, soit de manière dirigée (on cible alors une séquence spécifique), soit de manière aléatoire (en utilisant des composés ou radiations mutagènes).

EXERCICE 6

PROTEINE HASP ET CONFORMATION DE L'HEMOGLOBINE

Les globules rouges des vertébrés sont des cellules spécialisées dans le transport du dioxygène grâce à l'hémoglobine. Cette protéine est constituée de deux sous-unités α et deux sous-unités β .

ASHP est une protéine du cytosol des globules rouges. Par mutagenèse aléatoire on a engendré des souris mutantes homozygotes pour le gène codant ASHP. Le génotype mutant est noté $-/-$, et le génotype sauvage $+/+$.

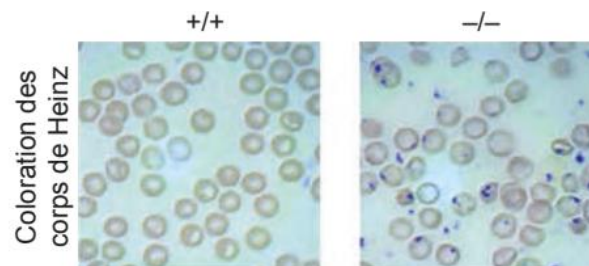


Figure TP7.9 Observation d'un frottis de sang d'une souris sauvage (gauche) et mutée (droite).

Les frottis ont été colorés au cristal violet, qui permet de colorer les corps de Heinz (structures formées par des agglomérats de chaînes dénaturées d'hémoglobine). (Modifié d'après le sujet de l'épreuve B du concours A-BCPST de 2012).

1) Quelle hypothèse peut-on faire sur le rôle de HASP par rapport à l'hémoglobine ?

On a réalisé une électrophorèse non dénaturante de globine α et de AHSP dans les conditions décrites dans la figure ci-contre :

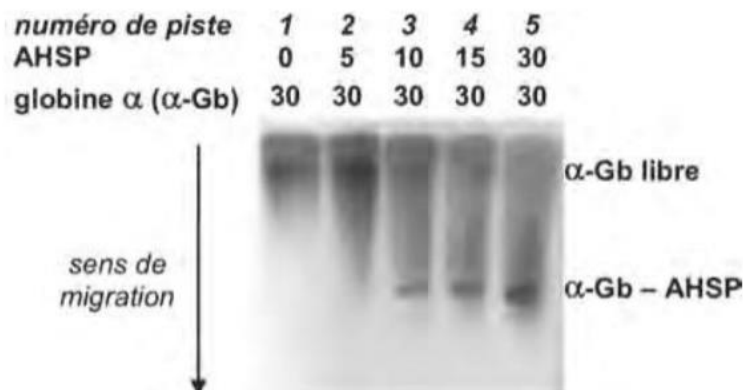


Figure TP7.10 Électrophorèse de globine α et AHSP en conditions non dénaturantes.

On incube la protéine AHSP avec des quantités variables de globine α . Les interactions entre AHSP et les globines α sont analysées par électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose en conditions non dénaturantes. Une fois la migration achevée, les bandes sont colorées avec de la benzidine, un composé qui se fixe uniquement à la globine α . Les concentrations (exprimées en $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en AHSP et en globine α (α -Gb) sont indiquées au-dessus de chaque piste. (Modifié d'après le sujet de l'épreuve B du concours A-BCPST de 2012).

2) Justifier que ces résultats suggèrent une interaction entre HASP et l'hémoglobine.

5.3. Transgénèse

La transgénèse consiste en l'insertion d'une construction génétique (le transgène) dans le génome d'une cellule ou d'un organisme. On étudie alors le phénotype induit par l'expression du transgène.

EXERCICE 7

REPONSE IMMUNITAIRE A UN PARASITE DE L'HOMME : *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Plasmodium falciparum est un eucaryote unicellulaire qui parasite les globules rouges, ce qui cause une maladie grave : le paludisme.

La protéine PfEMP1 de *P. falciparum* est produite à la surface des globules rouges infectés par le parasite. On émet l'hypothèse qu'elle permettrait la reconnaissance des globules rouges infectés par les cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes NK :

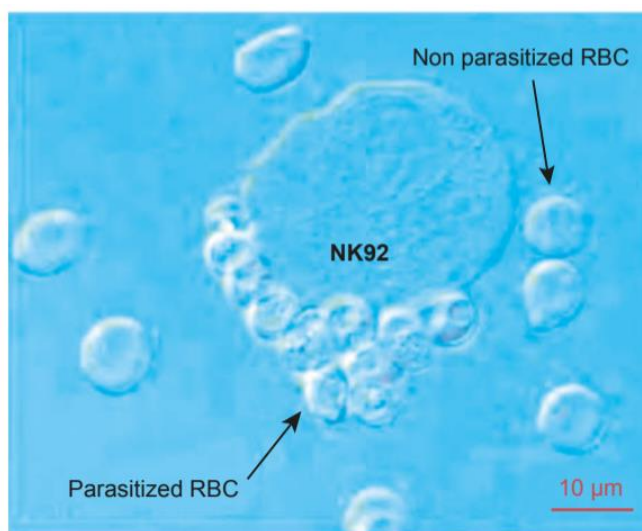


Figure TP7.12. Observation au microscope optique de lymphocytes NK mis au contact de globules rouges infectés (parasitized RBC) et non infectés (non parasitized RBC) par *P. f.*

(D'après Baratin et al., 2007, *PLoS ONE* 2(2): e228).

Or les lymphocytes NK expriment à leur membrane plasmique la protéine ICAM, connue pour être capable de se lier à d'autres protéines. On émet donc l'hypothèse que c'est cette protéine ICAM qui permet la fixation des lymphocytes NK sur les globules rouges infectés.

Afin de tester cette hypothèse, on réalise une transgénèse, dont le protocole et les résultats sont présentés ci-contre :

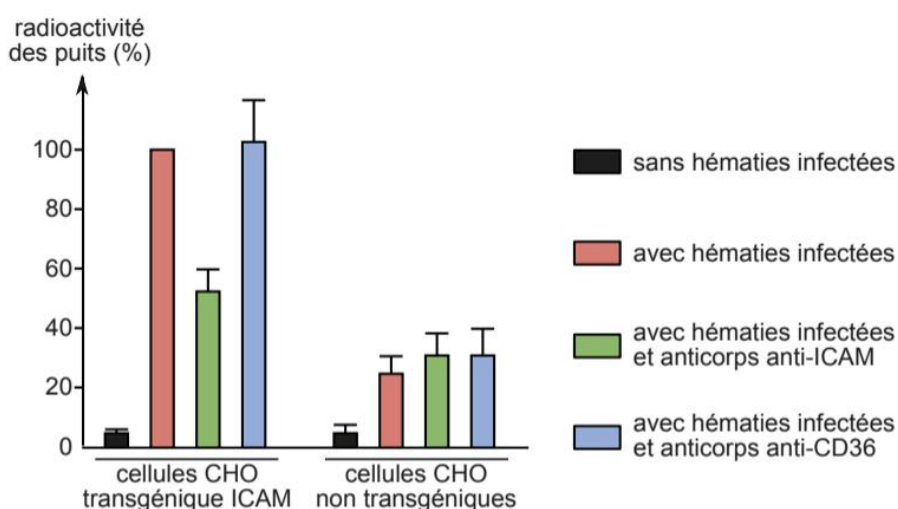


Figure TP7.13. Interactions entre la protéine ICAM et des hématies infectées.

On a engendré une lignée de cellules d'ovaire de hamsters transgéniques (cellules CHO), qui expriment le gène humain *ICAM* ; les cellules CHO sauvages n'expriment pas *ICAM*. Parallèlement, on a infecté des hématies humaines avec *P. f.* dans un milieu radioactif. On fixe les cellules CHO au fond d'un puits ; on met en contact les hématies avec les cellules CHO pendant 2 h, puis on rince le milieu pour éliminer les cellules non fixées. Cette expérience est réalisée dans plusieurs conditions : avec des cellules CHO transgéniques ou non transgéniques, avec des hématies infectées ou non, en présence ou non d'anticorps anti-ICAM ou anti-CD36 (CD36 est une protéine non produite par les cellules CHO ni par les hématies). Les résultats sont donnés en pourcentage de radioactivité par rapport à la situation avec hématies infectées et cellules transgéniques, sans anticorps (barre rouge). On admettra que le non recoupement des barres d'erreur est nécessaire et suffisant pour affirmer que les différences observées sont significatives. (Modifié d'après Joergensen et al., 2010, *PLoS Pathog* 6(9): e1001083).

- 1) L'hypothèse émise est-elle vérifiée ?