

Université Paris-Saclay

Licence de Biologie

L3S5

**U.E. Biochimie Structurale et
Fonctionnelle**

Responsables : Nicolas Bayan et Sylvie Nessler

Poly de TD

Equipe pédagogique :

Sylvie Nessler, Nicolas Bayan,
Hélène Barreteau, Natalia Conde e Silva, Guillaume Lenoir,
Dominique Liger, Laure Plançon-Arnould, Thierry Touzé,
Agathe Urvoas, Marielle Valerio-Lepiniec et Diego Zea

Sommaire

TD Prion / Chaperon.....	p 1
TD Membrane 1.....	p 5
TD Membrane 2.....	p 10
TD Membrane 3.....	p 15
TD Enzymo 1: Cinétique enzymatique.....	p 19
TD Enzymo 2: Inhibition.....	p 23
TD Interactions protéines / ligands.....	p 28
TD Interactions protéine / ADN.....	p 34
TD Analyse de séquence.....	p 39
TD Analyse structurale.....	p 40

TD Prion / chaperon

1) Le prion « agent infectieux » est constitué d'une protéine.

Une protéine infectieuse

s Prusiner (Pour la Science, Mars 1995)

J'ai commencé à m'intéresser aux maladies à prions en 1972, lorsqu'un de mes patients, atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, est décédé. En lisant les articles scientifiques consacrés aux maladies apparentées, j'ai appris que l'encéphalopathie spongiforme du mouton, la maladie de

Creutzfeldt-Jakob et le kuru étaient tous trois transmissibles par injection d'extraits de cerveaux contaminés dans le cerveau d'animaux sains. Les infections semblaient dues à un virus lent que personne n'avait réussi à isoler.

Dans l'un de ces articles, Tikvah Alper et ses collègues de l'hôpital Hammersmith, à Londres, indiquaient que l'agent causal de l'encéphalopathie spongiforme du mouton semblait

dépourvu d'acides nucléiques : alors que ces molécules sont généralement dégradées par les rayonnements ultraviolets ou ionisants, des extraits de cerveaux infectés par l'encéphalopathie spongiforme du mouton conservaient leur pouvoir infectieux. Puisque l'agent causal était dépourvu à la fois d'ADN et d'ARN, il n'était ni un virus, ni aucun autre micro-organisme. Quel était-il alors ?

Dès 1974, j'ai commencé à étudier cette question en cherchant à extraire l'agent infectieux de cerveaux de moutons atteints d'encéphalopathie spongiforme. De nombreux chercheurs avaient déjà échoué, mais l'optimisme de la jeunesse nous réussit : en 1982, nous avons produit des extraits de cerveaux de hamster, composés presque

exclusivement de l'agent infectieux. Afin de découvrir la composition de l'élément responsable de la maladie, nous avons soumis ces extraits à de multiples tests.

Tous nos résultats convergeaient vers une conclusion surprenante : l'agent infectieux de la tremblante du mouton (et probablement celui des maladies apparentées) ne contenait pas d'acides nucléiques et était essentiellement, sinon totalement, constitué d'une protéine. Nous avons conclu à l'absence d'ADN et d'ARN, parce que, comme l'Alper, nous avons observé que les opérations qui dégradent les acides nucléiques ne réduisent pas le pouvoir infectieux. Au contraire, nous avons découvert que les protéines étaient des composants essentiels, parce que les méthodes qui les dénaturent (c'est-à-dire qui les déplient) et qui les dégradent diminuent le pouvoir infectieux. J'ai alors introduit le terme de « prion » pour distinguer cette classe d'agent

infectieux des virus, des bactéries, des champignons et des divers agents pathogènes connus. Peu après, nous avons confirmé que les prions de la tremblante du mouton contiennent une protéine unique, que nous avons nommée PrP, pour « protéine du prion ».

Comparaison de la stabilité du prion infectieux et d'un viroïde témoin.

Traitement chimique :	concentration	Viroïde	Prion infectieux
Et ₂ PC *	10-20 mM	-	+
milieu basique	pH 10	-	+
SDS	1-10 %	-	+
Urée	3-8 M	-	+
Traitement enzymatique			
RNAse A	0.1-100 µg/ml	+	-
DNAse	100 µg/ml	-	-
Protéinase K	100 µg/ml	-	+
Trypsine	100 µg/ml	-	+

+ = inactivé

- = pas de changement dans le pouvoir infectieux

*Et₂PC = diethyl pyrocarbonate, un réactif qui se fixe sur les résidus histidine

En vous aidant de l'extrait de l'article ci-dessus et du tableau, retrouvez, expliquez et critiquez les arguments qui ont conduit à affirmer que l'agent infectieux de l'encéphalopathie spongiforme :

- 1- semble dépourvu d'acides nucléiques
- 2- est une protéine

2) Le résumé ci-dessous décrit les étapes qui ont conduit à la découverte de la protéine Prion «normale» ou cellulaire (PrPc).

Une banque d'ADNc a été réalisée à partir d'un homogénat de cerveau de hamster contaminé par le prion «agent infectieux »(PrPSc). Un clone codant pour la protéine PrP 27-30(*) a été sélectionné en utilisant une sonde correspondant à la partie N-terminale de cette protéine. Par southern-blot, un seul gène codant pour cette protéine a été mis en évidence aussi bien dans les tissus malades que dans les tissus sains. Les taux d'ARNm correspondant à la PrP sont les mêmes dans les cerveaux de hamsters infectés et sains. En utilisant des anticorps dirigés contre la PrP 27-30, une protéine PrP a été détectée dans un homogénat de cerveau infecté. Cette protéine a également été détectée dans un homogénat de tissus sain mais en plus faible quantité.

(*) Protéine PrP 27-30: forme dérivée de la protéine prion par protéolyse limitée. La masse moléculaire est réduite de 35 kDa à 27-30 kDa.

1- Quel résultat important a été mis en évidence dans ces expériences.

2- Décrivez sous forme d'un organigramme la séquence des expériences et le principe des deux méthodes résumées ci-dessus, qui ont permis de montrer que le gène du prion est exprimé et la protéine produite dans un organisme sain. Vous rappellerez brièvement comment on procède pour réaliser un Southern blot et par quelles techniques on peut quantifier les taux d' ARNm et de protéines dans les différents homogénats.

3- Quelle raison pourrait expliquer que la quantité de protéines est supérieure dans les tissus infectés alors que la quantité d'ARNm est identique dans les deux types de tissus, sains et infectés.

3) Comparaison des protéines prion « agent infectieux» (PrPSc) et des protéines prion cellulaire normale, (PrPc).

Dans le tableau ci-dessous sont résumés les résultats d'expériences réalisées en parallèle sur la PrPSc et sur la PrP.

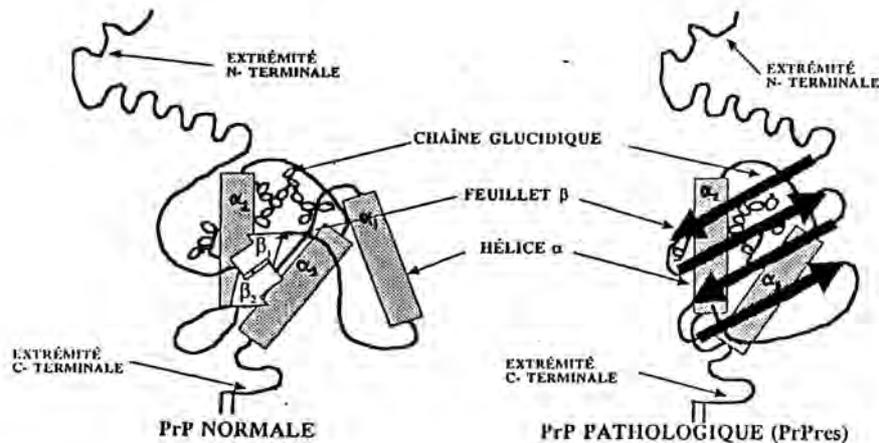
Propriétés	Protéine PrPc	Protéine PrPSc
Cerveau non infecté	Présente	Absente
Cerveau infecté	Quantité identique	Accumulation
Concentration	<1 µg/g	10 µg/g
Origine génétique	Un gène	le même gène
ARNm	2.1 Kilobases	2.1 Kilobases
Localisation		
Intracellulaire	Associée à la membrane	Associée à la membrane
Extracellulaire	Aucune	*Filaments amyloïdes avec plaques
Digestion par les protéases intracellulaires	Dégradée totalement	une fraction résiste et est convertie en protéines PrP 27-30

*Filaments amyloïdes : fibrilles de 6 à 10 µm formées par des protéines dont la structure est incorrecte et qui ont tendance à s'agréger.

1- Enumérez les hypothèses qui pourraient expliquer les différences de comportement existant entre les protéines PrPc et PrPSc ?

2- Qu'est-ce qu'une modification post-traductionnelle? Donnez des exemples.

4) Sur le schéma ci-dessous figure un modèle représentant les structures tridimensionnelles des protéines PrPc et PrPSc.



1- Décrivez les caractéristiques essentielles des deux types de structures secondaires, hélices α et feuillets β , que l'on trouve fréquemment dans les protéines.

2- Par quel type d'expérience a-t-on montré que pour certaines protéines, toute l'information nécessaire au repliement était contenu dans la structure primaire ?

3- Commentez le schéma ci-dessus, en particulier quelles sont les modifications structurales survenues sur la PrPSc ?

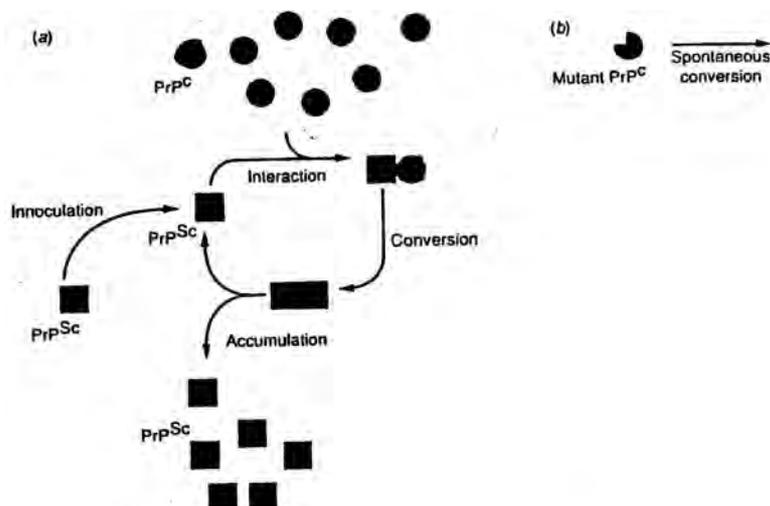
5) Vous trouverez ci-dessous une série de données et un schéma relatif à la «transformation» de la protéine normale en protéine prion infectieuse :

*Selon la structure schématisée ci-dessus la protéine PrPc contient trois segments d'hélice α

(H1, H2, H3). Des peptides correspondant à ces hélices α ont été synthétisés. Dans certains solvants la structure de ces peptides est bien en hélice α , mais dans des solvants aqueux le segment H1 adopte une structure de type β et précipite en formant des fibrilles.

**L'addition de 10% du peptide H1 à une solution contenant le peptide constitué des résidus 104 à 122 de la protéine prion fait passer ce dernier d'une conformation non structurée à une conformation en feuillet β .

***Il n'y a pas d'infection causée par l'inoculation de protéine PrPSc dans des souris transgéniques pour lesquelles le gène codant pour la PrPc normale a été tronqué.



1- A partir de ces données expliquez comment la protéine prion PrP^{Sc} peut être infectieuse.

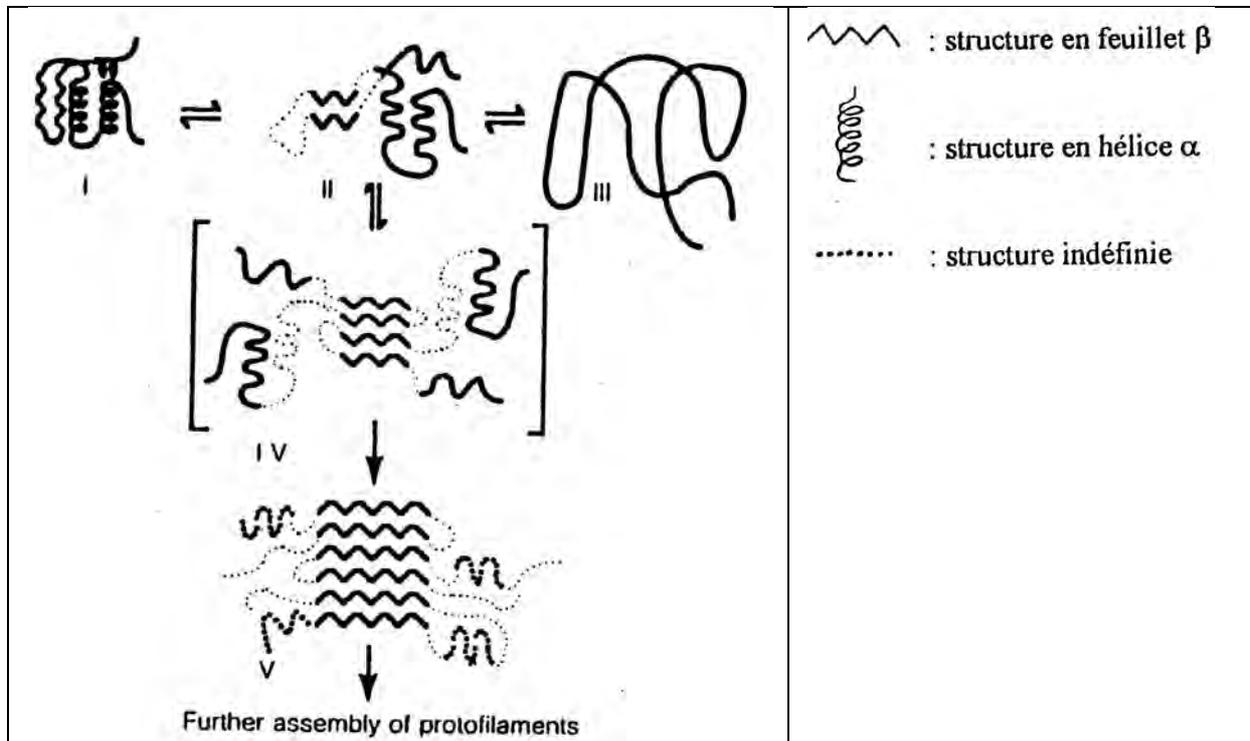
2- Quelles sont les deux origines possibles de la maladie ?

6) Formation des structures amyloïdes :

Les maladies à prion ainsi que d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer, certains types de diabète se caractérisent par la formation d'agrégats de protéines insolubles à l'extérieur de la cellule appelés fibrilles amyloïdes.

Ces dernières sont constituées par une superposition de feuillets ~ perpendiculaires à l'axe longitudinal, de la fibre. Dans ces diverses maladies les mutations responsables de ces structures amyloïdes affectent généralement la stabilité des protéines impliquées et leurs tendances à s'agréger.

Le schéma ci-dessous présente un modèle du mécanisme de formation de ces structures amyloïdes:



Il existerait des intermédiaires de repliements (II), distincts de la forme native (I) et de la forme dénaturée (III), qui pourraient s'associer entre eux par leurs domaines en feuillets β (IV) pour initier la formation des fibrilles amyloïdes (V).

1- Commentez ces données

2- Quels mécanismes peuvent intervenir dans une cellule pour empêcher l'agrégation des protéines ? Expliquez par exemple le rôle des protéines chaperon dans ces mécanismes.

TD Memb1

Lipides, détergents et reconstitution d'une protéine membranaire

I- Les lipides membranaires:

Exercice 1 - Composition lipidique des globules rouges

Alors que vous traversiez un fleuve lors d'une expédition dans une forêt tropicale, l'un de vos amis s'est fait mordre par un serpent venimeux et a failli mourir d'une hémolyse généralisée (lyse des globules rouges (GR)).

Afin de comprendre les bases de l'activité hémolytique du venin, vous analysez tout d'abord la composition en lipides des GR purifiés. La technique utilisée est la chromatographie sur couche mince (TLC), qui permet de séparer les différentes espèces lipidiques présentes dans un même échantillon. Les différents lipides sont ensuite quantifiés. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Analyse lipidique de la membrane plasmique de GR. Résultats exprimés en nombre de mole pour 10^8 cellules.

Nature des lipides	Moles / 10^8 cellules
Phosphatidylcholine	1080
Phosphatidylethanolamine	1080
phosphatidylserine	420
sphingomyéline	1080
Cholestérol	1380
Glycolipides dont gangliosides	180
Autres lipides	780

1- Rappelez le principe de la TLC ainsi que les caractéristiques des différentes classes de lipides. Quelle prédiction feriez-vous quant à la migration du cholestérol et d'un glycolipide dans un solvant organique non polaire sur TLC ?

2- Calculez à partir du tableau 1, pour chaque espèce lipidique, le % (mol/mol) par rapport aux lipides totaux.

Dans un deuxième temps, vous analysez la composition du venin de serpent. Vous découvrez que ce venin contient une protéase (qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines), une neuraminidase (qui clive l'acide sialique des gangliosides), et une phospholipase (qui hydrolyse les phospholipides). Le traitement des globules rouges par ces enzymes a donné les résultats décrits dans le tableau 2.

Tableau 2 : Traitement des globules rouges par des enzymes contenues dans le venin de serpent

Nature de l'enzyme utilisée	Observation d'une hémolyse
Protéase	NON
Neuraminidase	NON
Phospholipase	OUI

L'analyse biochimique des globules rouges après une hémolyse provoquée par le traitement à la phospholipase montre une forte augmentation du taux de phosphorylcholine libre (choline portant un groupement phosphate) et de diacylglycerol (glycérol estérifié à 2 chaînes d'acide).

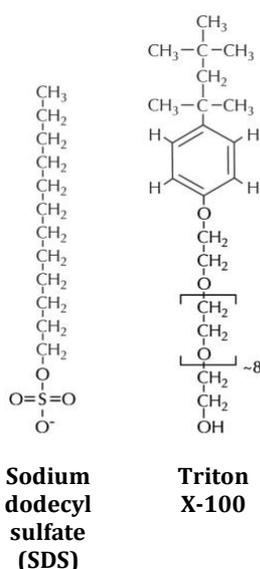
3- Quel est le substrat de la phospholipase et où est-il clivé ?

4- En vous basant sur vos connaissances de la composition de la membrane plasmique, expliquez pourquoi la phospholipase (et non la protéase ou la neuraminidase) provoque la lyse des globules rouges.

II – Les détergents :

Pour solubiliser les protéines membranaires on utilise des détergents. Ce sont des molécules amphiphiles composées d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile formant des micelles dans l'eau.

1- Examinez la structure du SDS et du Triton X-100 dans la figure ci-dessous et identifiez les zones hydrophiles et hydrophobes pour chaque molécule. Justifiez votre réponse.



2- Rappelez comment ces molécules s'insèrent dans les membranes et comment elles permettent leur solubilisation ainsi que la solubilisation des protéines membranaires ?

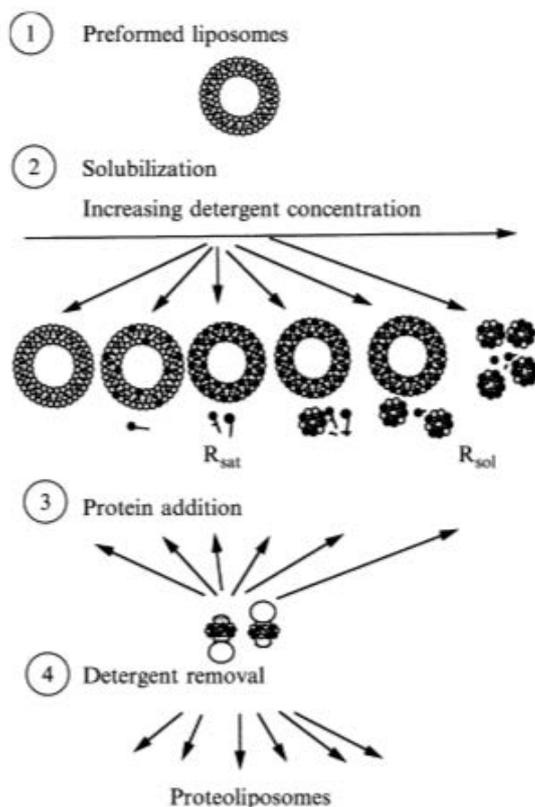
3- Lequel de ces deux détergents est généralement le plus approprié pour solubiliser une protéine membranaire ? Justifiez votre réponse

III - Reconstitution en liposome d'une protéine membranaire

Après avoir solubilisé la membrane et les protéines membranaires en détergent, vous avez purifié un transporteur membranaire Y. Vous souhaitez maintenant reconstituer cette protéine en protéoliposomes afin d'étudier sa fonction.

Pour reconstituer une protéine en liposome, l'une des stratégies consiste à mélanger des micelles mixtes lipides/détergents avec la protéine Y solubilisée en détergent. Pour former les protéoliposomes, on utilise ensuite des billes hydrophobes qui fixent avec une forte affinité les molécules de détergent sous forme monomérique. Ces billes vont donc éliminer petit à petit les molécules de détergent conduisant ainsi à la formation de protéoliposomes.

La figure suivante résume ces étapes :



préparation d'une suspension de liposomes dans un tampon

- solubilisation de ces liposomes par un détergent (triton X100 par exemple)

- ajout de la protéine Y (solubilisée dans le même détergent) à la solution

- reconstitution des protéoliposomes par élimination du détergent à l'aide de billes hydrophobes.

Pour commencer vous allez préparer des micelles mixtes lipides / détergents. Pour cela vous allez d'abord préparer des liposomes avec les lipides les plus pertinents pour la

stabilité de votre protéine. Ensuite vous allez déterminer la concentration de détergent nécessaire pour solubiliser totalement ces liposomes.

On dispose pour ceci :

- d'une solution chloroformique d'acide phosphatidique (PA) à 50mM
- d'une solution chloroformique de phosphatidylcholine (PC) à 20mM
- d'une fraction purifiée de la protéine Y à la concentration de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le tampon A + 10mM de Triton X-100
- de tampon A composé de Tris 20mM pH 7, NaCl 150mM.
- d'une solution de Triton X-100 à 10% préparée dans du tampon A. MM Triton X-100 = 625 Da

On veut d'abord préparer des liposomes contenant 5mM de PC et du PA, avec un rapport PC/PA de 9 (mole/mole) dans 4 mL de tampon A. Le protocole pour former ces liposomes est le suivant :

- Prélèvement des volumes de solution chloroformique de PC et PA
- Evaporation du chloroforme
- Resuspension des lipides dans le tampon A.

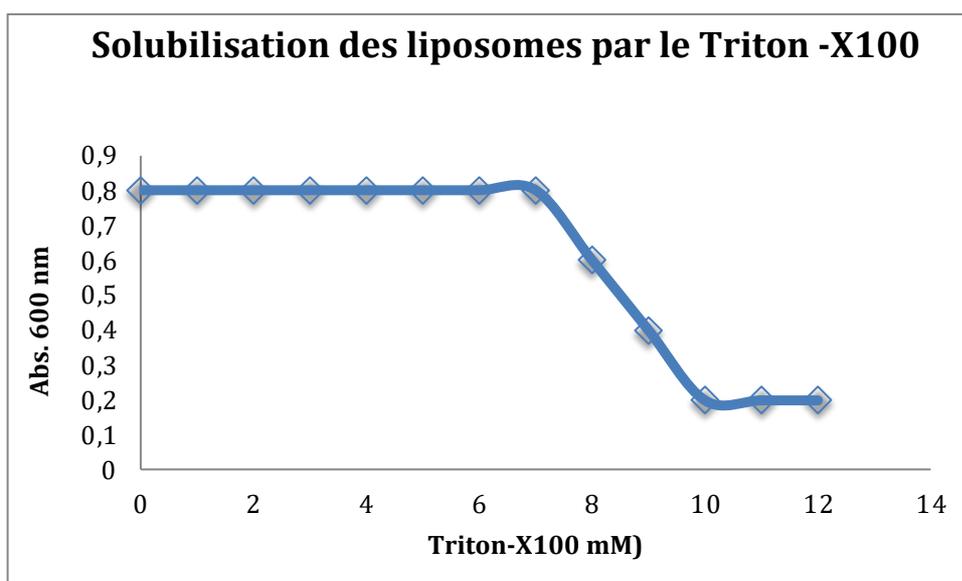
A ce stade on obtient des vésicules lipidiques multilamellaires.

- Pour obtenir des liposomes unilamellaires, cette suspension doit être soumise à des ultrasons.

1- Pourquoi les lipides sont dissous dans une solution chloroformique ?

2- Donnez les volumes de PC, PA et de tampon A qu'il faut pour former les 4 mL de liposomes.

On effectue sur ces liposomes une courbe de solubilisation par le Triton X-100. Pour ceci, après avoir formé des liposomes unilamellaires, on suit leur solubilisation par la mesure de l'absorbance à 600 nm en ajoutant petit à petit le Triton X-100. Les résultats sont portés sur la Figure 2 :



3-Que mesure-t-on lorsqu'on suit l'absorbance à 600 nm ?

4-Donnez les concentrations en détergent qu'il faut ajouter pour atteindre le seuil de solubilisation et la solubilisation totale des liposomes.

On veut effectuer la reconstitution de la protéine Y en se plaçant à une concentration en détergent correspondant à la solubilisation totale.

Le volume final de la solution de protéoliposomes doit être de 2mL et la concentration en lipide identique à celle des liposomes préparés ci-dessus. Le rapport PC/protéine doit être égal à 4000 (mole/mole). Les concentrations finales de Tris et de NaCl doivent être celles du tampon A.

La quantité de billes hydrophobes à utiliser est de 20 mg de billes / mg Triton X-100. On prendra comme MM de la protéine Y 130 kDa.

5-Proposez un protocole d'obtention de ces protéoliposomes (précisez bien entendu les volumes de chacun des composés utilisés).

TD-Memb2

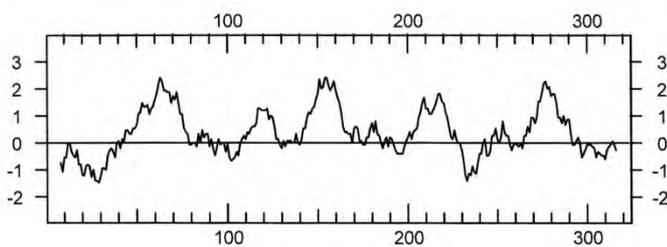
Topologie et mécanisme des protéines membranaires

I. Profil d'hydrophobicité

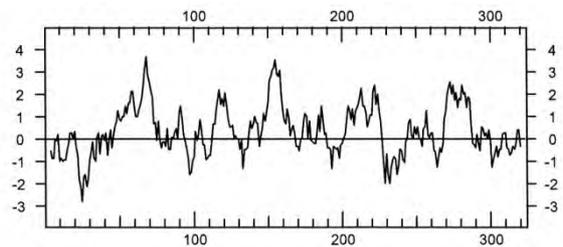
On dispose de la séquence de la sous-unité M du centre réactionnel de *Rhodopseudomonas viridis*. Son profil d'hydrophobicité, obtenu en utilisant l'échelle de Kyte et Doolittle, est présenté ci-dessous.

- Sous-unité M du centre réactionnel de *Rhodopseudomonas viridis*

Fenêtre de 15 résidus



Fenêtre de 7 résidus



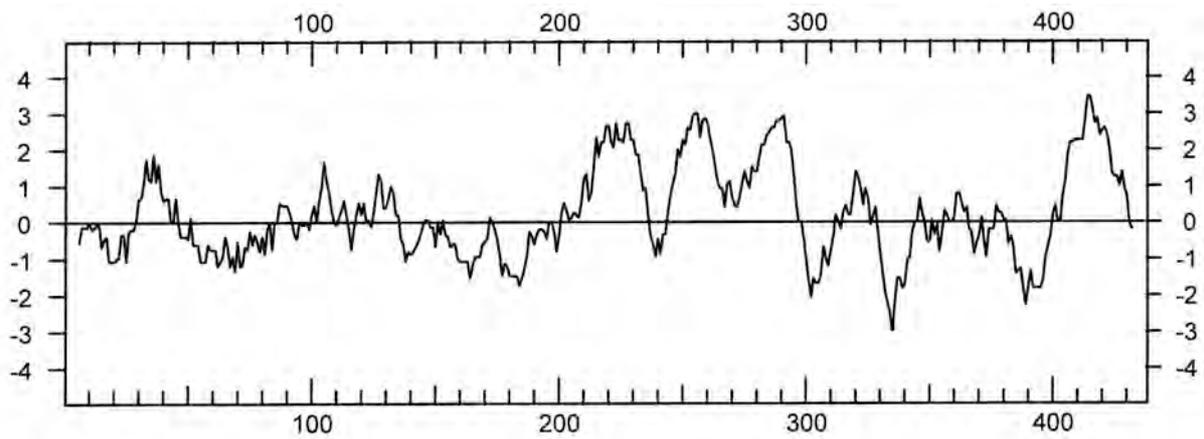
Rappelez le principe de cette méthode. Proposez un ou plusieurs modèle(s) d'organisation de la chaîne polypeptidique dans la membrane. Discutez l'influence du choix de la fenêtre sur les modèles proposés.

II. Étude expérimentale de la structure et du mécanisme de transport du récepteur nicotinique de l'acétylcholine

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AChR) est une glycoprotéine de la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire des vertébrés. La fixation de l'acétylcholine sur le récepteur déclenche l'ouverture d'un canal perméable au Na^+ , provoquant un flux entrant de Na^+ . Ce flux conduit à une dépolarisation de la membrane et à la contraction musculaire. AChR du poisson *Torpedo* est un oligomère formé de cinq sous-unités homologues ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) dont la masse moléculaire est de 250 kDa.

AChR a fait l'objet de nombreuses études visant à déterminer son organisation dans la membrane. Quelques-uns des résultats expérimentaux obtenus sur la sous-unité α sont présentés ci-dessous.

1. La connaissance de la structure primaire de AChR α permet de tracer son profil d'hydrophobicité. Elle montre également la présence d'un site de glycosylation à la position 141 de la séquence.



Profil d'hydrophobicité de AchR α

2. Des expériences de marquage chimique effectuées à l'aide d'un analogue non perméant de l'acétylcholine se fixant spécifiquement sur les groupements thiols ont montré que les cystéines 192 et 193 sont situées du côté extra cytoplasmique.

3. L'analyse d'images de microscopie électronique indique l'existence d'un domaine important localisé sur la face externe de la membrane.

À partir des données présentées en 1/, 2/ et 3/, proposez un ou plusieurs modèle(s) d'organisation de la chaîne polypeptidique de AchR α dans la membrane.

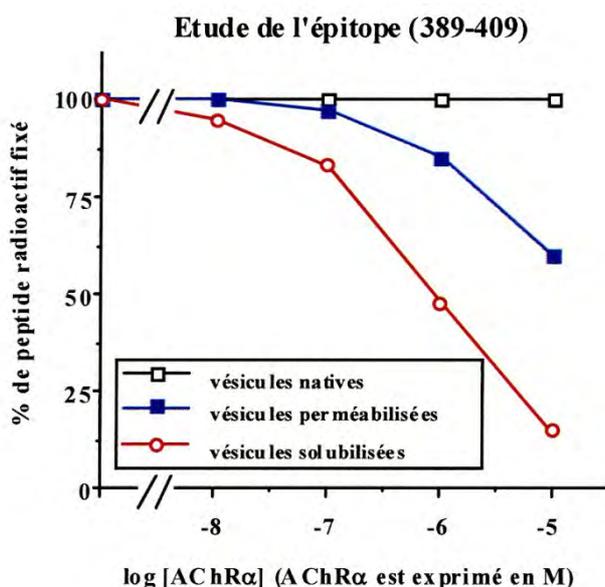
4. De nombreux résultats ont été obtenus en adoptant une approche immunologique. Le principe consiste à tester l'accessibilité de différents domaines de la protéine en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre ces domaines.

Pour chaque expérience, on dispose :

- De vésicules constituées uniquement de la membrane plasmique des cellules synaptique et contenant AchR dans son orientation native.
- D'un anticorps dirigé contre une petite séquence de la protéine dont on veut tester la localisation.
- D'un peptide radioactif (^{125}I) correspondant à la séquence étudiée.

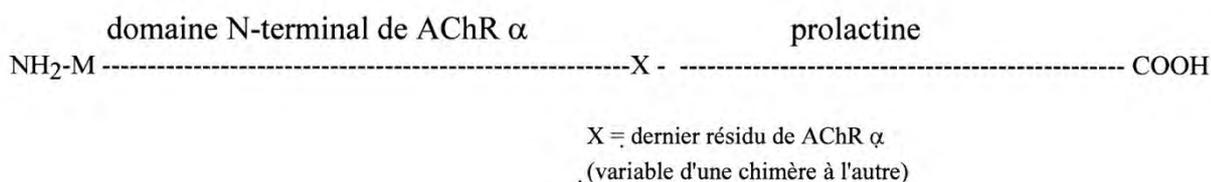
On incube les vésicules à différentes concentrations de récepteur en présence de l'anticorps et du peptide. Après une nuit à 4°C, on détermine le pourcentage de peptide radioactif fixé à l'anticorps. Deux autres expériences sont réalisées dans les mêmes conditions mais en présence de vésicules perméabilisées (perméables aux macromolécules) ou solubilisées en détergent.

Les résultats obtenus avec l'anticorps dirigé contre le segment 389-409 de AchR α sont présentés sur la figure ci-dessous.



Des résultats identiques à ceux présentés sur la figure ci-dessus ont été obtenus avec des anticorps dirigés contre les épitopes suivants : 152-159, 235-242, 339-346, 353-359, 360-370, 371-378, 389-396, et 428-437.

5. Une technique de fusion de gènes a également été utilisée. Des fusions sont réalisées entre une partie du gène codant AChRα et le gène codant la prolactine. Cette technique permet de fabriquer des protéines chimériques constituées d'une partie de longueur variable de la chaîne polypeptidique de AChRα (partie N-terminale) et de la chaîne polypeptidique de la prolactine (protéine « reporter ») :



La protéine chimérique est synthétisée in vitro en présence de microsomes. Puis, les microsomes sont préincubés en présence de protéases. La réaction de protéolyse est stoppée et la présence de prolactine visualisée par immunodétection après électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide. Le tableau ci-dessous résume les différentes fusions effectuées et les résultats obtenus.

N° du dernier résidu de AchRα dans la protéine chimérique	Présence de prolactine
239	-
271	+
334	-
396	-
432	+

Dans tous les cas, lorsque les protéases sont ajoutées à des microsomes préalablement solubilisés en détergent, aucune trace de prolactine ne peut être détectée sur gel.

Séquence des segments transmembranaires participant à la formation du pore. Le premier et le dernier résidu du segment transmembranaire de la sous-unité α sont numérotés.

Ces résultats sont-ils compatibles avec une structure en hélice α de ces segments ?

Pour progresser dans la compréhension du mécanisme de transport, les chercheurs ont utilisé un antagoniste non compétitif du récepteur à l'acétylcholine. Cet antagoniste a la propriété d'être photoactivable, ce qui lui permet, après illumination de l'échantillon, de se lier de façon covalente à l'acide aminé qui lui est le plus proche. De plus, sa petite taille et son caractère lipophile permettent sa fixation préférentielle dans le domaine transmembranaire de AchR. La fixation de l'antagoniste a été testée en absence et en présence de carbamylcholine, un analogue de l'acétylcholine.

Après incubation de AchR avec l'antagoniste photoactivable, en absence de carbamylcholine, il apparaît que l'antagoniste se fixe préférentiellement aux chaînes latérales de la leucine 251 et de la valine 255 de la sous-unité α , ainsi que sur les résidus homologues des chaînes β , γ , et δ . En revanche, en présence de carbamylcholine, la fixation de l'antagoniste à ces résidus est diminuée de 90% et de façon concomitante, le photomarquage des résidus thréonine 244 et sérine 248 de la sous-unité α (ainsi que des résidus homologues des autres sous-unités) augmente.

Que suggèrent ces résultats quant au mécanisme de transport de Na^+ par le récepteur à l'acétylcholine ?

Pour que AChR soit fonctionnel après purification et reconstitution en protéoliposomes, la présence de cholestérol est indispensable.

Quelles sont les raisons qui peuvent expliquer, selon vous, la nécessité d'inclure du cholestérol au mélange de lipides utilisés pour la reconstitution du récepteur ?

TD-Memb3

Transport du glucose

I- ETUDE DU TRANSPORT DU GLUCOSE DANS LES ERYTHROCYTES.

On étudie le transport du glucose à travers la membrane plasmique des erythrocytes. Pour cela on incube des globules rouges préalablement déplétés en glucose en présence de 5 mM de glucose dans le milieu extérieur et on mesure son incorporation au cours du temps. Les résultats ci-dessous donnent la concentration interne de glucose en fonction du temps :

Temps après l'addition de glucose (sec)	10	20	40	60	100	140	300	600
[Glu]_{int} (mM)	0,6	1,2	2,45	3,4	4,5	3,6	3	3
[Glu]_{int} (mM) en présence de X	0,6	1,2	2,45	3,4	4,5	4,8	5,1	5

On admettra que la concentration externe de glucose ne varie pas au cours de l'expérience.

On mesure également la vitesse initiale du transport du glucose en fonction de sa concentration externe en présence et en absence de X. Les résultats sont identiques dans les 2 cas :

[Glu]_{ext} (mM)	1	2	3	5	7,5	10
v_i mM/s	0,027	0,04	0,058	0,07	0,067	0,07

- Tracez les courbes $[Glu]_{int} = f(t)$ et $v_i = f([Glu]_{ext})$. Interprétez ces courbes : que peut-on dire sur le type de transport et quel pourrait être le rôle de X.

On refait les mêmes expériences de mesure du transport de glucose en présence de X mais en rajoutant à la suspension de globules rouges un autre composé Y. Les résultats sont les suivants :

Temps après l'addition de glucose (sec)	10	20	40	60	100	140	300	600
[Glu]_{int} (mM) en présence de X et Y	0,3	0,6	1,2	2,2	3,3	4	4,8	5

[Glu]_{ext} (mM)	1	2	3	5	7,5	10
v_i mM/s	0,013	0,022	0,031	0,038	0,047	0,05

- A partir de ces résultats proposez un rôle pour Y.

On refait les mêmes expériences de mesure du transport de glucose en présence de X mais en rajoutant à la suspension de globules rouges un autre composé Z. Les résultats sont les suivants :

Temps après l'addition de glucose (sec)	300	600	900	1200	1400	1800	3000	5400	10800
[Glu]_{int} (mM) en présence de X et Z	0,545	1,03	1,46	1,85	2,09	2,5	3,42	4,37	4,92

[Glu]_{ext} (mM)	1	2	5	7,5	10
v_i μM/s	0,4	0,8	1,95	2,9	4

- A partir de ces résultats proposez un rôle pour Z.

II- PURIFICATION ET RECONSTITUTION DU TRANSPORTEUR DU GLUCOSE DES ERYTHROCYTES.

Purification

Le protocole de purification du transporteur de glucose localisé dans la membrane du globule rouge (Glut1) est donné ci-dessous.

Etape 1 : un échantillon de sang est centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé

et le culot remis en suspension dans du tampon phosphate de Na 5 mM, pH 8, contenant 150 mM de NaCl. Cette opération est répétée plusieurs fois.

Etape 2 : le culot d'érythrocytes est remis en suspension dans du tampon phosphate de Na 5 mM, pH 8. Après quelques minutes d'agitation, l'échantillon est centrifugé à 21500 g pendant 30 min. Le surnageant (très rouge) est éliminé et le culot est remis en suspension dans du tampon phosphate de Na 5 mM, pH 8 et centrifugé dans les mêmes conditions.

Etape 3 : le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans une solution de NaOH 15 mM contenant 2 mM d'EDTA. Après quelques minutes d'agitation l'échantillon est centrifugé à 43500 g pendant 15 min.

Etape 4 : le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans un tampon Tris 50 mM pH 7,4 auquel est ajouté de l'octylglucoside (OG) à la concentration finale de 34 mM. Après 20 minutes d'agitation l'échantillon est centrifugé à 180000 g pendant 1 h.

Etape 5 : le surnageant est récupéré et déposé sur une colonne échangeuse d'anions préalablement équilibrée avec un tampon 50 mM Tris pH 7,4 contenant 34 mM d'OG. L'élution est effectuée dans ce même tampon par un gradient linéaire de NaCl. Des fractions sont collectées et les protéines détectées par mesure de l'absorbance à 280 nm. Le profil d'élution est donné dans la figure 1.

Analyse : les fractions délimitées par les flèches sont réunies. On réalise sur ce mélange un dosage de protéine, une électrophorèse en milieu dénaturant (SDS-PAGE) ainsi qu'un western blot. Les résultats sont donnés dans la figure 2.

- Expliquez ce que l'on fait dans chacune des étapes de la purification (précisez ce que l'on trouve dans les différents culots et surnageants).

- Quel autre composé aurait-on pu utiliser à la place de NaOH ou à la place de l'OG ?

- Le transporteur est-il totalement pur ?

Reconstitution

Les fractions purifiées sont utilisées pour une reconstitution dans des liposomes formés de lipides extraits et purifiés des érythrocytes. Pour cela on mélange de l'échantillon purifié et des lipides dans un tampon Tris 50 mM pH 7,4 contenant 100 mM NaCl et 62 mM OG. Après quelques minutes d'agitation le mélange est dialysé pendant 15 heures contre du tampon

Tris 50 mM pH 7,4, 100 mM NaCl. Le dialysat est centrifugé à 200000 g pendant 30 min et le culot remis en suspension dans le tampon Tris 50 mM pH 7,4, 100 mM NaCl.

On effectue sur ces protéoliposomes, une expérience de fonctionnalité : pour cela on incube les protéoliposomes en présence de 3 mM de glucose radioactif. A des temps donnés on prélève un échantillon et on mesure l'incorporation du glucose en séparant les liposomes du milieu extérieur.

Chaque prélèvement contient 1,5 mg de lipides. Les résultats ci-dessous donnent la quantité de glucose incorporé en fonction du temps.

Temps min	1	3	5	10	15	20	25	30
Glucose interne nmol	0,2	0,5	0,75	1	1,2	1,4	1,6	1,6

On admettra que la concentration externe de glucose ne varie pas au cours de l'expérience.

- *A quelle concentration de glucose interne doit-on se trouver au plateau ? En déduire le volume intraliposomal dans lequel est contenu ce glucose. Calculez ce volume en $\mu\text{l}/\text{mg}$ de lipides.*

L'analyse microscopique de cette reconstitution montre que les protéoliposomes sont unilamellaires, de taille homogène et ont un diamètre moyen de 32 nm. On estime à 4 nm l'épaisseur de la bicouche.

- *Calculez le volume interne théorique d'un protéoliposome.*
- *Sachant qu'un lipide occupe une surface de $0,5 \text{ nm}^2$ déterminez le nombre de lipides par protéoliposome. La masse moyenne d'un lipide étant de 785 Da, en déduire la masse de lipides par liposome.*
- *Déduire de ces calculs le volume théorique des protéoliposomes en $\mu\text{l}/\text{mg}$ de lipides.*

Il existe un moyen de titrer le nombre de transporteurs reconstitués. Cette quantité est évaluée ici à $6,5 \cdot 10^{-5}$ transporteur/lipide.

- *Calculez le nombre de transporteurs par liposome.*

Cette expérience a été faite dans le but de répondre à une question concernant l'activité de Glut1 reconstitué. En effet si l'on mesure la vitesse d'entrée du glucose par glut1 reconstitué on observe qu'elle ne représente que quelques % de la valeur estimée in vivo (pour un nombre de transporteurs équivalent). Ce phénomène est fréquemment observé pour d'autres transporteurs reconstitués. Les raisons peuvent être :

- qu'une faible fraction des transporteurs reconstitués seulement est active et l'activité est comparable à celle du transporteur in vivo.
- Qu'une fraction importante voir la totalité des transporteurs sont fonctionnels mais leur activité est plus faible qu'*in vivo*.
- *Montrer que l'expérience effectuée ci-dessus permet de répondre à cette question et qu'elle favorise la seconde hypothèse. Vous comparerez pour cela la valeur du volume intraliposomal occupé par le glucose à l'équilibre à celui des liposomes (ces valeurs ne sont comparables que ramenées à la même quantité de lipides).*

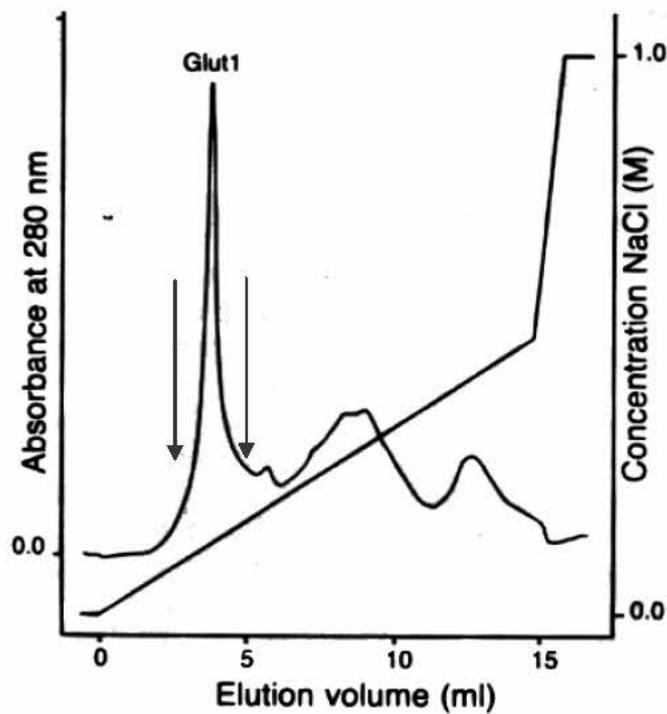
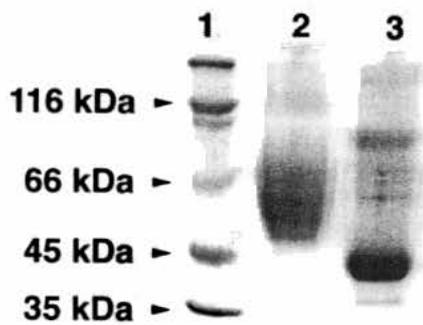
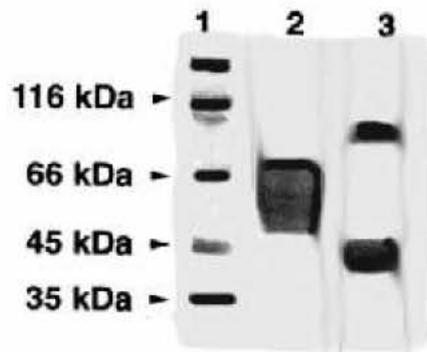


Figure 1 : profil d'élution de la chromatographie échangeuse d'anions



SDS-PAGE des fractions de Glut1 purifié
 1 : marqueurs de masse
 2 : fractions récupérées de la chromatographie
 3 : fractions récupérées de la chromatographie et traitées par une glycosidase*



Western blot révélé par des anticorps anti Glut1
 1 : marqueurs de masse
 2 : fractions récupérées de la chromatographie
 3 : fractions récupérées de la chromatographie et traitées par une glycosidase*

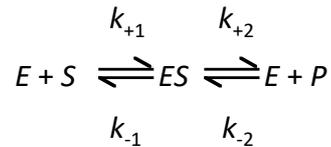
* : glut1 est une protéine glycosylée, un traitement par une glycosidase permet une hydrolyse du sucre.

Figure 2

TD Enzymo 1 : cinétique enzymatique

Exercice 1 : Rappel de cours : cinétique Michaelienne

Une réaction catalysée par un enzyme peut être schématisée de la façon suivante :



E , S , ES , et P représentent respectivement l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit de la réaction. k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} et k_{-2} sont les constantes de vitesse des réactions partielles.

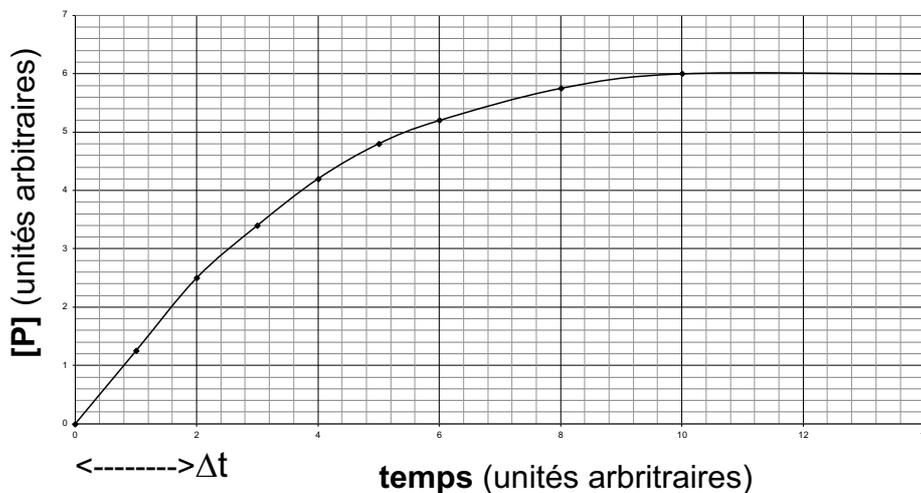
1. Écrivez l'équation donnant la vitesse d'apparition du produit de la réaction en fonction de $[ES]$, $[E]$, $[P]$, k_{+2} et k_{-2} .

NB: $[ES]$, $[E]$ et $[P]$ représentent respectivement les concentrations en complexe enzyme-substrat, enzyme et produit à un instant t quelconque de la réaction

2. Si on suit, pendant les premiers instants de la réaction, l'apparition du produit P , on peut considérer sa concentration comme négligeable.

Écrivez dans ces conditions l'équation donnant la vitesse initiale v_0 .

3. On a suivi l'apparition du produit de la réaction en fonction du temps et l'on a obtenu la courbe suivante :



Que pensez-vous de la vitesse de la réaction dans l'intervalle de temps Δt ?

4. Qu'en concluez-vous pour $[ES]$ dans cet intervalle de temps ?

Pendant cet intervalle de temps, on considère que la réaction enzymatique est à l'état stationnaire. Quelle équation rend compte de cet état ?

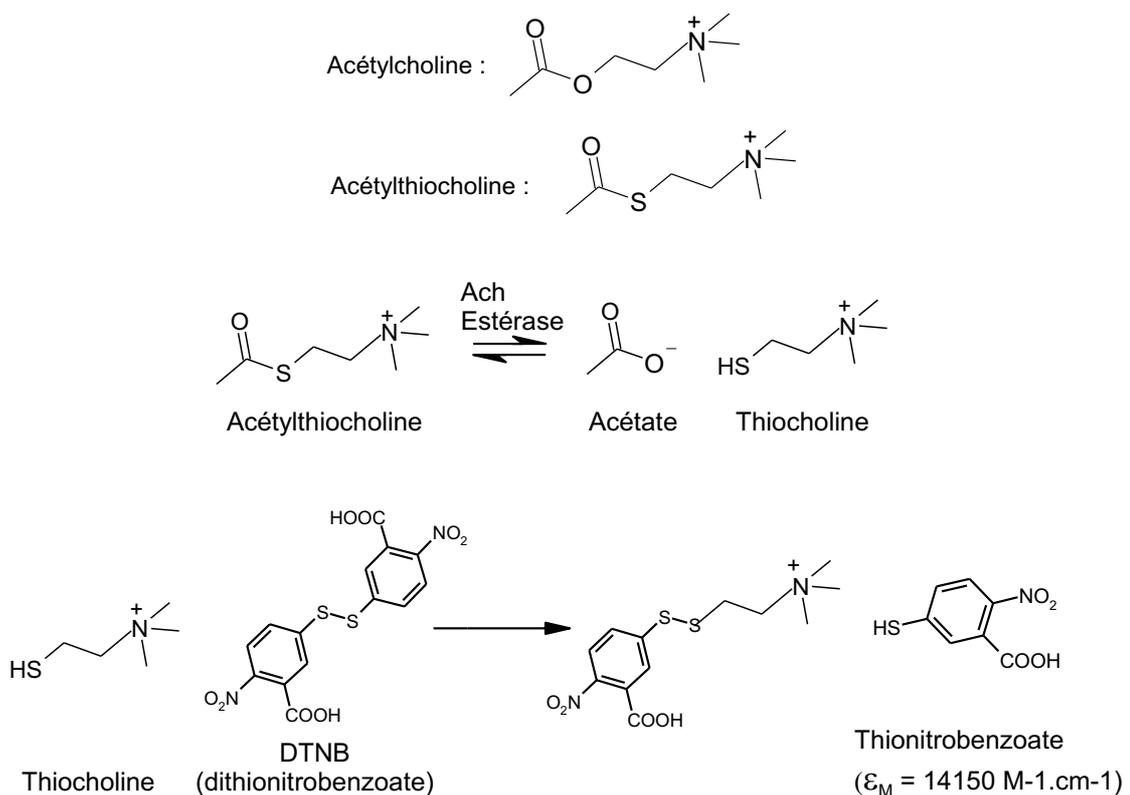
5. Écrivez les équations de conservation de l'enzyme et du substrat.

NB : On appelle respectivement $[S]_0$ et $[E]_0$ les concentrations initiales en substrat et enzyme ; l'enzyme étant le catalyseur de la réaction, sa concentration est très faible ; on a donc $[E]_0 \ll [S]_0$

6. Etablissez l'équation de vitesse (équation de Michaelis-Menten) v_0 en fonction de $[S]_0$, $[E]_0$ et des constantes de vitesse
7. Si on travaille à une concentration en substrat $[S]_0 = \text{constante}$ et si l'on fait varier la concentration en enzyme $[E]_0$, tracez l'allure de la courbe $v_0 = f([E]_0)$
8. Si on travaille à une concentration en enzyme $[E]_0 = \text{constante}$ et si l'on fait varier la concentration en substrat $[S]_0$
- Tracez l'allure de la courbe $v_0 = f([S]_0)$; quels paramètres peut-on estimer sur cette courbe ?
 - Tracez l'allure de la courbe $[ES] = f([S]_0)$; quel paramètre peut-on retrouver sur cette courbe?
 - Que peut-on dire de l'enzyme quand on travaille avec les concentrations en substrat les plus élevées ?

Exercice 2

L'acétylcholine estérase a pour fonction d'hydrolyser l'acétylcholine libérée sous l'effet d'un potentiel d'action au niveau de certaines synapses. Les produits formés lors de cette réaction sont la choline et l'acétate. Pour mesurer l'activité enzymatique, on utilise la capacité de l'acétylcholine estérase à hydrolyser un substrat synthétique : l'acétylthiocholine. Le groupement thiol de la thiocholine libérée est révélé par réaction avec le dithionitrobenzoate (ou DTNB) présent dans le mélange réactionnel. Le produit détecté est le thionitrobenzoate (ou TNB) qui absorbe spécifiquement à 412nm ($\epsilon_M = 14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)



1. Pour quelle raison utilise-t-on l'acétylthiocholine dans le test de mesure de l'activité enzymatique plutôt que l'acétylcholine, substrat naturel de l'enzyme ?
 - Quelle condition faut-il respecter pour que la variation d'absorbance en fonction du temps reflète effectivement la vitesse de la réaction catalysée par l'acétylcholine estérase ?
 - Comment s'en assurer ?
 - Quel contrôle faut-il obligatoirement effectuer pour s'assurer de la spécificité de la mesure ?

On réalise une série d'expériences de la façon suivante : on prépare un mélange contenant du DTNB 1mM et de l'acétylthiocholine en solution dans un tampon approprié. A $t=0$, on ajoute l'enzyme et on mesure l'absorbance à 412 nm de la solution en fonction du temps. On appelle E_0 et S_0 les concentrations initiales en enzyme et en substrat au temps $t=0$ de la réaction.

Exp1 : $E_0 = 0,4\text{nM}$ et $S_0 = 150\mu\text{M}$

	$A_{412\text{nm}}$
$t = 60\text{s}$	0,049
$t = 120\text{s}$	0,1
$t = 3600\text{s}$	2,12

Exp2 : $E_0 = 0,4\text{nM}$ et $S_0 = 0,3\text{mM}$

	$A_{412\text{nm}}$
$t = 60\text{s}$	0,051
$t = 120\text{s}$	0,102

2. Que peut-on dire de la valeur du K_M de l'acétylcholine estérase pour l'acétylthiocholine ? Calculez la constante catalytique de cette réaction.
3. Quelles seront les valeurs d'absorbance A_{3a} , A_{3b} et A_4 obtenues dans les expériences suivantes :

Exp3 : $E_0 = 0,8\text{nM}$ et $S_0 = 150\mu\text{M}$

	$A_{412\text{nm}}$
$t = 60\text{s}$	A_{3a}
$t = 3600\text{s}$	A_{3b}

Exp4 : $E_0 = 0,8\text{nM}$ et $S_0 = 0,1\text{mM}$

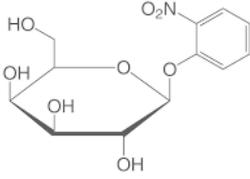
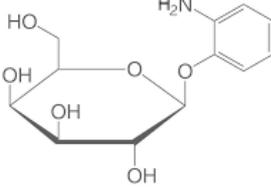
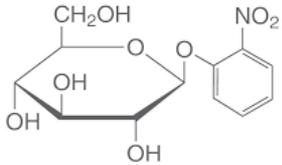
	$A_{412\text{nm}}$
$t = 3600\text{s}$	A_4

4. On réalise une expérience dans laquelle on suit l'hydrolyse de l'acétylthiocholine comme précédemment, mais dans un milieu réactionnel contenant également de l'acétylcholine. Ecrivez le schéma réactionnel correspondant à cette expérience. Pour simplifier on supposera que l'enzyme est michaélien et on appellera E l'acétylcholine estérase, S_a l'acétylthiocholine et S_b l'acétylcholine.
5. Si par exemple on répète l'expérience 2 en présence d'acétylcholine à 0,3mM, quel sera qualitativement l'effet de l'acétylcholine sur la variation d'absorbance à 412 nm à 60 et 3600s ? Comment va varier cet effet si l'on répète l'expérience avec des concentrations croissantes d'acétylcholine ?

Exercice 3

La β -galactosidase est une enzyme soluble cytoplasmique qui permet l'assimilation du lactose par l'organisme qui la produit. Elle catalyse la réaction d'hydrolyse du lactose en

glucose et galactose. La β -galactosidase d'*E. coli* hydrolyse également les 3 substrats synthétiques suivants :

Substrat S1	S2	S3
orthonitrophényl β -D-galactoside	orthoaminophényl β -D-galactoside	orthonitrophényl β -D-glucoside
		

1. En utilisant le substrat S1 et avec une concentration en enzyme $[E]_0 = 1,2 \text{ nM}$, on obtient les paramètres enzymatiques suivants : $V_M = 0,2 \Delta A. \text{ min}^{-1}$; $K_M = 0,13 \text{ mM}$

- Sachant que le coefficient d'extinction molaire ϵ_M de l'orthonitrophénol (produit de la réaction) est égal à $3700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, calculez les paramètres cinétiques V_M en $\text{M}.\text{min}^{-1}$ et k_{cat} en s^{-1} .

2. En utilisant les 2 autres substrats, on obtient les paramètres suivants :

$$\text{S2 : } \quad k_{\text{cat}} = 56 \text{ s}^{-1} \quad K_M = 0,45 \text{ mM}$$

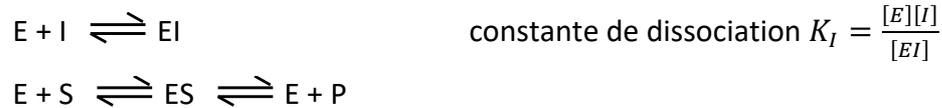
$$\text{S3 : } \quad k_{\text{cat}} = 0,14 \text{ s}^{-1} \quad K_M = 6,2 \text{ mM}$$

L'efficacité catalytique d'un enzyme vis à vis d'un substrat se définissant comme le rapport k_{cat}/K_M , calculez l'efficacité catalytique de la β -galactosidase d'*E. coli* vis à vis des 3 substrats testés. Concluez.

TD Enzymo 2 : Inhibition compétitive et non compétitive

Exercice 1 : rappel de cours : Inhibition compétitive

L'enzyme s'associe réversiblement au substrat ou à l'inhibiteur compétitif selon les schémas suivants :

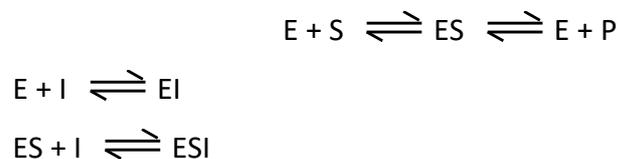


1. Établissez, dans les conditions d'état stationnaire, l'équation de vitesse.
2. Représentez les courbes $v_0 = f([S]_0)$ et $1/v_0 = f(1/[S]_0)$ en absence d'inhibiteur puis en présence d'inhibiteur.
3. On détermine graphiquement, pour différentes concentrations en inhibiteur, les constantes de Michaelis apparentes (K_M'). Représentez graphiquement les variations de K_M' en fonction de $[I]$; déduisez-en K_I .

NB : On rappelle l'expression $K_M' = K_M(1 + \frac{[I]}{K_I})$

Exercice 2 : rappel de cours : Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se fixant sur l'enzyme à un emplacement différent de celui du site de fixation du substrat, un complexe ternaire peut se former ; on aboutit donc aux schémas suivants :



Dans les conditions d'état stationnaire l'équation de vitesse devient (*démonstration non demandée*)

$$v_0 = \frac{V_M' \times [S]_0}{K_M + [S]_0} \text{ avec } V_M' = \frac{V_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

- a) Représentez les courbes $v_0 = f([S]_0)$ et $1/v_0 = f(1/[S]_0)$ en absence, puis en présence d'inhibiteur.
- b) En considérant l'expression de V_M' en fonction de $[I]$, proposez une représentation graphique linéaire permettant de déterminer K_I .

Exercice 3

Les études cinétiques réalisées avec un enzyme montrent que, pour une concentration initiale en substrat égale à 50 $\mu\text{g/mL}$, la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale V_M obtenue en présence d'une concentration saturante en substrat. Sachant que la masse moléculaire du substrat est de 200 Da, calculez le K_M de cet enzyme vis à vis de ce substrat.

On mesure les vitesses initiales de la réaction pour différentes concentrations initiales en substrat et on obtient les résultats suivants :

$[S]_0$ en M	v_0 en $\mu\text{M min}^{-1}$
$1.0 \cdot 10^{-3}$	0.0285
$1.6 \cdot 10^{-4}$	0.0140
$1.0 \cdot 10^{-4}$	0.0100
$6.6 \cdot 10^{-5}$	0.0077
$4.6 \cdot 10^{-5}$	0.0055

Déterminez graphiquement, en utilisant la représentation $1/v_0 = f(1/[S]_0)$, les valeurs V_M et K_M . Comparez la valeur de K_M à celle calculée précédemment.

Une même série d'expériences est réalisée en présence d'un inhibiteur à la concentration de 10^{-5} M. L'analyse graphique montre que le K_M est inchangé et que l'intersection de la droite nouvellement obtenue avec l'axe des ordonnées définit un point d'ordonnée 2 fois supérieure à celle du point d'intersection de la droite obtenue en l'absence d'inhibiteur avec ce même axe. Tracez cette droite ; de quel type d'inhibition s'agit-il ? Calculez la constante de dissociation, K_i , de l'inhibiteur pour l'enzyme.

Exercice 4 : La protéase du VIH, une cible thérapeutique

Partie 1

Parmi les recherches menées pour combattre l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine ou virus du sida), certaines se sont orientées en direction d'enzymes spécifiques du virus : transcriptase inverse et protéase en particulier. Si l'AZT (azidothymidine), la ddC (didésoxycytidine) et la ddi (didésoxyinosine) sont utilisées pour bloquer la transcriptase inverse, des inhibiteurs de la protéase sont également utilisés.

La protéase du VIH est un enzyme dimérique. Sa structure tridimensionnelle a été établie ce qui a permis de rechercher des inhibiteurs de cet enzyme. L'un d'entre eux le VCSF1 a été étudié ; sa constante de dissociation, K_i est de $100 \mu\text{M}$. On déterminera, dans l'étude suivante, le K_i d'un autre inhibiteur le VCSF8.

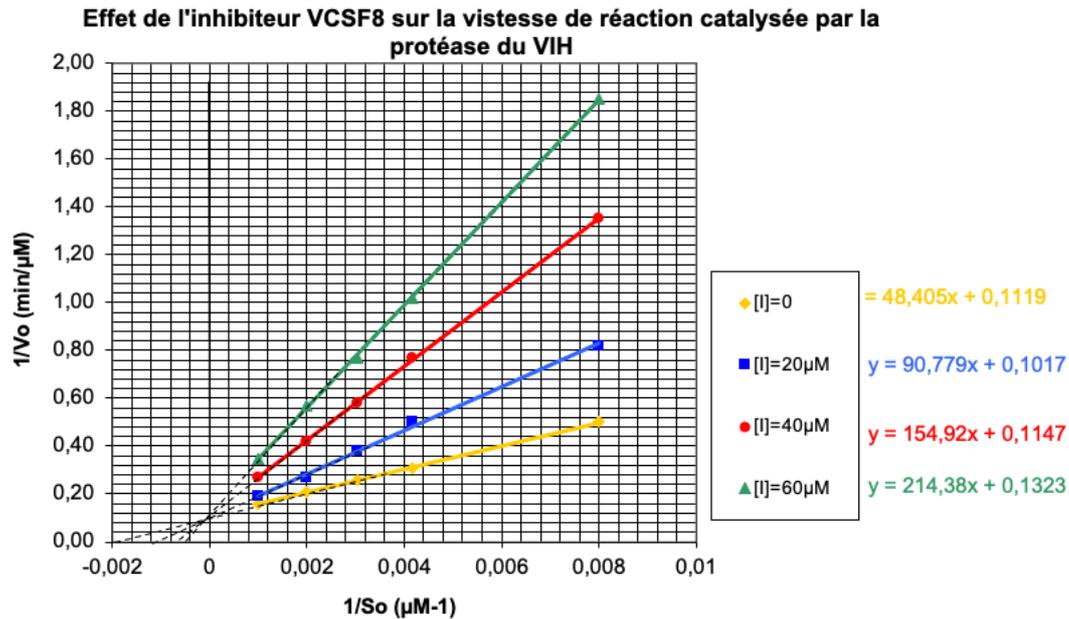
Les études sont réalisées de la façon suivante :

La protéase du VIH est incubée avec l'inhibiteur VCSF8 ; 1 minute après un peptide substrat est ajouté. Le mélange réactionnel est incubé pendant 5 minutes à 37°C ; la réaction est arrêtée et l'activité enzymatique est mesurée en quantifiant les produits d'hydrolyse par chromatographie HPLC. Il a été vérifié que, dans les conditions des expériences, on était toujours en conditions de vitesse initiale après 5 minutes de réaction.

Les résultats suivants ont été obtenus :

$[S]_0$ (mM)	v_0 sans I ($\mu\text{M min}^{-1}$)	v_0 avec [I]= $20\mu\text{M}$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)	v_0 avec [I]= $40\mu\text{M}$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)	v_0 avec [I]= $60\mu\text{M}$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)
0.125	2.00	1.22	0.74	0.54
0.24	3.22	2.00	1.30	0.98
0.33	3.85	2.63	1.72	1.30
0.50	4.76	3.70	2.38	1.75
1.00	6.25	5.26	3.70	2.86

Ces données ont été représentées ci-dessous selon la représentation de Lineweaver-Burk $1/v_0 = f(1/[S]_0)$.



1. Donner les paramètres K_M et V_M de la protéase du VIH vis à vis de son substrat peptidique en absence d'inhibiteur puis les paramètres en présence de l'inhibiteur (à chacune des 3 concentrations).
2. De quel type d'inhibition s'agit-il ?
3. Déterminez graphiquement, en utilisant une représentation graphique appropriée, le K_i de l'inhibiteur VCSF8 pour l'enzyme ; comparez-le à celui de l'inhibiteur VCSF1;
4. lequel de ces deux inhibiteurs a-t-il le plus d'intérêt thérapeutique ? Pourquoi ?

Partie 2 :

La protéase du VIH clive les polyprotéines virales nouvellement synthétisées pour libérer des protéines fonctionnelles essentielles à l'assemblage de nouvelles particules de virus. Cette protéase coupe spécifiquement des polypeptides ayant des séquences Tyr-Pro ou Phe-Pro. Ce type de clivage est inhabituel pour les protéases humaines.

1/ En quoi la protéase HIV peut-elle être une cible potentielle pour lutter contre l'infection par le virus ?

La première génération d'inhibiteurs de cette protéase a été basée sur des pseudopeptides spécifiques de cette enzyme. C'est-à-dire des molécules synthétiques analogues à des peptides mais pour lesquelles la liaison peptidique est remplacée par une liaison non clivable.

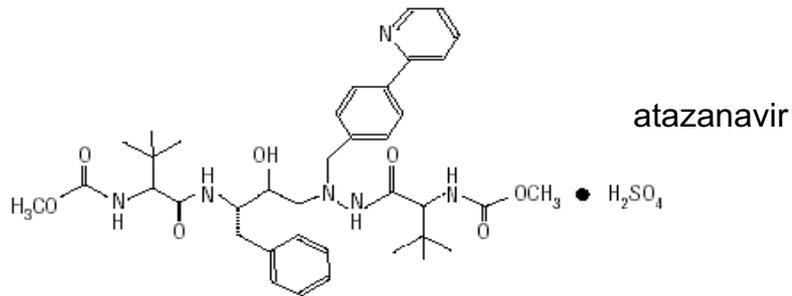
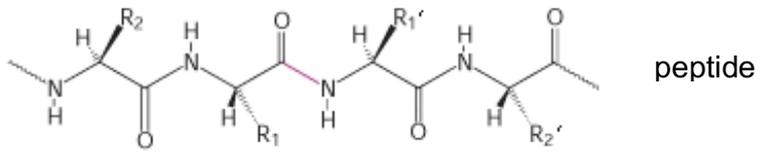


Figure 1

La figure 1 montre un peptide substrat et un inhibiteur de cette enzyme, l'atazanavir.

2/ Qu'observez-vous de commun sur ces molécules ?

Peut-on prévoir un mode d'inhibition de cette molécule, et lequel ?

3/ Décrivez la structure de la protéine représentée sur la figure 2.

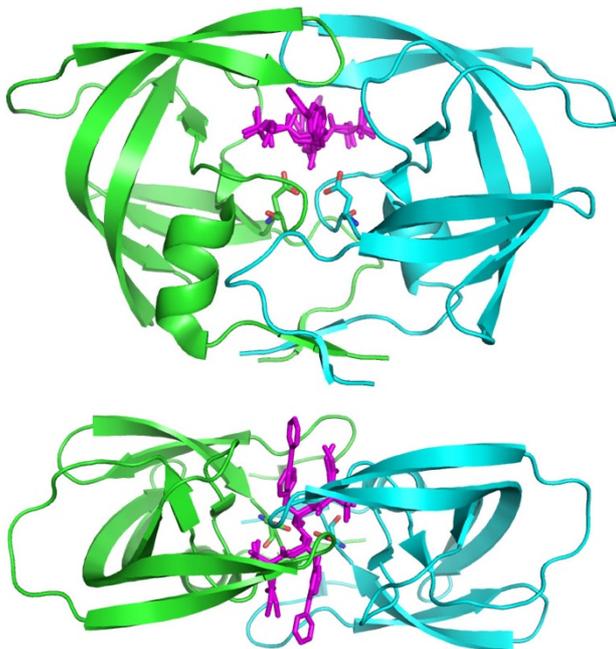


Figure 2. Structure d'un complexe protéase HIV / inhibiteur (atazanavir) vue sous orientations différentes. Les chaînes latérales des 2 résidus Asp25 sont représentées.

4/ D'après la surface de la protéine représentée sur la figure 3, comment pourrait-on expliquer que l'inhibiteur ait pu accéder à son site de fixation ?

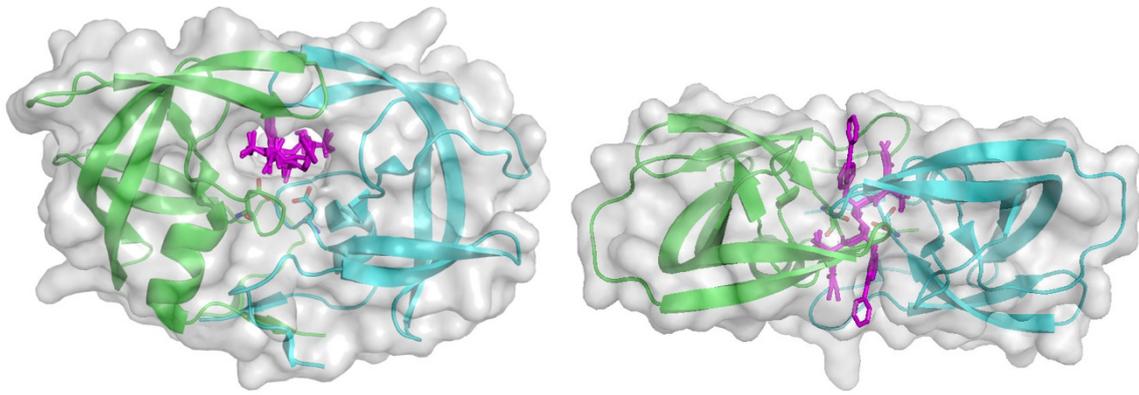


Figure 3. Représentation de la surface occupée par les atomes de la protéine.

Une difficulté dans la mise au point d'un traitement efficace d'infections par le VIH est la forte capacité du virus à évoluer en mutant constamment l'ensemble de ses gènes. Cette propension à la mutation a conduit à des résistances aux molécules utilisées dans le traitement, notamment aux inhibiteurs de protéases. Parmi toutes les séquences de variants de la protéase trouvées chez des patients résistants au traitement, les résidus Asp25, Thr26 et Gly27 sont parfaitement conservés.

L	G	K	L		V	L	E	M		M	G	I	F	I	D	I	I	A	G		V	I	I	N	L	I
10	16	20	24		32	33	34	36		46	48	50	53	54	60	62	64	71	73		82	84	85	88	90	93
I	E	R	I		I	I	Q	I		I	V	L	L	L	E	V	L	V	C		A	V	V	S	M	L
F		M			F			L		L		Y	V				M	I	S		T					
V		I			V			V					M				V	T	T		F					
C		T											A					L	A		I					
		V																								

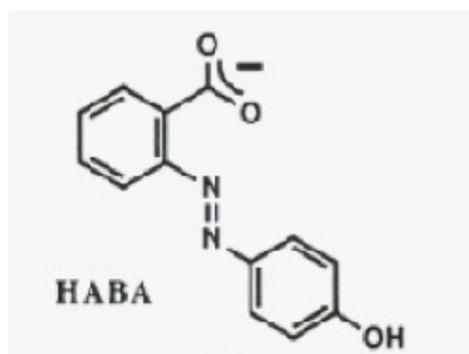
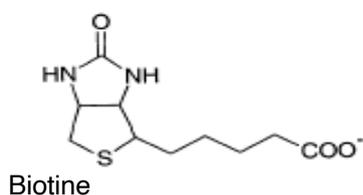
Figure 4. Mutations de la protéase les plus fréquemment observées chez des patients insensibles au traitement par l'atazanavir.

5/ D'après ces données, comment pourrait-on expliquer l'émergence de ces résistances ? quel serait le rôle dans la protéase des résidus conservés et celui des résidus mutés dans les formes résistantes?

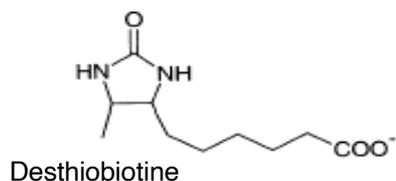
TD Interactions Protéines – Ligands

EXERCICE 1 : Etude comparative de ligands de la streptavidine

On étudie les interactions entre une protéine, la streptavidine, et différentes molécules dont les structures sont représentées ci-dessous. Le HABA est une molécule qui absorbe la lumière visible. La longueur d'onde au maximum d'absorption est fortement déplacée lors de son interaction avec la streptavidine. Ce changement est visible, la solution de HABA passant d'une coloration jaune, lorsque la molécule est à l'état isolé, vers une coloration rouge lorsqu'elle est fixée sur la streptavidine. Le coefficient d'absorption molaire à 500 nm du HABA qui correspond à cette absorbance dans le rouge passe d'une valeur nulle pour le HABA libre à $\epsilon_M = 35000M^{-1}.cm^{-1}$ pour le HABA fixé sur la streptavidine. Pour étudier qualitativement le phénomène, on fixe de façon stable de la streptavidine sur



HABA : 2- [4'-hydroxy-benzeneazo] benzoic acid



un gel de chromatographie. Le gel est blanc translucide et ne change pas d'aspect lors de la fixation de la streptavidine. On utilise ce gel contenant de la streptavidine pour préparer plusieurs colonnes de chromatographie identiques. Sur chacune des colonnes, on passe successivement les solutions indiquées, en volume suffisant pour équilibrer la colonne, puis on note la couleur du gel à l'issue du passage de chaque solution. Une colonne témoin est réalisée avec le même gel qui ne comporte pas de streptavidine. Cette colonne témoin reste d'une couleur blanc translucide en présence de biotine ou de desthiobiotine et devient jaune lorsqu'elle contient une solution de HABA.

Colonne 1

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1) HABA | Rouge |
| 2) Desthiobiotine | Blanc translucide |
| 3) HABA | Rouge |

Colonne 2

- | | |
|------------|-------|
| 1) HABA | Rouge |
| 2) Biotine | Blanc |
| 3) HABA | Jaune |

Colonne 3

- | | |
|--------------------------|---|
| 1) HABA + Desthiobiotine | Jaune (concentrations égales dans le mélange) |
| 2) HABA | rouge |

1. Représentez schématiquement le principe de l'expérience.

2. Quelles conclusions peut-on proposer, à partir de ces expériences, concernant l'interaction entre la streptavidine et les molécules testées ?

Peut-on les classer par ordre croissant d'affinité ?

On cherche à mesurer quantitativement les paramètres de l'interaction streptavidine/HABA. Pour cela, on mesure tout d'abord l'absorbance à 500 nm de solutions contenant une concentration constante de streptavidine ($[streptavidine] = 2 \mu M$) et des concentrations variables de HABA. Les valeurs mesurées sont reportées dans le tableau ci-dessous. On utilise dans cette expérience comme dans les suivantes, des cuves de trajet optique de 1 cm.

[HABA] en μM	Absorbance à 500 nm
50	0,2
100	0,23
200	0,255

3. Calculez, à partir de ces données, une valeur approchée du nombre de sites de fixation pour le HABA par molécule de streptavidine.

4. La streptavidine est une protéine tétramérique ; qu'en déduisez-vous ?

On réalise ensuite une série de mesures en concentration constante de HABA ($[HABA] = 3 \mu M$) et en concentrations variables de streptavidine. Pour simplifier, on admettra que les sites sont identiques et indépendants, et les données sont donc exprimées en fonction de la concentration en monomère de streptavidine.

Monomère de Streptavidine] (en μM)	Absorbance à 500nm
0	0
10	0,037
20	0,053
50	0,078
75	0,084
100	0,088

On appelle :

- $[L]_0$ la concentration en HABA totale
- K_D la constante de dissociation de l'équilibre de fixation entre une molécule de HABA et chaque molécule de streptavidine
- $[P]$ la concentration en monomère de streptavidine libre à l'équilibre dans chaque mélange réactionnel
- $[P]_0$ la concentration totale en monomère de streptavidine

5. Exprimez K_D en fonction de $[P]_0$, $[L]_0$ et $[PL]$.

6. Estimez l'ordre de grandeur de K_D par un traitement arithmétique des données. Quel type de traitement de ces données permettrait de déterminer plus précisément K_D ?
7. Montrer que l'équation de la courbe $[PL] = f([P])$ est une hyperbole. Quelle est son asymptote ? Quelle est la valeur de $[P]$ lorsque la moitié des molécules de ligand sont complexées ?
8. Tracez la courbe $[PL] = f([P]_0)$ à partir des données expérimentales. Quelle approximation doit-on faire pour en déduire une valeur approximative de K_D ?
9. Exprimer $[PL]/[P]$ en fonction de $[PL]$, K_D et $[L]_0$ sans faire d'approximation. Montrer que cette relation, appelée **relation de Scatchard**, permet de déterminer une valeur plus précise de K_D . Tracer $[PL]/[P]$ en fonction de $[PL]$ et déterminer K_D .
10. Sachant que la constante de dissociation du complexe streptavidine-biotine est de l'ordre de 10^{-13} M et qu'il est possible de « biotinyler » toute protéine d'intérêt, proposer une application de l'utilisation du complexe streptavidine-biotine.

EXERCICE 2 : Etude d'une interaction récepteur-hormone

(Expérimentations et résultats tirés des travaux d'A. Mélançon, Université du Québec à Trois-Rivières)

Une protéine P est constituée de plusieurs sites récepteurs R du ligand L ; n est le nombre de sites récepteurs par molécule de protéine ($[R]_0 = n \cdot [P]_0$). On admet que les sites récepteurs sont identiques et indépendants.

1. Ecrire l'expression de K_D et en déduire la relation de Scatchard pour le récepteur (protéine P) sur lequel se fixe le glucagon (ligand L) :

$$\frac{[RL]}{[L]} = n \times \frac{[P]_0}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D}$$

Le glucagon est une hormone peptidique de 29 résidus sécrétée par le pancréas. Lorsque le taux de glucose dans le sang (glycémie) diminue significativement, la sécrétion de glucagon est stimulée. Le glucagon sécrété agit principalement sur les hépatocytes, par l'intermédiaire d'un récepteur situé à leur surface : après fixation de l'hormone sur le récepteur, les réserves de glycogène hépatique sont mobilisées et hydrolysées sous forme de glucose libéré dans le sang.

Dans le but d'étudier les propriétés de liaison du récepteur au glucagon, et plus précisément après une période de jeûne ou d'exercice physique, des rats ont été assignés aléatoirement à des groupes contrôle (7 animaux), jeûne (7 animaux) et exercice physique

(7 animaux). Les rats du groupe « jeûne » ont été privés de nourriture pendant 24 heures, tandis que les rats du groupe « exercice physique » ont été soumis à une session de nage de 180 minutes. Les rats du groupe « contrôle » n'ont rien subi de particulier.

Juste après la fin de l'expérimentation, les rats ont été sacrifiés. Leur sang a été prélevé au niveau de la veine cave abdominale et, après centrifugation, le plasma a été récupéré et conservé à -80°C. Les foies ont quant à eux été prélevés, pesés, coupés en plusieurs morceaux et conservés à 4°C dans une solution tampon de saccharose à 4%. Les concentrations respectives en glucose plasmatique et glycogène hépatique sont représentées pour chaque groupe d'animaux, à la figure 1.

2. Que pouvez-vous conclure des effets du jeûne et de l'exercice physique sur ces deux concentrations ?

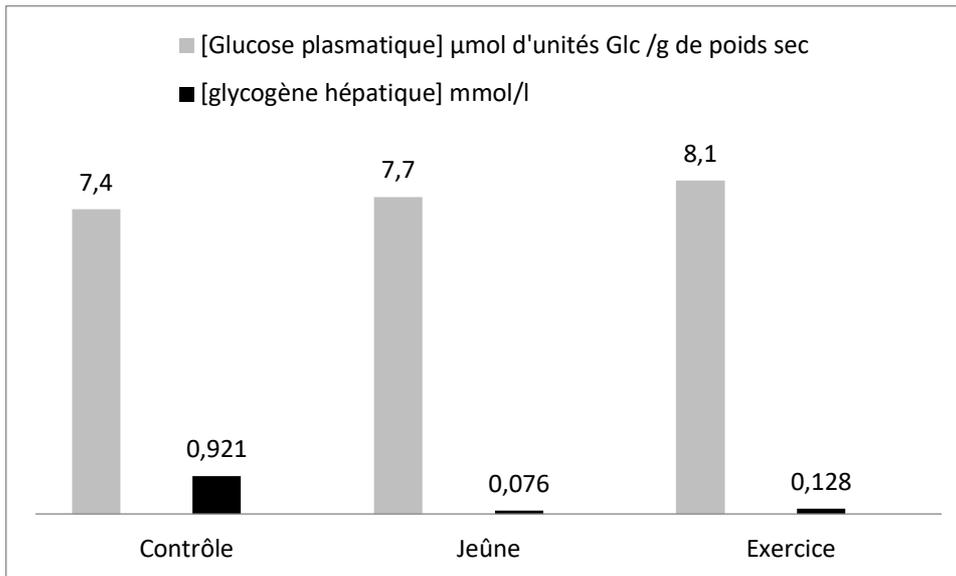


Figure 1 : Concentrations de glucose plasmatique et glycogène hépatique pour chaque groupe d'animaux.

Les membranes plasmiques des hépatocytes sont préparées par fractionnement subcellulaire à 4°C puis soumises à une expérience dite de radiolisation: une série de solutions contenant une quantité fixe de membranes sont incubées en présence de différentes concentrations en glucagon marqué à ^{125}I ; chaque solution est ensuite filtrée très rapidement à l'aide d'une pompe à vide sur une membrane dont la porosité permet le passage de molécules de moins de 10 kDa. La radioactivité présente dans la solution filtrée est mesurée ainsi que celle retenue sur le filtre.

3. Que permet de mesurer cette expérience?

L'expérience décrite ci-dessus a permis d'obtenir le graphique obtenu à la figure 2.

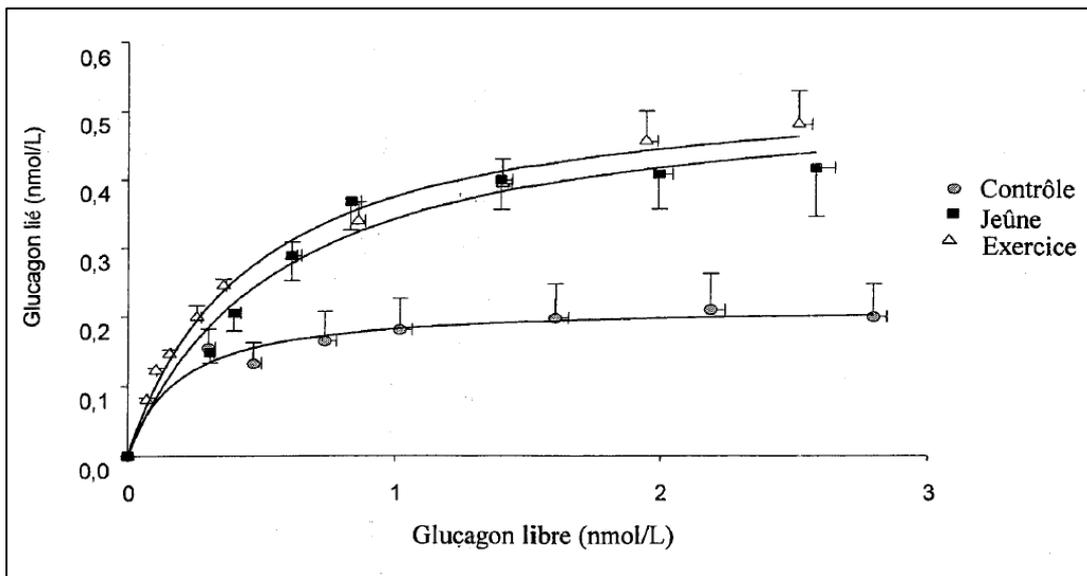


Figure 2 : Courbes de saturation des propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon.

4. Interprétez les résultats obtenus et proposez une (des) hypothèse(s) pour expliquer les différences observées entre la courbe « Contrôle » et les courbes « Jeûne » et « Exercice ».

5. La liaison d'un ligand sur un récepteur reflète une liaison de type spécifique. Le nombre de sites de liaison spécifique est donc limité dans une préparation donnée : on parle de phénomène de saturation.

Sachant que les liaisons non spécifiques correspondent à la fixation du ligand sur des sites non récepteurs, représentez, sur la figure 2, l'allure d'une courbe de liaison non spécifique.

6. A partir des données issues des courbes précédentes et rassemblées dans le tableau ci-dessous, tracer les courbes $[Glucagon\ lié]/[Glucagon\ libre] = f([Glucagon\ lié])$ et interpréter l'allure des courbes obtenues.

Groupe « contrôle »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.125	0.16	0.175	0.19	0.2	0.21			
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.6	0.8	1	1.8	2.2	2.8			
Groupe « jeûne »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.19	0.22	0.29	0.34	0.4	0.43	0.46		
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.3	0.4	0.65	0.85	1.4	2	2.6		
Groupe « exercice »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.09	0.12	0.15	0.2	0.27	0.33	0.41	0.46	0.5
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5	0.85	1.4	1.9	2.5

7. A partir des représentations de Scatchard, calculer, pour chaque groupe d'animaux, la constante de dissociation K_D .

Comment peut-on interpréter les résultats obtenus ?

8. Déterminer pour chaque groupe d'animaux, la concentration en sites de fixation maximale (B_{max}) du glucagon sur son récepteur :

- en **nmol/L**,

- puis **pmol/mg de protéines** sachant que les membranes plasmiques des hépatocytes incubées en présence de ^{125}I -glucagon contiennent 10 μg de protéines dans un volume de 150 μl ,

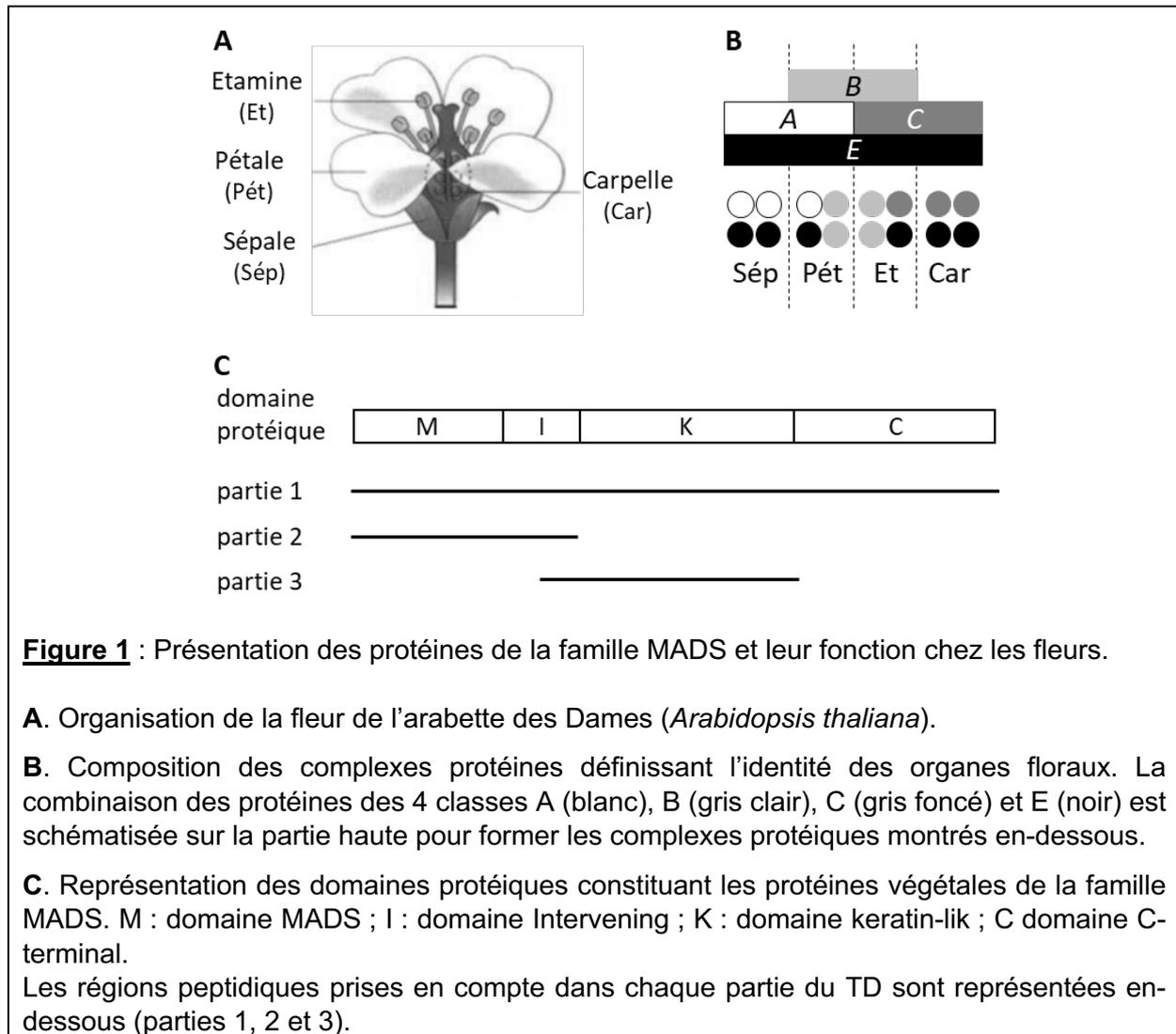
- et enfin en **nombre de récepteurs par cellule** sachant que chaque réaction a été effectuée dans un volume de 150 μl et que la masse de foie utilisée pour chaque expérience (2 g) équivaut à 10^9 cellules.

9. Quelle(s) conclusion(s) pouvez-vous tirer de cette étude, concernant l'effet du jeûne et de l'exercice sur l'interaction du glucagon avec son récepteur ?

TD Intractions protéines/ADN

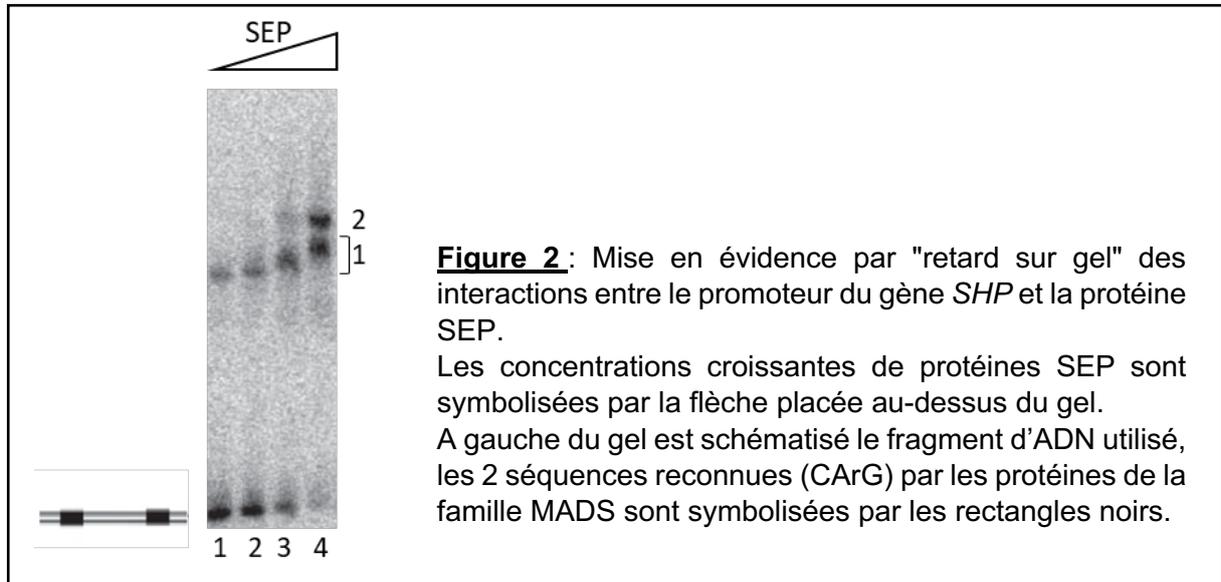
Chez les plantes, les facteurs de transcription à domaine MADS sont capables d'interagir entre eux pour former différents complexes protéiques. Ces complexes sont, par exemple, responsables de la définition de l'identité des organes floraux (**Figure 1**).

Les protéines SEP (classe E) sont impliquées dans tous les complexes. Dans le cas des sépales on les trouve en interaction avec AP1 (classe A) et dans les carpelles en interaction avec AG (classe C). Ces facteurs de transcription sont capables de reconnaître et de se fixer sur des séquences ADN appelés CArG.



Partie 1 - Mise en évidence de complexes protéines-ADN

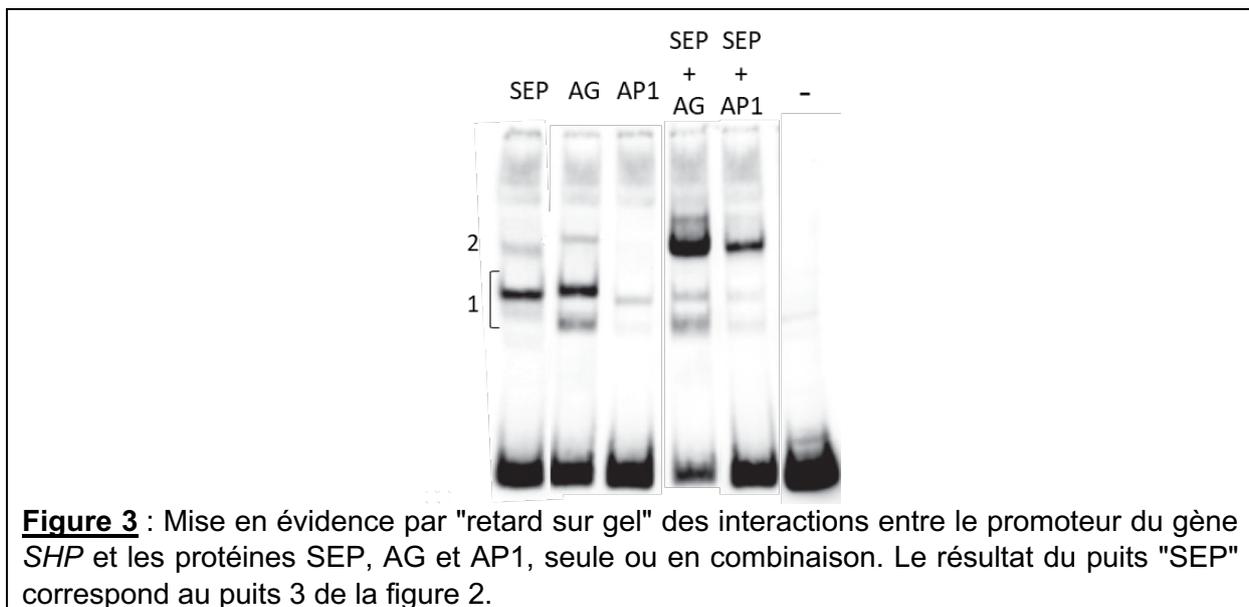
L'interaction entre une protéine d'intérêt et la séquence nucléotidique reconnue peut être mise en évidence *in vitro* par la technique de retard sur gel (ou EMSA pour *electrophoretic mobility shift assay*).



1- A quoi correspondent les trois bandes sur le gel de la **figure 2**? Légendez les bandes observées dans chaque puits.

2- Grâce à quel moyen visualise-t-on ces bandes ? Rappelez le principe et les grandes étapes expérimentales de l'EMSA.

3- Quelle information sur l'interaction promoteur *SHP*/protéine SEP déduit-on de ces données ?



4- Quelles sont les similitudes et les différences entre les différents complexes établis dans le gel présenté dans la **figure 3**? Proposez une hypothèse sur la composition protéique des complexes 1 et 2.

Partie 2 - Caractérisation de la séquence CArG reconnue par la protéine SEP.

La protéine SEP (les domaines M et I, partie 2 figure 1) est capable de reconnaître et d'interagir avec différents promoteurs sur le génome d'Arabidopsis. Une des séquences reconnues, nommée CarG, a été déterminée et le résultat est présenté dans la **figure 4**.

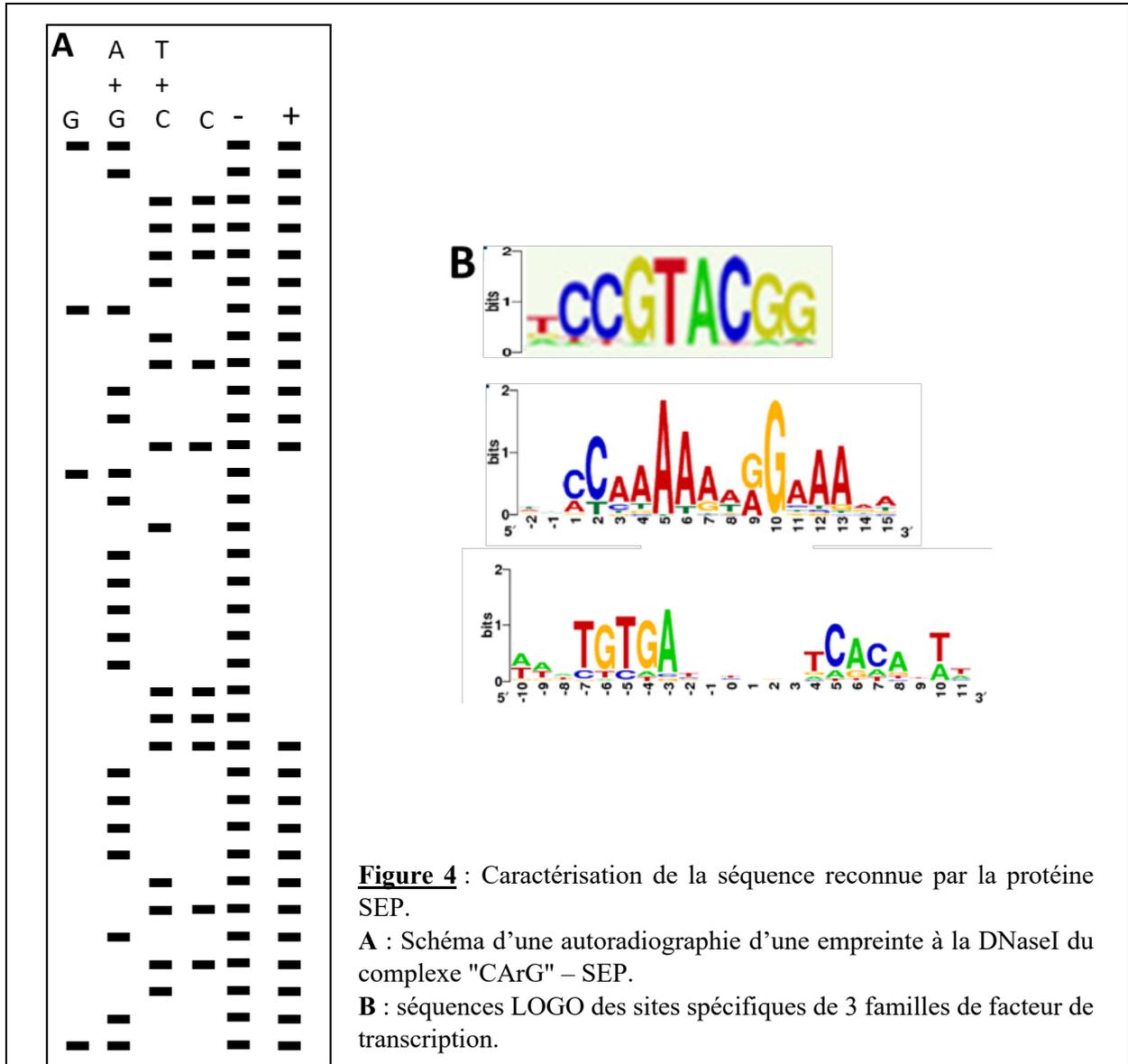


Figure 4 : Caractérisation de la séquence reconnue par la protéine SEP.

A : Schéma d'une autoradiographie d'une empreinte à la DNaseI du complexe "CArG" – SEP.

B : séquences LOGO des sites spécifiques de 3 familles de facteur de transcription.

5- A quoi correspondent les bandes de la **figure 4A** ? Comment ces molécules sont-elles rendues visibles ?

6- A quoi correspondent les 4 premiers puits sur cette autoradiographie (**figure 4A**) ? Par quel protocole obtient-on ces résultats ?

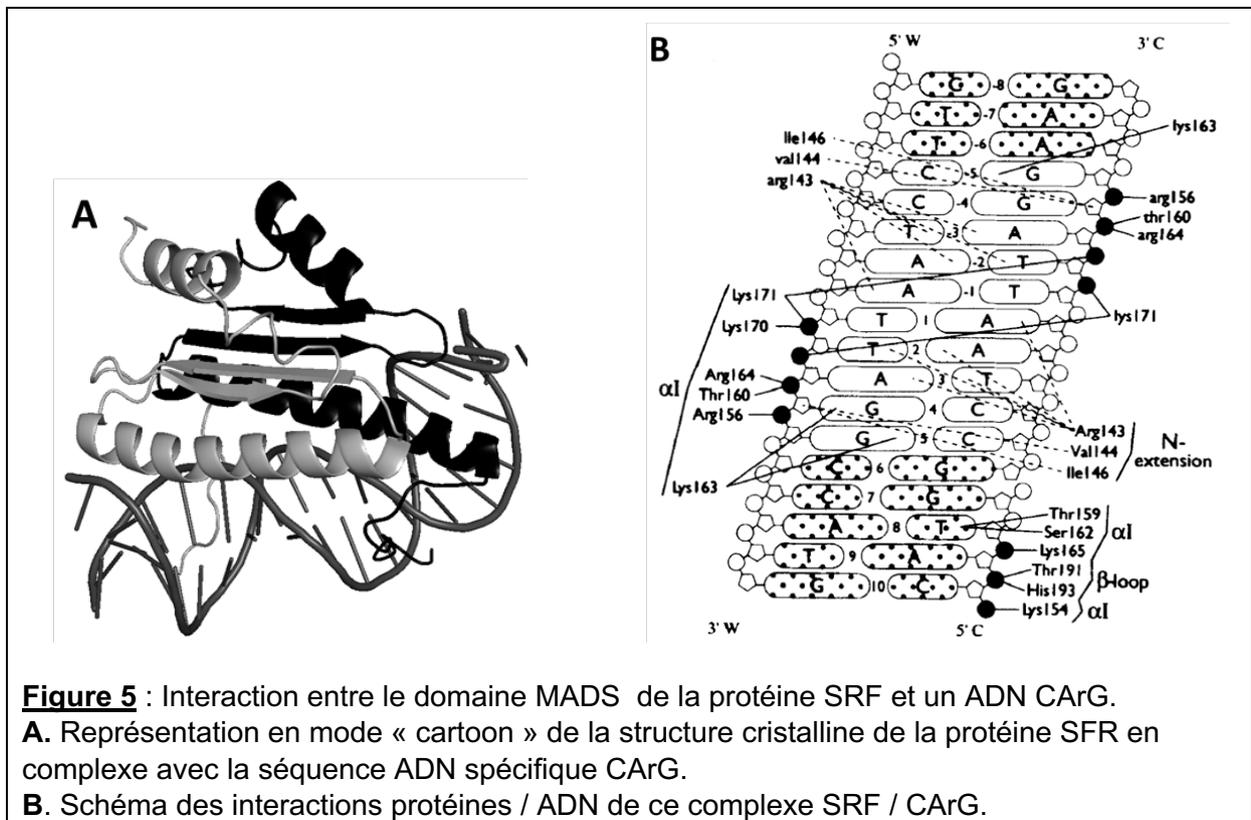
7- A quelle expérience correspondent les puits (+) et (-) ? Pourquoi certaines bandes ont-elles disparues dans le puits (+) par rapport au puits (-) ?

Rappelez le principe et les grandes étapes de cette expérience.

Déterminez la séquence d'ADN non visualisée dans le puits (+). N'oubliez pas d'orienter la séquence (5'-3').

8- Sur la base de la séquence protégée par la protéine SEP, établir la séquence LOGO probable pour les protéines MADS parmi celles proposées dans la figures 4B.

A l'heure actuelle, aucune structure SEP-CARG n'est disponible. Pour déterminer la nature des interactions protéine-ADN, nous utiliserons la structure du complexe SRF-CarG (SRF étant une autre protéines de la famille MADS) (figure 5)



9- Décrivez la structure du complexe (Figure 5A) : nombre de sous-unité(s), nature et nombre des structures secondaires, interfaces entre sous-unités, position des structures secondaires et des sillons de l'ADN.

10- Expliquez le détail des interactions représentées sur la figure 5B. Selon vous quelle est la nature des interactions établies ?

Partie 3 - Caractérisation structurale du domaine K de la protéine SEP

La structure du domaine K (partie 3 figure 1C) de la protéine SEP a été caractérisée par cristallographie.

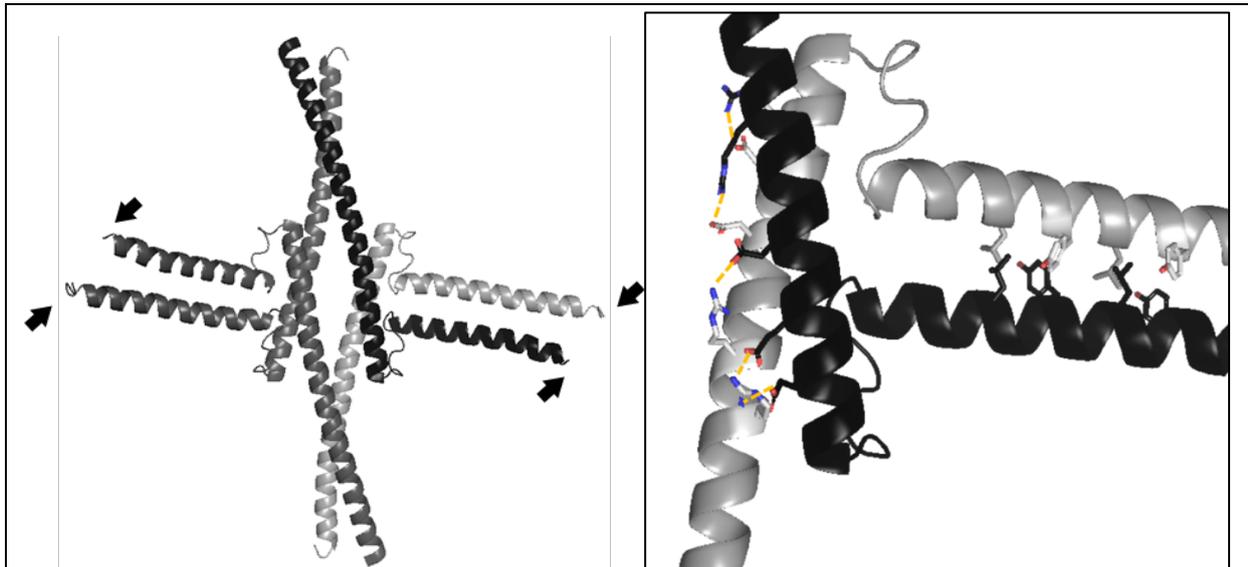


Figure 6 : Représentation, en cartoon, de la structure du domaine K de la protéine SEP. Les extrémités N-terminales sont repérées par des flèches. A droite, zoom sur une partie de la structure et mise en évidence en sticks colorés par type d'atome des résidus d'interface.

11- Décrivez la structure de la **figure 6** : nombre de sous-unité(s), nature et nombre des structures secondaires, interfaces entre sous-unités...

12- Une des interfaces de dimérisation implique les hélices 1 dont la séquence est donnée **figure 7**. A l'aide d'un diagramme sous forme de deux cercles, montrez que le segment souligné forme un Leucine-zipper. Reportez ces informations sur l'encart de la figure 6.

SEP REALA**VELSSQQEYLK**LKERYDALQRTQ**RN**

Figure 7 : Séquence de l'hélice 1 du domaine K de la protéine SEP

13- A l'aide de l'encart de la figure 6, précisez quelles autres interactions participent à la stabilisation de ce dimère.

14- Proposez une expérience pour tester quels résidus sont essentiels pour le maintien de ces interactions.

TD Analyse de séquence

La protéine Wzc du pathogène *Salmonella typhi*.

Exercice 1 : Utilisation de la banque UniProt

Sur la page web de la banque de séquences UniProt (www.uniprot.org), lancez une recherche sur le mot clé **Wzc**

- Combien d'entrées de la banque UniProt répondent à ce mot clé ?
- Combien sont dans la sous-partie annotée SwissProt de la banque ?
- Quel est le code d'entrée de la protéine du pathogène *Salmonella typhi*?
- A quelle sous-partie de la banque appartient-elle ?
- Combien de résidus comporte sa séquence ?

Cliquez sur le lien correspondant à ce code pour afficher les données relatives à cette protéine. En plus de la séquence qui constitue le cœur de l'information, on trouve dans la fiche différentes rubriques résumant les données connues sur la protéine.

- Dans quel processus biologique intervient-elle ?
- Quelle est la fonction moléculaire de Wzc ?
- Détaillez la réaction catalysée
- Quelle est sa localisation cellulaire ?
- Schématisez la topologie de cette protéine en indiquant les bornes de chaque domaine.
- Positionnez sur ce schéma les sites de modifications post-traductionnelles (PTM).
- A votre avis, lequel de ces domaines est le domaine catalytique ?
- Copiez la séquence (lien en haut de la section Sequence)

Exercice 2 : Recherche de similarité par BLAST

Sur le site du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) lancez un *protein BLAST* en collant la séquence précédemment copiée (au format FASTA) dans la case prévue à cet effet.

- Quel est le paramétrage par défaut de ce BLAST ?

Lancez la recherche (cochez l'option *Show results in a new window*)
Analysez la liste de résultats (il faut parfois quelques minutes pour l'obtenir).

- Combien de hits comporte cette liste (onglet *Overview*) ?

→ Selon la description des résultats et le *Graphic Summary* de cette recherche, les hits sont-ils très proches de la séquence requête ?

Relancez une recherche par BLAST sur la partie SwissProt de la banque Uniprot

→ Combien de hits obtient-on cette fois ?

→ La fonction de tous ces hits est-elle semblable à celle de la requête Wzc ?

→ Sur quelle portion de la séquence requête la majorité des hits de score inférieur à 200 s'alignent-ils ?

→ Quel est le code d'accès du plus mauvais hit issu de la SwissProt ?

→ Quelles sont les statistiques de cet alignement ?

Sélectionnez-le et affichez l'alignement local obtenu avec la requête (onglet *Alignments*)

→ Donnez la longueur et les bornes de cet alignement local

→ A quoi correspondent les signes + entre les deux séquences ?

Relancez une recherche par BLAST sur la Protein Data Bank

→ Combien de hits obtient-on cette fois ?

→ Combien ressemblent réellement à Wzc de *Salmonella typhi* ? Argumentez.

→ Quels sont les codes PDB des 3 meilleurs hits ?

Exercice 3 : Alignements multiples

A- Alignement global de séquences similaires

A partir des résultats du BLAST contre la SwissProt, cochez les hits de E-value=0

→ Expliquez pourquoi il est inutile de cocher la requête pour comparer sa séquence aux potentiels homologues identifiés par BLAST.

Téléchargez les séquences sélectionnées (bouton *Download*) au format FASTA (complete sequence)

Lancer le programme d'alignement multiple CLUSTALW sur le site de bioinformatique PRABI (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html) sur ces séquences d'homologues. Gardez le paramétrage par défaut mais sélectionnez *Output order = input* pour garder la séquence requête en haut de l'alignement et les hits de BLAST de similarité décroissante en dessous.

→ Expliquez le code couleur et les labels (* : .) en dessous de l'alignement

→ Les sites de modification post-traductionnelle identifiés dans Wzc de *Salmonella typhi* sont-ils conservés ? (Attention à la numérotation qui correspond aux positions dans l'alignement multiple et non au n° de résidu dans les séquences à cause des gaps introduits)

B- Recherche des éléments de structures secondaires

Relancez un alignement multiple en ajoutant aux séquences précédemment utilisées les 2 premiers hits du BLAST réalisé contre la Protein Data Bank. Ce sont donc 2 séquences de protéines homologues de structure 3D connue.

→ S'alignent-elles bien avec les autres ? Comparez les statistiques des 2 alignements multiples

En haut de la page de résultats, cliquez sur le bouton ESPript et lancez ce nouveau logiciel (bouton SUBMIT) qui vous permet d'afficher les éléments de structures secondaires (hélices alpha et brins beta) tels qu'observés dans les structure 3D disponibles dans la Protein Data Bank (Il faut autoriser les pop-up dans les réglages de votre browser pour pouvoir afficher la fenêtre de résultats de ce logiciel et ouvrir le fichier PDF). Regardez comment les structures secondaires sont réparties sur l'alignement calculé par ClustalW.

→ Les 2 structures couvrent-elles la totalité de la séquence de Wzc

→ La numérotation est-elle la même que dans ClustalW ?

→ Quelle est la région la moins conservée de cette famille de protéines ?

→ Est-elle structurée ?

→ L'extrémité C-terminale portant le cluster de tyrosines phosphorylées est-il structuré ?

TD Analyse structurale

Utilisation de la Protein Data Bank (PDB)

Sur le site de la Protein Data Bank (www.rcsb.org), allez chercher les informations sur le plus proche homologue structural de la protéine Wzc de Salmonella typhi identifié lors du TD Analyse de séquence et de code d'accès **7NHR**.

- Par quelle technique cette structure a-t-elle été résolue ?
- Combien de chaînes polypeptidiques contient-elle ?
- Toutes les chaînes sont-elles entièrement modélisées ?

Téléchargez le fichier de coordonnées atomiques (Download Files → PDB Format)

Regardez maintenant la fiche PDB de la structure du domaine C-terminal identifiée dans le TD Analyse de séquence et de code **3LA6**.

- Par quelle technique cette structure a-t-elle été résolue ?
- Combien de chaînes polypeptidiques contient-elle ? quelle est leur longueur ?
- Quel est le code UniProt de cette protéine ?

Dans le schéma « Protein feature view », en passant la souris sur la bande violette correspondant à la séquence de la protéine, vous pouvez voir la correspondance entre la numérotation des résidus dans la structure et dans la séquence UniProt.

- A quelles résidus de cette séquence correspond la structure ?

Regardez les différentes représentations présentées en haut à gauche de la page « Structure Summary ». L'unité asymétrique (plus petit volume répété dans l'empilement cristallin) contient 2 exemplaires de l'assemblage biologique.

- Décrivez cet assemblage.
- Quels sont les ligands associés à la protéine dans cette structure ?
- Dans l'onglet Sequence, cherchez quels sont les résidus impliqués dans la fixation de ces ligands

Téléchargez la structure de la Biological Assembly 1 au format PDB.

Utilisation du logiciel graphique PyMol

Ouvrez le logiciel PyMol et ouvrez les 2 structures précédemment téléchargées : 7NHR.pdb et 3LA6.pdb

Les menus proposés à droite de la fenêtre graphique (A = action ; S = show ; H = hide ; L = label ; C = color) permettent de modifier à volonté les représentations toutes (all) ou chacune des structures affichées.

On tourne la molécule avec la souris. On zoom en maintenant le bouton droit de la souris enfoncé et en la déplaçant de haut en bas de l'écran.

Affichez les 2 structures en mode Cartoon (Show → as → Cartoon)

Colorez les par chaîne (C → by chain → by chain)

Dezoomez pour voir les 2 structures.

Vous pouvez recentrer la vue sur l'une ou l'autre (Action → center)

→ Comparez les pour identifier les domaines périplasmiques (Nter), transmembranaires et cytoplasmiques (Cter) sur 7NHR.

Explorez les différents modes de représentation (cartoon, lines, spheres, sticks...) et de coloration

Masquez 7NHR en cliquant sur son nom

Affichez 3LA6 en cartoon coloré par chaîne.

Affichez la séquence en cliquant sur le bouton **S** en bas à droite de la fenêtre graphique

A la fin de la séquence de chaque chaîne, vous voyez les ligands ADP et Ca. Sélectionnez un ADP en cliquant sur son nom dans la séquence. Il apparaît couvert de petits points roses sur la structure et l'objet (sele) apparaît à droite.

Affichez-le en sticks et colorez-le par éléments (N bleu, O rouge...)

Recherchez les résidus de la protéine qui interagissent avec ce ligand (Action → find → polar contacts → to any atoms)

Superposez une représentation en Lines au Cartoon de la protéine pour visualiser les chaînes latérales des résidus en interaction avec l'ADP.

→ Retrouvez-vous les résidus identifiés dans l'exercice précédent sur la fiche PDB ?

Double-cliquez sur la chaîne verte et dans le menu contextuel qui s'affiche, créer un nouvel objet (chain → copy to object → new)

Masquez 3LA6 pour ne garder que cet objet (obj01) à l'écran

Changez son mode de coloration (C → by ss → Helix Sheet Loop) pour identifier le nombre de brins beta et d'hélices alpha

Passez ensuite en mode arc en ciel (C → spectrum → rainbow) pour suivre le tracé de la chaîne polypeptidique de l'extrémité Nter (bleue), à l'extrémité Cter (rouge).

→ Une boucle flexible n'a pas pu être construite dans cette structure. Cela crée deux extrémités supplémentaires. Identifiez les numéros des résidus manquants.

→ Faites le diagramme topologique de cette structure en reliant ces 2 extrémités par une boucle. Représentez les brins beta par des triangles et les hélices alpha par des cercles. Les brins d'un même feuillet doivent être sur la même ligne du diagramme. Les éléments de structure secondaire présents sur chacune des faces d'un feuillet beta sont respectivement représentés au-dessus et en dessous de celui-ci.

Vous indiquerez les extrémités de chaîne et numéroterez les brins et les hélices, dans l'ordre d'occurrence le long de la chaîne polypeptidique, en utilisant des chiffres pour les brins ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$...) et des lettres pour les hélices (αA , αB , αC ...)

Remarque :

Le logiciel PyMol est accessible gratuitement (<https://pymol.org/edu/?q=educational/>) et de nombreux tutoriels sont disponibles