

L3 Biologie Santé  
Partiel de Biochimie 2021-2022  
Le 15 octobre 2021

Durée de l'épreuve 1h30.

Question 1 (4 points) :

Dessinez un entérocyte et représentez les différents transporteurs ou canaux (vus en cours) localisés dans la membrane cytoplasmique et la membrane interne mitochondriale. Les décrire brièvement et préciser leur fonction physiologique.

Question 2 (4 points) :

Expliquer comment fonctionne un transporteur qui facilite le transport d'un soluté à travers la membrane.

Comment peut-on déterminer ses paramètres cinétiques  $K_T$  et  $V_{max}$ ? (expliquer clairement les expériences que l'on doit réaliser pour cela et faire obligatoirement au moins un schéma)

Question 3 (4 points) :

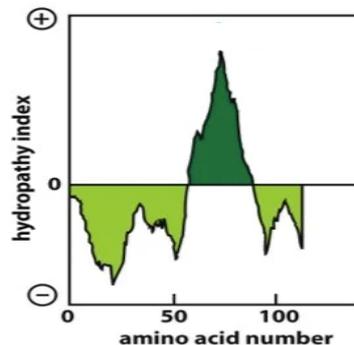
On extrait les lipides membranaires d'une cellule eucaryote. Parmi ces lipides, on trouve des phospholipides, des glycophospholipides et du cholestérol. Donnez la position relative de ces trois lipides sur une Chromatographie en Couche Mince (CCM). Justifiez votre réponse en explicitant le principe de cette technique.

La valeur de la fluidité membranaire est finement régulée dans la cellule. Expliquer pourquoi cette valeur dépend de la composition lipidique de la membrane.

Quelle serait la conséquence d'une trop grande viscosité de la membrane ?

Exercice 1 (4 points) :

On souhaite déterminer la topologie d'une protéine membranaire codant une protéine du globule rouge dont le profil d'hydrophobicité (échelle de Kyte et Doolittle) est donné ci-dessous.



- 1) Tracer un modèle topologique putatif de cette protéine. Justifier votre réponse
- 2) Afin de déterminer l'orientation de la protéine dans la membrane on va créer un gène de fusion entre une partie du gène codant cette protéine et la  $\beta$ -galactosidase. Expliquer quelle fusion il serait judicieux de faire et comment se fera l'expérience. Envisager les deux résultats possibles et, dans chaque cas, en tirer les conclusions adéquates.
- 3) Proposer une autre expérience qui pourrait également permettre de déterminer l'orientation de cette protéine. Expliciter clairement le principe et la mise en œuvre.

Exercice 2 (4 points) :

Pour l'exercice 1, on utilisera les données suivantes : Un lipide occupe en moyenne une surface de 0,5 nm<sup>2</sup>. La masse moyenne d'un lipide est de 785 Da. Le transporteur GluT a une masse moléculaire de 45 kDa. Il occupe une surface d'environ 3 nm<sup>2</sup> lorsqu'il est reconstitué. La surface d'une sphère se calcule à partir de la formule suivante :  $S = 4\pi R^2$ , R étant le rayon de la sphère.

Le transporteur GluT des globules rouges a été purifié en octylglucoside. Afin de tester sa fonctionnalité on souhaite le reconstituer dans des liposomes par la méthode utilisant les bio-beads.

- 1) Préciser le principe de cette méthode en prenant soin de bien expliquer pourquoi seules les molécules de détergent seront éliminées et pas les lipides.
- 2) Quel est le ratio lipides / protéines (en masse) à respecter dans le mélange de reconstitution pour espérer au moins une protéine par liposome ? Pour cela :
  - a. Calculer le nombre de lipides nécessaire pour former un liposome (diamètre ext = 36 nm et diamètre int = 28 nm).
  - b. En déduire le ratio lipides / protéines en masse
- 3) On réalise une expérience de transport du glucose avec des protéoliposomes formés dans les conditions décrites précédemment. On mesure expérimentalement un taux de reconstitution de 0,7 protéines par liposome. La concentration de glucose à l'intérieur des protéoliposomes, au début de l'expérience, est nulle. Le volume interne total de l'ensemble des protéoliposomes utilisés dans l'expérience est de 7 µl. Ils seront incubés en présence de glucose (externe) à la concentration de 12 mM et qui reste constante au cours de l'expérience (volume externe très grand). Calculer la quantité de glucose (en nmoles) que l'on va détecter dans ces protéoliposomes une fois l'équilibre atteint et si on considère que seule la moitié des transporteurs sont actifs et que la diffusion passive du glucose dans ces conditions est négligeable.
- 4) A votre avis, le sens d'insertion de ce transporteur aura-t-il un effet sur le résultat obtenu ?

Fin de l'épreuve

Si vous voulez en faire plus ..... répondre à cette question bonus (2 points) :

Le principe de la dialyse d'un soluté à travers une membrane artificielle repose sur un phénomène de diffusion passive. L'idée est souvent d'éliminer un soluté de faible masse moléculaire (NaCl) d'une préparation protéique par exemple. La vitesse de diffusion est, à tout moment, proportionnelle à la différence de concentration du soluté entre les deux compartiments. L'intérieur est le sac de dialyse dans lequel on a inséré l'extrait protéique contenant 500 mM de NaCl et le milieu extérieur contient un tampon dépourvu de NaCl (NaCl = 0 mM).

Décrire l'évolution de la concentration de NaCl dans le sac de dialyse en fonction du temps. Le volume du sac de dialyse est de 1ml. Ce sac de dialyse baignera dans un volume de tampon de 10 ml. Quelle sera la concentration de NaCl dans la préparation protéique une fois l'équilibre atteint ? Que faudrait-il faire pour éliminer totalement le NaCl de la préparation protéique (élimination > à 99%) ?