

**DS de biochimie**  
**Samedi 3 décembre 2022**  
*Durée : 3 heures*

**PARTIE 1 – épreuve de synthèse**

*Durée conseillée : 1 heure*

**Sujet**

**Liaisons faibles et liaisons covalentes dans les macromolécules**

Seule une introduction rédigée et un plan détaillé sont attendus.

Veillez à proposer des titres explicites. Essayez d'organiser votre plan avec 3 niveaux de subdivisions.

Pour chaque partie, indiquer l'exemple choisi et citer une éventuelle illustration (sans la dessiner)

**PARTIE 2 – épreuve d'analyse de documents**

*Durée conseillée : 2 heures*

**Thème 1 - Les récepteurs gustatifs**

Les récepteurs gustatifs sont répartis sur les papilles de la langue mais également au palais. Les cellules sensorielles expriment à leur surface des protéines membranaires appelés TR pour « Taste Receptor ». Le type T2R concerne les récepteurs à l'amertume. Ce devoir porte sur les récepteurs de type T1R.

**1) Biochimie des polypeptides T1R**

Les polypeptides T1R sont codés par 3 gènes, tous portés sur le chromosome 4. Ils sont à l'origine de 3 isoformes appelées T1R1, T1R2 et T1R3. Leur structure est très similaire.

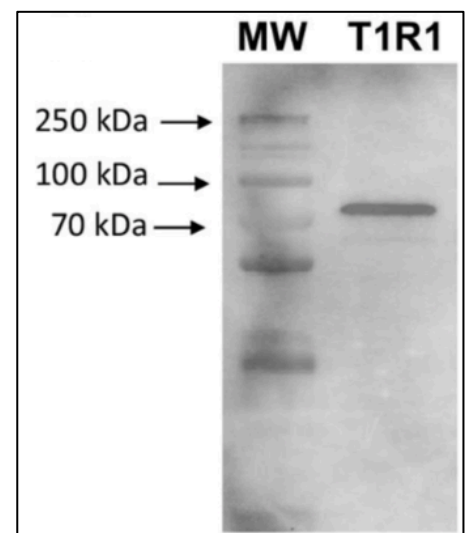
**1A – Analyse biochimique des isoformes T1R**

Des protéines T1R1 ont été isolés à partir de cellules de Souris.

Une électrophorèse dénaturante de type SDS-PAGE a été réalisée afin de déterminer la masse moléculaire de la molécule. Le gel est présenté en document 1.

Question 1 – Estimez la masse moléculaire de T1R1 et déduisez le nombre approximatif d'acides aminés.

Question 2 – Une électrophorèse en conditions natives aboutit au même gel. Que pouvez-vous en déduire ?



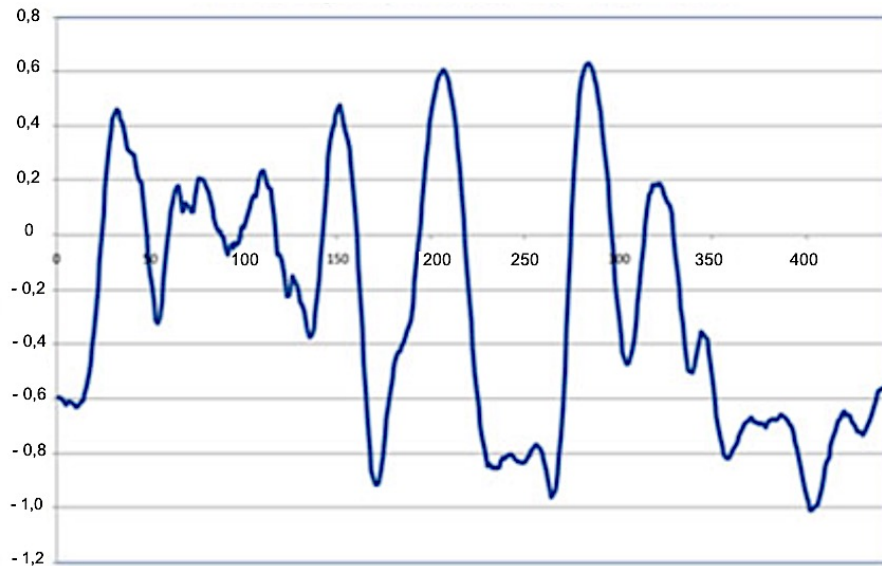
*Document 1 – Gel SDS-PAGE d'une solution de polypeptides T1R1 purifiés.  
 MW = marqueur de taille (Source : Crowe et al, Neurogastroenterol Motil, 2020)*

Les protéines T1R appartiennent à une famille de récepteurs très présents chez les Mammifères, les récepteurs RCPG (pour Récepteur Couplé à la Protéine G).

L'alignement des séquences de nombreuses espèces a montré l'existence de 3 domaines conservés :

- en Nter, deux lobes constituent le site de liaison à la molécule gustative ;
- en position médiane, une région riche en cystéine forme 2 brins bêta antiparallèles ;
- en Cter, la séquence a été étudiée ci-dessous (Document 2).

Un récepteur à la saveur sucrée est composé d'une isoforme T1R2 associée à une isoforme T1R3. Le récepteur à l'umami est un hétérodimère T1R1-T1R3.



Document 2 – Profil d'hydropathie de la séquence de 450 acides aminés en position Cter, étudiée par fenêtre de 21 acides aminés, dans le cas du récepteur T1R2 (Source : Abro et al, 2008)

Question 3 – Expliquez comment est obtenu un tel profil.

Question 4 – Proposez une interprétation structurale de la partie Cter de T1R2.

Question 5 – À l'aide des informations fournies et de la réponse précédente, schématisez le récepteur à la saveur sucrée.

## 1B – Liaison des polypeptides T1R aux molécules sucrées

### a) Mesure d'affinité

L'affinité des domaines globulaires de T1R2 et T1R3 a été mesurée par analyse cinétique à partir de Souris ayant toutes le même allèle pour les gènes T1R. L'affinité est mesurée en déterminant la valeur  $K_d$ , concentration en ligand susceptible de se lier à 50% des sites de liaison.

Une souris moins sensible au sucré a également été étudiée : la séquence de sa chaîne T1R3 présente une substitution de l'isoleucine par une thréonine en position 60. La souris est notée I60T.

Protéine	Saccharose (mM)	Glucose (mM)
T1R2	15,0 +/- 5,0	2,6 +/- 0,2
T1R3	3,4 +/- 0,4	8,2 +/- 1,5
T1R3 de la souris mutée I60T	20,1 +/- 3,0	32 +/- 5,0

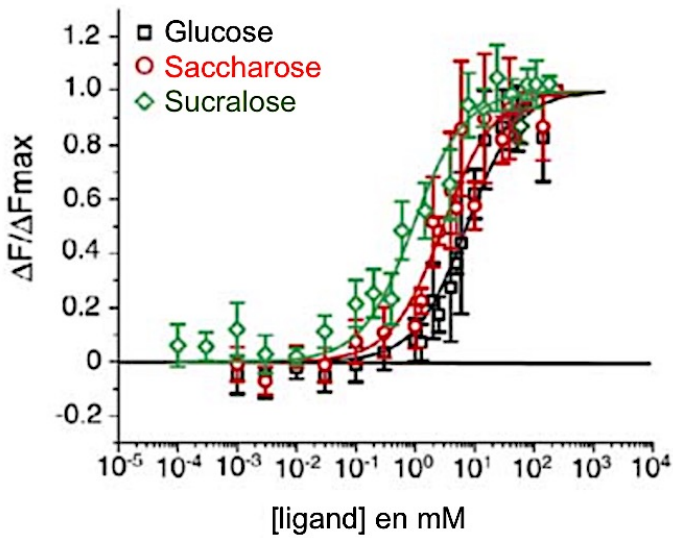
Document 3 – Mesure des valeurs de  $K_d$  des chaînes : valeur moyenne +/- écart-type standard (Source : Nie et al, Current Biology, 2005)

Question 6 – Comparez les affinités des deux chaînes non mutées pour les sucres testés.

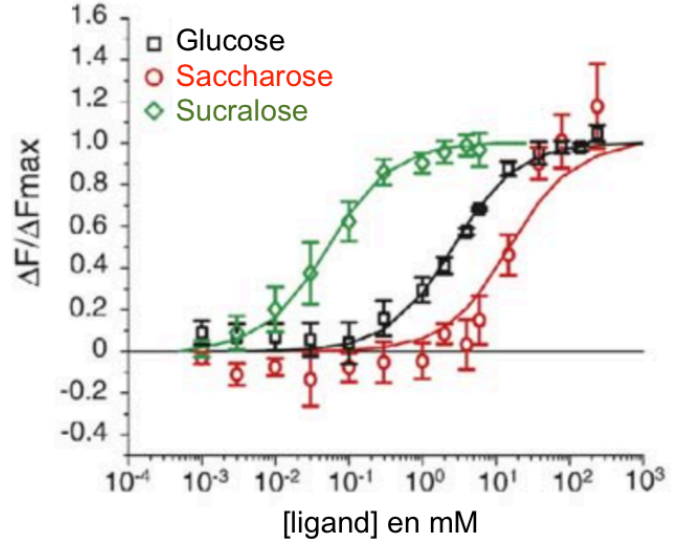
Question 7 – Proposez une explication au fait que la souris mutée soit moins sensible à la saveur sucrée.

**b) étude de la forme des protéines**

Une modification de la fluorescence intrinsèque du tryptophane (mesurée sous la forme d'une différence de fluorescence  $F$  entre état initial et état final, notée  $\Delta F/F$ ) reflète un changement de géométrie de la chaîne d'acides aminés.



**Sous-unité T1R3**



**Sous-unité T1R2**

Document 4 – Variation de fluorescence du tryptophane des chaînes T1R2 et T1R3 en présence de quantités croissantes de ligands. (Source : Nie et al, Current Biology, 2005)

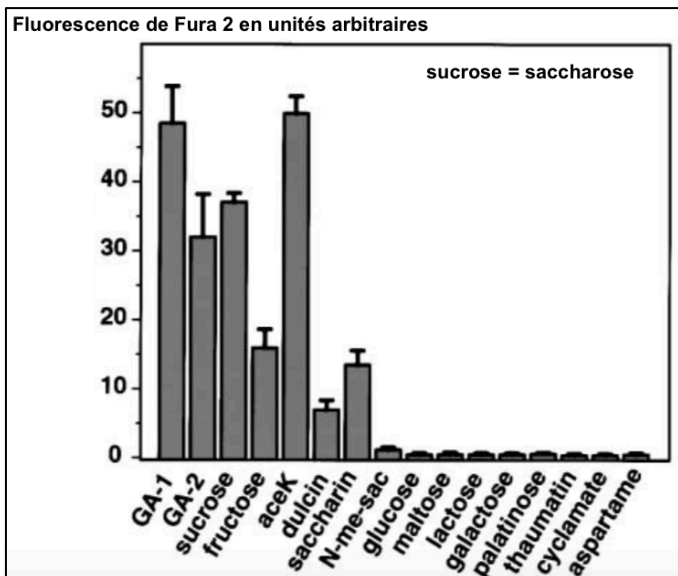
Question 8 – Comparez les résultats obtenus pour les deux chaînes T1R3 et T1R2.

Question 9 – Les résultats obtenus sont-ils concordants avec le tableau du document 3 ? Que pensez-vous de l'effet du sucralose ?

**2) Les différents substrats à saveur sucrée**

Lors de la fixation d'un ligand dans le site de liaison des protéines T1R, une protéine G active un second messager permettant l'entrée massive d'ions  $Ca^{2+}$  dans la cellule, détectable par la fluorescence d'un chélateur de calcium (le Fura2) : **sa fluorescence est proportionnelle à  $[Ca^{2+}]$  intracellulaire**.

Des cellules de rat ont été modifiées de façon à exprimer en surface les récepteurs T1R2-T1R3 et la machinerie de transduction. La fluorescence de Fura2 est mesurée en présence de différentes molécules.



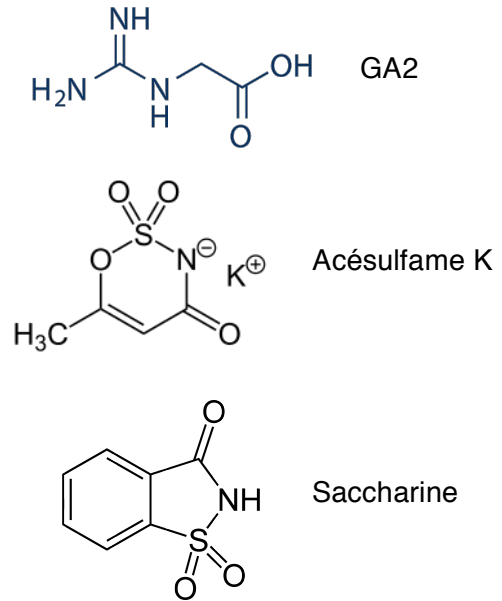
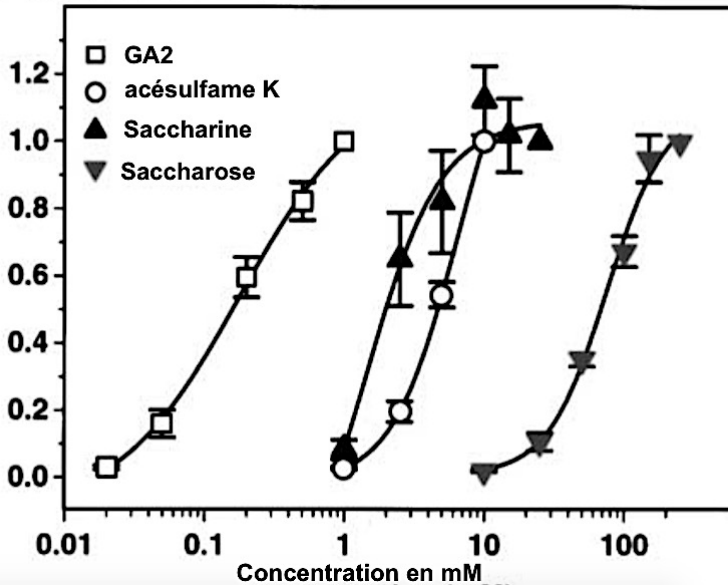
- Édulcorants GA1 et GA2 à 500  $\mu$ M
- Sucrose = Saccharose et fructose à 250 mM
- AceK (acésulfame K) à 10 mM
- Dulcine et aspartame à 2 mM
- Saccharine à 5 mM
- N-me-sac = saccharine méthyliée à 5 mM
- Glucose, maltose, lactose, galactose, palatinose à 250 mM
- Thaumatine à 0,1 %
- Cyclamate à 15 mM

GA = guanidinoacétique acide

Document 5 – Mesure de la fluorescence de cellules exprimant T1R2-T1R3 en présence de différents composés. Les mesures sont répétées 16 fois. (Source : Nelson et al, The Cell, 2001)

Question 10 – En prenant appui sur des molécules précises, discutez la spécificité du récepteur étudié.

Fluorescence de Fura 2 normalisée



Document 6 – Fluorescence de Fura2 normalisée avec la dose la plus élevée de la molécule sucrée testée. Un minimum de 20 essais a été réalisé pour chaque point. (Source : Nelson et al, The Cell, 2001)

Question 11 – Comparez la différence d'activation induite par le saccharose et la saccharine (un édulcorant fréquent dans les plats allégés en sucre). Confrontez votre analyse aux résultats du document 5.

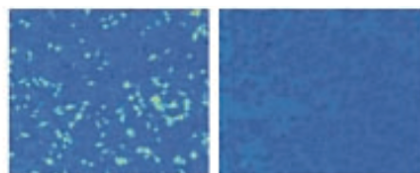
### 3) Le lactisole, un additif des pâtes à tartiner

Comme dans la partie 2), des cellules sont transformées de manière à exprimer en surface le récepteur T1R2-T1R3 et à posséder les protéines de transduction du signal. L'activation du récepteur au sucre s'accompagne d'une hausse du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, qui peut être visualisée grâce à Fura2, une substance qui fluoresce en présence d'ions calcium.

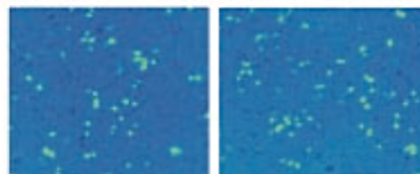
Ces cellules sont ensuite cultivées sur un support gélosé. Chaque champ de l'image est centré sur une culture où les cellules forment un tapis continu.

[Saccharose] = 300 mM	+	+
[Lactisole] = 1,25 mM	-	+

Fluorescence des cellules humaines



Fluorescence des cellules de souris

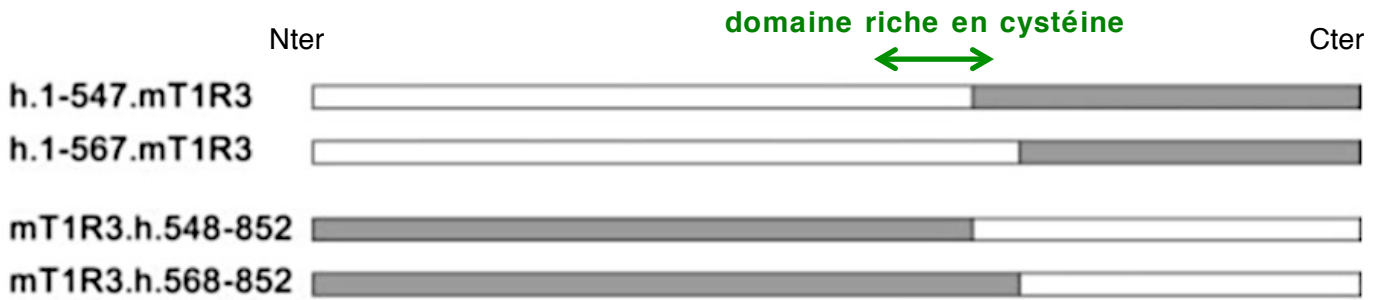


Document 7 – Mesure de l'activation des récepteurs T1R2-T1R3 par mesure de la fluorescence de Fura2. Chaque champ du microscope contient environ 1000 cellules. (Source : Li et al, PNAS 2002)

Question 12 – Décrivez l'effet du lactisole chez l'être humain et proposez deux hypothèses d'action.

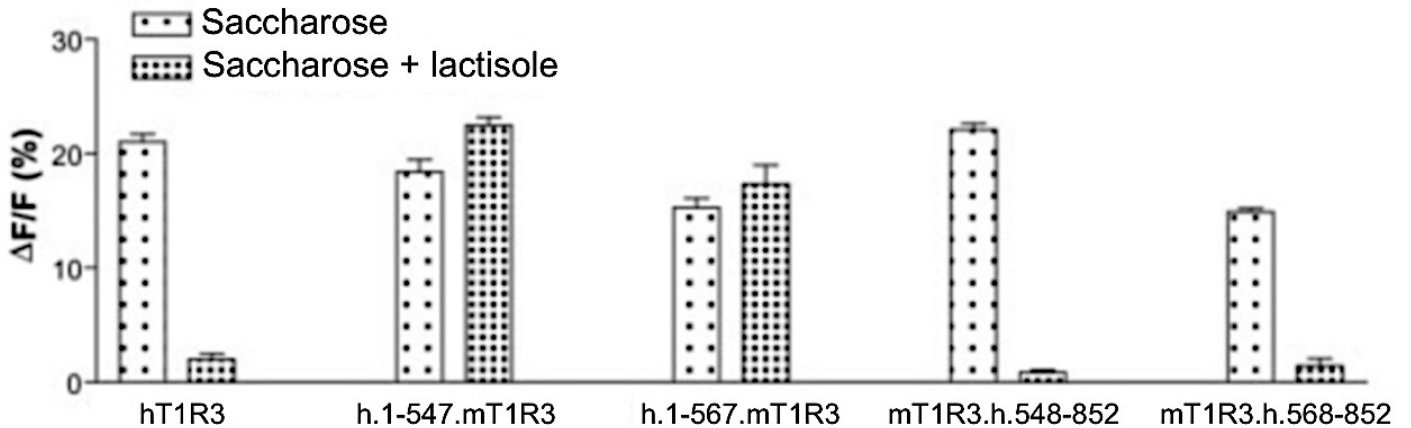
Question 13 – Comparez l'effet du lactisole dans le cas des humains et des rongeurs (rat et souris).

Afin d'identifier le mode d'action du lactisole, des récepteurs chimères ont été construits par association entre des séquences humaines (en blanc ci-dessous) et murines (en gris) du récepteur.



Récepteurs chimères testés : les séquences blanches sont d'origine humaine et les séquences grisées sont d'origine murine. Le polypeptide h.1-547.mT1R3 signifie que le polypeptide T1R3 est une chimère composée des acides aminés 1 à 547 de la séquence humaine, associés à la séquence 548-852 de souris.

Ces récepteurs sont ensuite suivis par analyse de leur conformation : une variation de  $\Delta F/F$  indique un changement de géométrie du polypeptide T1R3.



Document 8 – Analyse de la variation de forme des polypeptides chimères T1R3 en présence de saccharose avec ou sans lactisole. (Source : Li et al, PNAS 2002)

Question 14 – Tirez de ce document le lieu de fixation du lactisole. Quelle hypothèse proposée à la question 12 pouvez-vous retenir ?

## Thème 2 – Le récepteur CB2R aux endocannabinoïdes

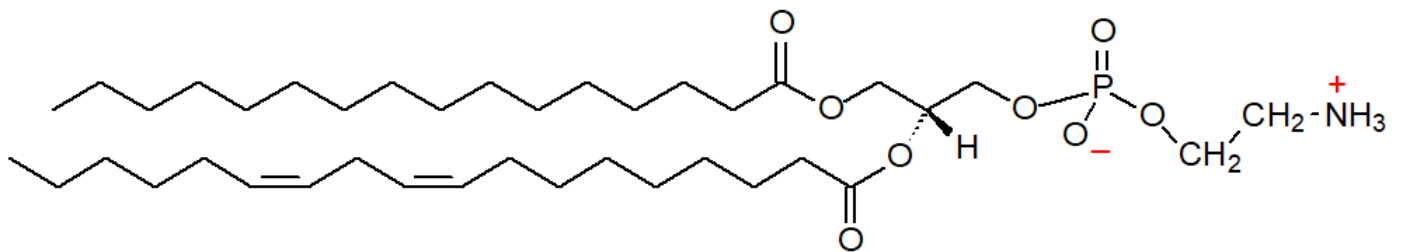
Le cannabis contient des molécules psychoactives similaires à des molécules produites par les Mammifères, les endocannabinoïdes. Il existe deux types d'endocannabinoïdes notés CB1 et CB2. On s'intéresse à leurs récepteurs. Le récepteur CB1R est très présent dans le système nerveux central et est responsable des effets psychotropes. L'étude qui suit est centrée sur le récepteur CB2R, qui semble avoir un rôle dans les phénomènes d'addiction et la cicatrisation.

### 1) Synthèse de l'anandamide, un endocannabinoïde qui se lie à CB2R

L'anandamide (ou AEA pour N-arachidonylethanolamide) est un neurotransmetteur produit par certains neurones du cerveau. On le trouve aussi en petites doses dans le cacao.

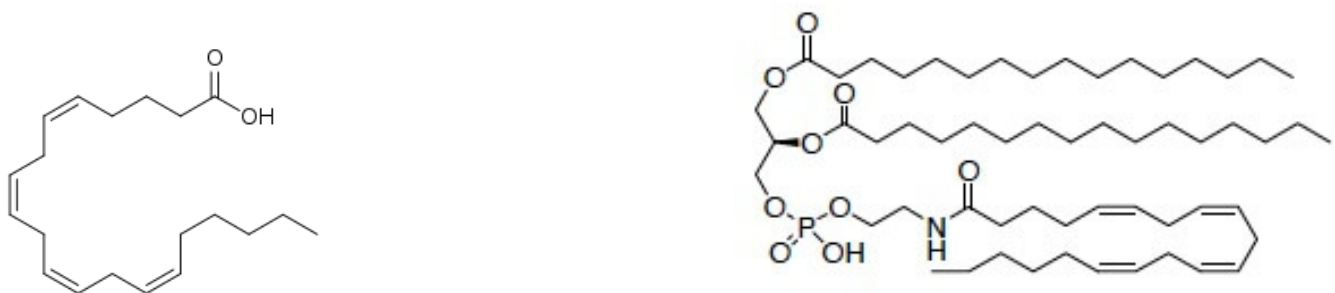
Sa chaîne de synthèse est la suivante :

#### 1) Molécule de départ = molécule A



Question 1 – Identifiez cette molécule, sa famille et sa localisation probable dans la cellule.

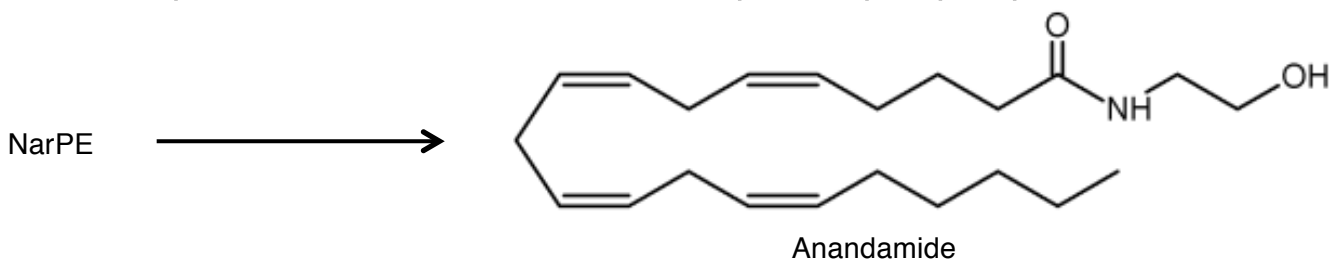
#### 2) Réaction de la molécule A avec l'acide arachidonique conduisant au NarPE



Acide arachidonique + molécule A  $\longrightarrow$  NarPE + H<sub>2</sub>O

Question 2 – Identifiez la réaction chimique ci-dessus et le type de liaison formée.

#### 3) Dernière étape : formation de l'anandamide AEA par une phospholipase



Question 3 – Décrivez la réaction permettant la libération de l'anandamide dans le cytosol de la cellule.

## 2) CB2R et cicatrisation du cristallin

Le glaucome est une maladie fréquente chez les personnes âgées, dans laquelle le cristallin s'opacifie et l'acuité visuelle se dégrade. Il faut inciser la cornée pour remplacer le cristallin. Parfois, cette incision cicatrise mal, **avec une matrice extracellulaire trop dense**.

Comme l'usage du cannabis pour soulager la douleur semble réduire les cas de mauvaise cicatrisation, on étudie ici le rôle des récepteurs CB2R dans le contrôle de cette cicatrisation.

Question 4 – Citez 3 biomolécules présentes dans la matrice extracellulaire animale. Précisez leur famille.

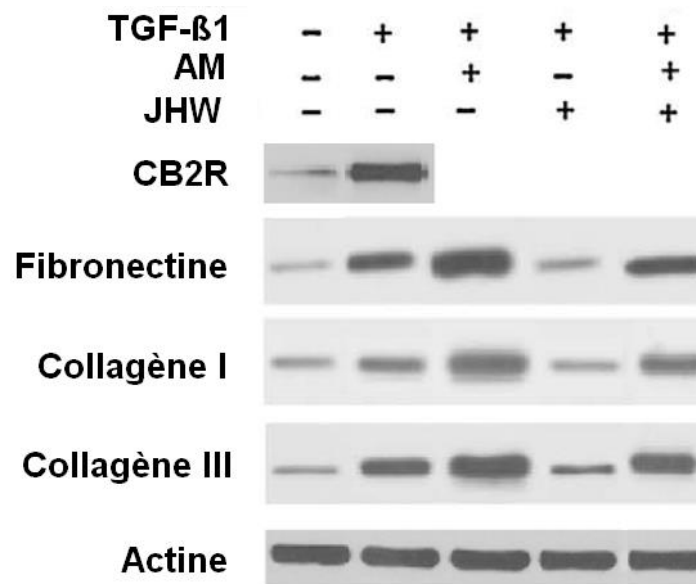
Question 5 – Citez le nom des cellules produisant la matrice extracellulaire animale.

### a. TGF $\beta$ 1, CB2R et synthèse de matrice extracellulaire

Lors d'une mauvaise cicatrisation, un facteur de croissance nommé TGF- $\beta$ 1 est sécrété en grande quantité. Les chercheurs supposent que :

- le TGF- $\beta$ 1 est impliqué dans l'apparition d'une cicatrice ;
- l'action du TGF- $\beta$ 1 peut être sous le contrôle des endocannabinoïdes de type 2 (CB2).

Pour tester cette hypothèse, ils analysent les protéines produites par les fibroblastes en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'activateur ou d'inhibiteur des récepteurs CB2R.



Document 1 - Western-blot diverses protéines produites par les Fibroblastes Humains de Tenon, en présence (+) ou non (-) de TGF- $\beta$ 1, d'un inhibiteur (AM) des récepteurs CB2R, ou d'un activateur (JHW).  
La quantité de protéine CB2R n'a pas été étudiée dans toutes les conditions.

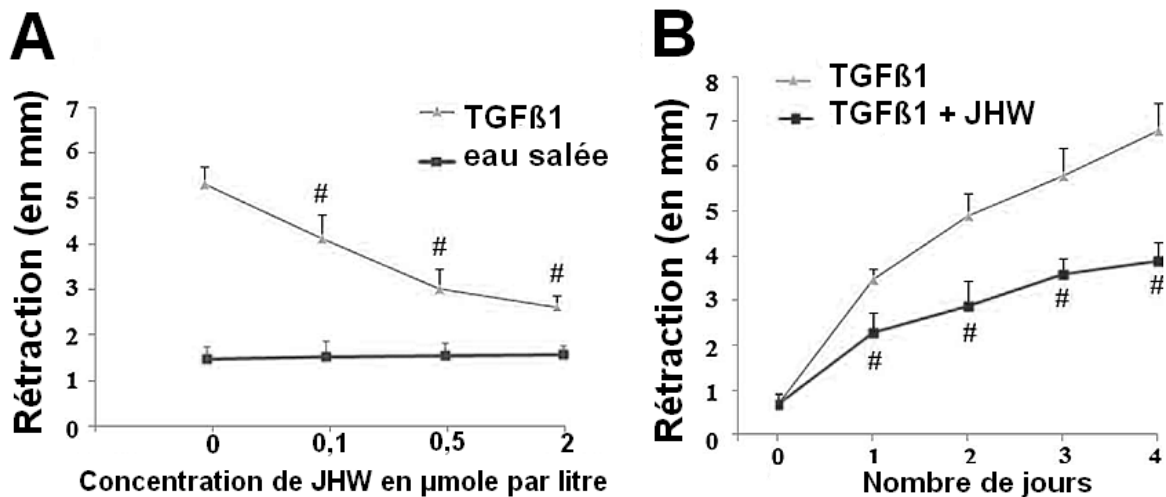
Question 6 – Quel est l'importance de la ligne « actine » dans le document 1 ?

Question 7 – Quel est l'effet du TGF- $\beta$ 1 seul sur les protéines produites par les fibroblastes ?

Question 8 – Les résultats du Document 1 valident-ils l'hypothèse émise par les chercheurs ?

## b. CB2R et rétraction de la matrice extracellulaire

De la matrice extracellulaire normale est mise en présence de TGF- $\beta$ 1, et éventuellement de l'activateur des récepteurs CB2R (JHW). La rétraction de la matrice extracellulaire est due à un dépôt de protéines en forte quantité, ce qui rigidifie le réseau protéique de la matrice extracellulaire, qui rompt alors facilement et empêche la cicatrisation.



*Document 3 - Rétraction de la matrice extracellulaire en présence de TGF- $\beta$ 1 ou d'eau salée, en fonction de la concentration de l'activateur des récepteurs CB2R (JHW) durant 3 jours (A), ou en fonction du temps (B) pour une concentration de JHW de 0,5 mole.L<sup>-1</sup>, en nombre de millimètres perdus.*

*« # » désigne des valeurs significativement différentes du témoin.*

Question 9 – Quel est l'effet de TGF- $\beta$ 1 sur la matrice extracellulaire ? Justifiez.

Question 10 – Quel est l'effet de CB2R sur la matrice extracellulaire ? Justifiez.

Question 11 – Proposez un schéma bilan qui résume l'action du TGF- $\beta$ 1 et des endocannabinoïdes CB2 sur la cicatrisation.