

DS de biochimie
Samedi 3 décembre 2022
Durée : 3 heures

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

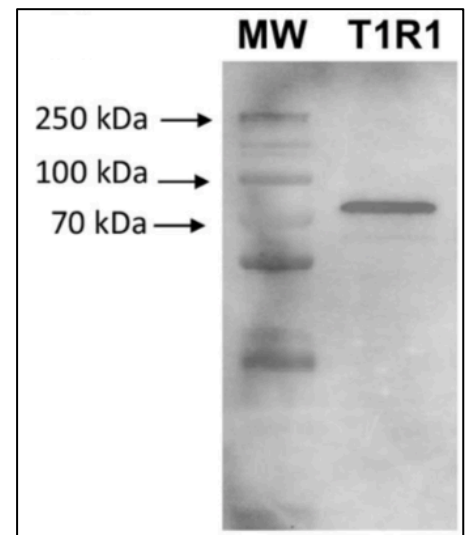
Les polypeptides T1R sont codés par 3 gènes, tous portés sur le chromosome 4. Ils sont à l’origine de 3 isoformes appelées T1R1, T1R2 et T1R3. Leur structure est très similaire.

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. **Environ 85 kDa soit 850 aa**

Question 2 – Une électrophorèse en conditions natives aboutit au même gel. Que pouvez-vous en déduire ? **Une chaîne unique d’acides aminés donc protéine à structure III**



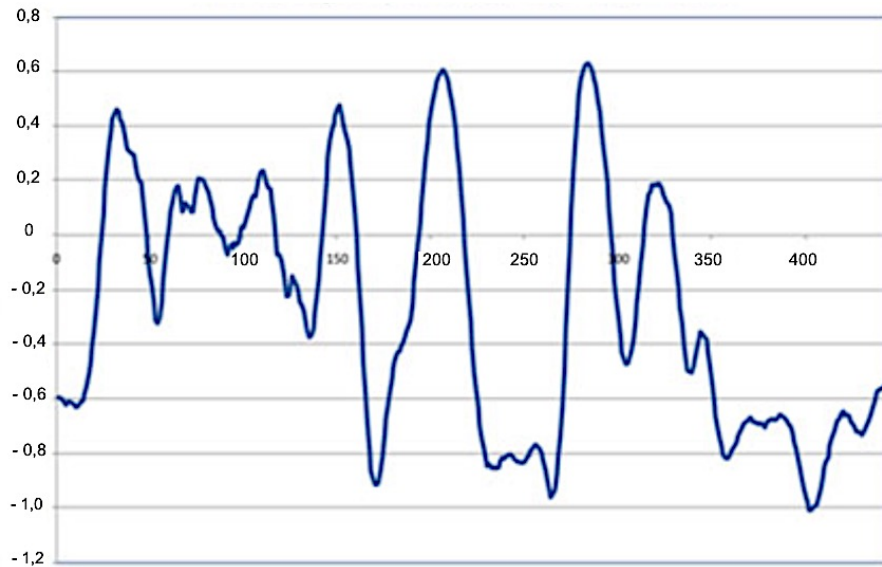
*Document 1 – Gel SDS-PAGE d’une solution de polypeptides T1R1 purifiés.
 MW = marqueur de taille (Source : Crowe et al, Neurogastroenterol Motil, 2020)*

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'hydrophobicité 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.

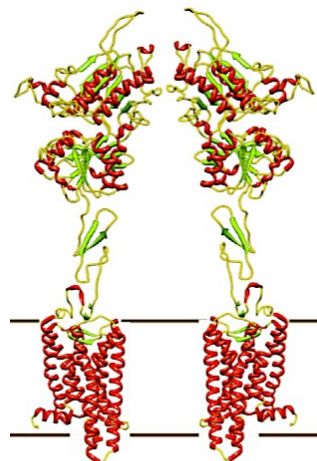
La séquence est analysée par fenêtre de 21 acides aminés : pour une séquence de 21 acides aminés, l'indice moyen d'hydrophobicité est calculé et attribué à l'acide aminé central de la séquence. La fenêtre est alors décalée d'une unité et on recommence. Les valeurs obtenues sont reportées dans un graphique : chaque point représente donc, pour chaque acide aminé de la séquence, l'environnement de la séquence qui l'entoure.

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

T1R2 possède 7 segments transmembranaires. Il serait judicieux de connaître les préférences conformationnelles des acides aminés de ces séquences afin de proposer un modèle en hélices alpha.

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

hétérodimère



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.

Le polypeptide T1R2 possède une meilleure affinité pour le glucose que pour le saccharose : son K_d est 6 fois plus faible. Son affinité pour le glucose est très élevée, bien supérieure à celle de T1R3.

Le polypeptide T1R3 possède une meilleure affinité pour le saccharose que pour le glucose (différence de K_d d'un facteur 2). Son affinité pour le saccharose est bien supérieure à celle de T1R2 car son K_d est 5 fois plus faible.

Bilan : le glucose se fixe préférentiellement sur T1R2 et le saccharose sur T1R3.

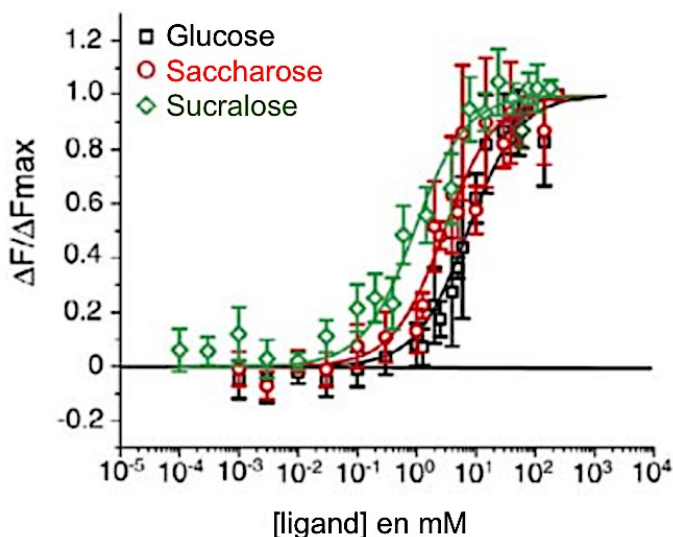
Question 7 – Proposez une explication au fait que la souris mutée soit moins sensible à la saveur sucrée.

L'affinité du récepteur muté est très inférieure au témoin : $K_d \times 6$ pour le saccharose et $K_d \times 4$ pour le glucose. La mutation porte sur un seul acide aminé : l'isoleucine I60, de nature hydrophobe, semble fondamentale pour la liaison à la molécule sucrée. Son remplacement par un acide aminé hydrophile diminue grandement l'affinité.

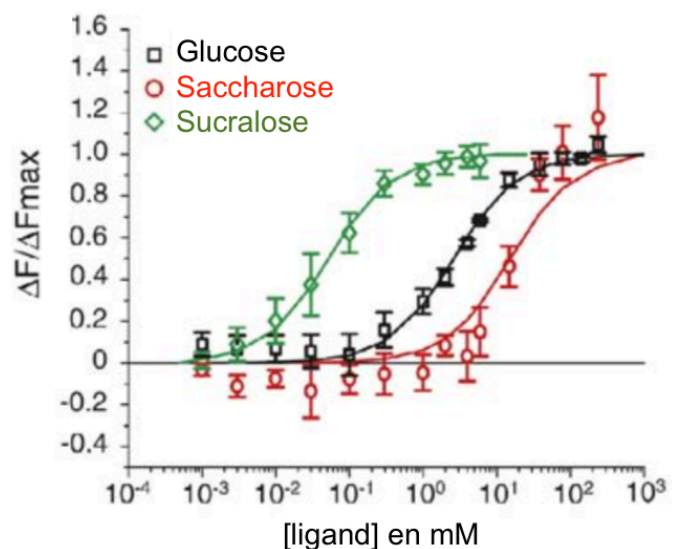
L'isoleucine en position 60 doit faire partie des acides aminés de liaison.

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.

Dans les deux cas : la liaison avec le substrat induit un changement de conformation : les courbes obtenues ont une allure sigmoïde témoignant d'un effet de transition entre deux conformations.

Pour T1R3, ce changement de conformation survient pour des concentrations en ligands de l'ordre de 1 à 10 mM, avec une tendance de meilleure affinité pour le sucralose (pour le saccharose et le glucose, les barres d'erreur semblent ne pas montrer de différence significative).

Pour T1R2, le changement de conformation a lieu pour des concentrations très différentes : le sucralose montre une valeur de K_d un peu en-dessous de 0,1 mM, le glucose un K_d aux alentours de 2 ou 3 mM et un peu plus de 10-12 mM pour le K_d du saccharose.

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

L'affinité est la valeur de la concentration de ligand à une valeur de 50% de fixation, donc ici à $\Delta F/F = 0,5$. On peut donc lire le K_d sur les courbes du document 5 et les comparer au tableau du document 4.

Pour T1R3, $\Delta F/F = 0,5$ pour des concentrations en ligands de l'ordre de 1 à 10 mM, avec une meilleure affinité pour le saccharose que le glucose : ceci est en accord avec le document 4.

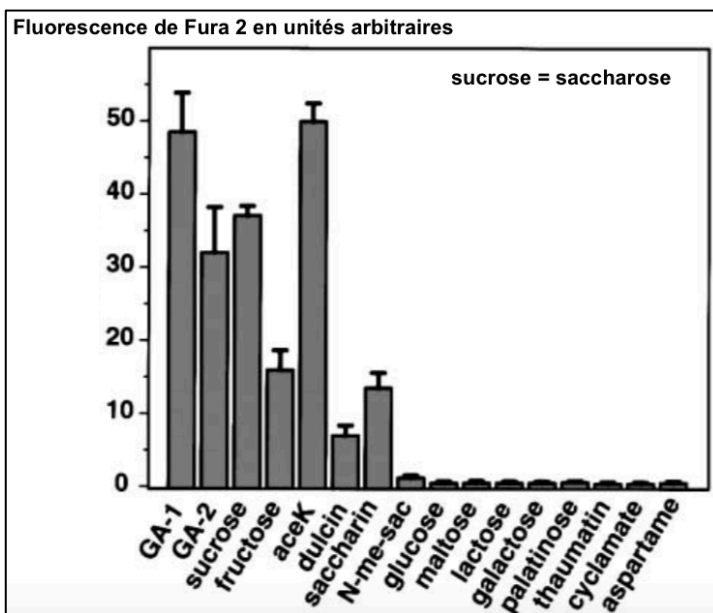
On trouve pour T1R2 la même concordance : entre 2 et 3 mM pour le glucose et environ 12 à 15 mM pour le saccharose.

Le sucralose semble un bon édulcorant : il a un effet dès de très faibles concentrations dans les 2 cas.

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 messenger 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 μ 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 méthylée 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)

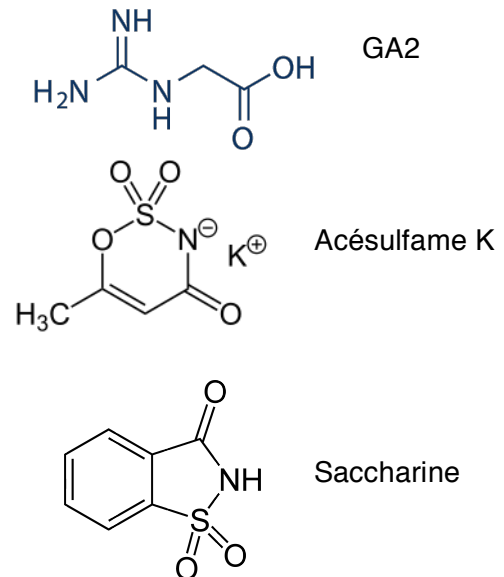
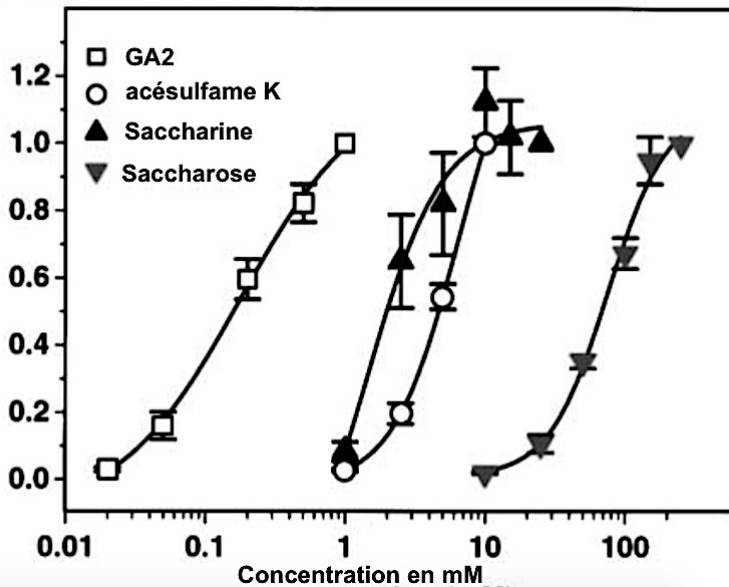
Question 10 – En prenant appui sur des molécules précises, discutez la spécificité du récepteur étudié.

Le récepteur est peu spécifique : il est capable de lier au moins 7 molécules différentes qui sont 7 substrats très différents donnant une réponse positive (activation du récepteur).

Mais la spécificité est néanmoins présente car il y a une distinction nette entre fructose et glucose, entre saccharine et saccharine méthylée.

L'effet des molécules est par contre assez disparate : GA1 et AceK ont un fort effet (50 UA), GA2 et saccharose ont un effet important (35-40 UA), fructose et saccharine et enfin dulcine.

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.

Figure 6 : l'activation est de 50% vers 2 mM pour la saccharine contre environ 80 mM pour le saccharose. Les récepteurs T1R sont donc plus sensibles à la saccharine.

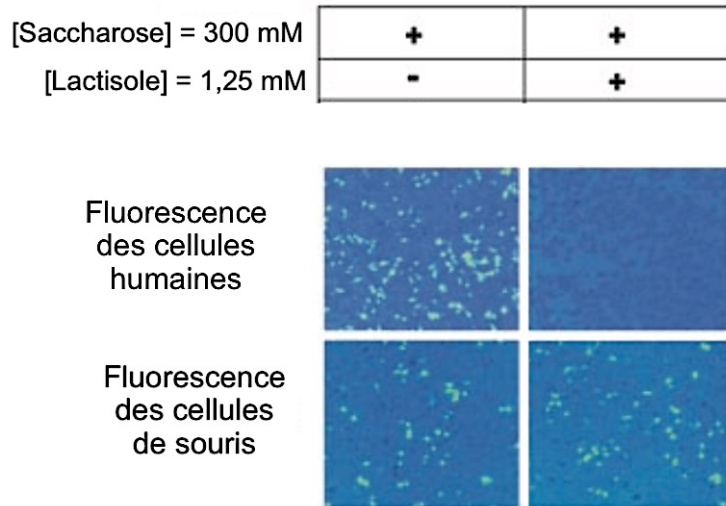
Sur la figure 5, le saccharose provoque une réponse de 37 UA alors que la saccharine n'émet qu'une dose de fluorescence de 15 environ : ceci est dû à la concentration testée : 250 mM pour le saccharose contre 5mM pour la saccharine. On a bien une activation supérieure pour la saccharine.

Les deux figures sont complémentaires.

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.



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.

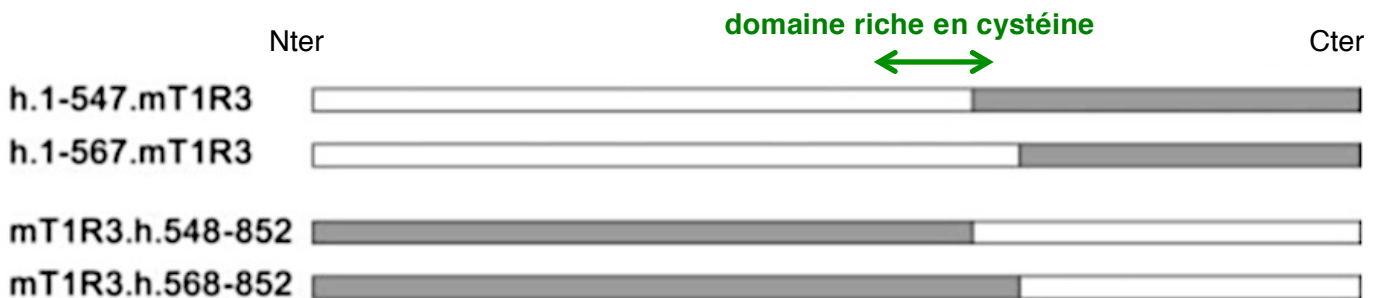
Le lactisole inhibe l'activation des récepteurs par le saccharose.

Il pourrait entrer en compétition avec le saccharose pour la liaison au site de liaison. Ou alors, il pourrait modifier la conformation du récepteur, déformant le site de liaison alors incapable de lier le saccharose ou d'y répondre. Ou encore, il pourrait se lier au saccharose et l'empêcher alors de se fixer sur le récepteur.

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

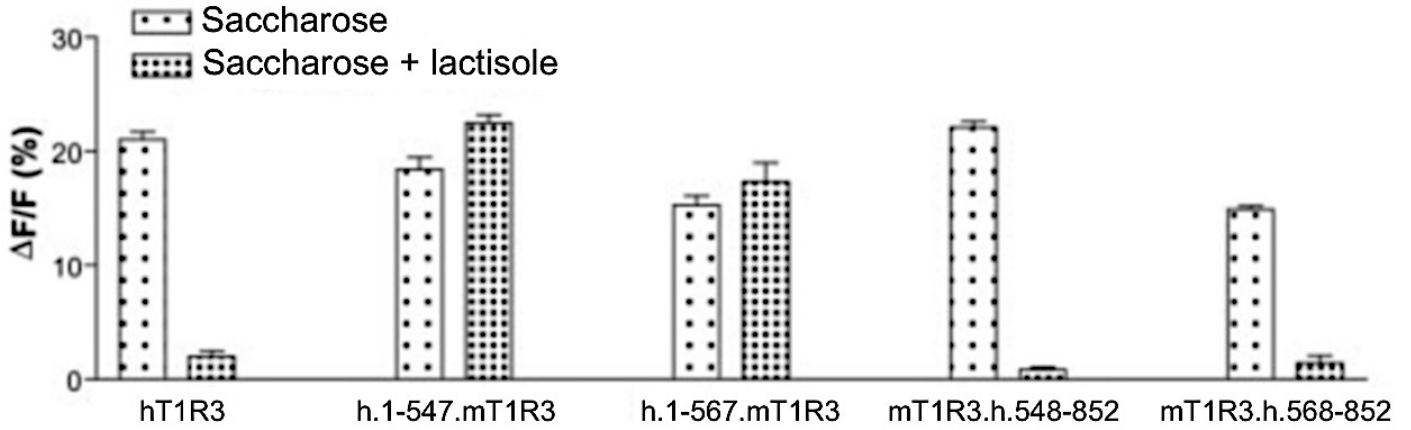
Le lactisole semble sans effet sur les récepteurs de souris.

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 pouvez-vous retenir ?

Cas du témoin : polypeptide T1R3 humain

Le saccharose provoque un changement de conformation du polypeptide T1R3 à l'origine de l'activation et de la réponse à la saveur sucrée : cela s'observe grâce à la variation de $\Delta F/F$ de l'ordre de 20%.

La présence de lactisole empêche ce changement de conformation (et donc l'activation du récepteur).

Pour rappel, le lactisole n'a pas d'effet sur le récepteur murin.

Une chimère possédant la partie externe de T1R3 humain mais la partie membranaire de T1R3 murin n'est plus sensible à l'action inhibitrice du lactisole : $\Delta F/F$ ne montre pas de différence significative entre les 2 mesures. Le lactisole ne semble donc pas agir sur le site de liaison au saccharose.

À l'inverse, une chimère possédant la partie externe de T1R3 murin mais la partie membranaire de T1R3 humain est très sensible à l'action inhibitrice du lactisole : $\Delta F/F$ reste proche de 0 en présence de lactisole : il n'y a pas de changement de conformation. Le lactisole semble donc agir sur la séquence transmembranaire du polypeptide T1R3.

Le lactisole n'entre donc pas en compétition avec le saccharose dans le site de liaison mais se fixe sur la partie transmembranaire et empêche le changement de conformation de T1R3 induit par la liaison au saccharose et nécessaire à l'activation de la réponse.

Thème 2 – Le récepteur CB2R aux endocannabinoïdes

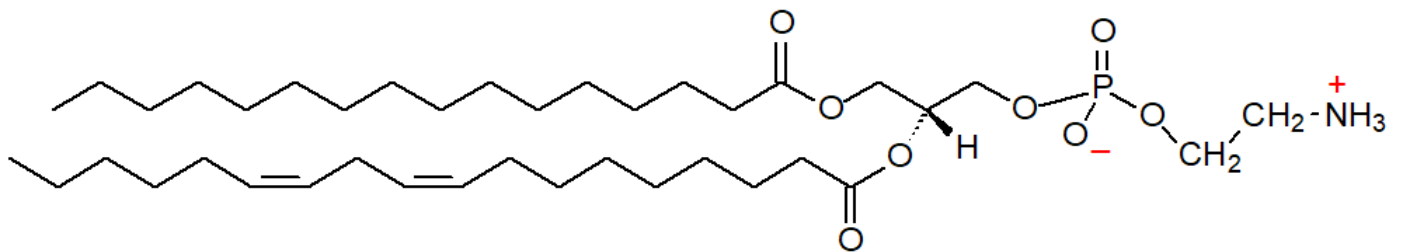
Le cannabis est une molécule psychoactive similaire à des molécules produites par diverses cellules des Mammifères, les endocannabinoïdes. Il existe deux types d'endocannabinoïdes notés CB1 et CB2. On s'intéresse à leurs récepteurs. Le récepteur CB1R est très présent dans le système nerveux central et 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 :

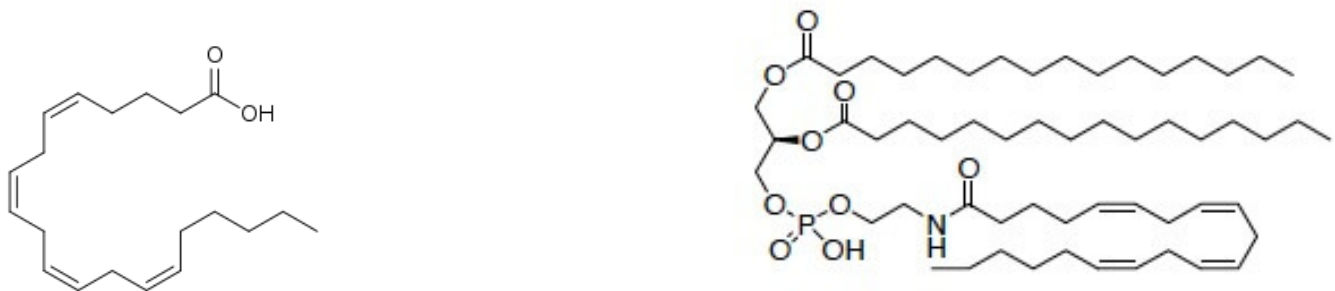
1) Molécule de départ = molécule A



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

Phosphatidyléthanolamine (phosphoglycéride) – présente dans les membranes.

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

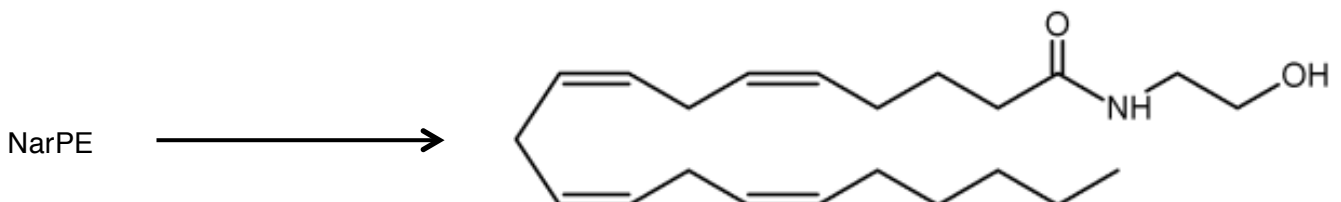


Acide arachidonique + molécule A \longrightarrow NarPE

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

Condensation avec formation de liaison peptidique.

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.
Hydrolyse au niveau du groupement phosphate.

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.
Protéoglycane (glycoprotéine), glycosaminoglycane (glucide), collagène (protéine), fibronectine (protéine), laminine (protéine)...

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

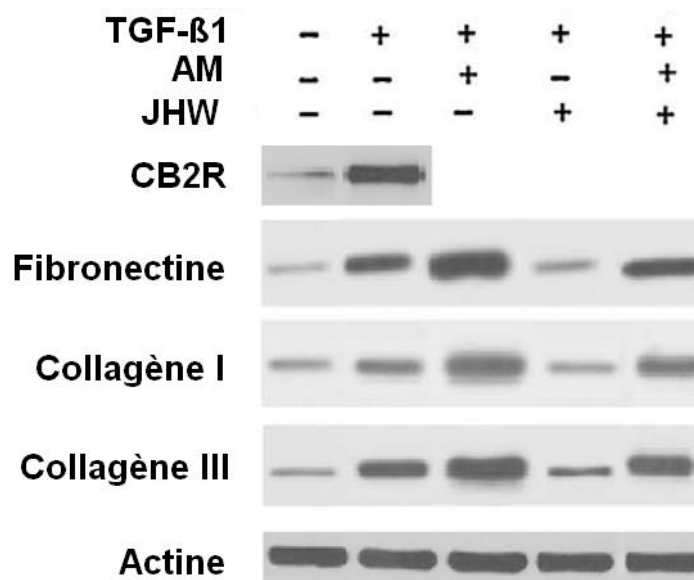
Fibroblaste

a. TGF β 1, CB2R et synthèse de matrice extracellulaire

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

- le TGF- β 1 est impliqué dans l'apparition d'une cicatrice ;
- l'action du TGF- β 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- β 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- β 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 ?

Le dépôt d'actine révélé permet de valider la comparaison quantitative des protéines entre les différentes pistes. L'actine est une protéine universelle : elle est en égale proportion dans les cellules, et doit donc l'être sur le gel, ce qui témoigne d'un dépôt identique dans tous les puits.

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

TGF- β 1 stimule la production de récepteur CB2R mais aussi de fibronectine et de collagène I et III. Il augmente la synthèse de ces protéines, qui étaient déjà produites par les fibroblastes, mais en moindres quantités.

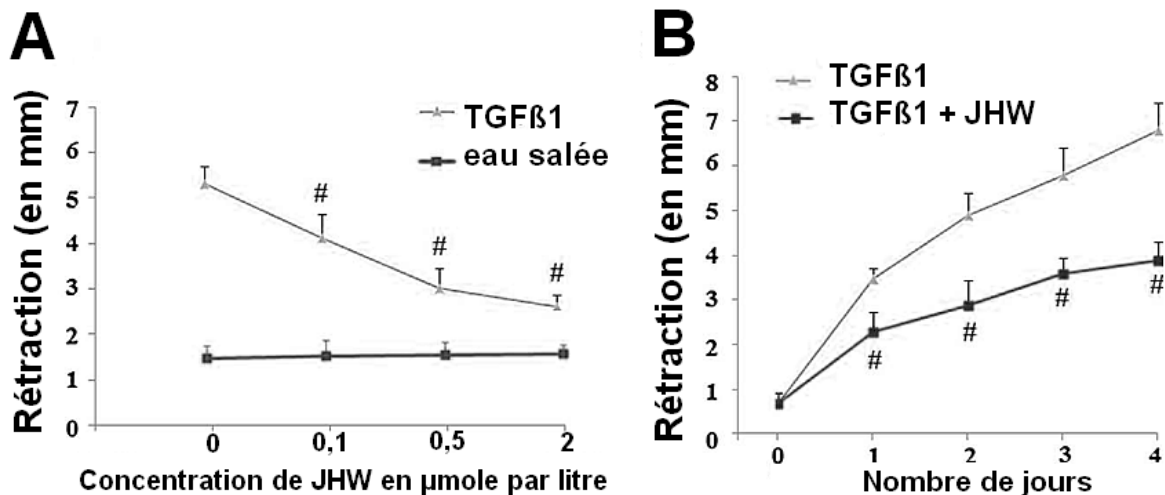
Question 8 – Les résultats du Document 1 valident-ils l'hypothèse émise par les chercheurs ?

Concernant la cicatrice, le TGF- β 1 augmente la production de protéines de la MEC donc cela valide l'hypothèse : un amas de protéines de la MEC est à l'origine d'une mauvaise cicatrisation.

Concernant l'effet de CB2R, on remarque qu'un inhibiteur de CB2R augmente grandement la production de protéines de la MEC alors qu'un stimulateur de CB2R diminue cette synthèse : le TGF- β 1 pourrait donc agir par une voie mettant en jeu le CB2R mais tous deux semblent antagonistes. On peut imaginer que TGF- β 1 inhibe le CB2R qui lui-même inhibe la synthèse des protéines de la MEC.

b. CB2R et rétraction de la matrice extracellulaire

De la matrice extracellulaire normale est mise en présence de TGF- β 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- β 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⁻¹, en nombre de millimètres perdus.

« # » désigne des valeurs significativement différentes du témoin.

Question 9 – Quel est l'effet de TGF- β 1 sur la matrice extracellulaire ?

TGF- β 1 provoque une rétraction de 5 mm de la MEC alors qu'elle n'est que de 1,5 mm dans l'eau salée (en l'absence de JHW). Le TGF- β 1 stimule la production de protéines de MEC donc cela forme un dépôt protéique à l'origine du phénomène de rétraction (donc de mauvaise cicatrisation).

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

La présence de JHW, stimulateur de CB2R, diminue la rétraction : celle-ci diminue de moitié en présence de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de JHW. Cet effet est visible à long terme : à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, le JHW diminue de moitié la rétraction de la MEC au jour 4.

Le JHW stimule le CB2R, ce qui réduit la rétraction. Donc CB2R semble diminuer le phénomène de rétraction de la MEC. Il serait un inhibiteur de la voie d'action du TGF- β 1.

Question 11 – Proposez un schéma qui résume l'action des endocannabinoïdes CB2 sur la cicatrisation.

