

Tutorat n°3 : Biocell : tutoriel de l'analyse de l'expérience



Othman, Raphaël, Franck et Armand ont fini de comparer la longueur de leurs phallus respectifs (bravo Franck, tu as gagné) et décide de travailler un peu, maintenant :

L'enveloppe nucléaire est renforcée par un réseau fibreux de **lamines** (la lamina nucléaire) qui double la membrane interne de l'enveloppe nucléaire formant une couche de 10 à 20 nm d'épaisseur et interrompue par des pores nucléaires. Ce réseau est composé de polypeptides appelés lamines (de 3 types différents : Lamine A, Lamine B et Lamine C. Lamine A et Lamine C sont quasi-identiques) **Là, on a eu la présentation de ce qu'on risque d'étudier. On voit bien qu'il n'y a pas tellement d'informations. Éventuellement l'histoire des 3 lamines peut paraître pertinente.**

À la différence des filaments intermédiaires, la lamina nucléaire a un domaine central plus long et un signal de localisation nucléaire. Elle forme un réseau à maille carrée et dynamique. Quand la cellule entre en **mitose**, la **membrane nucléaire se fragmente** et la **lamina nucléaire se désassemble**. **Vous allez me dire : « ouais mais tu surlignes ça parce que tu sais sur quoi ça va porter » → C'est le principe : jetez toujours un coup d'œil aux documents de l'expérience avant de lire l'énoncé → ça permet de savoir les choses importantes à voir.**

Afin d'étudier le **rôle de la phosphorylation**, on marque des cellules avec de la 35S-méthionine, puis on purifie les **lamines A, B et C** de cellules en **mitose** et de cellules en **interphase**. On analyse alors par électrophorèse bidimensionnelle sur gel chacune des lamines purifiées. On traite également des **échantillons identiques par la phosphatase alcaline** et on les **analyse de la même manière**.

Alors là, avant d'attaquer les documents, il faut ranger tout ça dans sa tête (tête en verlan → je suis un malade !)

- Étude de la **phosphorylation** des lamines
- Selon **mitose** ou **interphase**
- Même étude avec **phosphatase alcaline** → pourquoi ? ... Attendre de voir ce qu'on dit sur cette enzyme. (mais ça doit déjà faire penser à une sorte de témoin)
- lors de la mitose, la membrane se désintègre, la lamina se désassemble

→ on est prêt à attaquer les DOC : YEAHHH !!!!!

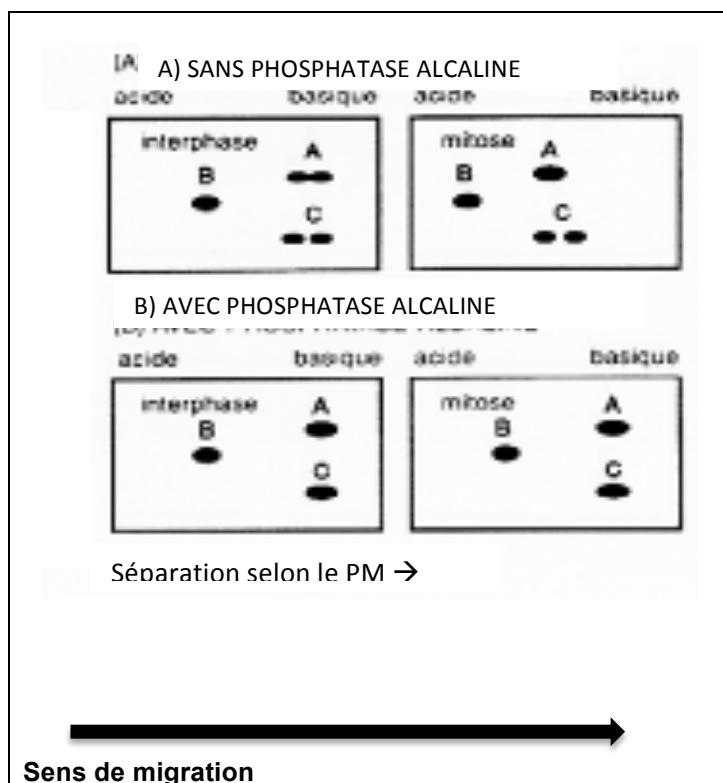


Figure 1

Séparation bidimensionnelle des lamines nucléaires de cellules en interphase et en mitose

(A) : pas de traitement par la phosphatase alcaline.

(B) : traitement par la phosphatase alcaline

Les lettres indiquent les positions des lamines A, B et C.

Les lamines purifiées de cellules en interphase et en mitose ont été ajoutées pour donner le mélange.

Les protéines acides sont chargées plus négativement
Les protéines basiques sont chargées plus positivement.

La phosphatase alcaline est une enzyme ayant la faculté d'hydrolyser les résidus phosphate.

L'électrophorèse consiste à **séparer** différents ensembles moléculaires selon **leur poids**, leur taille, leur charge

On rajoute quelques infos :

- Phosphatase alcaline : coupe le phosphate qui est sur la lamine
- On va voir la différence de poids entre différentes lamines dans différentes situations

QCM 1 : Concernant les résultats de la figure 1, donnez la/les réponse(s) exacte(s) :

- A) Les résultats démontrent que les lamines de cellule mitotiques sont plus lourdes que celles des cellules interphasiques **VRAI** : lamines de C mito migrent moins loin donc ça prouve qu'elles sont plus lourdes
- B) Les résultats démontrent que les lamines de cellules mitotiques sont plus phosphorylées que les cellules interphasiques **VRAI** : on va un pas plus loin que l'item précédent : sans phosphate, les lamines migrent à la même distance qu'elles viennent de C mitotiques ou interphasiques alors que sans phosphatase alcaline : les plus lourdes sont mitotiques donc ont plus (+) de phosphate que les interphasiques
- C) Les résultats suggèrent que les lamines de cellules mitotiques sont bien plus repliées que celles des cellules interphasiques **FAUX** : item sortit du trou du cul du monde → un peu beaucoup n'importe quoi. Rien ne nous indique ça, de près ou de loin
- D) L'électrophorèse avec Phosphatase Alcaline est faite pour s'assurer que la différence de migration entre les cellules mitotiques et les cellules interphasiques n'est due qu'aux résidus de phosphate **VRAI** : ça, si vous avez bien compris l'expérience, vous devez le voir avant de lire l'item. Y'a souvent des items sur les témoins
- E) Toutes les réponses sont fausses

Dans la cellule, de nombreuses protéines une fois synthétisées, sont transportées puis modifiées au sein de compartiments cellulaires tel que le réticulum endoplasmique. Cette expérience a pour but d'étudier la maturation de la protéine Gas1p dans la cellule.

De nombreuses enzymes au sein du réticulum endoplasmique catalysent des réactions permettant l'ajout de chaînes contenant des sucres à la partie C-terminale de protéines comme Gas1p. Ces chaînes sont des séquences signales permettant l'incorporation et l'acheminement des protéines dans des vésicules jusqu'à l'appareil de Golgi. Là, les séquences sont remaniées et envoyées à l'endroit où elles sont destinées.

Gas1p est une protéine qui se trouve à la membrane plasmique. Après sa synthèse, cette protéine est introduite dans le réticulum endoplasmique où elle subit plusieurs modifications. La protéine est d'abord N-glycosylée, puis o-mannosylée et finalement une séquence signal GPI lui est rajoutée. La protéine sert d'ancre au GPI et se loge dans la membrane plasmique.

Nous allons travailler avec des levures qui contiennent des mutations sur les séquences codantes pour les enzymes impliquées dans les modifications de Gas1p dans le réticulum endoplasmique. On décide d'en étudier quelques unes et de déterminer leur incidence sur Gas1p. Les mutations étudiées sont sur les gènes suivants : Sec61, Sec53, Gpi3, Sec18 et Ga1 : : Leu2

Ce tableau résume les effets constatés des mutations sur la chaîne de réaction permettant la parfaite maturation de la protéine Gas1p

Donc là, tout est assez clair. On va voir les modif dans le RE qui permettent d'envoyer la protéine Gas1p au golgi. Pour ça, on observe différentes mutations de gènes codant pour ces modifs

MUTATION	CONSÉQUENCE POUR Gas1p
Sec61	Pas de N-Glycosylation, pas de O-mannosylation et pas de GPI
Sec53	N-glycosylation, pas de O-mannosylation et pas de GPI
Gpi3	Pas d'ancrage GPI, pas de modification au Golgi
Sec18	Pas de transport au Golgi
Gas1 : : LEU2	Pas de protéine Gas1p

Figure 2

QCM2 : D'après les résultats de la figure 2, les résultats suggèrent que :

- A) La séquence contenant la mutation de sec61 code pour une enzyme dont la propriété est de transloquer Gas1p dans le réticulum endoplasmique **VRAI** : la glycosylation et la mannosylation étant des modifs du RE : n'ayant pas été faites, on peut SUPPOSER que Gas1p n'a même pas été transloquée dans le RE et donc que la protéine Sec61 code pour une protéine qui permet cette translocation
- B) La mutation de sec53 code pour l'enzyme donneuse de mannose à Gas1p **VRAI** : On ne voit pas de mannosylation bien qu'il y ait glycosylation donc on peut supposer ça aisément.
- C) La mutation de sec18 code pour le signal NLS **FAUX** : un bon item qui sort de nulle part ! signal NLS = signal pour aller au noyau mais là, il n'en est pas question
- D) La O-mannosylation n'est pas nécessaire à la N-glycosylation **VRAI** : on voit qu'il y a une glycosylation mais pas de mannosylation pour Sec53 donc on en déduit que ce n'est pas nécessaire ☺
- E) Toutes les réponses sont fausses

QCM3 : D'après les résultats de la figure 2, les résultats démontrent que :

- A) La mutation de sec61 code pour une enzyme dont la propriété est de transloquer Gas1p dans le réticulum endoplasmique **FAUX** : rien ne le prouve, il peut y avoir plein d'autres fonctions de la protéine codée par sec61 qui fait qu'on a ces résultats
- B) La mutation de sec53 code pour l'enzyme donneuse de mannose à Gas1p **FAUX** : Pareil que A
- C) La mutation de sec18 code pour le signal NLS **FAUX** : si c'est pas suggéré, ça sera d'autant moins démontré
- D) La O-mannosylation n'est pas nécessaire à la N-glycosylation **VRAI** : En effet, il est certain que cette O-mannosylation n'intervient pas du tout dans la N-glycosylation. Rien ne nous permet d'avoir un quelconque doute
- E) Toutes les réponses sont fausses

Voilà, j'espère que cela vous aura été utile. On essaye de bien vous expliquer les expériences car c'est vraiment important de maîtriser cet immonde exercice de réflexion que Gigi affectionne tout particulièrement

Voilà, bon courage à vous, amis biocellois et MAY THE FORCE BE WITH YOU !!