

**SESSION 2004**

---

Filière : 2<sup>ème</sup> concours – Concours F/S (Paris)

**BIOLOGIE - BIOCHIMIE**

(Epreuve commune aux ENS Ulm et Lyon)

Durée : 3 heures

---

*L'usage de la calculatrice est autorisé.*

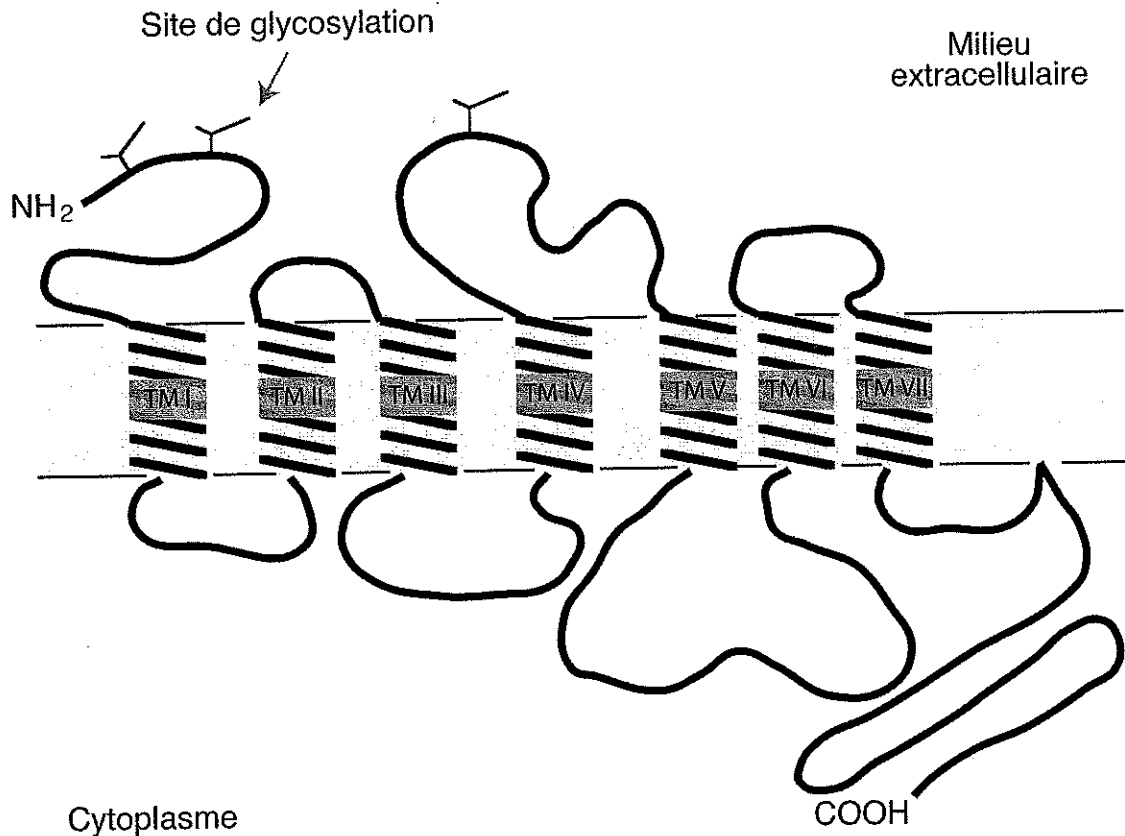
L'usage de la calculatrice est autorisé  
Les deux parties de ce sujet sont indépendantes.

**Partie 1 (7 points) :**

À partir d'un exemple que vous choisirez, décrivez le mode de fonctionnement de la transduction du signal permettant la transmission de l'information provenant d'un signal extracellulaire vers le cytoplasme.

## Partie 2 (13 points) :

Parmi les différents types de récepteurs membranaires, la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est certainement la plus variée et la plus importante. Leur structure se compose d'un élément central formé de 7 segments transmembranaires (figure 1). L'extrémité N-terminale se situe du côté extracellulaire et l'extrémité C-terminale du côté cytoplasmique.

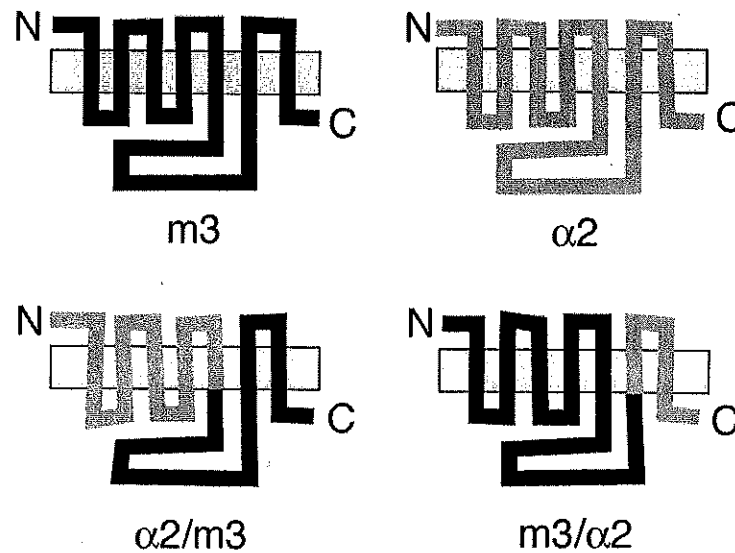


*Figure 1 :* Structure générale des récepteurs couplés aux protéines G. Les 7 segments transmembranaires sont reliés entre eux par des boucles extracellulaires et intra-cytoplasmiques. La partie du récepteur du côté extracellulaire possède plusieurs sites de glycosylation (fixation de sucres). TM, segment transmembranaire.

Le but des différentes expériences que vous allez voir est de comprendre comment s'effectue la transduction du signal au niveau de ces récepteurs. Dans l'organisme, les RCPG reconnaissent leur ligand naturel pour lequel ils sont capables de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Un agoniste est une molécule qui est capable de mimer l'effet du ligand naturel, c'est-à-dire sa fixation sur le récepteur ainsi que la transduction du signal. À l'opposé, un antagoniste est capable de se fixer sur le récepteur, mais bloque la transduction du signal.

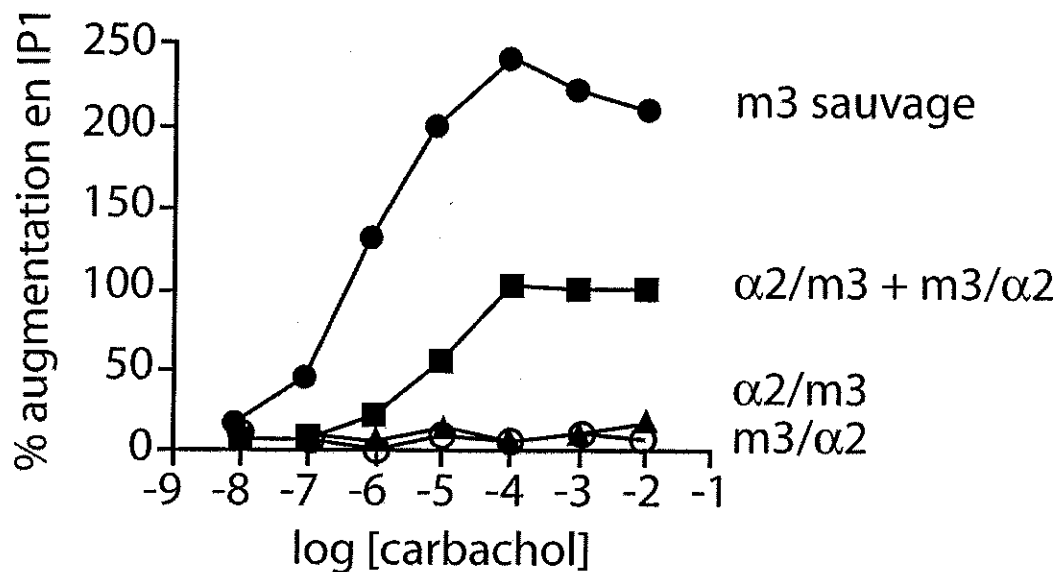
### Question 1

Une première série d'expérience a été effectuée en utilisant des récepteurs « chimères ». Ces chimères sont construites en assemblant des régions de protéines appartenant à des récepteurs différents. Dans ces expériences, les récepteurs utilisés sont les récepteurs  $\alpha 2$ -adrénergiques et m3 muscariniques. Les récepteurs adrénérgiques sont sensibles à l'adrénaline et les récepteurs muscariniques sont activés par l'acétylcholine.



**Figure 2 :** Structure des chimères entre les récepteurs m3 muscariniques (en noir) et  $\alpha 2$ -adrénergiques (en gris). L'extrémité N-terminale est située du côté extracellulaire et l'extrémité C-terminale du côté cytoplasmique.

On mesure la production d'inositol monophosphate (IP1) après stimulation par un agoniste des récepteurs muscariniques (le carbachol) de chacune des constructions, exprimées dans des cellules en culture (figure 3).



**Figure 3 :** Mesure de l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol (PI) en inositol monophosphate (IP1) après co-expression dans des cellules en culture du récepteur m3 muscarinique sauvage (cercles pleins), de la chimère  $\alpha 2/m3$  (triangles),  $m3/\alpha 2$  (cercles vides) et des deux chimères simultanément (carrés). Les cellules en culture exprimant les différents récepteurs sont incubées avec des concentrations croissantes de carbachol pendant 1 heure à 37°C et l'augmentation résultante du niveau d'IP1 est mesurée. Les réponses à la stimulation des récepteurs sont exprimées comme un pourcentage de l'augmentation d'IP1 par rapport aux niveaux de base déterminés en absence de carbachol.

**1.A :** Décrivez les résultats obtenus.

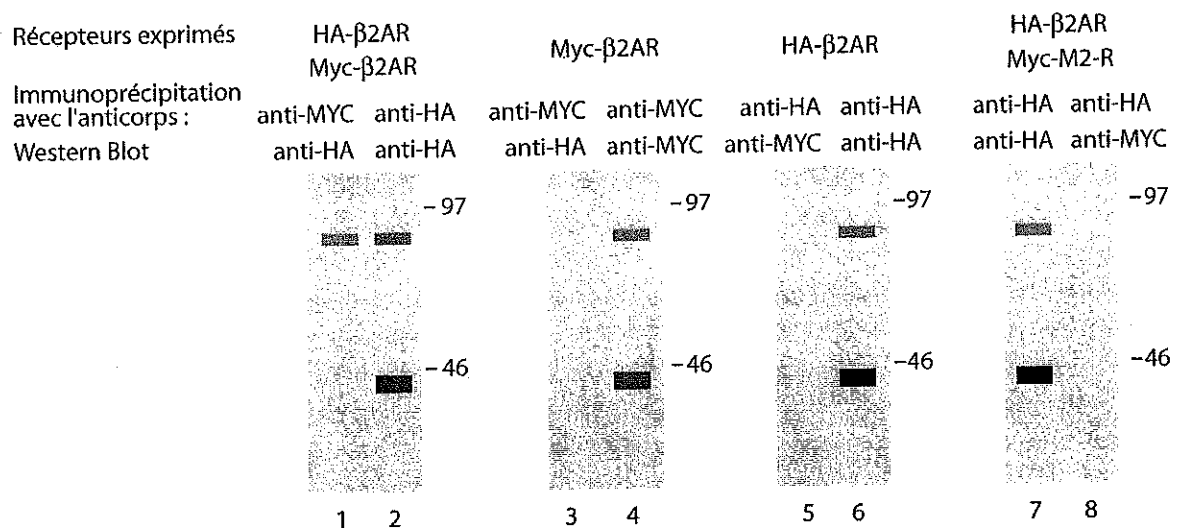
**1.B :** Que pouvez-vous en conclure sur le mécanisme de réponse des récepteurs muscariniques aux ligands extracellulaires ?

## Question 2

Une autre série d'expérience a été effectuée sur les récepteurs  $\beta 2$ -adrénergiques ( $\beta 2$ -AR) et muscariniques de type m2. Les récepteurs  $\beta 2$ -AR comme les  $\alpha 2$ -adrénergiques ont pour ligand naturel l'adrénaline, et les récepteurs muscariniques m2 ont pour ligand l'acétylcholine.

Cette série d'expérience est basée sur le principe de la co-immunoprécipitation. Cette technique permet de détecter les interactions qui ont lieu entre les protéines. Le principe est d'utiliser un anticorps dirigé contre une partie d'une protéine donnée (épitope), d'incuber un extrait cellulaire avec cet anticorps et de réaliser une précipitation de la protéine contre laquelle cet anticorps est dirigé. On peut ensuite séparer les protéines purifiées lors de la co-immunoprécipitation sur gel SDS-PAGE et identifier les différentes bandes obtenues à l'aide d'anticorps spécifiques (technique du Western Blot).

Dans les expériences qui nous intéressent ici, l'anticorps n'est pas dirigé directement contre la protéine mais contre une étiquette spécifique, rajouté à la protéine. Les cellules à partir desquelles les extraits sont produits ont été transformées pour exprimer des protéines dont la partie N-terminale a été modifiée pour contenir ces étiquettes. On dispose de deux étiquettes différentes, l'étiquette Myc reconnue par des anticorps anti-Myc et l'étiquette HA reconnue par des anticorps anti-HA. Ces étiquettes ne modifient pas le comportement ni les propriétés naturelles des protéines. On réalise différentes combinaisons possibles en fonction des étiquettes et des anticorps utilisés (figure 4).



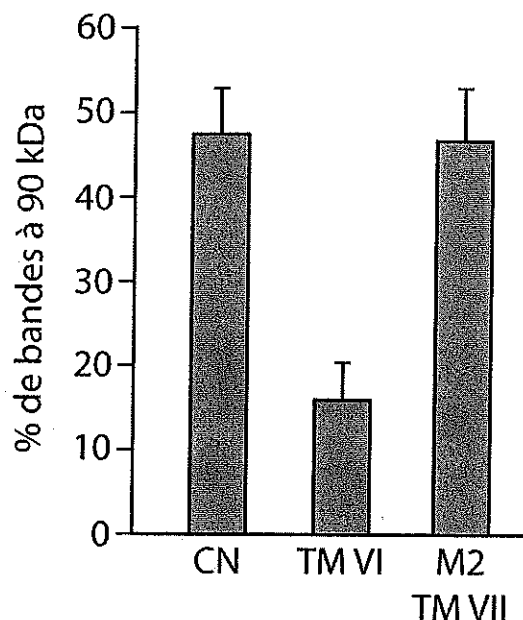
**Figure 4 :** Co-immunoprécipitation des récepteurs  $\beta 2$ -AR portant deux étiquettes différentes. Lignes 1 et 2, les récepteurs Myc- $\beta 2$ AR et HA- $\beta 2$ AR sont co-exprimés dans des cellules en culture et immunoprécipités avec l'anticorps reconnaissant Myc (ligne 1) ou celui reconnaissant HA (ligne 2). On effectue ensuite un Western Blot avec les deux précipités en utilisant un anticorps anti-HA. Lignes 3 et 4 le récepteur  $\beta 2$ -AR avec l'étiquette Myc est exprimé seul dans les cellules et immunoprécipité avec l'anticorps anti-Myc. Les anticorps anti-HA (ligne 3) ou anti-Myc (ligne 4) sont utilisés pour visualiser les bandes sur le Western Blot. Lignes 5 et 6 le récepteur  $\beta 2$ -AR avec l'étiquette HA est exprimé seul dans les cellules et immunoprécipité avec l'anticorps anti-HA. Les anticorps anti-Myc (ligne 4) ou anti-HA (ligne 5) sont utilisés pour visualiser les bandes sur le Western blot. Lignes 7 et 8, les récepteurs HA- $\beta 2$ AR et Myc-m2-R (récepteur muscarinique de type m2) sont co-exprimés dans des cellules en culture et immunoprécipités avec l'anticorps anti-HA et le Western Blot est révélé avec l'anti-HA (ligne 7) ou l'anti-Myc (ligne 8). La taille des marqueurs de poids moléculaire (97 et 46) sont exprimées en kilo-daltons (kDa).

**2.A :** Décrivez les résultats obtenus. À quoi correspondent les bandes observées ?

**2.B :** Qu'apporte ces expériences par rapport à celle des récepteurs chimères vue précédemment ?

### Question 3

Des expériences préliminaires ont montré l'importance des interactions physique qui existent entre les différents segments transmembranaires. Afin de poursuivre les investigations sur l'importance de ces segments lors de l'activation des RCPG, différents peptides ont été synthétisés, et leur effet sur la formation des différentes bandes obtenues par Western Blot, analysé (figure 5).

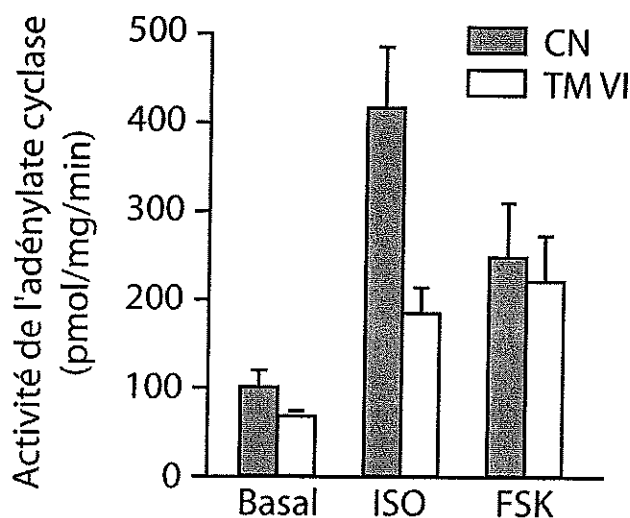


*Figure 5* : Effet de différents peptides sur la formation de la bande d'environ 90 kDa de récepteurs. Des extraits membranaires de cellules exprimant le récepteur Myc- $\beta$ 2-AR sont mis en présence à température ambiante de différents peptides pendant 30 minutes. Les extraits membranaires sont alors analysés par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-Myc. La taille relative de chacune des deux bandes observées (voir figure 4) est mesurée, la proportion de la bande autour de 90 kDa est rapportée à la quantité totale des deux bandes et exprimée en pourcentage. Les différents peptides utilisés sont les suivants : CN, peptide contenant une séquence en acides aminés sans lien avec les autres peptides. TM VI, peptide correspondant à la séquence en acides aminés du segment transmembranaire numéro VI du récepteur  $\beta$ 2-AR. m2 TM VII, peptide correspondant au segment transmembranaire numéro VII du récepteur muscarinique m2.

3.A : Décrivez les résultats obtenus. Quel est l'intérêt du peptide m2 TM VII ?

### Question 4 :

Les récepteurs  $\beta$ 2-AR, une fois activés, stimulent l'adénylate cyclase, une enzyme située dans la membrane plasmique. L'effet des différents peptides sur l'activité de l'adénylate cyclase a aussi été mesurée (figure 6).



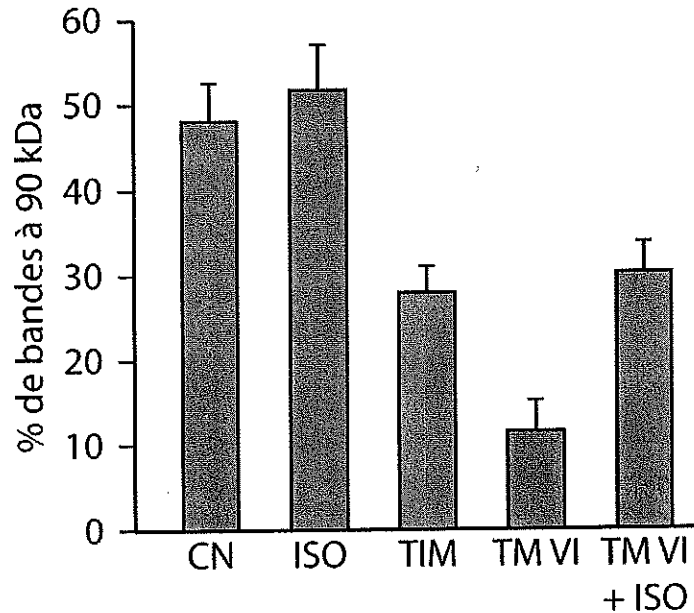
*Figure 6* : Effets du peptide TM VI sur l'activité de l'adénylate cyclase après stimulation des récepteurs  $\beta$ 2-AR. Des préparations de membranes de cellules exprimant les récepteurs  $\beta$ 2-AR sont traitées avec le peptide CN (voir figure 5) ou le peptide TM VI. L'activité de l'adénylate cyclase est alors mesurée à l'état basal (Basal), en présence d'isoprotérénol (ISO) un agoniste des récepteurs  $\beta$ 2-AR ou en présence de Forskoline (FSK), une drogue capable d'activer l'adénylate cyclase de façon directe sans l'intermédiaire d'un récepteur membranaire.

4.A : Quel est l'intérêt de mesurer l'activité de l'adénylate cyclase ?

4.B : Quelles informations complémentaires vous apporte cette expérience ?

### Question 5

Pour comprendre comment se forment les bandes à 90 kDa, on mesure les effets d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs  $\beta_2$ -AR sur la formation de ces bandes (figure 7)



*Figure 7* : Effets des ligands des récepteurs  $\beta_2$ -AR sur la formation de bandes à 90 kDa. Mesure de la proportion de bandes à 90 kDa parmi la population totale de bandes observées (voir figure 5) sur des extraits membranaires où les récepteurs  $\beta_2$ -AR sont exprimés après traitement pendant 30 minutes avec le peptide CN, ou 1  $\mu$ M d'isoprotérénol (ISO), ou 10  $\mu$ M de timolol (TIM) un antagoniste des récepteurs  $\beta_2$ -AR, ou le peptide TM VI. La dernière barre de l'histogramme correspond à un traitement à l'isoprotérénol suivi de 30 minutes de traitement par le peptide TM VI.

5.A : Décrivez les résultats obtenus avec cette expérience.

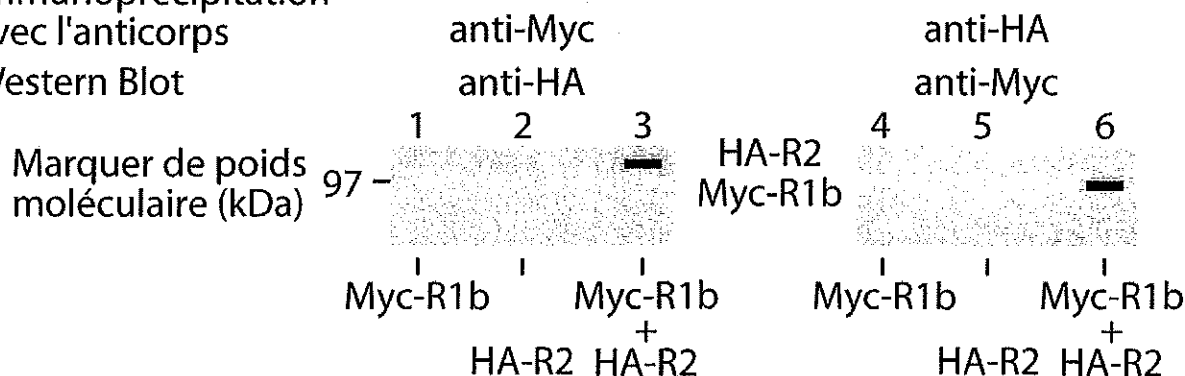
5.B : Quel est l'intérêt de cette expérience ? Quelles informations vous donne-t-elle sur le mode de fonctionnement des récepteurs  $\beta_2$ -AR ?

### Question 6

Afin de préciser si les modes d'actions observés pour les récepteurs adrénergiques sont généralisables, une série d'expérience a été effectuée sur les récepteurs de l'acide  $\gamma$ -aminobutyric (GABA). Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur majeur du système nerveux central des mammifères. La fixation du GABA sur les récepteurs  $GABA_B$ , qui appartiennent à la famille des RCPG, produit une inhibition lente et prolongée de la transmission nerveuse. Plusieurs membres de la famille des récepteurs  $GABA_B$  ont été découverts (R1a, R1b et R2) avec des localisations dans le cerveau au niveau des mêmes neurones.

Afin de vérifier si ces localisations ne donnent pas lieu à des interactions physiques, des expériences de co-immunoprécipitation ont été effectuées dans des cellules de mammifères exprimant les récepteurs  $GABA_B$ R1b et  $GABA_B$ R2 (figure 8). Les récepteurs  $GABA_B$ R2 ont une taille de 110 kDa et les récepteurs  $GABA_B$ R1b une taille autour de 96 kDa.

Immunoprécipitation  
avec l'anticorps  
Western Blot



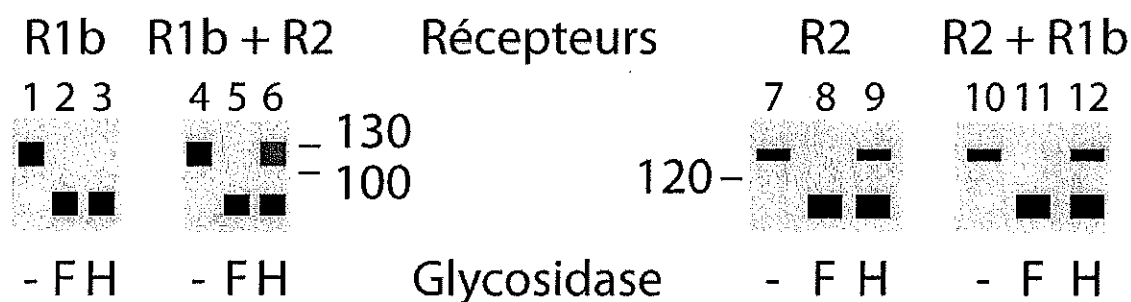
**Figure 8 :** Des cellules en culture ont été transfectées par le récepteur Myc-GABA<sub>B</sub>R1b (lignes 1 et 4), HA-GABA<sub>B</sub>R2 (lignes 2 et 5) et avec ces deux récepteurs (lignes 3 et 6). Ces cellules ont été collectées, lysées et leur contenu immunoprécipité (IP) à l'aide de l'anticorps anti-Myc (Lignes 1, 2 et 3) ou anti-HA (lignes 4, 5 et 6). Les précipités sont ensuite soumis à un Western Blot où les récepteurs sont identifiés à l'aide des anticorps anti-HA (lignes 1, 2 et 3) ou anti-Myc (lignes 4, 5 et 6). La référence à 97 kDa correspond à la taille du marqueur de poids moléculaire.

**6.A :** En analysant le résultat de cette expérience, le mode de fonctionnement des récepteurs GABA<sub>B</sub> vous semble-t-il différent de celui des récepteurs adrénérgiques ?

### Question 7

La voie classique d'adressage d'une protéine à la membrane de la cellule passe par plusieurs étapes. La protéine membranaire est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, elle subit alors des modifications à l'intérieur de l'appareil de Golgi. Ensuite elle est triée et exportée vers la membrane plasmique. Pour comprendre où se trouvent les différents types de récepteurs GABA<sub>B</sub> dans les cellules, on utilise un test de résistance des récepteurs aux endoglycosidases (figure 9).

Les GPCR sont des récepteurs membranaires, à ce titre la partie extracellulaire de ces récepteurs est couverte de résidus glycosylés. L'ajout de ces sites glycosylés a lieu dans l'appareil de Golgi. Les endoglycosidase sont des enzymes qui sont capables de cliver de façon spécifique les sucres rajoutés sur les RCPG dans le Golgi. L'endoglycosidase H est capable de cliver les sucres formés au départ de l'appareil de Golgi mais pas ceux qui sont modifiés dans la zone terminale de l'appareil de Golgi. Par contre l'endoglycosidase F permet de couper n'importe quel type de sucres.



**Figure 9 :** L'état de glycosylation des récepteurs est analysé après traitement d'extraits de cellules exprimant les récepteurs GABA<sub>B</sub>R1b (lignes 1 à 3), GABA<sub>B</sub>R2 (lignes 7 à 9), ou une combinaison des deux récepteurs (lignes 4 à 6 et 10 à 12). Le traitement des extraits est effectué en présence d'endoglycosidase F (F) ou d'endoglycosidase H (H) ou sans endoglycosidase (-). Les échantillons sont ensuite analysés par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les récepteurs GABA<sub>B</sub>R1b (lignes 1 à 6) ou GABA<sub>B</sub>R2 (lignes 7 à 12)



7.A : Décrivez les résultats de cette expérience. Que vous apprend-t-elle sur la localisation cellulaire des récepteurs GABA<sub>B</sub> ?

### Question 8

Dans la dernière série d'expérience, la technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert) est utilisée. Cette méthode est un dosage de proximité où l'énergie engendrée par la dégradation d'une molécule chimique (la coelenterazine) par une enzyme, la *Renilla* luciférase (donneuse d'énergie), est transférée à la GFP (Green Fluorescent Protein) qui agit comme accepteur d'énergie. La GFP émet ensuite de la lumière à sa longueur d'onde d'émission spécifique. Le transfert d'énergie est la conséquence d'un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur (figure 10). L'efficacité du transfert dépend de la distance entre les deux molécules donneur et accepteur et cette efficacité est maximale à 50 Å.

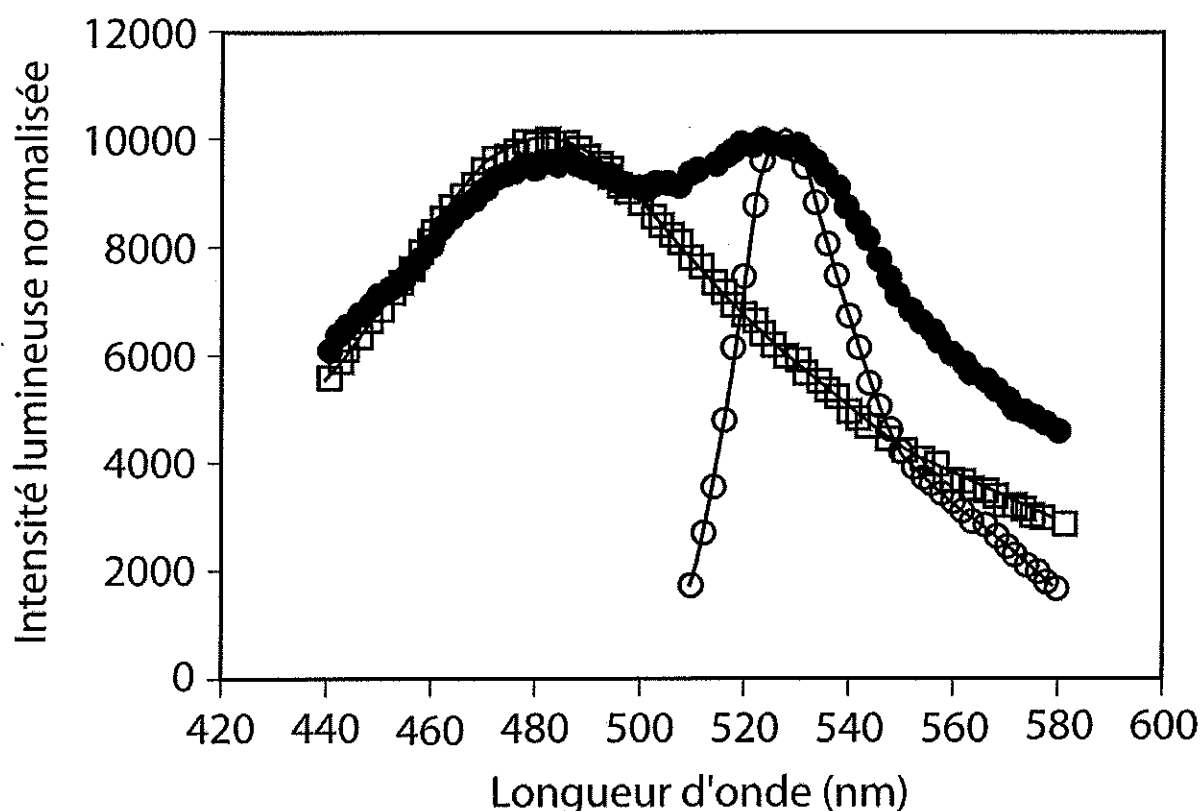


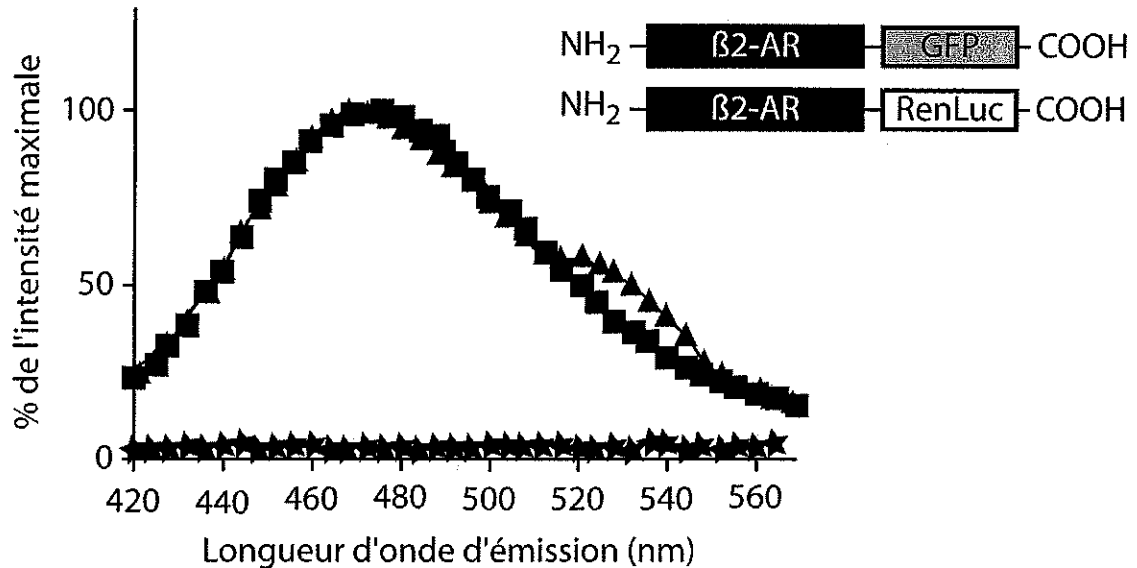
Figure 10 : Spectres d'émission de la *Renilla* luciférase (carrés), de la GFP (cercle vide) et d'une protéine chimère fusion de ces deux protéines (cercles pleins). La réaction de luminescence a été initiée par l'ajout de 1  $\mu$ M de coelenterazine.

8.A : En vous appuyant sur les connaissances que vous avez en chimie sur les couches électroniques des atomes, expliquez quel est le phénomène à l'échelle atomique à la base du principe de BRET ?

8.B : Pour quelle raison, les longueurs de l'accepteur sont-elles plus grandes que celles du donneur ?

### Question 9

Cette méthode a été appliquée à l'analyse des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques ( $\beta$ 2-AR), en exprimant dans une cellule en culture, une chimère entre la *Renilla* luciférase et le  $\beta$ 2-AR et une autre chimère entre la GFP et le  $\beta$ 2-AR (figure 11).



**Figure 11 :** Mesure de BRET dans des cellules en culture vivante exprimant une chimère entre le récepteur  $\beta 2$ -AR et la GFP (astérisques), une chimère entre le récepteur  $\beta 2$ -AR et la *Rénilla* luciférase (carrés pleins) et les deux chimères en même temps (triangles pleins). Les cellules sont mises en présence de coelenterazine  $5 \mu\text{M}$  et la mesure de l'émission de lumière est effectuée immédiatement. L'intensité lumineuse est représentée en pourcentage de l'intensité maximale obtenue. La structure des deux protéines chimère est indiquée sur la figure (RenLuc pour *Rénilla* luciférase).

**9.A :** Décrivez cette expérience.

**9.B :** Expliquez pourquoi les protéines *Rénilla* luciférase et GFP sont fusionnées en C-terminal des récepteurs  $\beta 2$ -AR ?

**9.C :** Quel contrôle proposeriez-vous pour vous assurer que l'interaction observée entre les récepteurs est bien spécifique et pas due au fait que les récepteurs sont exprimés en grande quantité dans les cellules étudiées ?

### Question 10 – Questions de synthèse

**10.A :** À partir des différents exemples que vous venez de voir, réalisez un schéma de synthèse regroupant les différents modes d'activation des récepteurs couplés aux protéines G.