

Suite TP04 : Analyse des résultats de mutagenèse par UV sur les levure Ade2.

TP 05. Les étapes de la biosynthèse des protéines

Avant tout, prendre conscience de quelques techniques permettant de suivre des molécules au niveau cellulaire. --> flash autoradiographie.

Puis:

Partie 1 : Schématiser les localisation des différentes étapes. 45min

À partir d'une analyse des expériences décrites :

Localiser les lieux des différentes étapes de la biosynthèse des protéines sur le document distribué.

Pour cela :

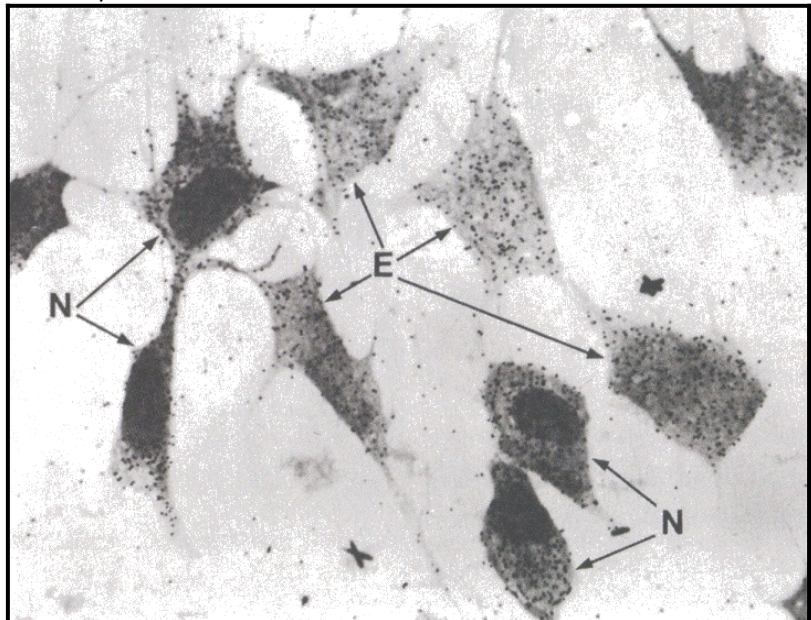
- Localiser le lieu de la synthèse des protéines dans une cellule eucaryote
- Déterminer le rôle de l'ARN
- Localiser le lieu de synthèse de l'ARN et son « déplacement » au sein de la cellule
- Reporter l'ensemble de ces informations sur le schéma distribué en faisant attention à réaliser une légende claire et complète.

Expérience n°1 : Résultats obtenus par marquage sur des fractions cellulaires

On met en culture des cellules normales et des cellules énucléées*. On ajoute au milieu de culture un acide aminé radioactif. Les cellules sont ensuite rincées (élimination des acides aminés radioactifs non incorporés dans des protéines) puis on réalise une autoradiographie**.

* cellule dont on a retiré le noyau

** consulter l'animation [autoradiographie.exe](#) (sur le réseau)



Expérience n°2 : La synthèse in vitro de protéines grâce à des extraits de cellules*

L'ARN (acide ribonucléique) est un acide nucléique comme l'ADN (acide désoxyribonucléique) sauf que le désoxyribose est remplacé par un ribose ainsi que la thymine par l'uracile. Contrairement à l'ADN, il n'est composé que d'un seul brin.

On peut synthétiser in vitro des protéines grâce à des extraits de cellules.

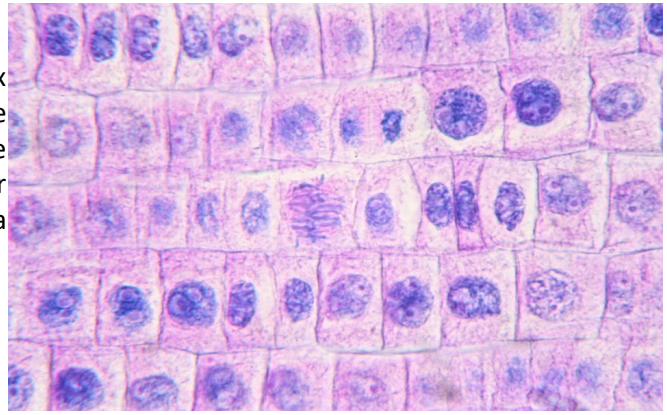
On étudie l'action de deux enzymes sur ce processus : une RNase, qui digère l'ARN, et une DNase, qui digère l'ADN.

Conditions	Résultats
Extraits de bactéries	Synthèse des protéines
Extraits de bactéries + RNase	Arrêt immédiat de la synthèse des protéines
Extraits de bactéries + DNase	Arrêt progressif de la synthèse des protéines

* Expériences de Nirenberg et Matthaei (c.f. TP 02)

Expérience n°3 : Coupe de racine d'ail coloré au vert de méthyle pyronine

Le vert de méthyle-pyronine est un mélange de deux colorants qui permet de différencier l'acide désoxyribonucléique (coloré en vert par le vert de méthyle), de l'acide ribonucléique (coloré en rose par la pyronine). En présence d'ADN et d'ARN, la coloration sera violette.



Expériences n°4 et 5 : suivi de deux molécules rendues radioactives : la leucine* et l'uracile**

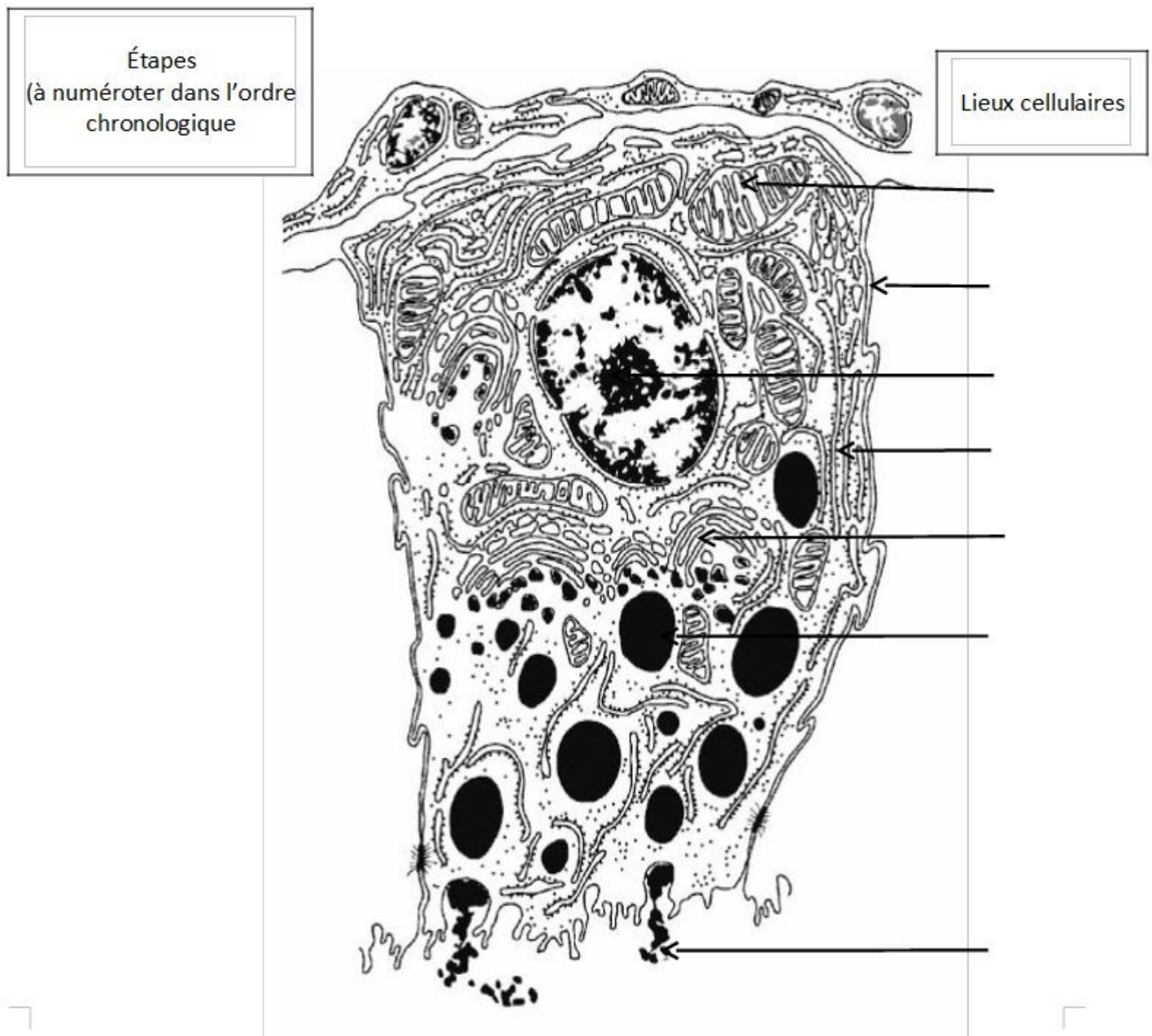
Re-consulter l'animation « Autoradiographie » PUIS Cel_panc.exe (même emplacement que le précédent)

Ergastoplasme est synonyme de réticulum endoplasmique

*acide aminé

**nucléotide caractéristique de l'acide ribonucléique (ARN)

La cellule pancréatique fabrique des protéines en très grande quantité. Ces protéines sont des enzymes que la cellule exporte de son cytoplasme par exocytose. Ces enzymes iront ensuite agir dans le tube digestif.



Partie 2 : D'une séquence nucléotidique à une séquence polypeptidique : la naissance du code génétique. 1h

Doc. 1 Les bases du code de traduction de la séquence nucléotidique à une séquence polypeptidique

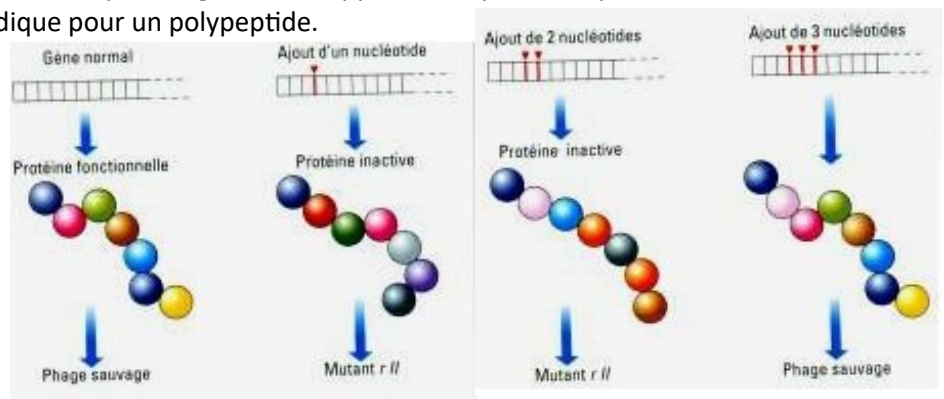
En 1958, Francis Crick montra expérimentalement que deux principes guidaient le passage de l'information de l'ADN à la protéine.

Premier principe : la spécificité d'un segment donné d'acides nucléiques est représentée uniquement par la séquence des bases qui le constituent et que cette séquence renferme une indication codée sur la nature, l'ordre et le nombre des acides aminés (de la protéine).

Deuxième principe : l'information passe de l'acide nucléique à un autre acide nucléique et également de l'acide nucléique à la protéine, mais jamais de la protéine à la protéine ou de la protéine à l'acide nucléique.

Doc. 2 Expérience d'addition de nucléotides dans un gène de virus bactériophage T4 suivie de traduction.

1961, l'étude du bactériophage T4 muté pour le gène rIIa a apporté une preuve expérimentale au mode de codage de la séquence nucléotidique pour un polypeptide.

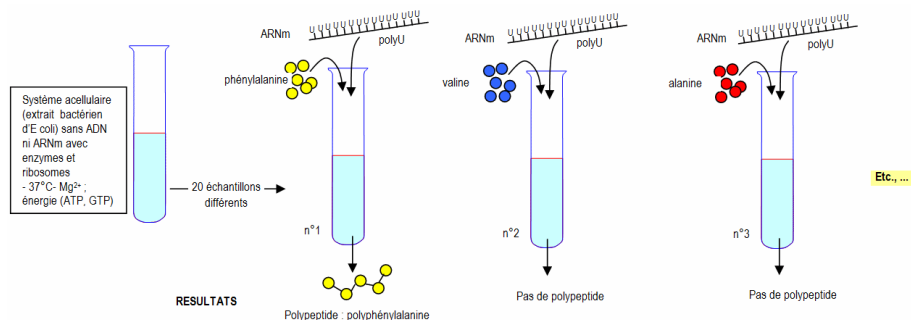


Rq : la disparition d'un acide aminé n'engendre pas forcément de perte de fonctionnalité d'une protéine si celui-ci n'appartient pas au site actif ou ne participe pas à sa structure tridimensionnelle.

Doc. 3 Décryptage de la traduction de la séquence de l'ARN_m en séquence polypeptidique

Nirenberg et Matthaei (1961) découvrent une enzyme (ARN polymérase) permettant de synthétiser, in vitro, des ARN_m dont la séquence est connue. Ces auteurs ajoutent à un milieu contenant des précurseurs (les 20 acides aminés), un ARNm de synthèse ne contenant que des nucléotides à Uracile (U). Ce polymère poly 'U' déclenche la synthèse d'un polypeptide constitué uniquement de phénylalanine. Avec le même type d'expérience, d'autres polypeptides sont obtenus avec d'autres ARN_m de synthèse :

ARNm de synthèse	Acides aminés ajoutés	Protéine synthétisée
UUUUUUUUUU	Tous les acides aminés	Phe-Phe-Phe
UUUUUUUUUU	Tous les acides aminés sauf la phénylalanine	Pas de synthèse
CCCCCCCCC	Phe, Val, Ala	Pas de synthèse
CCCCCCCCC	Phe, Val, Pro	Pro-Pro-Pro
ACACACACA	Pro, Thr, His, Gln	Thr- His- Thr
AACACACAA	Pro, Thr, Asn, Gln	Asn- Thr- Gln
AACACACAA	Pro, Thr, His, Gln	Pas de synthèse



Autres expériences : avec

ARNm	polypeptide obtenu
polyA	polymère de lysine
polyC	polymère de proline

Doc. 4 Comparaison de la séquence nucléotidique, ARNm et polypeptidique de la PAH

Pour cela, transcrire puis traduire la séquence nucléotidique d'une enzyme : la Phénylalanine hydroxylase grâce au fichier « phenorm.cod » en ARNm à l'aide **d'Anagène**. Puis faire de même pour Phe1, 2 ect...

Noms des allèles	Séquence nucléotidique		Séquence protéique	
	Position du 1 ^{er} changement dans la séquence	Type de mutation	Position du 1 ^{er} changement dans la séquence	Phénotype
PHE1				sévère
PHE2				peu sévère
PHE3				sévère
PHE4				assez sévère
PHE5				sévère
PHE6				normal
PHE7				sévère
PHE8				normal
PHE9				peu sévère
PHE10				sévère

Pour mettre en évidence la correspondance entre les séquences nucléotidiques et peptidiques, construire le graphique représentant la position du 1^{er} changement dans la séquence nucléotidique en fonction de celle du premier changement peptidique.(à faire avec un **tableur type calc** en intégrant le calcul de pente)

Réaliser un schéma bilan explicitant comment l'information génétique contenue dans la séquence nucléotidique d'un gène permet la synthèse d'une protéine.

Vous analyserez au préalable les différents documents afin d'en tirer des conclusions utilisables pour construire ce schéma.