

TP révisions 3

durée : 4h ; vendredi 5 juin (8h-12h et 13h-17h) ; salle de TP de bio.

Plan de révisions :

- SV-A : histologie animale (téguments, intestin, poumon, branchies...)
- SV-D et SV-F : électrophorèses, méthodes de biomol et de génétique moléculaire
- SV-E : étude d'une enzyme
- SV-G : structure, détermination et biologie florale
- SV-K : construire une phylogénie
- révisions de logiciels : popG, populus, RatCVS, Regulpan, Libmol/Rastop, LibreOffice diverses micrographies

I. Cinétique enzymatique

Ce TP a pour objectif de réviser les raisonnements et manipulations visant à caractériser l'activité d'une enzyme.

1. Manipulations

On étudie ici une enzyme, la **catalase**, qui catalyse la réaction $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. On cherche à déterminer la vitesse initiale pour deux concentrations différentes en substrat.

L'avancement de la réaction sera mesuré par la mesure de la concentration en produit (O_2), par des sondes reliées à un logiciel d'enregistrement. La réaction aura lieu dans des cuves d'environ 20 mL. On utilisera un volume de solution d' H_2O_2 de 0,5 mL.

NB : contrairement aux manipulations habituelles d'enzymo, on utilisera un grand volume d'enzyme, correspondant cependant à une faible concentration, vu les conditions d'extraction ; il est important d'utiliser le même volume (donc la même concentration) d'enzyme pour les deux manipulations, mais la détermination précise de ce volume n'est pas utile.

- **Mettez au point un protocole permettant de déterminer la vitesse initiale (v_i) de l'enzyme à deux concentrations de substrat différentes.**
- **Mettez en œuvre ce protocole et déterminez v_i .**

2. Exercice

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme impliquée dans certaines fermentations. Elle catalyse la réaction $\text{pyruvate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{lactate} + \text{NADH} + \text{H}^+$.

On détermine la vitesse initiale de la réaction (notée v_i) pour diverses concentrations initiales en pyruvate (concentration notée $[\text{S}]_0$).

$[\text{S}]_0$ (mM)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1	2	3
v_i (mM.min ⁻¹)	0,075	0,125	0,157	0,180	0,200	0,212	0,232	0,250	0,270	0,3

Document 1: Etude de la vitesse initiale de la LDH pour diverses valeurs de concentration initiale en pyruvate.

1. Tracez le graphe de la v_i en fonction de $[\text{S}]_0$, et commentez l'allure obtenue.
2. Tracez la courbe de cinétique dans la représentation de Lineweaver-Burk. En faisant les choix que vous jugerez nécessaires :
 - a. Déterminez si l'enzyme est michaelienne ou allostérique.
 - b. Déterminez K_M et $v_{\max}$.

II. Electrophorèses

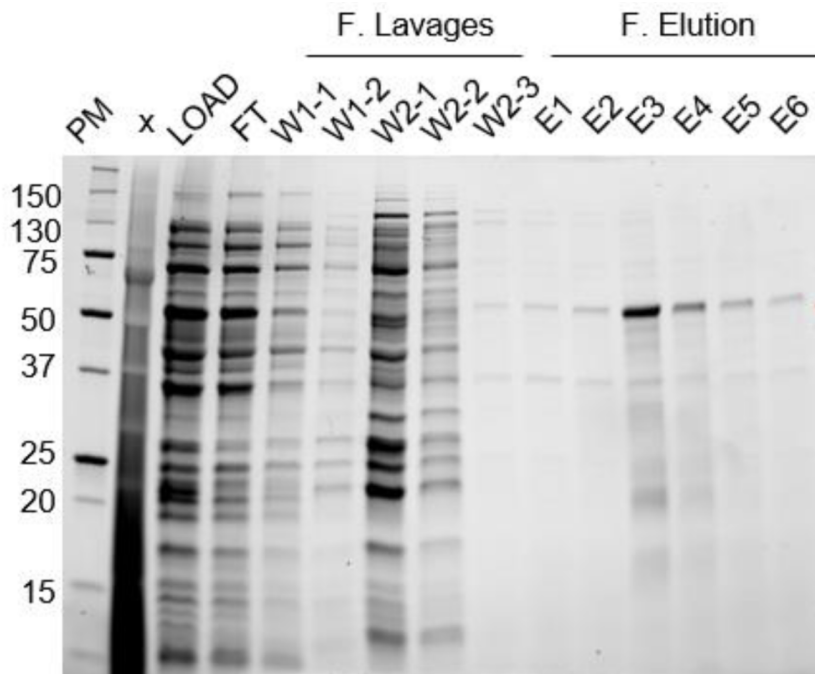
Il s'agit ici de réviser le geste technique correspondant au dépôt dans les puits d'un gel d'agarose d'une solution d'ADN colorée et densifiée par le glycérol. Révisez bien l'utilisation de la micropipette : réglage du volume, 1^{er} et 2^e cran d'arrêt notamment.

- Déposez dans le puits (paillasse prof) un volume de 12 μL .

III. Chromatographie d'affinité

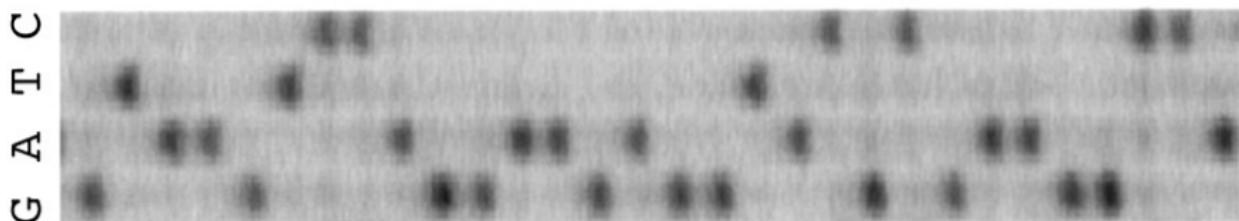
- Rappelez en une phrase l'intérêt de la chromatographie d'affinité.
- Évaluez la qualité de la purification effectuée dans le document 2.

Document 2 . On cherche à purifier la protéine MD-Oct4 dans un lysat bactérien. Cette protéine a une affinité pour le Ni^{2+} -NTA, qui est un composé présent dans la colonne d'affinité. On place le lysat (load) dans la colonne, on récupère une première fraction (FT = flow through), on lave ensuite la colonne avec un premier solvant (w1-1 et w1-2) puis avec un second solvant (w2-1, w2-2 et w2-3). On récupère 6 fractions suite à l'élution (E1 à E6). Les protéines sont révélées par un colorant non spécifique.



IV. Le séquençage par la méthode de Sanger

Une séquence d'ADN a été séquencée par la méthode de Sanger (document 3).



Document 3: Gel de séquençage correspondant à 4 réactions de polymérisation en présence de ddNTP radioactifs à guanine, adénine, thymine ou cytosine. Observation après autoradiographie. Sens de migration : de la gauche vers la droite.

- Déterminez cette séquence.

V. Identifications de structures biologiques

Vous disposez de lames microscopiques de biologie animale.

- Identifiez ces lames.
- Réalisez des dessins d'observation.

VI. Réviser les logiciels classiques

Vous disposez d'ordinateurs. Utilisez les pour réviser l'utilisation de logiciels classiques.

1. PopG et la modélisation de l'évolution de la fréquence allélique

PopG permet de modéliser l'évolution de la fréquence d'un allèle :

- dans le cas d'un allèle neutre ($\omega(AA) = \omega(Aa) = \omega(aa) = 1$) : dérive génétique
- dans le cas d'un allèle délétère ($\omega(AA) > \omega(Aa) > \omega(aa)$) : sélection directionnelle
- dans le cas d'un avantage hétérozygote ($\omega(Aa) < \omega(AA)$ et $\omega(aa)$) : sélection balancée

Divers autres paramètres peuvent être réglés : nombre de générations, nombre de population évoluant simultanément, taux de mutation...

- **Modélisez des évolutions de fréquences alléliques théorique pour tester divers types de sélection ou l'importance de la dérive.**

2. Populus et la modélisation de la dynamique d'une population

Populus permet de nombreuses modélisations en dynamique des populations, dont seulement certaines sont au programme.

- *Single species dynamics* → *density independent growth* : croissances exponentielle et géométrique

On peut choisir un mode discret (petites populations) ou continu (grandes populations), en choisissant comme paramètre un taux d'accroissement discret (λ) ou continu (r).

- *Single species dynamics* → *density dependent growth* : croissances logistiques

Là encore, on peut choisir un mode discret ou continu. La capacité du milieu est notée K et le taux d'accroissement r . Il est également possible (mode *lagged logistic*) d'intégrer un temps de latence entre le prélèvement de ressources et leur utilisation (τ : *feedback lag*), ce qui permet notamment de modéliser des dépassements de la capacité du milieu.

- *Multi species dynamics* → *continuous prey-predator models* : modèles proie-prédateur (notamment de Lotka Volterra)

L'affichage classique permet de visualiser l'effectif des deux populations au cours du temps, mais on peut aussi afficher la population des proies en fonction de celle des prédateurs. Les paramètres sont les taux d'accroissement des proies (r_1) et des prédateurs (d_2), le rendement écologique de la prédation (ou taux de conversion proie → prédateur, noté C), et l'efficacité des prédateurs dans la capture des proies (g).

- **Modélisez des dynamiques de populations théoriques en faisant varier divers paramètres.**

3. Regulpan et RatCVS : modéliser la régulation de l'activité cardiaque

Regulpan et RatCVS permettent de modéliser la régulation l'activité cardiaque par les systèmes nerveux et hormonal, ainsi que par des composés chimiques de synthèse.

- **Réalisez et interprétez diverses modélisations (section de nerfs, injections de drogues).**

4. Pymol, Rastop et Libmol : visualiser la structure 3D des biomolécules

Pymol, Rastop et Libmol sont trois logiciels de visualisation de la structure 3D des molécules. Les données sont acquises généralement par cristallographie aux rayons X, et sont consignées dans des fichiers au format .pdb.

- Pymol est assez délicat à utiliser, mais très puissant.
- Rastop est plus ergonomique, et largement suffisant pour une utilisation courante.
- Libmol, bien que plus limité en terme de fonctionnalité, est largement plus simple à utiliser, et il existe en version locale comme *online*.

- **Téléchargez 2Z3C (une enzyme du SARS-CoV2) et mettez en évidence l'interaction entre l'enzyme et son inhibiteur.**

- Téléchargez 5JQ3 (protéine du virus Ebola) et montrez que cette protéine est glycosylée.
- Téléchargez 6PV7 (récepteur nicotinique) et traitez la de façon à montrer que sa structure est adaptée à sa fonction de canal à Na^+ .

VII. Construire une phylogénie par cladistique (max. de parcimonie)

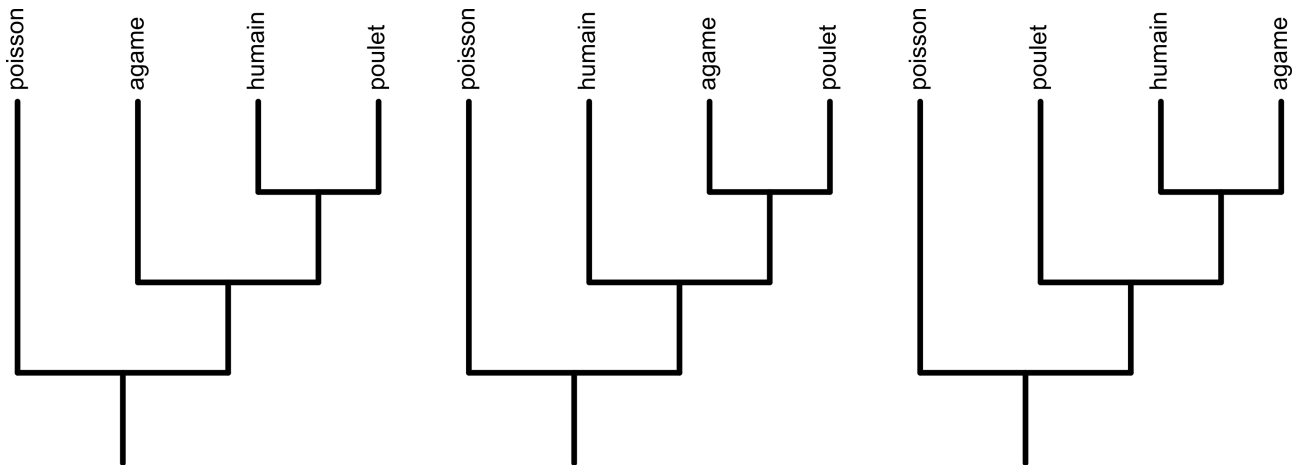
On donne ci-dessous un alignement effectué sur une portion de séquence d'ADN. Pour plus de commodité, les caractères polymorphes sont indiqués par une lettre.

Rappel : les méthodes cladistiques sont basées sur des hypothèses d'histoire évolutive, c'est-à-dire sur les hypothèses d'homologies (homologie primaire) confirmée ou non par le choix du meilleur arbre (homologie secondaire) ; l'orientation des caractères (dérivé ou ancestral) se fait par le choix d'un groupe externe valide a priori.

NB : l'agame est un lézard.

	a	b	c	d	e	fg
agame :	GT A TGGCTCGAGCATT T GGCAT CC CTGCGCGTGTTTAC AT CACACGAGGTA					
poisson :	GT C TGGC CC GAGCATT T GGCAT CC CTGTGCGTGTTTAC AA CACACGAGGTA					
humain :	GT C TGGCTCGAGCATT T GGCAT AC CTGTGCGTGTTTAC A -CACACGAGGTA					
poulet :	GT A TGGCTCGAGCATT A GGCAT AC CTGCGCGTGTTTAC CT CACACGAGGTA					

- Construisez l'arbre phylogénétique permettant de classer ces espèces en utilisant la méthode du maximum de parcimonie. On donne ci-dessous trois arbres potentiels.



VIII. Déterminations et dissections florales

Comme pour les séances précédentes, vous disposez de fleurs. Entraînez-vous à la dissection et à la détermination florale.