

BIOTECHNOLOGIE

Durée : 3 heures

Notes :

- L'usage d'une calculatrice, d'abaques et tables est interdit pour cette épreuve.

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve.

En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui contrôlera et éventuellement remplacera son sujet.

La question rédactionnelle (intitulée partie A dans les sujets des sessions précédentes) est clairement identifiée.

PARTIE 1. *Synechococcus elongatus*, nouvel hôte pour la production de protéines recombinées (10 points) Surexpression protéique dans un contexte photosynthétique

Synechococcus elongatus est une cyanobactérie photosynthétique d'eau douce à haut potentiel environnemental et industriel. Sa capacité de convertir le CO₂, notamment issu de l'utilisation des énergies fossiles, en biomolécules d'intérêt industriel (saccharose, cellulose...) a conduit au développement d'outils moléculaires entraînant une ou des modification(s) de son génome et permettant la surexpression de protéines hétérologues.

1 Présentation de *S. elongatus*

Le **document n°1** montre une structure en microscopie électronique de *Synechococcus elongatus*.

- 1.1. Discuter¹ la notion de compartimentation cellulaire comme critère de distinction entre procaryotes et eucaryotes (il est possible de répondre en 5 lignes maximum).
- 1.2. Réaliser un schéma d'interprétation de l'organisation structurale de *S. elongatus* (image A) à l'aide du **document n°1** et sachant qu'elle apparaît gram négative (didermique) à la coloration de gram.

Les conditions de culture de *S. elongatus* sont précisées dans le **document n°2**.

- 1.3. Exploiter les informations du **document n°2**, pour conclure quant à la photolithotrophie et l'autotrophie de *S. elongatus*.

1.4. Question rédactionnelle : Photosynthèse oxygénique de *S. elongatus*

Décrire les différentes phases de la photosynthèse oxygénique de *Synechococcus elongatus*, en précisant notamment l'importance des membranes thylacoïdales.

En s'appuyant sur différents schémas fonctionnels brièvement commentés, dégager les caractéristiques générales des transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique, et expliquer comment sont produits les molécules d'ATP et le pouvoir réducteur.

Proposer une méthode de suivi de l'activité photosynthétique d'une culture de *S. elongatus* par mesure d'un des produits finaux (rejeté dans le milieu).

¹ Discuter : procéder à l'examen contradictoire, en débattre

2 Etude du cycle circadien de *S. elongatus*

Il est intéressant de vérifier l'influence des rythmes circadiens dans le contexte d'une application biotechnologique. Ces rythmes reposent sur des activités biochimiques ou physiologiques cycliques des organismes dont la périodicité est d'environ 24 heures.

L'horloge moléculaire de *S. elongatus* repose sur le fonctionnement autonome et cyclique de trois protéines Kai² nommées respectivement Kai1, KaiB et KaiC.

L'opéron kaiBC (à l'origine de la synthèse des protéines KaiB et KaiC) est sous le contrôle du facteur de transcription LalA.

L'étude de l'effet de la protéine LalA peut être menée en analysant une souche de *S. elongatus* génétiquement modifiée. La souche a subi les trois modifications suivantes :

- invalidation du gène lalA endogène ;
- positionnement du gène lalA sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG (isopropyl-thio- β -galactoside) ;
- positionnement du gène rapporteur luc codant la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'opéron KaiBC, régulé par la protéine LalA.

2.1. Réaliser un schéma montrant les modifications génétiques, décrites ci-dessus, apportées au chromosome de *Synechococcus elongatus*.

Les résultats de l'induction par l'IPTG sont fournis dans le **document n°3**.

2.2. Exploiter les résultats du témoin (addition d'eau) du **document n° 3A** pour valider que la régulation de l'opéron kai est circadienne. Proposer une explication à l'absence d'effet de l'invalidation du gène lalA.

2.3. Analyser ensemble les autres résultats du **document n° 3A** pour déduire les modalités de l'action de la protéine LalA sur la transcription de l'opéron Kai.

2.4. A l'aide du **document n°3B** montrer l'effet de la surexpression de la protéine LalA sur la croissance bactérienne.

Le cycle circadien de *Synechococcus* doit donc être maintenu pour obtenir une bonne croissance, mais un éclairage alterné jour/nuit n'est pas indispensable.

3 Outils moléculaires commerciaux

Des outils moléculaires existent pour faciliter le travail de recherche dans le cadre de la production de protéines d'intérêt chez différents hôtes.

Les cartes de deux générations de vecteurs navettes d'expression de *Synechococcus* sont fournies dans le **document n°4**.

Les étapes de clonage de l'ADN d'intérêt sont classiquement réalisées chez *E. coli*, le vecteur recombiné transforme par la suite *Synechococcus* pour les étapes d'expression de protéines recombinées.

3.1. Expliquer la (les) particularité(s) du gène marqueur de sélection employé.

² « kai » signifie « rotation » ou « cycle » en japonais.

- 3.2. Préciser la particularité des vecteurs pSyn, liée à l'absence d'origine de répllication autonome fonctionnelle chez *Synechococcus*.
- 3.3. Déduire de l'analyse comparée des cartes des vecteurs pSyn_1 et pSyn_6, les caractéristiques des séquences à cloner et le type de clonage à mettre en œuvre.

PARTIE 2. La thrombine, une protéase et un activateur de récepteur

(10 points)

1 La thrombine bovine : structure, clivage de protéines de fusion

Physiologiquement, la thrombine provient de l'activation de son précurseur inactif, la prothrombine (le zymogène), par protéolyse spécifique en présence d'un complexe enzymatique appelé prothrombinase. Le document n°5 montre les résultats d'une électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate) d'une préparation purifiée de thrombine bovine.

1.1. Analyser les résultats du document n°5 et proposer un schéma de structure de la thrombine.

1.2. Le gel utilisé a été coulé en gradient de concentration d'acrylamide 4 à 12 % (m/v) comme indiqué dans le document n°5. Justifier l'intérêt de ce gradient.

La thrombine est couramment utilisée en laboratoire comme protéine de clivage « site spécifique » de protéines recombinées. Elle est ainsi utilisée, par exemple, pour le clivage de protéines de fusion lorsque sa séquence spécifique est insérée entre celle dite « étiquette » et celle correspondant à la protéine d'intérêt.

1.3. Présenter, à l'aide d'un schéma annoté, la structure covalente et la géométrie de la liaison peptidique. Justifier cette géométrie.

La composition des séquences de coupure de la thrombine est donnée dans le document n°6.

1.4. Indiquer les caractéristiques particulières des aminoacides proline (P) et arginine (R).

Le document n°7 présente la séquence primaire d'une protéine de fusion réalisée par un laboratoire. Il présente aussi le résultat de l'analyse de la séquence par le logiciel « peptide cutter ».

1.5. Indiquer l'intérêt de l'analyse par « peptide cutter ».

On se propose d'hydrolyser, en présence de la thrombine, la protéine de fusion présentée au document n°7.

1.6. Indiquer si la protéine issue de l'hydrolyse sera identique ou non à la protéine naturelle.

2. Taux de sites actifs d'une préparation purifiée de thrombine et constante catalytique sur substrat *N*-benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide

Le **document n° 8** présente le dosage de la concentration en sites actifs d'une préparation de thrombine par la méthode dite « au substrat suicide » pNP-GB.

2.1 A l'aide des résultats expérimentaux et des données présentés dans le **document n°8** calculer la concentration en sites actifs thrombine dans le milieu réactionnel. En déduire que la concentration en sites actifs de la préparation est de $200 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$.

2.2 Calculer le pourcentage de thrombines actives de la préparation (poser le calcul, poser l'application numérique et montrer ainsi que le résultat est proche de 100%).

Données :

- La masse moléculaire de la thrombine est de 35 000 Da.
- Chaque thrombine possède un seul site catalytique.
- La préparation de thrombine utilisée ($7,2 \text{ g.L}^{-1}$) est pure.

Le **document n° 9** donne les résultats d'une étude des paramètres cinétiques de la thrombine sur substrat *N*-benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide (NbPVRpA). Cette étude a été conduite avec une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ de la préparation de thrombine évaluée en 2.1 et 2.2.

2.3.1 L'étude cinétique montre que le comportement est Michaélien. Expliciter cette affirmation.

2.3.2 Expliquer pourquoi la vitesse maximale V_{max} est la vitesse initiale à saturation de l'enzyme par le substrat.

2.3.3 Déduire des données présentées au **document n°9** la valeur du coefficient catalytique (k_0 ou k_{cat}) de la thrombine sur le substrat NbPVRpA, dans les conditions proposées.

Des préparations de thrombine bovine immobilisée sur micro billes sont commercialisées. Elles permettent de traiter facilement des échantillons de protéines de fusion puisque la thrombine immobilisée est récupérable par simple centrifugation et peut être ainsi est recyclée.

2.4. Un fabricant annonce 10 mmoles de *N*-benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide par mmole de thrombine immobilisée et par seconde. Comparer cette valeur à celle obtenue pour l'enzyme libre, proposer une explication.

3. Thrombine et récepteur PAR1

Lors de la coagulation du sang, la thrombine est la protéase qui catalyse l'hydrolyse du fibrinogène en fibrine insoluble qui forme la matrice fibreuse du caillot sanguin. La thrombine se comporte aussi comme un médiateur de type hormone en déclenchant des réponses de ses cibles cellulaires : activation de l'agrégation des plaquettes, effet mitogénique sur les lymphocytes, régulation de protéines exprimées par les cellules endothéliales vasculaires... Un des récepteurs protéiques membranaires de la thrombine se nomme PAR1 (acronyme anglais de protease activated receptor 1). Le **document n°10** présente une étude de l'interaction thrombine PAR1 sur un modèle cellulaire exprimant ce récepteur. Il présente également un schéma de mécanisme d'activation du récepteur PAR1.

Valider le modèle présenté par la figure en partie C du **document n°10** en analysant les résultats présentés en partie A de ce document.

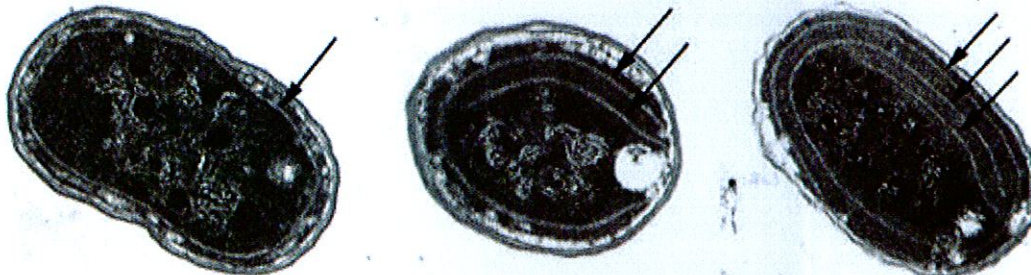
FIN DE L'ÉPREUVE

Document n°1 : Photographie en microscopie électronique de *Synechococcus* après culture sous différentes intensités lumineuses. (unité, μmol de photons par m^2 et par seconde)

A. $1330 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

B. $160 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (au milieu)

C. $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (à droite).



Les flèches montrent les membranes thylacoïdales. (source : Kana and Glibert, 1987 ; avec la permission de Todd Kana)

Document n°2 : Milieu et conditions de culture de *S. elongatus*

Milieu de culture		Conditions de culture																					
<u>Composition du milieu de culture BG11</u>		<u>Apport de CO₂</u> : Milieu de culture liquide avec un bullage d'air enrichi en dioxyde de carbone (1-2 % CO ₂) <u>Température</u> : 30°C <u>Agitation</u> 100 rpm (pour culture liquide) <u>Intensité lumineuse modérée</u> : 100 μmol . m ⁻² s ⁻¹ (lampe fluorescente blanche refroidie)																					
<table><tr><td>NaNO₃</td><td>1.5 g</td></tr><tr><td>K₂HPO₄</td><td>0.04 g</td></tr><tr><td>MgSO₄·7H₂O</td><td>0.075 g</td></tr><tr><td>CaCl₂·2H₂O</td><td>0.036 g</td></tr><tr><td>Acide citrique</td><td>0.006 g</td></tr><tr><td>Citrate d'ammonium ferrique</td><td>0.006 g</td></tr><tr><td>EDTA (sel disodique)</td><td>0.001 g</td></tr><tr><td>NaCO₃</td><td>0.02 g</td></tr><tr><td>Mélange éléments (*)</td><td>1.0 mL</td></tr><tr><td>Agar (si nécessaire)</td><td>10.0 g</td></tr><tr><td>Eau distillée</td><td>1.0 L</td></tr></table> pH à 7,1 après stérilisation	NaNO ₃		1.5 g	K ₂ HPO ₄	0.04 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036 g	Acide citrique	0.006 g	Citrate d'ammonium ferrique	0.006 g	EDTA (sel disodique)	0.001 g	NaCO ₃	0.02 g	Mélange éléments (*)	1.0 mL	Agar (si nécessaire)	10.0 g	Eau distillée	1.0 L
NaNO ₃	1.5 g																						
K ₂ HPO ₄	0.04 g																						
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g																						
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036 g																						
Acide citrique	0.006 g																						
Citrate d'ammonium ferrique	0.006 g																						
EDTA (sel disodique)	0.001 g																						
NaCO ₃	0.02 g																						
Mélange éléments (*)	1.0 mL																						
Agar (si nécessaire)	10.0 g																						
Eau distillée	1.0 L																						
(*) Mélange Eléments																							
<table><tr><td>H₃BO₃</td><td>2.86 g</td></tr><tr><td>MnCl₂·4H₂O</td><td>1.81 g</td></tr><tr><td>ZnSO₄·7H₂O</td><td>0.222 g</td></tr><tr><td>NaMoO₄·2H₂O</td><td>0.39 g</td></tr><tr><td>CuSO₄·5H₂O</td><td>0.079 g</td></tr><tr><td>Co(NO₃)₂·6H₂O</td><td>49.4 mg</td></tr><tr><td>Eau distillée</td><td>1.0 L</td></tr></table>	H ₃ BO ₃	2.86 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg	Eau distillée	1.0 L									
H ₃ BO ₃	2.86 g																						
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 g																						
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222 g																						
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39 g																						
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079 g																						
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49.4 mg																						
Eau distillée	1.0 L																						

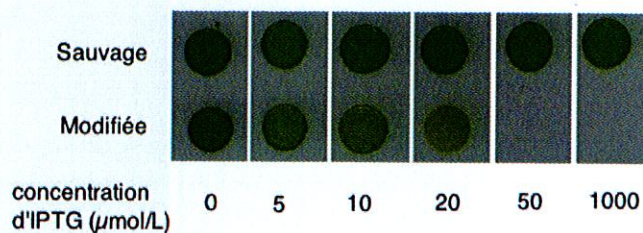
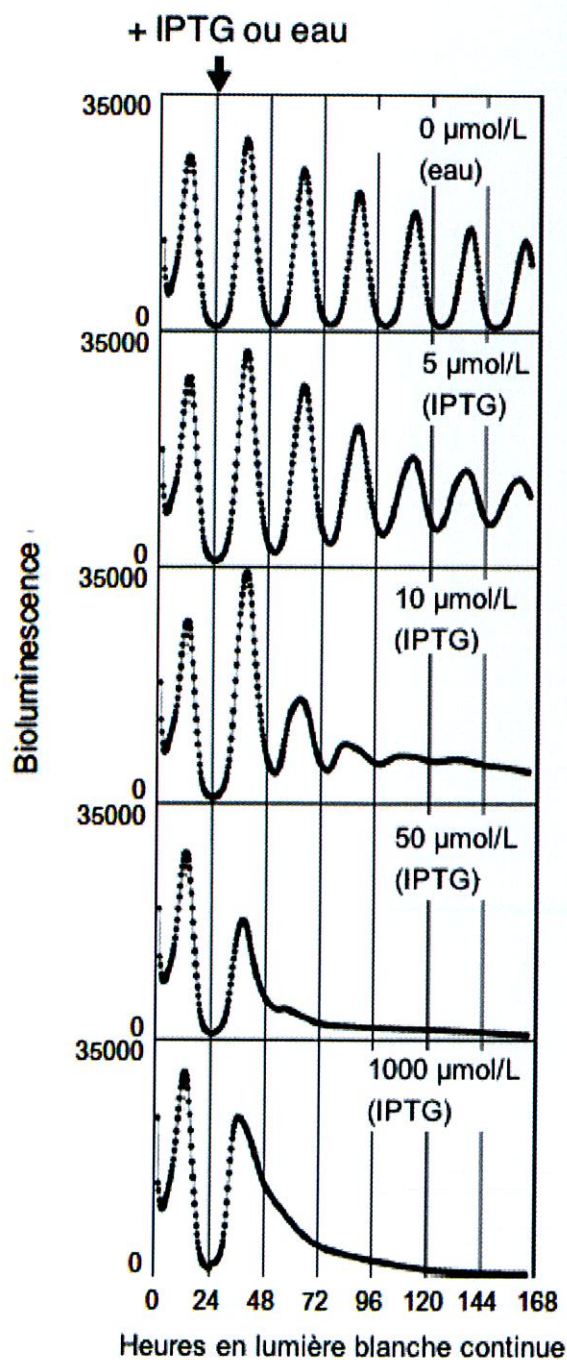
Document n°3 : Effet de la surexpression de laA

3A : LalA et rythme circadien

La souche génétiquement modifiée a été ensemencée sur milieu BG-11 M gélosé. Des colonies isolées ont été cultivées en lumière blanche continue (sans alternance jours/nuits). Après 24h, l'IPTG a été ajouté à différentes concentrations finales (voir graphe). L'activité du gène rapporteur luciférase est évaluée par bioluminescence (unités arbitraires).

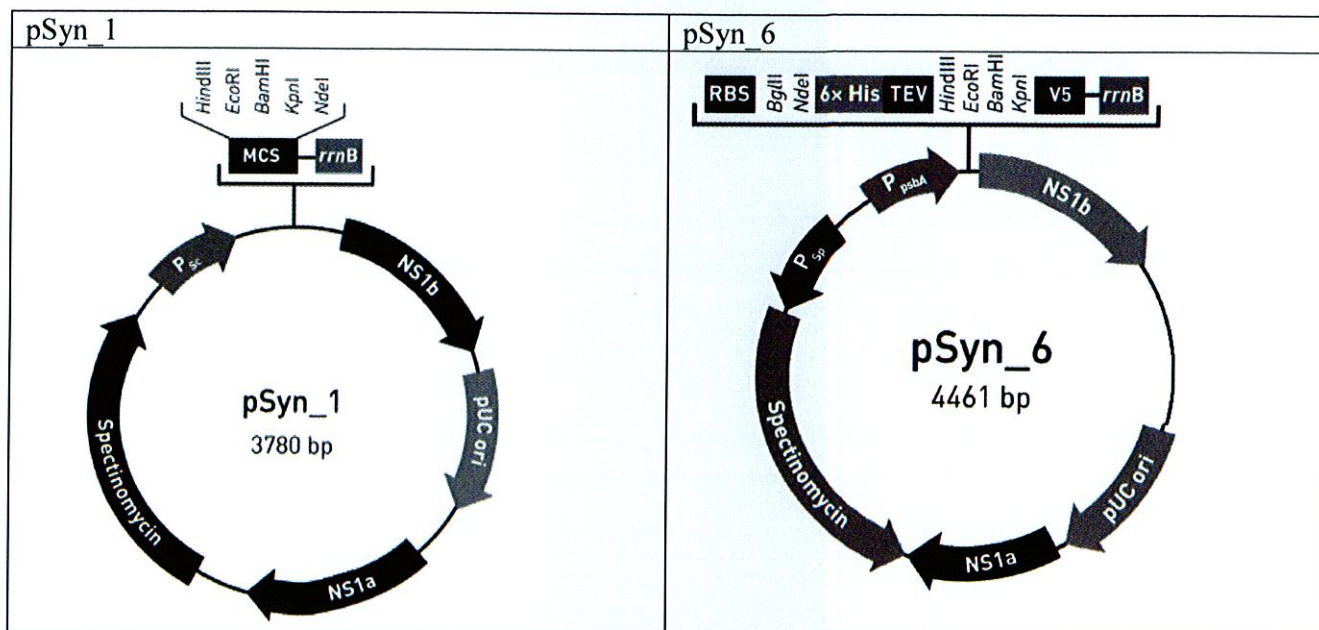
3B : LalA et croissance bactérienne

Les souches sauvage et modifiée ont été cultivées en milieu BG-11 M. Les cultures ont été diluées pour obtenir une densité optique égale à 0,2 à 730 nm. Une goutte calibrée de chaque culture diluée a été déposée sur un milieu BG-11 gélosé, contenant différentes concentrations d'IPTG (0, 5, 10, 20, 50, and 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les boîtes ont été incubées pendant 4 jours.



Les cultures ont été soumises à un éclairage en continu (pas d'alternance jours/nuits)

Document n°4 : Evolution technologique du vecteur navette d'expression chez *Synechococcus elongatus*.



Légendes

NS1a et NS1b	Sites de recombinaison homologue (vers une séquence NS1 du chromosome de <i>S. elongatus</i>)
rrnB	Site terminateur de transcription
P _{Sc}	Promoteur faible non inductible issu de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
P _{psbA}	Promoteur fort constitutif du gène psbA de <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 (codant une protéine du photosystème II)
6-His et V5	Etiquette de détection et/ ou de purification
TEV	Site de coupure de la protéase (de restriction) TEV (Tobacco Etch Virus endopeptidase)
MCS	Site multiple de coupure
RBS	Site de liaison au ribosome
Spectinomycin	Gène de résistance à la spectinomycine

Sources :

Handbook of cyanobacteria T.A. Sarma (2012), CRC press

Invitrogen

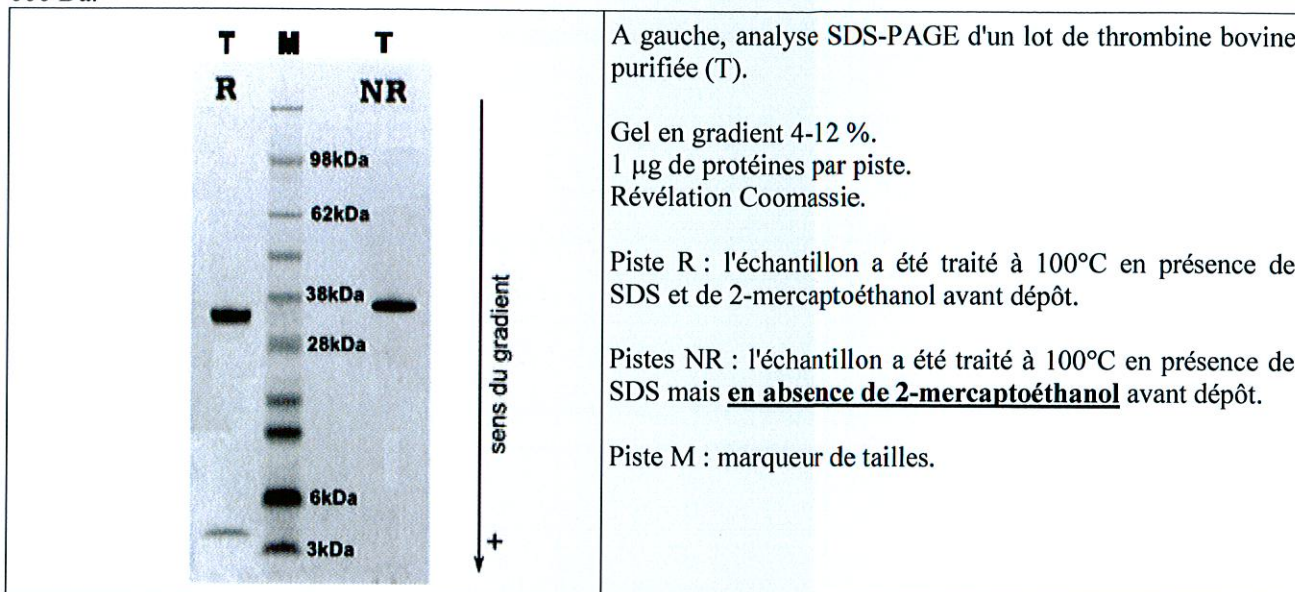
<http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/media/table/BG11.html>

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Synechococcus-sp-WH7803-et-RCC307-.html>

D'après: Y. Taniguchi et al. / FEBS Letters 586 (2012) 753–759

Document n°5 : Structure de la thrombine

La prothrombine est le zymogène inactif précurseur de la thrombine. C'est une glycoprotéine formée d'une unique chaîne polypeptidique de masse moléculaire 72 000 Da. La masse moléculaire de la thrombine est de 36 000 Da.



Document n°6 : Sites de clivage par la thrombine bovine

Les compositions (séquences en résidus acides aminés) des sites de coupure reconnus par la thrombine sont données dans le tableau ci-dessous.

Séquences possibles pour le clivage endoprotéasique par la thrombine	
-P4-P3-P-R-↓-P'1-P'2	Avec P4 = A, F, G, I, L, T, V ou M Avec P3 = A, D, F, G, I, L, T, V, W ou M Avec P'1 = ni D ni E Avec P'2 = ni D ni E La séquence LVPR↓GS est très efficacement reconnue et se trouve être la séquence la plus utilisée dans les protéines de fusion.
Les séquences -G-R-↓-G-P'2 sont très efficacement reconnues	Où P'2 peut alors être n'importe quel acide aminé.

P = proline, R = arginine.

D = aspartate, E = glutamate.

A = alanine, F = phénylalanine, G = glycine, I = isoleucine, L = leucine, T = thréonine, V = valine, M = méthionine, W = tryptophane.

(D'après http://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_enzymes.html)

Document n°7 : Protéine de fusion his₆-annexin5 à site de clivage pour la thrombine

La séquence primaire de la protéine de fusion his₆-annexin5 est :

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAQVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLLTSRSNAQRQEISAAF
KTLFGRDLLDDLKSELTGKFEKLIVALKPSRLYDAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYEG
SSLEDDVVGDTSGYYQRMVLVLLQANRDPDAGIDEAQVEQDAQALFQ
AGELKWTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDDKYMTISGFQIETIDRETSGNLEQLLLAVV
KSIRSIPAYLAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIK
GDTSGDYKKALLLLCGEDD

La séquence primaire de l'annexin5 humaine normale est soulignée. On peut observer que l'étiquette de fusion comprend un motif de 6 histidinyls (symbole H) en quasi position N terminale et une séquence d'hydrolyse par la thrombine (LVPR|GS).

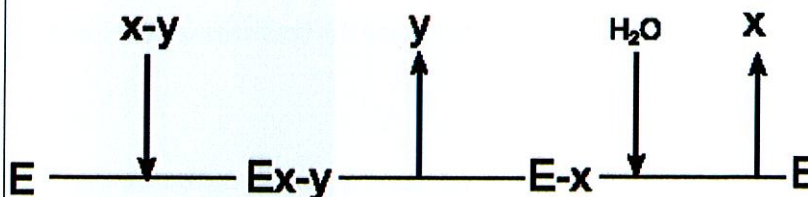
Le logiciel « peptide cutter », après analyse de la séquence de la protéine de fusion indique : 1 site unique de coupure pour la thrombine à l'acide aminé R en position 17 (...LVPR|GS...).

(La séquence annexin5 a été obtenue via UNIPROT (<http://www.uniprot.org>) avec l'entrée P08758 Annexin A5 humaine)

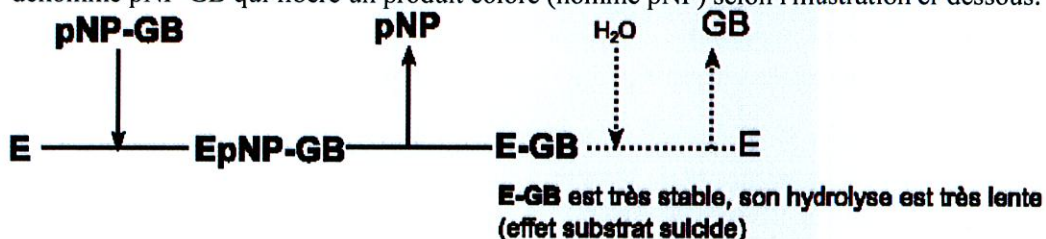
Document n°8 : Dosage des sites actifs d'une préparation de thrombine bovine

La figure de droite donne le chemin réactionnel de la réaction d'hydrolyse d'un substrat catalysé par la thrombine.

Dans la figure, E désigne l'enzyme thrombine libre, x-y désigne le substrat qui sera hydrolysé en x et y, Ex-y désigne le complexe enzyme substrat x-y et E-x désigne l'intermédiaire covalent acyl-enzyme qui apparaît.



Pour doser les sites actifs d'une préparation de thrombine, on utilise un substrat synthétique suicide dénommé pNP-GB qui libère un produit coloré (nommé pNP) selon l'illustration ci-dessous.



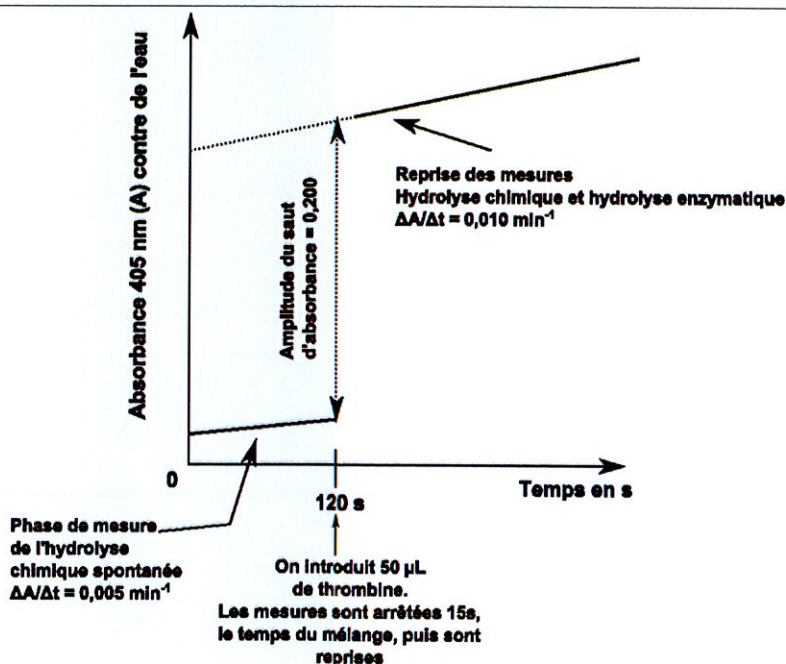
Ainsi, une préparation de thrombine mise en présence de substrat pNP-GB libère de façon « explosive » un pNP par site actif. Le pNP qui absorbe fortement à 405 nm est mesuré par absorptiométrie sachant son coefficient d'absorbance spécifique de 20 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Les sites actifs sont ainsi dosés.

La figure de droite propose une manipulation pratique de dosage des sites actifs d'une préparation de thrombine.

On enregistre, au départ, l'absorbance à 405 nm d'une cuve porte échantillon contenant 950 µL. Au temps 120 s on ajoute 50 µL de préparation thrombine, on homogénéise et on reprend l'enregistrement d'absorbance passé un délai de 15s (nécessaire aux opérations d'homogénéisation).

Volume de thrombine introduite : 50 µL dans 950 µL de solution tamponnée de substrat suicide. Soit un volume réactionnel total de 1mL.

ϵ_{pNP} à 405 nm = 20 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹



Dosage des sites actifs Thrombine par méthode au substrat suicide pNP-GB

(Document adapté de Chase, Shaw ; Titration of Trypsin, Plasmin, and Thrombin with p-Nitrophenyl p'-Guanidinobenzoate HCl ; Method in Enzymology (1970) 19, 20-27)

Document n°9 : Paramètres cinétiques de la thrombine sur substrat N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide

La thrombine catalyse l'hydrolyse du substrat synthétique N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide (NpPVRpA) en libérant du p-nitroanilide dosable par absorptiométrie à 405 nm.

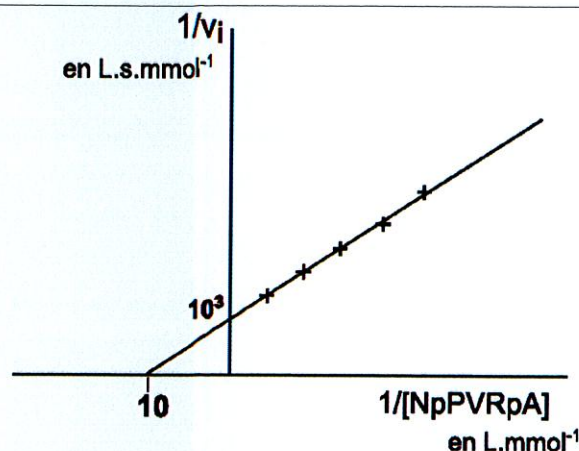
La figure ci-dessous présente une étude vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat NpPVRpA.

La préparation enzymatique thrombine dont la concentration en sites actifs a été mesurée à $200 \cdot 10^{-6}$ mol/L est diluée au 1/100.

Les vitesses initiales d'hydrolyse du NpPVRpA sont mesurées dans des milieux réactionnels de volume final 1 mL et dans lesquels 10 μ L de préparation enzymatique au 1/100 sont introduits.

La seule variable est la concentration en substrat NpPVRpA.

37°C, tampon Tris Cl pH 8,1 50 mM.

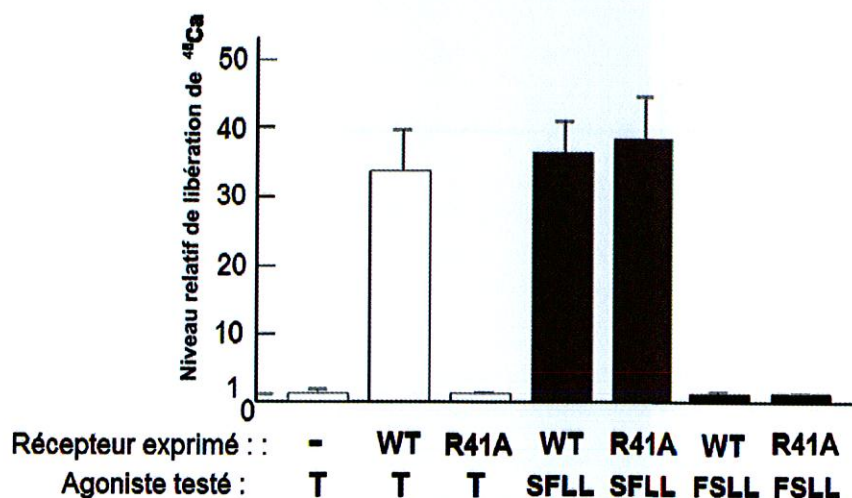


Document n°10 : Mécanisme d'activation du récepteur PAR1 par la thrombine

A. Tests d'activation de PAR1 exprimé par des ovocytes de Xénope

Dans des cellules ovocytes de Xénope (un amphibien) on introduit un ARN messager (originaire de la transcription *in vitro* d'un ADNc) codant le récepteur PAR1 de la thrombine. On injecte soit l'ARNm codant le récepteur sauvage WT, soit l'ARNm codant le récepteur muté R41A. La séquence peptide signal est présente et le récepteur est ainsi exprimé en surface des ovocytes. Le récepteur PAR1 fait partie des récepteurs couplés à la protéine G et l'activation du récepteur membranaire PAR1 entraîne la libération de calcium Ca^{2+} par les ovocytes. Cette libération peut être mesurée en utilisant une mesure radioactive à l'aide de $^{45}Ca^{2+}$. Les ovocytes sont incubés en présence de $^{45}Ca^{2+}$ puis placés en milieu non marqué. On peut alors mesurer le niveau basal de libération du calcium et le niveau de libération dans les minutes qui suivent l'ajout d'un agoniste éventuel du récepteur PAR1.

La figure ci-dessous présente quelques-uns des résultats obtenus.



(Document adapté de Vu et al., "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation", Cell 64 (1991), 1057 - 1068. La séquence PAR1 a été obtenue via UNIPROT (<http://www.uniprot.org>) avec l'entrée P25116 PAR1-human.)

B. Séquence du récepteur PAR1 sauvage du mutant R41A et des peptides SFL et FSLLRNPNDKYEPF

→ Le récepteur membranaire PAR1 de la thrombine, une fois le peptide signal éliminé, a pour séquence primaire :

22		41		
ARTRARRPE	SKATNATLDP	RS FLLRNPND		
KYEPFWEDEE	KNESGLTEYR	LVSINKSSPL	QKQLPAFISE	DASGYLTSSW
LTLFVPSVYT	GVFVVSPLN	IMAIVVFILK	MKVKKPAVVY	MLHLATADVL
FVSVLPFKIS	YYFSGSDWQF	GSELCRFVTA	AFYCNMYASI	LLMTVISIDR
FLAVVYPMQS	LSWRTLGRAS	FTCLAIWALA	IAGVVPLLLK	EQTIQVPGLN
ITTCHDVLNE	TLLEGYYAYY	FSAFSAVFFF	VPLIISTVCY	VSIIRCLSSS
AVANRSKSR	ALFLSAAVFC	IFIICFGPTN	VLLIAHYSFL	SHTSTTEAAY
FAYLLCVCVS	SISCCIDPLI	YYYASSECR	YVYSILCCKE	SSDPSSYNSS
GQLMASKMDT	CSSNLNNSIY	KKLLT		

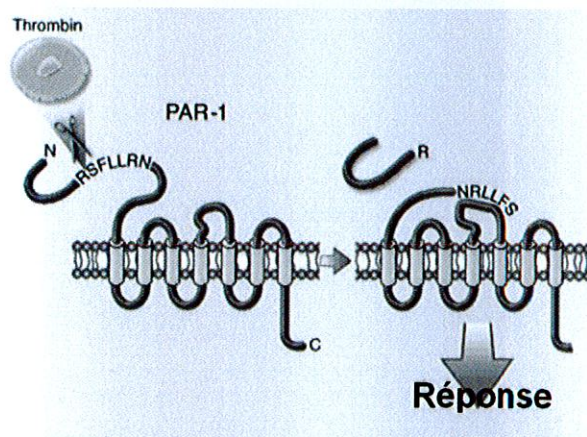
PAR1 possède un site unique de coupure pour la thrombine au niveau de l'arginine 41. Cette arginine (R) est en gras souligné sur la séquence (coupure ...LDP**R**|SFL..). Sa position est en 21 et pas 41 car le peptide signal n'a pas été donné.

→ Le mutant R41A du récepteur PAR1 voit son arginine 41 (R41) substituée par une alanine (A)
Le site de coupure par la thrombine est perdu.

→ Le peptide dénommé SFL a pour séquence : SFLLRNPNDKYEPF (soit la séquence des acides aminés 42 à 55 de PAR1, en souligné sur la séquence de PAR1).

→ Le peptide dénommé FSL a pour séquence : FSLLRNPNDKYEPF

C. Mécanisme de l'activation de PAR1 par la thrombine



(Document adapté de <http://parcc.inserm.fr/spip.php?article31>.)