

Session 2009

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

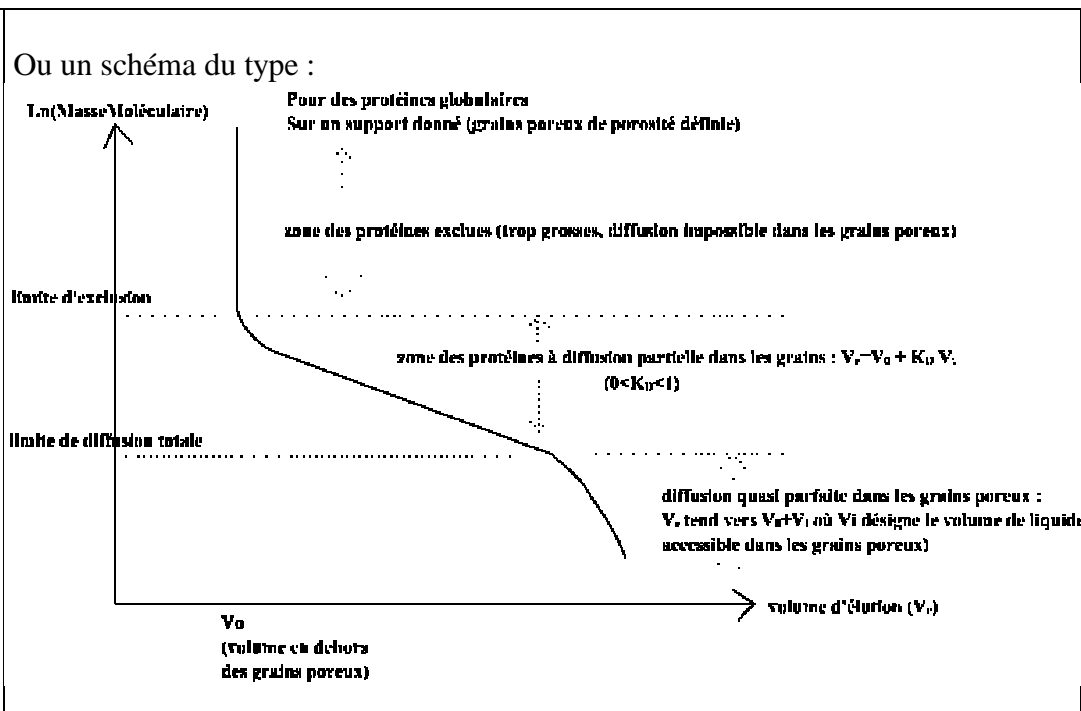
BIOLOGIE STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DES PROTÉINES

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

CORRIGÉ ET BARÈME

Caractérisation de la métallocarboxypeptidase de l'archaebactérie hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*

Questions	CORRIGÉ	Barème
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition		2 points
1.		8,5 points
1.1	Structure conventionnelle plane d'un acide aminé de la série L.	0,5 pt
1.2	Structure chimique de la liaison peptidique. Ne pas oublier la configuration et les rotations correctes autour des seules liaisons sigma vraies et pas entre NH et CO.	1 pt
1.3	<ul style="list-style-type: none"> - Pureté. Les extraits les moins purifiés présentent l'allure classique en trainées (ou smear) dû aux très nombreuses protéines présentes. Dès la chromatographie hydrophobe, une bande majoritaire apparaît vers 55000 Da. Cette bande est unique après la dernière étape de purification. La PfuCP paraît donc alors pure. - Structure. La PfuCp serait formée par une unité protéique vers 55000 Da de masse moléculaire. 	1 pt
1.4	Même quantité d'enzyme pour un facteur 3 de diminution des protéines totales ($2398/802 \approx 3$). D'où enrichissement ≈ 3.	0,5 pt
1.5	Rendement global de la purification = $15 \cdot 10^3 / 150 \cdot 10^3 = 10 \%$. C'est faible, mais pas surprenant compte-tenu de la multiplication des étapes.	1 pt
1.6	Structuration par des liaisons H entre CO et NH des liaisons peptidiques. Signaler que pour qu'une hélice alpha soit stable il ne faut pas de chaînes latérales trop grosses ou porteuses de charges identiques	0,5 pt
1.7	Segment de protéine présentant une structure tridimensionnelle bien définie, autonome, indépendante du reste de la protéine.	0,5 pt
1.8	Présenter le principe de la chromatographie d'exclusion-diffusion : éléments clés = <ul style="list-style-type: none"> • grains poreux à porosité strictement définie • existence d'une phase liquide externe au grain déterminant le volume mort ou volume minimal d'élution (v_m) et d'une phase liquide interne aux grains (volume v_i) • selon la taille des molécules par rapport à la dimension des pores des grains, 3 comportements : molécules trop grosses exclues de la phase liquide interne aux grains volume d'élution = v_m, molécules très petites à diffusion parfaites dans les grains volume d'élution = $v_m + v_i$, molécules intermédiaires à diffusion sélective dans les grains volume d'élution = $v_m + K v_i$ (K coef de distribution dans les grains, $0 < K < 1$). Pour des protéines globulaires hydrosolubles un support d'exclusion diffusion propose ainsi 2 MM critiques encadrant la zone de diffusion sélective. 	2,5 pts

	<p>Ou un schéma du type :</p>  <p>ln(Masse Moléculaire)</p> <p>Pour des protéines globulaires Sur un support donné (grains poreux de porosité définie)</p> <p>zone des protéines exclues (trop grosses, diffusion impossible dans les grains poreux)</p> <p>limite d'exclusion</p> <p>zone des protéines à diffusion partielle dans les grains : $V_e = V_0 + K_{av} V_i$ ($0 < K_{av} < 1$)</p> <p>limite de diffusion totale</p> <p>diffusion quasi parfaite dans les grains poreux : V_e tend vers $V_0 + V_i$ où V_i désigne le volume de liquide accessible dans les grains poreux)</p> <p>V_0 (volume en dehors des grains poreux)</p> <p>volume d'élution (V_e)</p> <p>Expliquez précisément comment cette technique peut permettre d'évaluer la masse moléculaire d'une protéine : pour une gel donné dans une colonne donnée, dans l'intervalle des MM de diffusion (perméation) sélective et pour les protéines globulaires hydrosolubles, on a grosso modo $\ln(MM) = a V_e + b$. En étalonnant avec des protéines de MM connues on peut évaluer un inconnu.</p>	
1.9	Structure probable de la PfuCP : homodimère, 2 sous unités vers 55000-60000 Da. L'exclusion diffusion = analyse en conditions natives donne 120 000 peu différent de 2 fois 55 000 (résultat SDS-page a priori dénaturant des structures quaternaires). Les deux techniques sont peu précises.	1 pt
2.		6 points
2.1	Arrêt par refroidissement brusque.	0,5 pt
2.2	<ul style="list-style-type: none"> Présenter le modèle $E+S = ES \rightarrow E+P$ avec les constantes k_{+1}, k_{-1} et k_{cat} et dire que si il n'y a pas de réaction retour (réaction irréversible ou début de réaction donc réaction retour négligeable) la vitesse est $k_{cat}[ES]$. Phase préstationnaire : Au temps zéro vrai de la réaction $[ES]=0$ et la vitesse = $k_{cat}[ES]=0$. Puis il se forme du complexe ES ($E+S \rightarrow ES$) ainsi $[ES]$ augmente et la vitesse augmente. Mais au fur et à mesure que $[ES]$ augmente, la vitesse de disparition de ES augmente aussi par $ES \rightarrow E+P$ et $ES \rightarrow E+S$. Ainsi on atteint un état quasi-stationnaire pour lequel $[ES]$ devient quasi constant, $d[ES]/dt=0=k_{+1}[E][S]-(k_{cat}[ES]+k_{-1}[ES])$. La vitesse = $k_{cat}[ES]$ devient alors quasi constante : c'est la vitesse dite vitesse initiale. Elle est appelée vitesse initiale car l'étape préstationnaire est de durée très brève (inaccessible avec les techniques classiques). Cet état quasi stationnaire n'a été évidemment possible que parce que l'enzyme est en concentration catalytique devant le substrat. Cette vitesse initiale quasi constante se maintient tant que la diminution de $[S]$ n'est pas trop importante et tant que la réaction retour est négligeable. 	2,5 pts

2.3	Pourquoi peut-on dire que le comportement de la PfuCP est michaélien ? Car la fonction $v_i=f(S)$ apparaît du type hyperbole droite passant par l'origine, $y=ax/(b+x)$. Ce qui se voit mieux grâce à la représentation linéarisante $1/v_i=f(1/S)$. Donner la valeur du K_M : $1/1,1 = 0,9$ mM. Définir le concept de K_M : concentration en substrat pour laquelle $v_i=v_{max}/2$ (et on ne veut pas voir dans les copies $K_M =$ constante de dissociation de ES, car même si K_M est assimilable à K_D dans 90% des cas, ce n'est pas une définition valable).	1,5 pt
2.4	Pour des températures non dénaturantes, la loi d'Arrhénius donne une loi d'augmentation de la vitesse en fonction de la température par élévation de k_{cat} selon $v = Ae^{-E_a/RT}$. C'est une allure exponentielle que l'on peut voir entre 30 et 90°C pour la PfuCP. Au delà il y a une dénaturation qui se surajoute. Le plus efficace est l'analyse par linéarisation : en passant en ln on aura $\ln(\text{vitesse}) = cste - E_a/RT$: droite de coefficient directeur $-E_a/R$. Calculer l'énergie d'activation E_a de la réaction : pente = $-E_a/R$ d'ou $E_a = 6000 * 8 = 48\ 000\ Jmol^{-1}$.	1,5 pt
3.		3,5 points
3.1	Si une sérine est en position C-terminale, son enlèvement génère un peptide dont la masse moléculaire est diminuée de la masse moléculaire de la sérine à laquelle il faut rajouter la masse de l'eau d'hydrolyse. 105,09 est la masse de la sérine. Comme $1801,1 - 105,09 + 18,02 = 1714,03$, l'hypothèse est vérifiée. L'analyse en spectrométrie de masse va ainsi donner différents pics de masses caractéristiques séparées par la masse correspondant à la troncature de tel ou tel acide aminé (en tenant compte de l'eau d'hydrolyse).	1 pt
3.2	La PfuCP enlève les acides aminés par l'extrémité C terminale de façon réursive . Soit un peptide de n acides aminés, en laissant agir en temps limité (hydrolyse ménagée) on aura différents peptides possibles tronqués à partir de l'extrémité C terminales : longueur n, n-1, n-2, n-3, Avec à chacun sa masse moléculaire caractéristique et des troncatures correspondant aux masses moléculaires des acides aminés éliminés .	1 pt
3.3	L'analyse des calculs de trocature donne alors : N->C : N-acetyl-X-.....-X-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser	0,5 pt
3.4	Recyclage aisé de l'enzyme.	0,5 pt
3.5	Fixation covalente ou adsorption (ionique ou pas ...). Inclusion et coréticulation sont non adaptées.	0,5 pt