

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTÉINES

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7
L'usage d'un dictionnaire anglais/français est autorisé
L'usage de la calculatrice est interdit

Sujets zéros du BTS biotechnologies : avertissement.

Les sujets zéros ont été conçus par des professeurs enseignant en BTS et finalisés en commission de choix et d'élaboration de sujets. Contrairement aux sujets d'examens, ils n'ont pas été testés. Leur faisabilité pendant le temps imparti par un élève moyen n'a donc pas été vérifiée.

Il s'agit ici de montrer l'orientation et l'esprit dans lequel les sujets peuvent valider les connaissances et savoir-faire acquis lors de la formation des étudiants se préparant au BTS biotechnologies. Ces sujets ne constituent pas des « modèles » ; ils donnent l'orientation des sujets d'évaluation respectant les **définitions de l'épreuve**, et suivent les **préconisations** qui ont guidé leur élaboration. (cf : «Avertissement »)

Ces sujets sont à porter à la connaissance des étudiants en formation et à travailler avec eux à titre d'entraînement pour les épreuves terminales. Ils nécessitent que soient conjointement mobilisées les connaissances des élèves et leurs capacités à exploiter les documents associés.

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

Les métallocarboxypeptidases (EC 3.4.17) sont des carboxypeptidases à cation métallique divalent présent dans le site actif. Elles possèdent une courte séquence conservée comprenant deux histidines et un acide glutamique.

1. Structure et purification de l'enzyme (8,5 points)

- 1.1 Représenter la structure plane de l'un (au choix) de ces deux acides aminés.
- 1.2 Présenter la structure chimique de la liaison peptidique entre deux acides aminés en montrant la configuration et les liaisons autorisant une libre rotation.

Une métallocarboxypeptidase (dénommée PfuCP) a été purifiée à partir de l'archaebactérie *Pyrococcus furiosus*.

Le **document n° 1** présente les étapes de la purification et les résultats obtenus.

- 1.3 Analyser globalement les résultats présentés par l'électrophorégramme du **document n° 1**. Préciser les informations obtenues sur la pureté d'une part et sur la structure d'autre part.
- 1.4 Montrer que le facteur d'enrichissement lors de l'étape (C) est très voisin de 3.
- 1.5 À partir des données du tableau, calculer le rendement global de la purification. Cette valeur est-elle surprenante ?

La structure de la PfuCP a été déterminée par diffraction aux rayons X. Elle se caractérise par la présence d'un nombre important d'hélices alpha et une structuration en domaines.

- 1.6 Indiquer comment sont stabilisées les hélices alpha des protéines (aucun schéma n'est exigé). Préciser si tous les acides aminés sont compatibles avec cette structure secondaire.
- 1.7 Rappeler ce qu'on entend par domaine protéique.

La masse moléculaire de la PfuCP a été évaluée par chromatographie d'exclusion-diffusion en conditions natives. La valeur déterminée est alors d'environ 120 kDa.

- 1.8 Présenter le principe de la chromatographie de gel filtration (exclusion-diffusion) en précisant la signification de « zone de perméation sélective » (zone de diffusion partielle). Expliquer précisément comment cette technique peut permettre d'évaluer la masse moléculaire d'une protéine.
- 1.9 En combinant les résultats obtenus par l'analyse SDS-page et l'analyse en chromatographie d'exclusion, donner la structure probable de la PfuCP. Justifier la réponse.

2. Caractéristiques cinétiques de l'enzyme (6 points)

Les caractéristiques cinétiques de la PfuCP ont été étudiées. Les résultats sont présentés dans le **document n° 2**. Les mesures de vitesse ont été réalisées en méthode « 2 points » avec arrêt de la réaction (temps zéro puis temps 10 minutes). Les vitesses obtenues ont été utilisées comme des vitesses initiales (v_i) pour tracer un graphe $v_i=f([ZAR])$ et $1/v_i=1/[ZAR]$ où [ZAR] désigne la concentration en substrat.

- 2.1 Indiquer comment est arrêtée la réaction.
- 2.2 Expliciter précisément la notion de vitesse initiale en enzymologie. La réponse devra faire intervenir les notions d'état stationnaire et d'état pré-stationnaire de réaction.
- 2.3 Expliquer pourquoi le comportement de la PfuCP est qualifié de michaélien.
Définir le K_M .
Donner la valeur du K_M de la PfuCP pour le substrat ZAR.
- 2.4 Le **document n° 3** décrit une étude de l'influence de la température sur l'activité de l'enzyme et les résultats obtenus.
 - Justifier l'allure affine de la fonction $\ln(\text{vitesse})=f(1/\text{température absolue})$.
 - Expliquer l'écart à la loi d'Arrhénius pour les températures testées les plus élevées.
 - Calculer l'énergie d'activation de la réaction. Pour le calcul on admettra que R, constante des gaz parfaits, a pour valeur $8 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

*Donnée : rappel de la loi d'Arrhénius pour un coefficient de vitesse k,
 $k = A e^{-E_a/RT}$ où A désigne le coefficient pré-exponentiel qui peut être considéré comme constant, E_a l'énergie d'activation, T la température absolue en K et R la constante des gaz parfaits.*

3. L'enzyme, outil de séquençage (3,5points)

Comme l'activité carboxypeptidase de la PfuCP est récurrente, son utilisation pour le séquençage de peptides est possible. Un peptide N-acétylé, la N-acétyl-rénine est soumis à digestion ménagée par la PfuCp à la température de 80°C pendant 1 minute puis le résultat de l'hydrolyse est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les résultats sont présentés dans le **document n° 4**.

- 3.1 Le pic correspondant à la masse moléculaire 1801,1 est celui de la N-acétyl-rénine intacte. Montrer qu'on peut expliquer le pic 1714,1 par la présence d'une sérine en position C-terminale. Justifier l'utilisation de la masse moléculaire de l'eau dans le calcul nécessaire.
- 3.2 Justifier le caractère ménagé de l'hydrolyse réalisée et expliquer comment se manifeste sur le graphe du **document n° 4** l'action récurrente de la PfuCP.
- 3.3 En déduire la séquence des 7 derniers acides aminés de la N-acétyl-rénine.

On peut envisager d'utiliser de la PfuCP immobilisée sur billes magnétiques pour les opérations de séquençage.

- 3.4 Quel serait l'intérêt de cette immobilisation ?
- 3.5 Proposer (sans développer) une méthode d'immobilisation utilisable dans ce cas.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
--

Document n° 1

Purification de la PfuCP et analyse des extraits

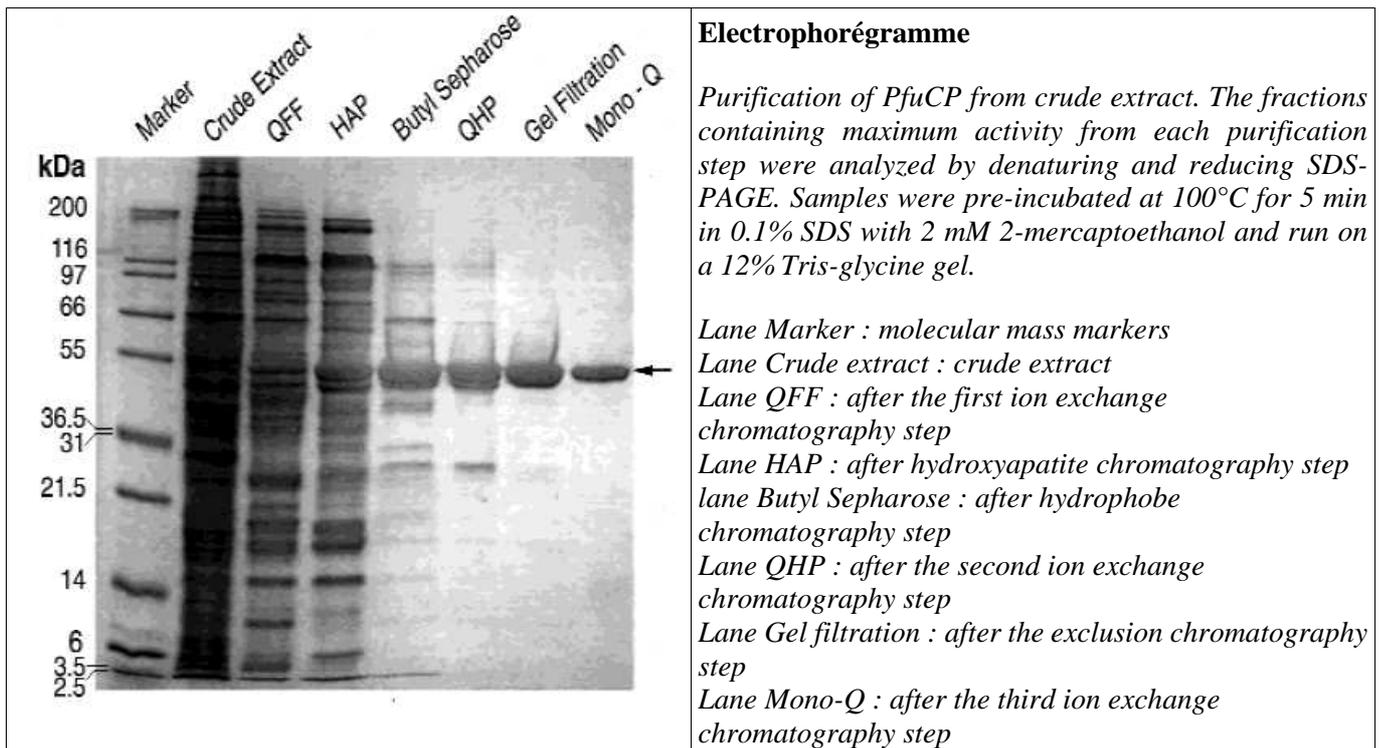
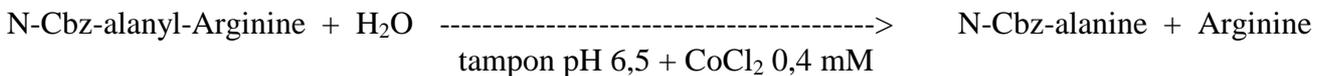
Après culture en fermenteur, les bactéries sont recueillies par centrifugation du moût. Les bactéries sont alors lysées. Le lysat est centrifugé, le surnageant est recueilli et constitue l'extrait brut utilisé pour la suite des étapes de la purification (il est protégé à l'aide de l'inhibiteur PMSF de certaines protéases).

Après chaque étape de purification on réserve la fraction contenant le maximum d'enzyme. On mesure la concentration en protéines totales et la concentration en activité catalytique de la fraction réservée, ce qui permet de calculer la quantité totale de protéines et la quantité d'enzyme récupérée. Puis on passe à l'étape de purification suivante.

Référence de l'étape	Étapes de la purification	Protéines totales (mg)	Quantité d'enzyme récupérée en unités U
A	Extrait brut	20 000	150 10 ³
B	Chromatographie sur échangeur fort d'anions	2398	100 10 ³
C	Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite	802	100 10 ³
D	Chromatographie d'interaction hydrophobe (motif butyl)	183	83 10 ³
E	Chromatographie sur échangeur fort d'anions	14	16 10 ³
F	Chromatographie d'exclusion diffusion	13	16 10 ³
G	Chromatographie sur échangeur fort d'anions	10	15 10 ³

Tableau. Purification de la métallocarboxypeptidase de l'archaeobactérie hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* (PfuCP). Les différentes étapes successives sont indiquées par la colonne de gauche du tableau. Par convention, une unité d'enzyme catalyse l'hydrolyse de 1 µmol de substrat ZAR (N-Cbz-Ala-Arg) par minute dans le standard de mesure à 80°C.

PfuCP

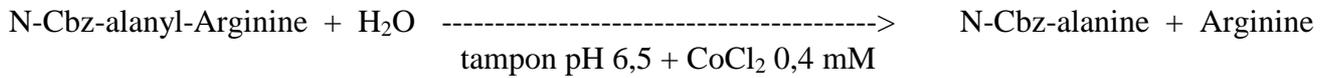


Document n° 2

Comportement Michaélien de la PfuCP

Cinetic assays conditions.

The substrate is the N-blocked dipeptide N-Cbz-alanyl-Arginine (ZAR).



4 μL of enzyme sample in a total volume of 100 μL . The total mixture is incubated for 10 minutes at 80°C followed by quenching on ice (the equilibration time for the mixture to reach 80°C and 0°C is considered negligible relative of the timescale of the assay). Arginine formed is then measured with a ninhydrin reagent (photometry at 500 nm ; absorbances are compared with an arginine standard curve).

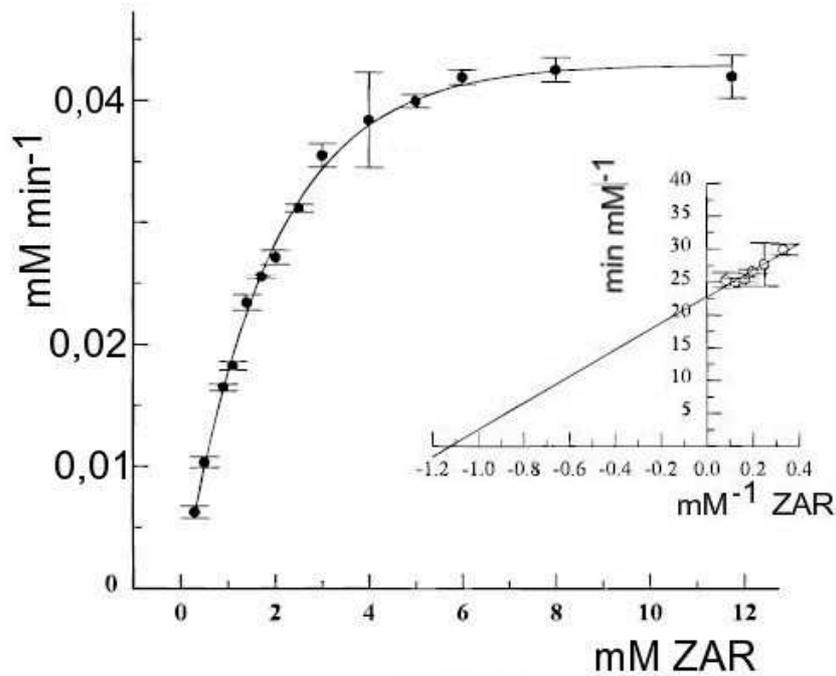
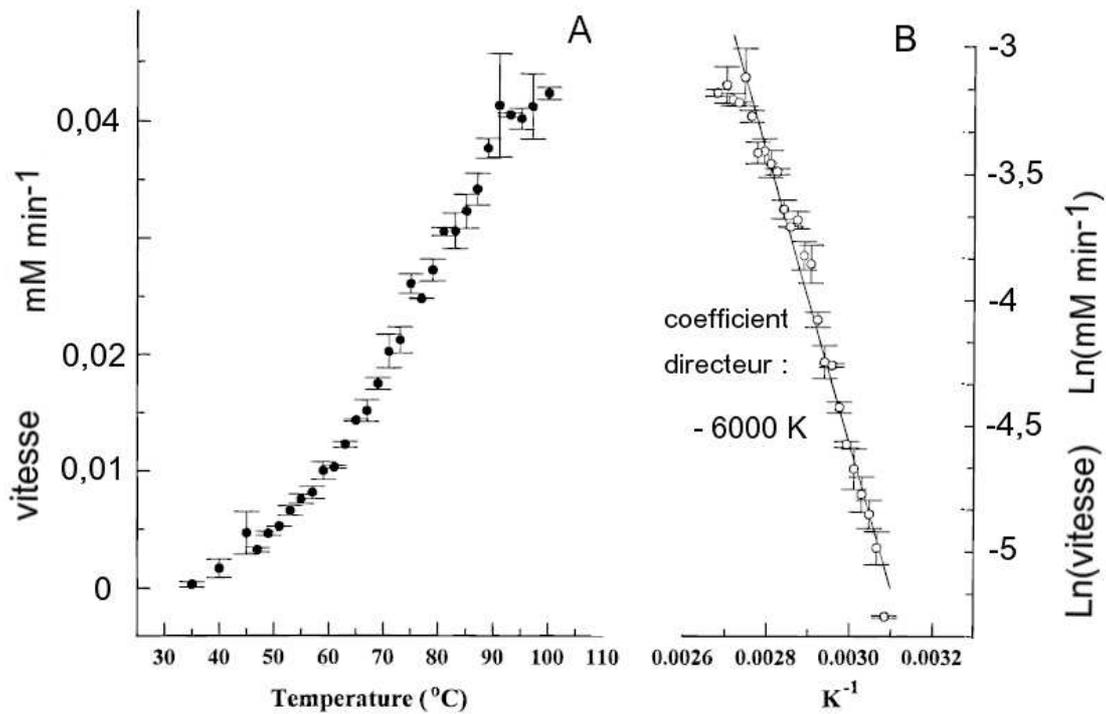


Figure 3. Comportement michaélien de la PfuCP.

Document n° 3

PfuCp et température

Différentes cinétiques sont conduites à partir d'un même extrait conservé à -20°C comme indiqué dans le document n°3 mais la concentration en substrat ZAR est fixée à 5 mM et la température de réaction est variable.



En A, fonction $\text{vitesse} = f(\text{température})$.

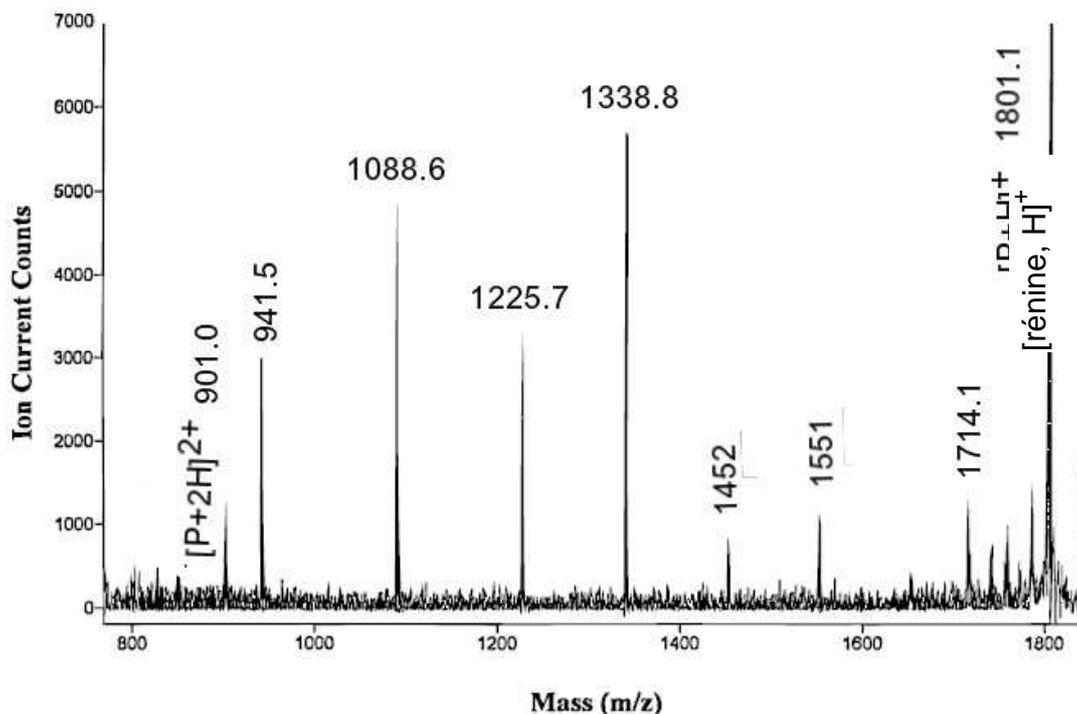
En B, représentation $\text{Ln}(\text{vitesse}) = f(1/\text{température absolue})$ dans l'intervalle $52^{\circ}\text{C} - 93^{\circ}\text{C}$ (332 K - 366 K) ($0,00308 \text{ K}^{-1} - 0,00273 \text{ K}^{-1}$).

Document n° 4

Séquençage de la N-acétyl-Rénine à l'aide de la PfuCP et d'une spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le procédé MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, désorption et ionisation de la protéine à étudier placée dans une matrice soumise à des impulsions laser) associé à la spectrométrie de masse TOF (Time Of Flight) sépare les différents peptides d'un mélange en fonction de leur masse moléculaire. Chaque peptide P du mélange est protoné et monochargé. Il est visualisé par un pic correspondant à sa masse moléculaire à l'unité de masse atomique près. L'intensité (Ion Current count) des pics n'est pas significative et ne doit pas être prise en compte.

N-acetyl-Renin (MW = 1800.1) was digested at pH 6,5 with purified PfuCP . The reaction was carried 1 min at 80°C and stopped on ice and addition of TFA. The sample was subsequently analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and the monoisotopic masses were recorded.



L'échelle des abscisses donne les masses moléculaires des peptides détectés.

Tableau présentant les masses atomiques de divers acides aminés

Masses moléculaires (en unités atomiques relatives)		
Alanine : 89,09	Leucine, Isoleucine : 131,17	Méthionine : 149,21
Sérine : 105,09	Asparagine : 132,12	Tyrosine : 181,19
Proline : 115,13	Aspartate : 133,10	Phénylalanine : 165,19
Valine : 117,15	Glutamine : 146,15	Histidine : 155,15
Thréonine : 119,12	Lysine : 146,19	eau : 18,02
	Glutamate : 147,13	

Tableau des calculs nécessaires au séquençage

$1801,1 - 105,09 + 18,02 = 1714,03$	$1338,58 - 131,17 + 18,02 = 1225,43$
$1714,03 - 181,19 + 18,02 = 1550,86$	$1225,43 - 155,15 + 18,02 = 1088,30$
$1550,86 - 117,15 + 18,02 = 1451,73$	$1088,3 - 165,19 + 18,02 = 941,13$
$1451,73 - 131,17 + 18,02 = 1338,58$	
	$(1800,1+2) / 2 = 901$