

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

***BIOLOGIE STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DES PROTÉINES***

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 6 pages numérotées de 1/6 à 6/6
L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

Les β -lactamases

Les β -lactamines sont des antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane. Elles possèdent un noyau structural commun, le cycle β -lactame.

Certaines souches bactériennes produisent des β -lactamases capables d'hydrolyser le cycle β -lactame, donc, capables d'inactiver ces antibiotiques. Par conséquent, la présence de ces enzymes confère à la souche productrice une résistance à ces antibiotiques.

1. Structure et activité des β -lactamases « TEM » (15 points)

TEM-1 est une β -lactamase retrouvée aussi bien chez des souches bactériennes Gram-positives que chez des souches bactériennes Gram-négatives.

1.1 TEM-1 est désignée par le code E.C 3.5.2.6 selon la classification internationale des enzymes.

1.1.1 Rappeler les grands principes de cette classification.

1.1.2 Citer les différentes classes d'enzymes.

1.1.3 Préciser la classe de TEM-1.

1.2 Le **document 1** présente la structure de la β -lactamase TEM-1. Celle-ci révèle que l'enzyme est composée de deux domaines structuraux, le site actif de l'enzyme se situant à l'interface entre ces deux domaines.

1.2.1 Nommer une technique permettant la détermination précise de la structure tridimensionnelle d'une protéine.

1.2.2 Définir la structure secondaire d'une protéine en précisant les liaisons mises en jeu.

1.2.3 Indiquer les types de structures secondaires qui apparaissent dans le document 1.

1.2.4 Préciser la signification de « domaine structural d'une protéine ».

1.2.5 Indiquer les rôles des résidus d'acides aminés présents dans le site actif d'une enzyme.

1.3 De nombreuses souches d'*E.coli* productrices de β -lactamases TEM ont été isolées. Différents variants de TEM ont alors été mis en évidence.

Chez le variant TEM-31, la cystéine 241 est substituée par une lysine.

1.3.1 Donner la formule semi-développée de ces deux acides aminés.

1.3.2 Nommer les fonctions chimiques présentes dans les chaînes latérales de ces deux acides aminés.

1.3.3 Citer deux caractéristiques distinguant ces deux acides aminés et pouvant entraîner des modifications de structure.

Le tableau du **document 2** présente des paramètres cinétiques de TEM-1 et de TEM-31.

1.3.4 Définir les 2 paramètres K_M et k_{cat} .

1.3.5 Comparer les affinités apparentes de ces 2 enzymes pour la pénicilline G.

1.3.6 Montrer que l'enzyme TEM-31 est 17 fois plus efficace pour l'hydrolyse de la pénicilline G que pour l'hydrolyse de la céphaloridine.

BOE 3 BP

L'acide clavulanique est un analogue structural des β -lactamines.

- 1.3.7 En déduire le type d'inhibition de l'activité β -lactamase attendu par ajout d'acide clavulanique ; justifier.
- 1.3.8 Préciser quel est le paramètre cinétique modifié ; justifier.
- 1.4 Certaines mutations des β -lactamases TEM s'accompagnent d'un accroissement de la résistance à la dénaturation thermique à 42°C. On étudie cette dénaturation en traçant la fonction $\ln(\text{activité résiduelle}) = f(\text{temps de dénaturation})$
 - 1.4.1 Lister les opérations expérimentales permettant de tracer cette fonction.
 - 1.4.2 Définir le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de l'enzyme à 42°C.
 - 1.4.3 Dans quel sens varie le $t_{1/2}$ lorsque la résistance à la dénaturation thermique augmente ? Justifier.
- 1.5 Certaines mutations des β -lactamases TEM ont pour conséquence une modification du point isoionique (pI).
 - 1.5.1 Définir le paramètre pI.
L'isoélectrofocalisation permet de séparer les protéines selon le pI.
 - 1.5.2 Exposer succinctement le principe de cette technique.
 - 1.5.3 Justifier son intérêt en électrophorèse bi-dimensionnelle.

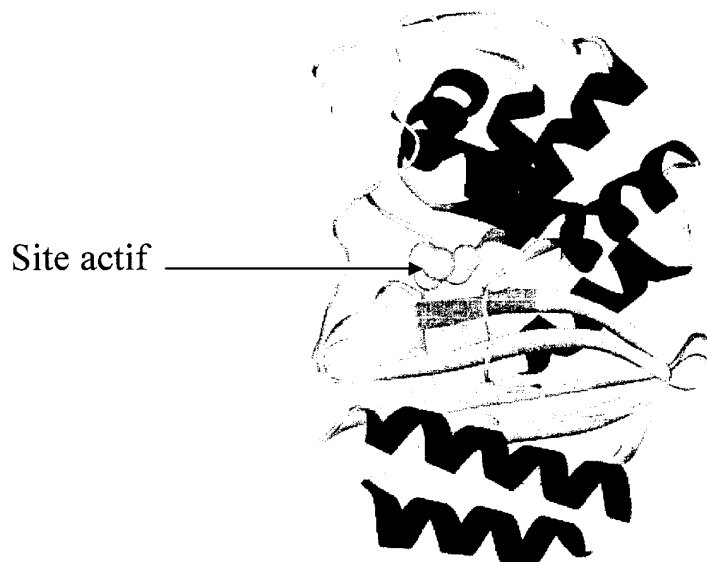
2. Obtention d'une fraction pure de β -lactamase « BES-1 » (5 points)

On cherche à purifier une nouvelle β -lactamase BES-1 (MM = 29 kDa), responsable de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Les différentes étapes de cette purification sont indiquées dans le **document 3**.

- 2.1 Le **document 4** présente le protocole de l'extraction de cette β -lactamase.
 - 2.1.1 Expliquer comment la lyse bactérienne est obtenue.
 - 2.1.2 Indiquer l'intérêt de l'étape de dialyse dans le protocole.
- 2.2 La phase stationnaire utilisée pour la chromatographie de gel filtration présente un domaine de fractionnement (ou domaine de séparation) de 700 à 5 000 Da.
 - 2.2.1 Cette phase stationnaire est constituée de billes de SéphadexTM.
Donner les caractéristiques de ces billes.
 - 2.2.2 Préciser le comportement de la β -lactamase dans ce gel.
Indiquer à quoi correspond son volume d'élution.
- 2.3 Analyser l'électrophorégramme du **document 5** présentant le résultat du suivi par SDS-PAGE de la purification.

Document 1

Structure tridimensionnelle de la β -lactamase TEM-1.
(La sérine active est repérée par la flèche.)



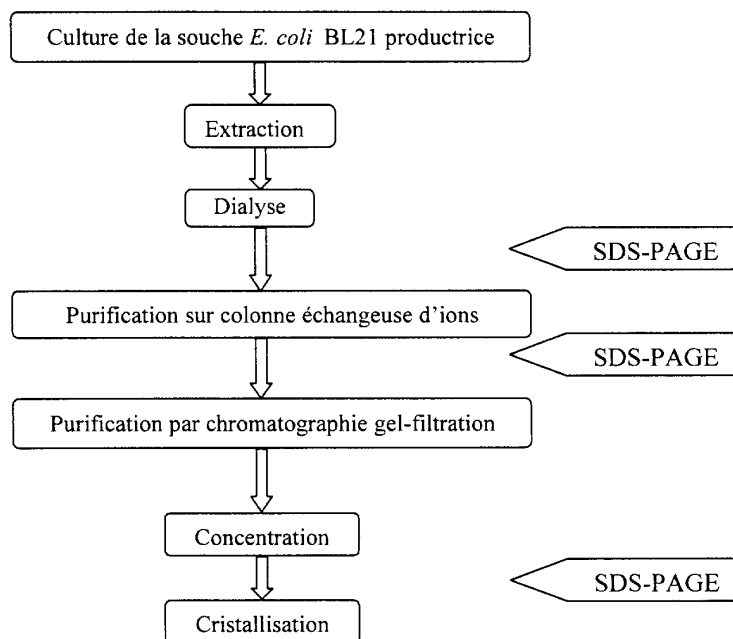
Document 2

Paramètres cinétiques des β -lactamases TEM-1 et TEM-31

Souche productrice	β -lactamase	k_{cat} en unités arbitraires relatives pour le substrat :		K_M (μM) pour le substrat :	
		Pénicilline G	Céphaloridine	Pénicilline G	Céphaloridine
DH5 α TEM-1	TEM-1	100	65	38	1169
13162	TEM-31	100	11	365	681

Document 3

Organigramme montrant les différentes étapes de la manipulation



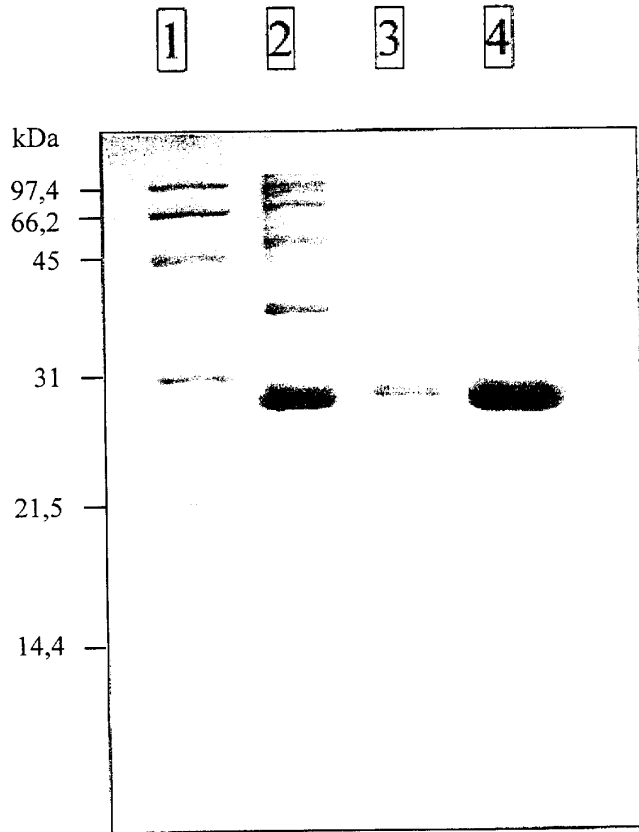
Document 4

Extraction de BES-1

Deux litres de bouillon sont centrifugés pendant 15 minutes à 7000 rpm à une température de +4°C. Trois lavages successifs du culot sont effectués : le premier en eau ultra-pure, les deux suivants en tampon MES (petite molécule ionique) à 20 mmol.L⁻¹. Le culot est pesé, puis soumis à des cycles congélations-décongélations. Lors de la dernière décongélation à température ambiante, le culot est repris avec du tampon MES à 20 mmol.L⁻¹ ajusté à pH 6,5 (20 mL de tampon pour 5 g de culot), puis subit 5 cycles de sonication de 30 secondes après 30 secondes de pause. La suspension est ensuite centrifugée 10 minutes à 10 000 rpm et à +4°C. De la DNase est ajoutée au surnageant, et une centrifugation de 1 heure à 10 000 rpm à +4°C est effectuée. À l'issue de la centrifugation, le surnageant contenant la protéine est prélevé. Son volume est de 90 mL.

Document 5

Electrophorégramme obtenu par SDS-PAGE



Piste 1 : Marqueur de masse moléculaire

Piste 2 : Fraction protéique avant purification

Piste 3 : Fraction protéique après purification sur colonne échangeuse d'ions

Piste 4 : Fraction protéique après purification sur colonne de gel-filtration.