



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV®](#)

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

**BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES
PROTEINES**

SESSION 2015

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- calculatrice,
- dictionnaire anglais/français.

Tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 8 pages numérotées de 1 à 8

Purification de l'aminopeptidase-N (APN) recombinante et évaluation de l'efficacité d'inhibiteurs sélectifs

L'APN (EC 3.4.11.2) est une ecto-enzyme N glycosylée, transmembranaire appartenant à la classe des aminopeptidases zinc dépendante. Elle est exprimée à la surface de cellules épithéliales (intestin, rein), et, de cellules du système nerveux central (synapses). Elle intervient dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire.

L'APN est également surexprimé à la surface des cellules tumorales.

Il a été démontré qu'un inhibiteur spécifique de cette enzyme, comme la bestatine, bloque la croissance des cellules tumorales. La conception d'inhibiteurs spécifiques de l'aminopeptidase-N présente donc un intérêt thérapeutique.

La production d'une APN recombinante dans des cellules d'insecte a permis d'évaluer l'efficacité de divers inhibiteurs synthétiques.

1. Caractéristiques de l'APN (5 points)

L'APN catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique à l'extrémité N-terminale de chaînes polypeptidiques.

1.1 Ecrire la réaction chimique catalysée par l'APN en prenant un tripeptide comme substrat. Les molécules seront représentées sous forme semi-développée, et les chaînes latérales des résidus d'acides aminés seront symbolisées par la lettre R.

Le **document 1** présente une structure schématique de l'APN.

1.2 Proposer une technique permettant de déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine.

1.3 Repérer sur le **document 1** les deux principaux domaines structuraux. Préciser leur localisation cellulaire et le type de structure secondaire présent.

1.4 Décrire la structure et préciser la composition et le rôle du site actif d'une enzyme.

Le **document 2** présente le mécanisme catalytique de l'APN.

1.5 Préciser la nature de chacune des interactions de faible énergie repérées 1 et 2.

1.6 A l'aide du **document 2**, distinguer les acides aminés qui ne participent qu'à la fixation du substrat, de ceux qui interviennent directement dans l'hydrolyse du peptide.

1.7 Préciser le type et le nom du cofacteur de l'APN.

2. Extraction et purification de l'APN recombinante (5 points)

L'APN recombinante est une protéine glycosylée. Des cellules d'insecte ont été choisies comme système d'expression.

2.1 Expliquer pourquoi il est préférable d'exprimer la protéine recombinante APN dans les cellules d'insectes, plutôt que dans une bactérie de type *Escherichia coli*.

Après production, l'APN recombinante est extraite du cytoplasme des cellules d'insectes, puis purifiée selon le protocole présenté dans le **document 3**.

2.2 Le protocole d'extraction de purification fait intervenir une précipitation différentielle des protéines au sulfate d'ammonium. Exposer le principe de cette technique.

A l'aide des **documents 3 et 4**, répondre aux questions suivantes :

2.3 Calculer la masse de sulfate d'ammonium $m_{(NH_4)_2SO_4}$ ajoutée dans les 500 mL de la fraction F1 pour l'amener de 45 % à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium.

2.4 Indiquer le but de la dialyse.

2.5 Présenter sous forme de schémas annotés le principe de la fixation et de l'élution de la protéine d'intérêt sur la résine échangeuse d'anions.
Donnée : le pHi de l'APN est de 6,8.

2.6 Proposer une autre méthode d'élution de cette protéine à partir de la résine échangeuse d'anions.

2.7 Préciser les intérêts de l'ultrafiltration réalisée lors de l'étape 6.

3. Suivi et évaluation de la purification de l'APN recombinante (5 points)

Le suivi de la purification de l'APN recombinante a été réalisé avec les techniques SDS-PAGE, et, Westernblot. Les résultats obtenus pour les fractions F2 et F4 sont présentés dans le **document 5**.

3.1 Analyser les résultats du gel SDS-PAGE et du Western blot. Conclure.

La purification a été évaluée grâce à un dosage des protéines par mesure de l'absorbance à 280 nm et un dosage de l'activité enzymatique sur chaque fraction récupérée (F1, F2, F3, F4).

3.2 Citer le ou les acides aminés qui absorbent à 280 nm.

Pour déterminer l'activité enzymatique de chaque fraction récupérée, le substrat utilisé est la leucine p-nitroanilide. Son hydrolyse conduit à la p-nitroaniline qui absorbe à 405 nm. La réaction enzymatique se déroule à 30 °C dans du tampon à 20 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5. L'activité enzymatique des fractions est déterminée par une méthode cinétique.

3.3 Préciser la condition de concentration dans le milieu réactionnel à laquelle le substrat doit satisfaire.

Le **document 6** regroupe les résultats de l'évaluation des étapes de purification.

3.4 Ecrire les équations aux grandeurs et aux unités permettant de calculer les paramètres suivants :

- activité spécifique z_{sp} (en U.g⁻¹) ;
- rendement de purification global ;
- taux de purification (ou enrichissement) global.

3.5 Calculer :

- les activités spécifiques des fractions F1 et F4 ;

- le rendement de purification global ;
- le taux de purification (ou enrichissement) global.

3.6 Analyser les résultats du rendement et du taux de purification.

4. Evaluation *in vitro* de l'efficacité d'inhibiteurs sélectifs sur l'APN recombinante (3 points)

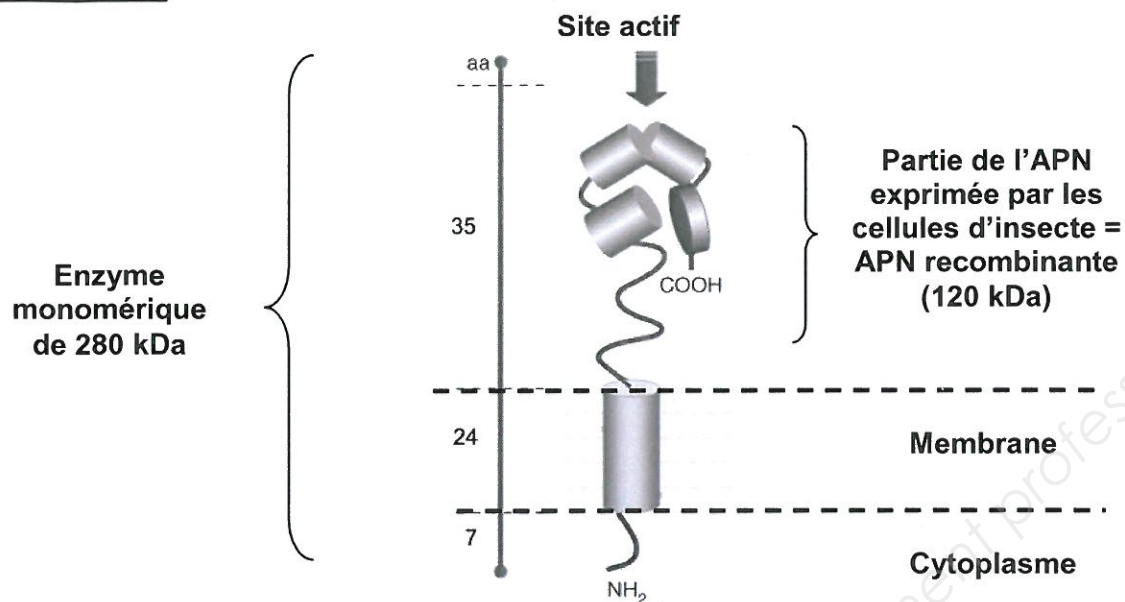
Le **document 7** présente des inhibiteurs synthétiques de l'APN, candidats médicaments en chimiothérapie anti-cancéreuse. Exploiter ce document pour répondre aux questions ci-dessous.

- 4.1 A partir de la formule du K_I , montrer qu'un inhibiteur efficace présente une valeur de K_I faible.
- 4.2 Utiliser les grandeurs de K_I et de IC_{50} des inhibiteurs analysés, pour identifier l'inhibiteur le plus efficace. Argumenter la réponse.
- 4.3 Indiquer, en le justifiant, le type d'inhibition probable exercée par le 7-amino-6-benzosubérone sur l'APN.
- 4.4 Après avoir rappelé la signification des paramètres cinétiques d'une enzyme, v_{max} et K_M , expliquer comment varie chacun de ces paramètres lorsque l'enzyme est en présence de l' inhibiteur 7-amino-6-benzosubérone.

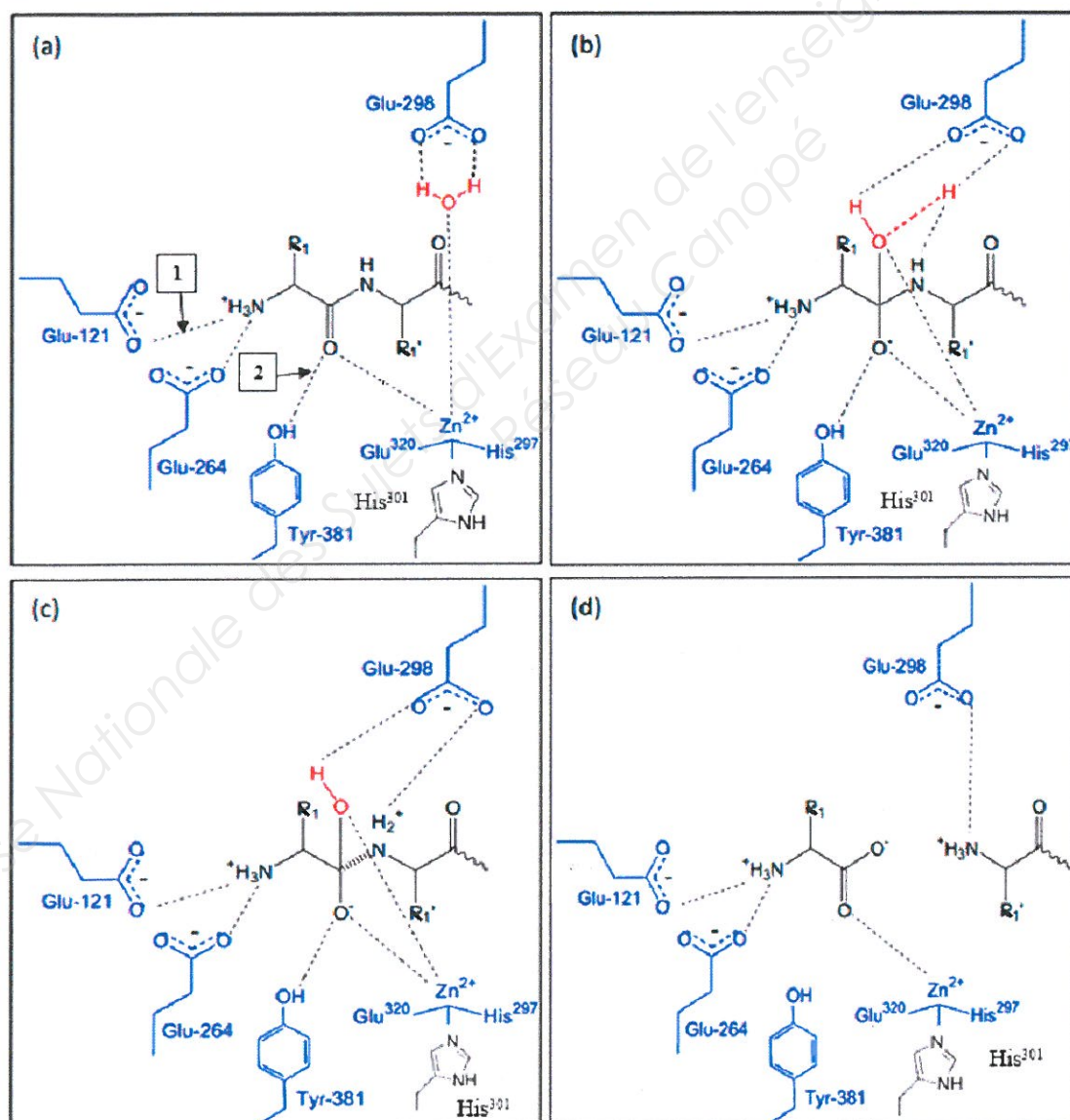
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : Structure schématique de l'APN



Document 2 : Mécanisme catalytique des aminopeptidases-N



Document 3 : Protocole d'extraction et de purification de l'APN recombinante

1/ **Centrifugation d'une suspension de cellules d'insectes produisant l'APN recombinante** puis élimination du surnageant.

2/ **Remise en suspension du culot cellulaire dans du tampon de lyse** (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5% glycérol et 1% Triton X-100). Homogénéisation et incubation 3 heures à 4°C. Centrifugation du lysat obtenu à 20 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Récupération de 500 mL de surnageant correspondant à la **fraction soluble F1**.

3/ **Précipitation au sulfate d'ammonium** de la fraction F1 : les 500 mL de la fraction F1 sont amenés à 45% de saturation en sulfate d'ammonium. Le culot de sédimentation est éliminé et le surnageant d'un volume de 500 mL est récupéré et amené à 50 % en sulfate d'ammonium. Le surnageant est rejeté. Le culot est repris dans un minimum de tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

4/ **Dialyse** de la solution obtenue (taille des pores 5000 Da). On obtient la **fraction F2**.

5/ **Purification de la fraction F2 sur résine échangeuse d'anions Q Sepharose (Fast Flow 50 mL)**. Pour cela on utilise les tampons suivants : Tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5/Tampon 50 mM Tris – HCl pH 7,5 + fraction F2/Gradient linéaire en NaCl (de 0 à 0,275 mol.L⁻¹ en NaCl)
Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont réunies pour donner la **fraction F3**.

6/ **Ultrafiltration sur cellule Amicon Ultra** de la fraction F3 (cellule composée d'une membrane ayant un seuil de coupure de 100 kDa). Après filtration, on obtient la **fraction F4** (V_{F4} = 5 mL).

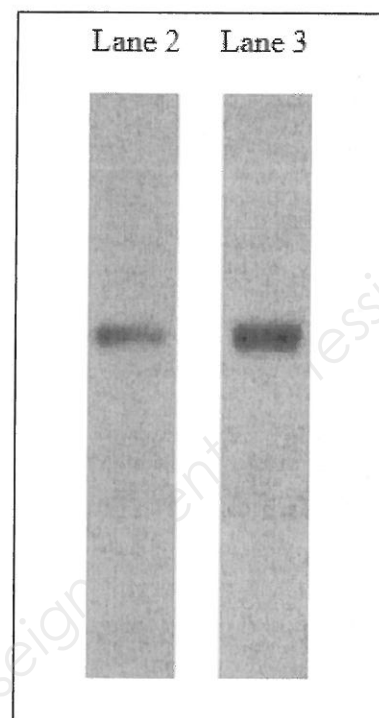
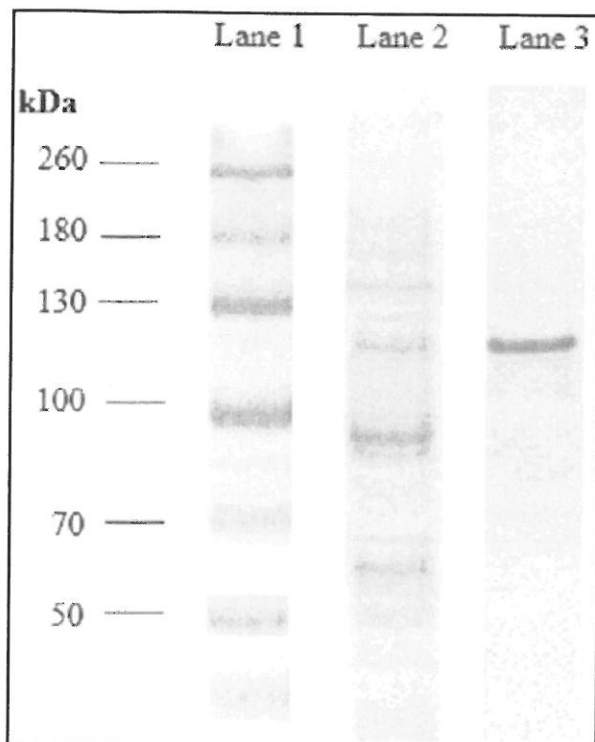
Document 4 : Quantités de sulfate d'ammonium (g) à ajouter à 1 L de solution protéique pour atteindre le pourcentage de saturation souhaité, à 0°C.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Document 5 : SDS-PAGE and Western blot analyses of F2 and F4 fractions



A/ SDS-PAGE analysis of purified APN's fractions using a Coomassie Blue staining (Lane 1: protein size markers / Lane 2: F2 fraction / Lane 3: F4 fraction).

B/ Western blot analysis on nitro-cellulose transfer membrane using a polyclonal anti APN antibody (Lane 2: F2 fraction / Lane 3: F4 fraction).

Document 6 : Evaluation des étapes de la purification

Fractions	Volume (mL)	Dosage des protéines (g.L ⁻¹)	Activité catalytique totale z (U)
F1	500	24	119
F4	5	51	54

Document 7 : Caractéristiques des inhibiteurs synthétiques de l'APN

Document 7a : évaluation de l'efficacité de divers inhibiteurs synthétiques de l'APN

This enzyme has been identified as a potential target for cancer chemotherapy. Recently, new inhibitors have been synthesised. These compounds are useful biochemical tools that can be used to characterise new biological functions for APN's catalytic activity. The K_I and IC_{50} values of these compounds have been evaluated on purified APN.

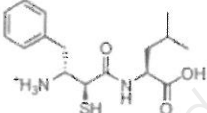
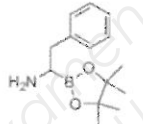
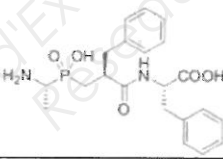


K_I : EI complex dissociation constant

$[E]$: enzyme concentration

$[I]$: inhibitor concentration

$[EI]$: EI complex concentration

Synthetic inhibitors	Structures	Inhibition constant K_I (μM)	Inhibitory Concentration that causes 50% of the inhibitory effect IC_{50} (μM)
Bestatin derivatives		4,4	8,8
Boronic Acid derivatives		0,01	0,02
Phosphonic acid derivatives		0,001	0,002
7-amino-6-benzosuberone	Document 7b	0,007	0,014

Document 7b : mode de liaison proposé de l'inhibiteur 7- amino- 6 - benzosubérone au site actif de l'APN

