



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 2016

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériels autorisés :

- calculatrice
- dictionnaire anglais/français

Tout autre matériel est interdit.

Documents à rendre avec la copie :

- document 6page 8/8

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

La peroxydase du raifort (HRP)

Une enzyme multifonctionnelle à l'avenir encore prometteur

Les peroxydases sont retrouvées dans de très nombreux organismes, notamment chez les plantes.

La peroxydase de raifort ou HRP pour *horseradish peroxidase*, est la plus étudiée. Elle constitue notamment un auxiliaire incontournable de nombreuses techniques d'analyse couramment utilisées dans les laboratoires de biotechnologies (kits de diagnostic médical, immuno-essais...).

Elle est également étudiée en tant qu'auxiliaire de dépollution des eaux usées riches en phénols. Elle semble également être un outil prometteur en vue du traitement ciblé de tumeurs cancéreuses.

1. Caractéristiques structurales de la protéine HRP (6 points)

Le **document 1** présente les caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la peroxydase de raifort (**HRP**).

- 1.1. Indiquer la classe d'enzyme à laquelle appartient l'HRP.
- 1.2. Proposer un rôle pour le groupement prosthétique de l'HRP.
- 1.3. Décrire la structure de l'HRP.

Le **document 2** présente l'alignement des séquences de trois isoenzymes de l'HRP réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL.

- 1.4. Indiquer la signification des astérisques (*) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 118 de l'isoenzyme dont le numéro d'accension est P00433.
- 1.5. Rappeler la nature et les propriétés de la chaîne latérale de la phénylalanine (F) et de celle de la tyrosine (Y).
- 1.6. Expliquer la signification des deux points (:) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 296 de l'isoenzyme dont le numéro d'accension est P00433.
- 1.7. Expliquer les termes « identity » et « similar positions » fournis par le logiciel CLUSTAL.
- 1.8. Indiquer les modifications post-traductionnelles que subit l'HRP.
- 1.9. En déduire une définition pour le terme d'isoenzyme.

2. Caractéristiques de la catalyse enzymatique médiée par l'HRP (5 points)

De nombreux substrats chromogènes ont été développés afin de suivre l'activité de la peroxydase. Les paramètres k_{cat} et K_M de trois d'entre eux (ABTS, TMB et gaïacol) sont indiqués dans le **document 3**.

- 2.1. Comparer l'affinité de l'enzyme pour les trois substrats. Justifier la réponse.

- 2.2. Considérant la signification de $1/K_M$ et de la k_{cat} , indiquer la signification du rapport k_{cat}/K_M .
- 2.3. Calculer le rapport k_{cat}/K_M pour les trois substrats étudiés.
- 2.4. Identifier le substrat pour lequel l'enzyme est la plus efficace.

L'aminopyrine est un substrat alternatif utilisé pour déterminer l'activité de la peroxydase.

Le **document 4** présente un mode opératoire permettant de déterminer la concentration d'activité catalytique notée b de l'HRP.

- 2.5. Argumenter que la mesure de la vitesse initiale est déterminée en condition de $v_{i\max}$.
- 2.6. Indiquer la signification d'une unité d'activité enzymatique utilisée dans cette procédure opératoire.
- 2.7. Indiquer les compositions qualitative et quantitative du milieu réactionnel et en déduire son volume.

La vitesse initiale (mesurée par un $\Delta A/\Delta t$) est égale à $0,06 \text{ min}^{-1}$. L'équation aux grandeurs utilisée pour le calcul de la concentration d'activité catalytique b de l'HRP est :

$$b = 2 * \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon * l} * V_{ML} * \frac{1}{V_E}$$

- 2.8. Justifier la présence du facteur 2 présent dans cette équation aux grandeurs.
- 2.9. Poser l'équation aux valeurs numériques et calculer la concentration d'activité catalytique b en unité (U) par millilitre de solution d'enzyme.

3. Développement d'outils de dépollution par immobilisation de l'HRP (4 points)

L'HRP est capable de transformer de nombreux polluants aromatiques en polymères moins dangereux et facilement éliminables. Son immobilisation devrait permettre de développer des bioréacteurs capables de traiter les effluents pollués.

Le **document 5** présente le procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules de magnétite.

- 3.1. Identifier le type d'immobilisation mis en jeu dans ce document.
- 3.2. Citer deux avantages et deux inconvénients de cette immobilisation.

Le **document 6** montre la représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée.

- 3.3. Sur le **document 6** à rendre avec la copie, déterminer graphiquement les valeurs de K_M pour les formes libre et immobilisée de l'HRP.
- 3.4. Commenter les valeurs obtenues.

Après utilisation, les nanoparticules magnétiques sont recyclées par simple lavage à l'eau distillée. Le **document 7** présente les activités résiduelles relatives de l'HRP immobilisée après chacun des quatre cycles de récupération.

- 3.5. Analyser et interpréter les résultats.

4. Utilisation de l'HRP comme outil thérapeutique (3 points)

L'HRP est actuellement testée pour développer des outils de lutte anticancéreuse, par exemple la stratégie « ADEPT » (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy).

Cette stratégie permet de libérer un composé toxique au contact des cellules ciblées. Elle met en œuvre des anticorps conjugués à l'HRP, spécifiquement dirigés contre les cellules tumorales. L'acide indole acétique (IAA), substrat de l'enzyme, est employé comme prodrogue.

4.1. Schématiser une molécule d'anticorps de type Ig G mettant en évidence les chaînes polypeptidiques orientées et identifiées, les ponts disulfures, les domaines et les paratopes.

4.2. Illustrer la stratégie thérapeutique par un schéma annoté et commenté.

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 : Caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la peroxydase de raifort

1a : Horseradishperoxidase (HRP)

Classification : EC Number : 1.11.1.7 (Peroxidase)

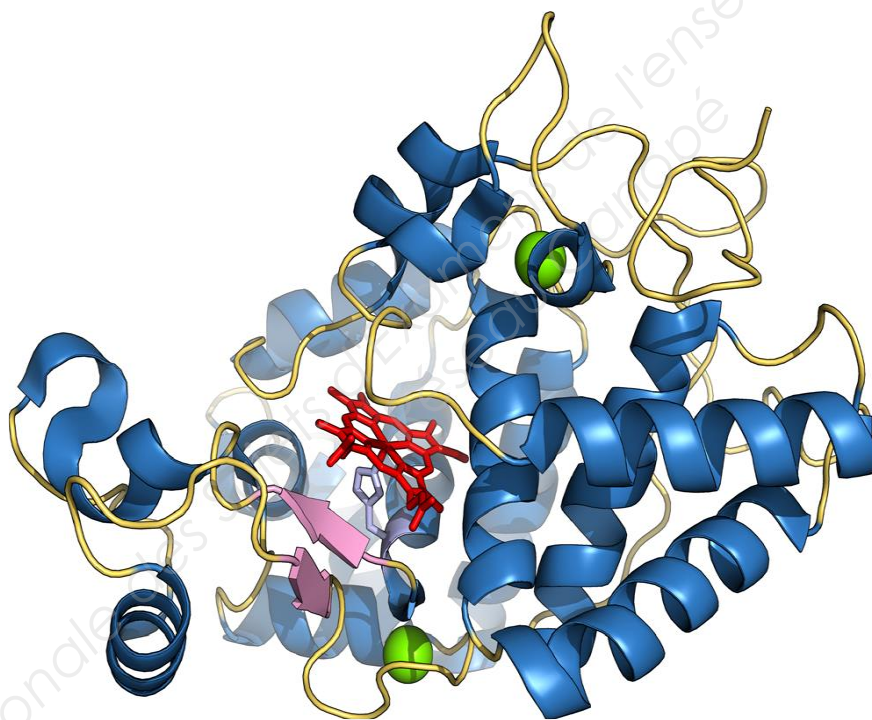
Reaction: $2 \text{ phenolic donor} + \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{ phenoxyl radical of the donor} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

HRP exists in at least 15 different isoenzymes in the horseradish root, of which the isoenzyme C1A is the most abundant and thus the most studied.

The monomeric isoenzyme C1A is a 34 kDa polypeptide comprising 308 aminoacids.

It contains a heme-group (with a Fe^{3+} ion) as prosthetic groups and 2 Ca^{2+} ions. It contains also four disulphide bridges.

1b : Structure of HRP C1A



The two calcium ions are shown as spheres.

The heme group lies between the distal and the proximal domain.

Florian W. Krainer & Anton Glieder An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) 99:1611–1625

<http://www.uniprot.org/align/>

	Sequence	Position
P00433	MHFSSSSSTLFTC--ITLIPLVCLILHASLSDA	58
Q42517	--MKTQTKVMGG--HVLITVFTLCMLCSAVRA	56
P17180	MGF---SPLISCSAMGALILSCLLLQASNSNA	57
	: : : : * : *	
	*** * : * . : ** . : : * : * : *	
P00433	DPRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDN	118
Q42517	EIRMAASLIRLHFHDCFVNGCDASVLLDGTN---	113
P17180	DPRIAASLLRLHFHDCFVNGCDASILLDN	117
	: * : *** : : ***** . ***** : *** : . : ** * * . ** . *** ** : : : : *	
P00433	SACPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAF	178
Q42517	NACPGVVS CADILT LAARDSVYLSGGPQWRVALGRKDGLVAN	172
P17180	RACPRTVSCADVLTIASQISVLLSGGPWWVPVPLGRRDSVEAF	177
	*** . ***** : ** : : : * * * : *** * * *** : * : * . ** : ** * :	
P00433	KDSFRNVGLNRRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYN	238
Q42517	IAKFAAVGLNIV-TDVVALSGAHTFGQAKCDLFSNRLF	231
P17180	KKAFADVGLNRPSDLVALSGGHTFGRAQCQFVTPRLYN	237
	* **** : * : ***** . ***** : : * : . ** : ** . : ** ** : * * * : :	
P00433	CPLNGNLSALVDFDLRTPITFDNKYYVNLLEEQKGLIQSDQ	297
Q42517	CPIGGNGNKTAPLDRNSTDAFDNNYFKNLLEGKGLLSSDQ	291
P17180	CPQNGN GTVLVNFVDVTPNTFDRQYYTNLRNGKGLIQSDQ	295
	** * * . . : * : ** . : : * : *** : . *** *** : * : * * * . : :	
P00433	NSTQTFFFNAFVEAMDRMGNITPLTGTQGQIRLNCRVVNSNS	353
Q42517	RSQYLFFRDFTCSMIRMGSL--VNGASGEVRTNCRVIN-----	327
P17180	SNTFAFFAGFVADAMIRMGNLRPLTGTQGEIRQNCRVVNSRI	349
	* * * * * : * * * * : * * * * * : * * * * * : *	

Propeptide sequence is underlined.

Identical positions : 141

Identity : 39,607 %

Similar positions : 85

Protein which is post-translationally modified by the cyclization of a N-terminal glutamine.

Protein containing covalently linked carbohydrates of various types.

Protein which is modified by the formation of four disulfur bonds.

Document 3 : Paramètres cinétiques de l'HRP pour différents substrats

<http://www.brenda-enzymes.org/>

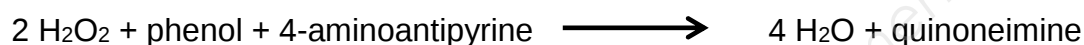
	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})
ABTS	0,18	736
Gaïacol	4,7	990
TMB	0,09	172

ABTS: 2,2' azino bis 3'ethyl benthiazoline 6 sulfonic acid

TMB: 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine

Document 4 : Protocole de dosage de l'HRP

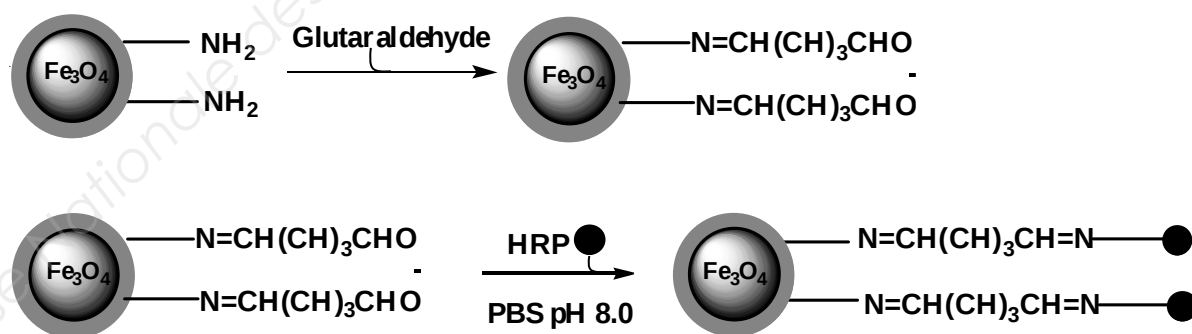
Reaction



HRP enzyme activity was measured using phenol, 4-aminoantipyrine (AAP), and hydrogen peroxide as substrates. The assay mixture contained 250 μL 9.6 mM AAP, 100 μL 100 mM phenol, 100 μL 2 mM hydrogen peroxide, 450 μL 100 mM phosphate buffer pH 7.4, and 100 μL enzyme solution. The approach in this assay was to provide all substrate concentrations at $10 \cdot K_M$ or more. The rate of reaction was measured by monitoring the rate of formation of the product which absorbed light at a peak wavelength of 510 nm upon addition of the enzyme; thus, one unit of activity (U) used in this study is defined as the number of μmol peroxide converted per min at pH 7.4 and 25°C . The extinction coefficient for quinoneimine is $6,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

WuY., TaylorK. E., BiswasN., and BewtraJ. K.. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998. 22(5):315-322.

Document 5 : Procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules magnétiques

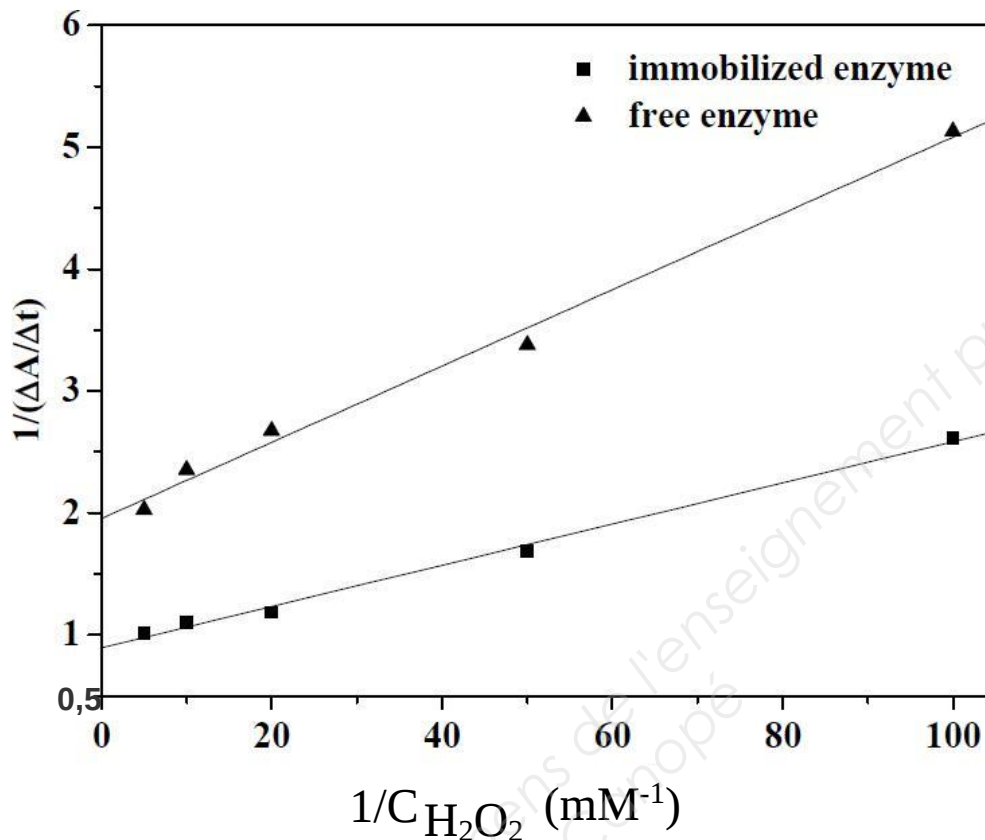


Des nanoparticules de magnétite (Fe₃O₄) sont recouvertes d'un polymère aminé puis soumises à l'action du glutaraldéhyde. L'HRP est finalement ajoutée en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 8.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH₂-Modified Magnetic Fe₃O₄/SiO₂ Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.

Document 6 à rendre avec la copie

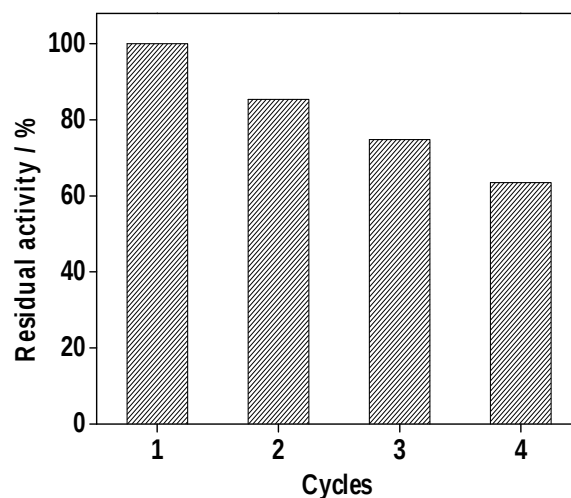
Document 6 : Détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée



Les activités enzymatiques ont été déterminées par une méthode colorimétrique.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH₂-Modified Magnetic Fe₃O₄/SiO₂ Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.

Document 7 : Étude de l'activité enzymatique résiduelle après recyclage de l'HRP immobilisée



Chang, Q., Tang, H. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH₂-Modified Magnetic Fe₃O₄/SiO₂ Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19, 15768-15782.