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

Base Nationale des Sujets d'examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

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**.

Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

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'ammener 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 ;

Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

- 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.

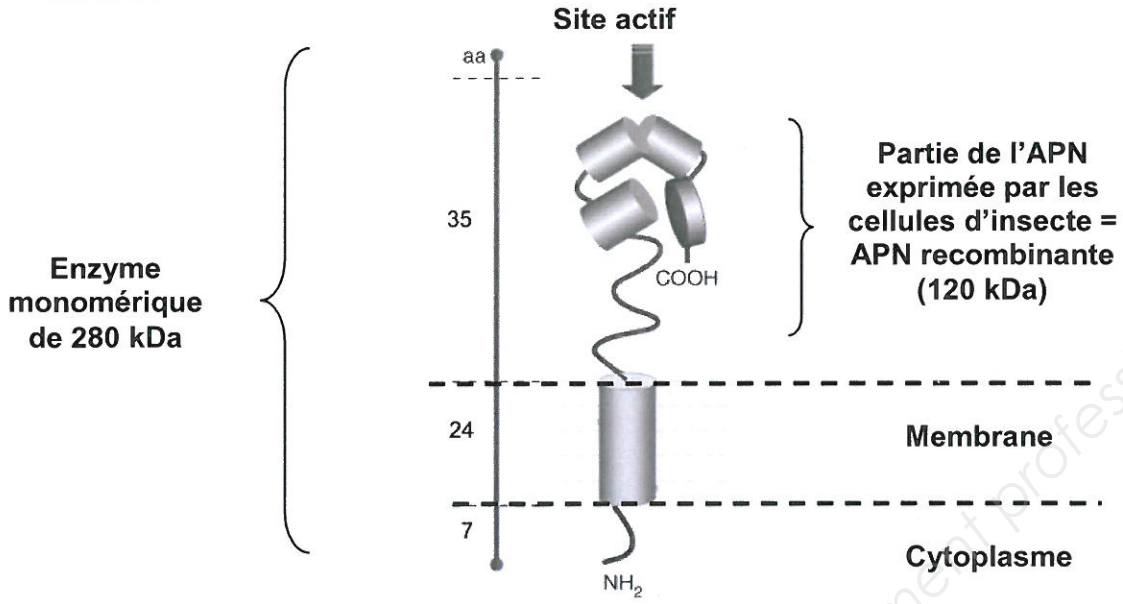
4.3 Indiquer, en le justifiant, le type d'inhibition probable exercée par le 7-amino-6-benzosubérone sur l'APN.

4.4 Après avoir rappelé la signification des paramètres cinétiques d'une enzyme, v_{imax} et K_M, expliquer comment varie chacun de ces paramètres lorsque l'enzyme est en présence de l' inhibiteur 7-amino-6-benzosubérone.

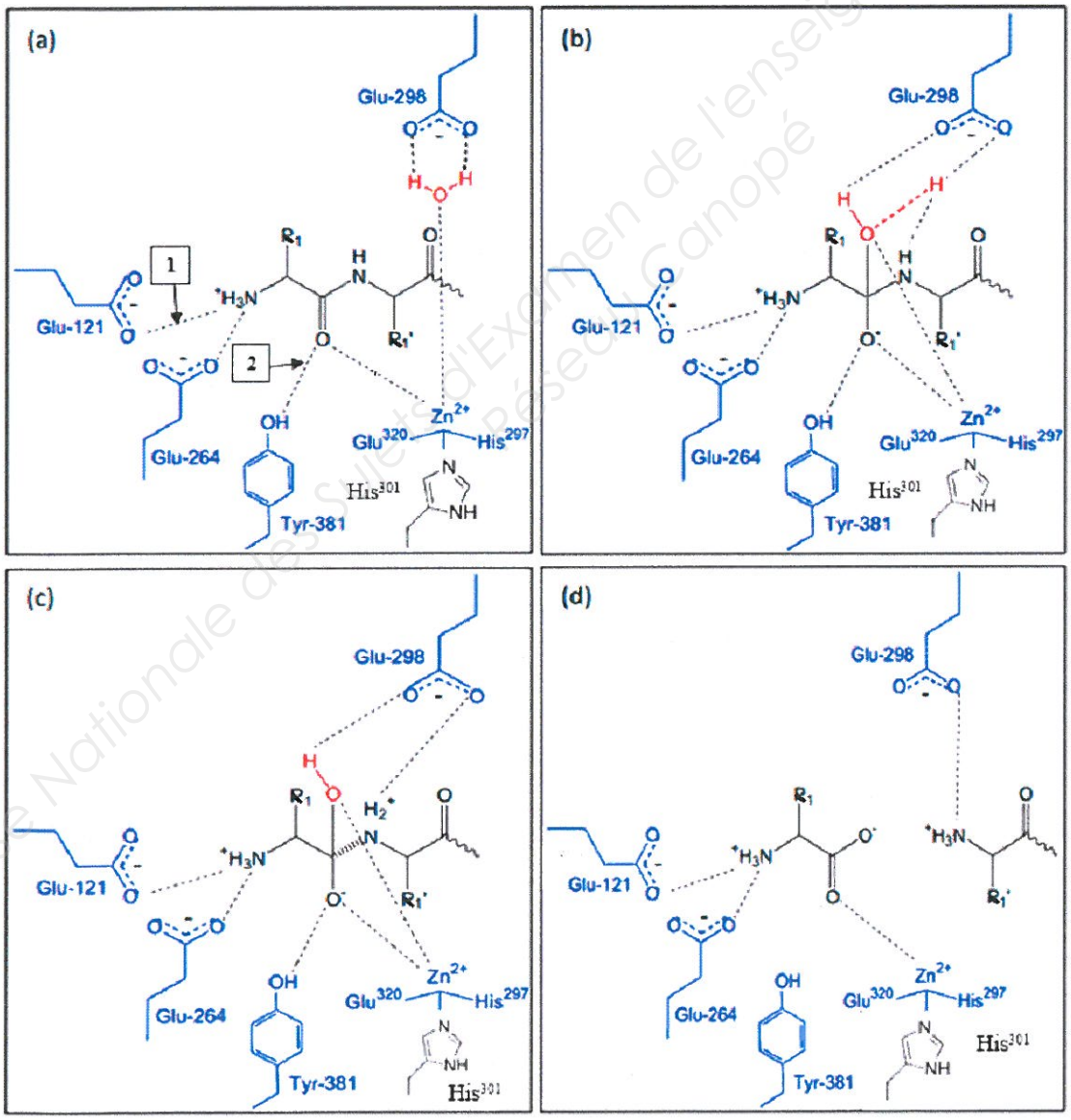
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Base Nationale des sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 1 : Structure schématique de l'APN



Document 2 : Mécanisme catalytique des aminopeptidases-N



Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel Réseau Canopé

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**.*

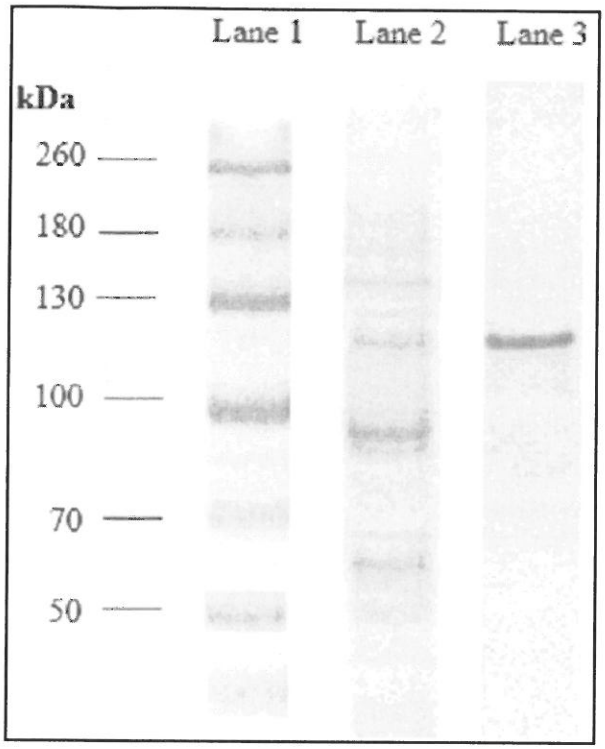
*6/ **Ultrafiltration sur cellule Amicon Ultra** de la fraction F3 (cellule composée d'une membrane ayant un seuil de coupure de 100 kDa). Après filtration, on obtient **la fraction F4** (V_{F4} =5 mL).*

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.

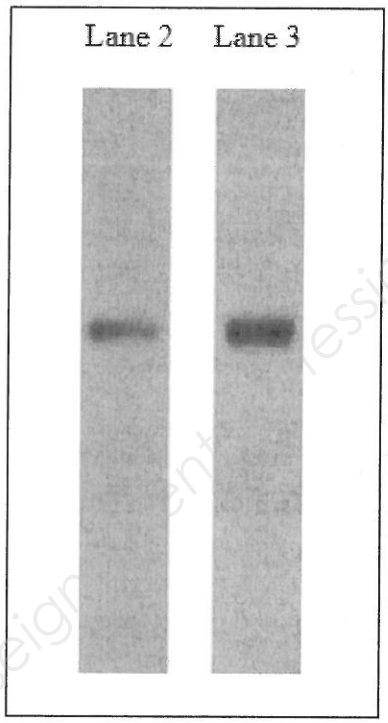
% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)	grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																
	% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559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

Base Nationale des sujets d'examen de l'enseignement professionnel Réseau Canopé

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).*

Base Nationale des sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

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 synthetised. 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.

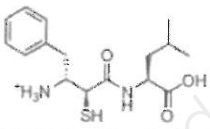
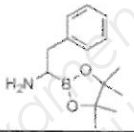
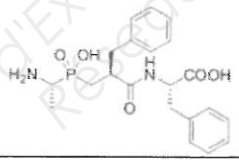
E + I ⇆ EI $\quad K_I = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]}$

K_I: EI complex dissociation constant

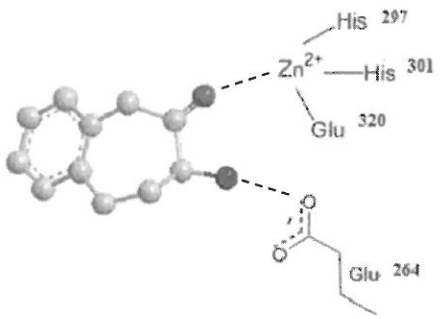
[E]: enzyme concentration

[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-benzosuberon	**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



Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.