



**LE RÉSEAU DE CRÉATION  
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Canopé de l'académie de Bordeaux  
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**  
**BIOTECHNOLOGIES**

***BIOCHIMIE 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'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français est autorisée.***

***L'utilisation d'une calculatrice est interdite.***

**Remarque importante :**

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

## Étude de phosphatases alcalines mutées, responsables de maladies des os et des dents (hypophosphatasies) chez l'homme

Chez l'homme, la phosphatase alcaline humaine « tissu non spécifique » (notée TNSALP) est une protéine ancrée dans la membrane plasmique, côté milieu extracellulaire, par l'intermédiaire d'un bras GPI (glycosyl phosphatidyl inositol). Elle catalyse la réaction d'hydrolyse d'une molécule de pyrophosphate, qui, à forte concentration, bloque le processus de minéralisation du milieu extracellulaire. Ainsi, certaines mutations du gène codant pour la TNSALP sont responsables de maladies affectant la minéralisation des os et des dents (hypophosphatasies).

### 1. Étude de la structure et de la synthèse de la TNSALP sauvage (10 points)

L'enzyme TNSALP est un homodimère non covalent. Chaque sous-unité (66 kDa) porte 3 chaînes glucidiques ce qui lui donne une masse moléculaire globale de 80 kDa. Les formes glycosylée et non glycosylée peuvent coexister dans le cadre d'une surexpression.

#### 1.1 Définir les termes « homodimère » et « non covalent ».

Des cellules COS-1 sont transfectées par un plasmide portant le gène **codant pour la protéine TNSALP sauvage**. Après 24 heures de culture, elles sont lysées par sonication à 4°C, puis le lysat est centrifugé à basse vitesse. Le surnageant obtenu, appelé homogénat cellulaire, est analysé par SDS-PAGE, suivi d'un western blot utilisant un anticorps anti-TNSALP.

#### 1.2 Présenter les étapes principales d'analyse de l'homogénat cellulaire.

#### 1.3 Expliquer pourquoi dans la plupart des cas une seule bande ou un nombre faible de bandes est observé après l'ajout d'anticorps.

L'électrophorèse SDS-PAGE est effectuée en conditions réductrices et en conditions non réductrices.

#### 1.4 Donner le nom et le rôle d'un agent réducteur utilisé pour pré traiter les échantillons en conditions réductrices.

Les résultats obtenus pour l'analyse de l'homogénat cellulaire contenant la protéine sauvage sont visualisés sur les pistes 1 et 5 du document 1.

#### 1.5 Expliquer pourquoi ces résultats sont en accord avec les données sur la structure de la protéine TNSALP sauvage.

Les trois résidus de la protéine TNSALP sauvage, correspondant à des sites de glycosylation, sont surlignés en gris sur le document 2. Le document 3 donne la correspondance entre le code à une lettre et le code à trois lettres des acides aminés.

#### 1.6 Donner le nom et la formule du résidu surligné **N** dans le document 2.

#### 1.7 Nommer la liaison reliant l'ose et le résidu **N** de la protéine glycosylée.

#### 1.8 Préciser le(s) compartiment(s) cellulaire(s) où se déroule cette glycosylation.

#### 1.9 Citer deux rôles joués par les chaînes glucidiques sur une glycoprotéine.

Le schéma du **document 4** représente le phénomène de translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique rugueux.

**1.10** Annoter ce schéma (**légendes 1 à 6 à recopier sur la copie**).

Les 17 premiers résidus de la séquence de la TNSALP sauvage délimitent le peptide signal.

**1.11** À l'aide des **documents 2 et 3**, relever les caractéristiques de cet élément.

**1.12** Citer les étapes successives du phénomène représenté sur **le document 4**.

## 2. Étude des mutants de la protéine TNSALP (7 points)

Chez certains patients atteints d'hypophosphatasie plus ou moins sévère, des protéines mutantes ont été isolées :

- TNSALP (R 433 H) : substitution de l'arginine 433 par une histidine
- TNSALP (R 433 C) : substitution de l'arginine 433 par une cystéine

Des cellules COS-1 sont utilisées pour produire les protéines TNSALP mutantes, selon les mêmes étapes que pour la protéine sauvage.

Pour les protéines sauvage et mutantes (R 433 H et R 433 C), la mesure de l'activité spécifique dans les homogénats cellulaires est effectuée selon le mode opératoire du **document 5**.

- 2.1** En utilisant le mode opératoire fourni, donner la formule littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique, CAC, en  $U \cdot mL^{-1}$  d'homogénat cellulaire. Justifier les unités et préciser les valeurs numériques des volumes intervenant dans cette formule.
- 2.2** Calculer les activités spécifiques, AS, en  $U \cdot mg^{-1}$ , pour chaque forme protéique, à l'aide des résultats du **document 6**.
- 2.3** Commenter les activités spécifiques obtenues, en tenant compte des substitutions distinguant les formes sauvages et mutées.

Les TNSALP humaines sauvages contiennent 5 résidus cystéines (C 102, C 122, C 184, C 472 et C 480) dont la position est très conservée entre les différentes isoenzymes connues. Chaque sous-unité de la protéine sauvage contient 5 cystéines ; seule la cystéine 102 n'est pas impliquée dans un pont disulfure.

Les protéines mutantes (R 433 H et R 433 C) sont analysées de la même façon que la protéine sauvage, par western blot. Les résultats sont présentés dans le **document 1 (pistes 2, 3, 6 et 7)**.

- 2.4** Définir la notion d'isoenzyme.
- 2.5** Comparer les résultats obtenus pour ces mutants à ceux de la protéine sauvage.
- 2.6** Proposer une hypothèse permettant d'expliquer les modifications structurales observées pour les mutants R 433 C.
- 2.7** Schématiser (formule semi-développée) un pont disulfure formé entre deux cystéines.

Un double mutant est créé à partir du mutant TNSALP (R 433 C) pour lequel le résidu cystéine C 102 est substitué par une sérine : **TNSALP (R 433 C ; C 102 S)**. La protéine correspondante est analysée par western blot, selon les mêmes conditions que les autres protéines : les résultats sont donnés dans le **document 1 (pistes 4 et 8)**.

- 2.8** La cystéine 102 participe-t-elle à la modification structurale observée pour les mutants (R 433 C) et (R 433 C ; C 102 S) ? Justifier.

- 2.9 Représenter schématiquement la structure quaternaire des protéines des deux mutants TNSALP (R 433 C), TNSALP (R 433 C ; C 102 S) et de la protéine sauvage, en précisant la position des ponts disulfures intra et/ou intercaténaire(s) (intra et inter chaînes). Représenter les liaisons reliant les sous-unités.

**Données** : résidus cystéines reliés par des ponts disulfures C 122-C 184 et C 472-C 480

### 3. Utilisation de l'enzyme TNSALP (R 433 H) en dosage immuno-enzymatique (2 points)

L'enzyme TNSALP (R 433 H) est intéressante pour sa forte activité. On envisage de l'utiliser comme marqueur dans une technique ELISA.

Les premières étapes du dosage d'un antigène par compétition en microplaques sont les suivantes :

- Etape 1 : fixation de l'anticorps spécifique (en quantité limitante)
- Etape 2 : saturation de la microplaque avec de la gélatine

3.1 Représenter l'étape 3 de compétition.

3.2 L'activité enzymatique mesurée diminue en fonction de la concentration en antigène à doser. Justifier cette observation.

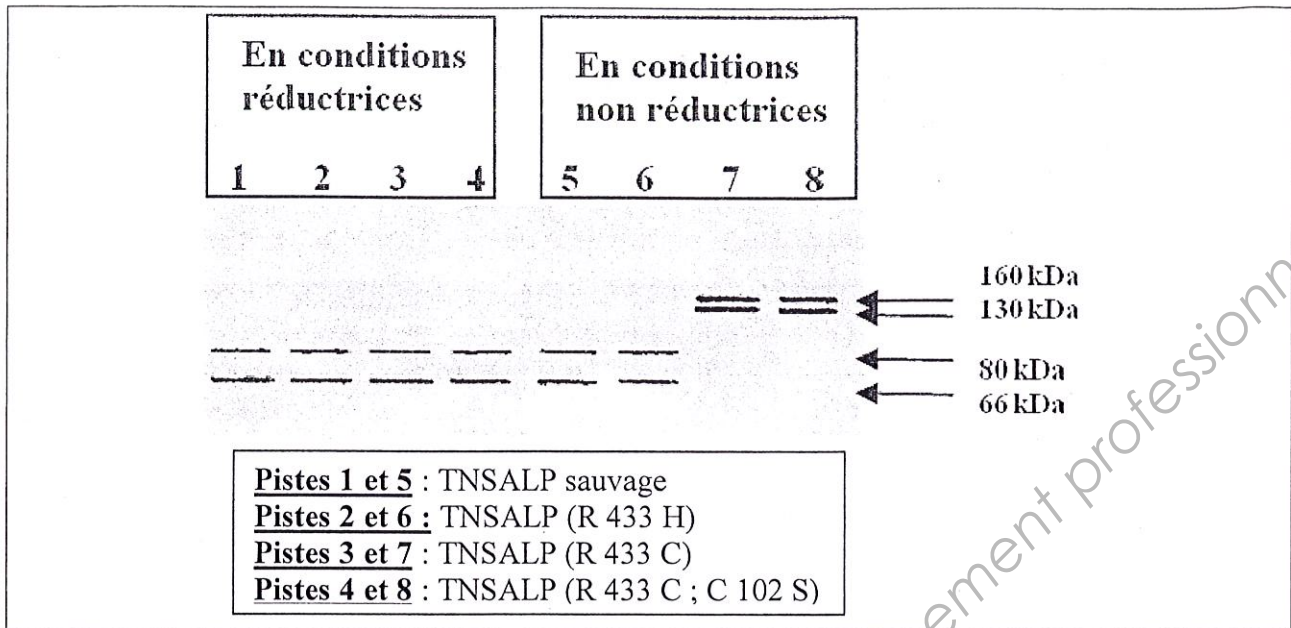
3.3 Préciser le rôle de la gélatine.

3.4 Les étapes 1, 2 et 3 se terminent par un lavage. Donner le rôle du lavage dans l'étape 3.

**Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition (1 point)**

## Document 1

Analyse de la protéine sauvage et des protéines mutées par SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices couplé à un western blot



## Document 2

## Séquence de la protéine TNSALP sauvage

```

MISPFVLVAIGTCLTNS      LVPEKEKDPK YWRDQAQETL KYALELQKLN TNVAKNVIMF
                    10      20      30      40
LGDGMGVSTV TAARILKGQL HHPNPEETRL EMDKPRFVAL SKTYNTNAQV PDSAGTATAY
                    50      60      70      80      90      100
LCGVKANEGT VGVSAATERS RCNTTOGNEV TSILRWAKDA GKSVGIVTTT RVNHATPSAA
                    110     120     130     140     150     160
YAHSADRDWY SDNEMPEEAL SQCKDIAYQ LMHNIRDIDV IMGGGRKMYM PKNKTDVEYE
                    170     180     190     200     210     220
SDEKARGTRL DGLDLVDTWKSEF PRYKSHFIW NRTELLTLDP HNVDYLLGLF EPGDMQY
                    230     240     250     260     270     280
ELNRNNVTDP SLSEMVVVAI QILRKNPKGF FLLVEGGRID HGHHEGKAKQ ALHEAVEMDR
                    290     300     310     320     330     340
AIGQAGSLTS SEDTLTVVTA DSHVFTFFGG YTPRGN SIFG LAPMLS DTDK KPFTAILYGN
                    350     360     370     380     390     400
GPGYKVVGGE RENVMVDYA HNNYQAQSAV PLRHETHGGE DVAVFSKGPM AHLLHGVHEQ
                    410     420     430     440     450     460
NYVPHVMAYA ACIGANLGH C APASSAGSLA AGPLLLALAL YPLSVLF
                    470     480     490     500

```

*Le peptide signal est représenté en gras.*

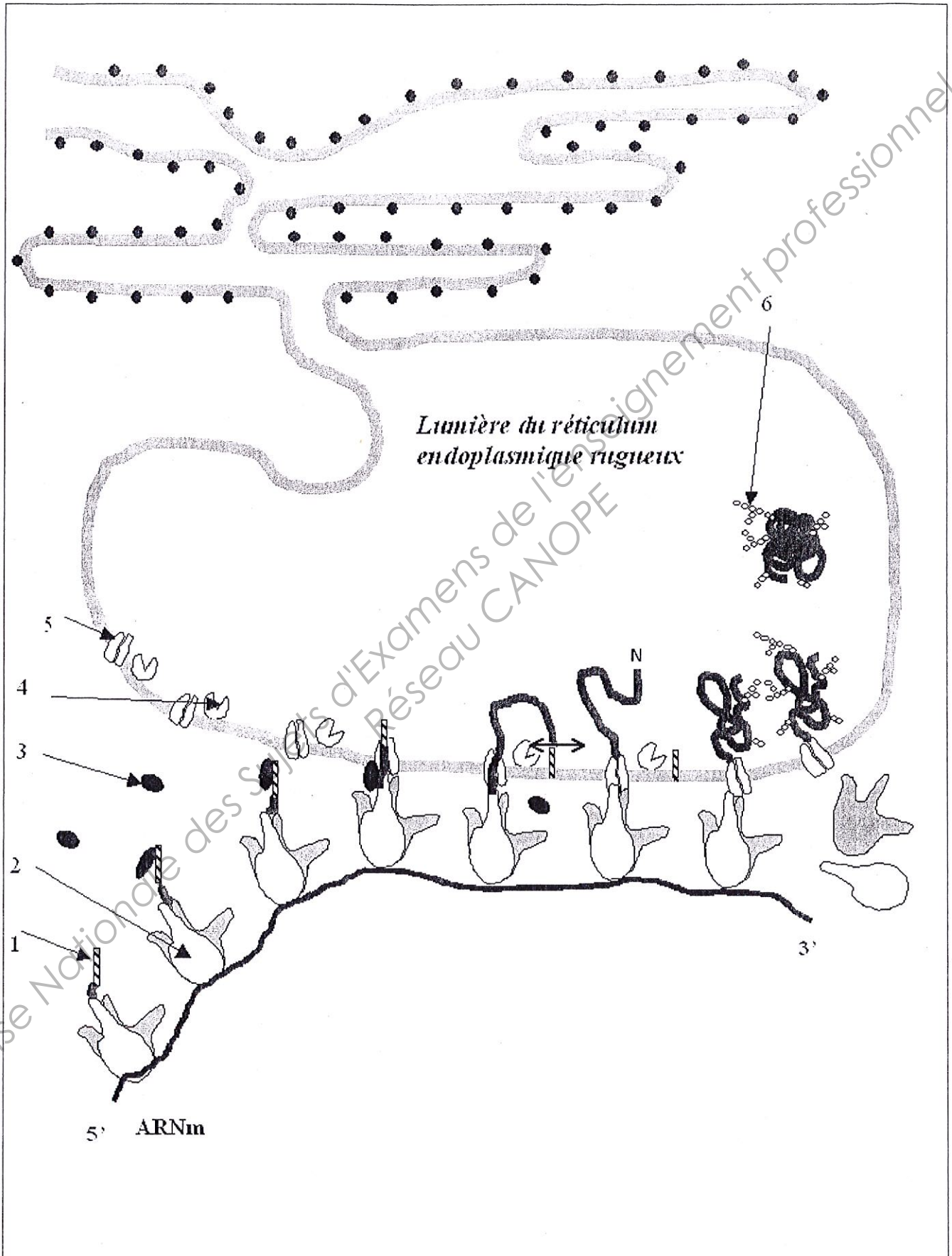
## Document 3

Correspondance entre le code à une lettre et le code à 3 lettres de certains acides aminés

<b>M</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>N</b>
<b>Met</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Pro</b>	<b>Phe</b>	<b>Leu</b>	<b>Val</b>	<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Cys</b>	<b>Asn</b>

Document 4

Représentation de la synthèse et de la translocation de la protéine TNSALP dans le réticulum endoplasmique rugueux



## Document 5

## Mesure de l'activité spécifique des enzymes TSNALP sauvage et mutantes

**Protocol :**

*Alkaline phosphatase was assayed at pH 10.0 using pNPP (para-nitrophenyl phosphate ou nitro-4 phenyl phosphate) as substrate. The reaction mixture contained :*

- 0.1 mL of pNPP (10 mM)
- 0.3 mL of 2-amino-2-methyl propanol / HCl buffer (0,5 M) with MgCl<sub>2</sub> (2 mM)
- 0.1 mL of cellular homogenate

*Incubation was at 37 °C for 15 min, after which time 0.5 mL of 0.75 M NaOH was added to each tube. Absorbancies were measured at 410 nm ( $\epsilon$  pNP at 410 nm = 18 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).*

*One unit of alkaline phosphatase is that quantity of enzyme which releases 1  $\mu$ mol of p-nitrophenol per min.*

## Document 6

## Détermination des activités spécifiques des protéines mutantes et sauvage

	Concentration d'activité catalytique en U par mL d'homogénat cellulaire	Concentration massique en protéines en mg par mL d'homogénat cellulaire (méthode de Folin- Lowry)
TNSALP sauvage	1500	5,0
TNSALP (R 433 H)	3000	6,0
TNSALP (R 433 C)	612	6,0