

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

SESSION 2021

DUREE DE L'ÉPREUVE : 2h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français,
- tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2021
U.3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	BOE3BP	Page : 1/10

Les protéines Tau et la maladie d'Alzheimer

Les protéines Tau, très solubles et non repliées, sont naturellement présentes en abondance dans les axones. Leur rôle physiologique est de stabiliser les microtubules axonaux en s'y associant.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative présentant deux caractéristiques pathologiques principales : la présence de plaques amyloïdes extracellulaires et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs : NeuroFibrillary Tangles). Ceux-ci sont dus à l'autoassemblage des protéines Tau, favorisé par une hyperphosphorylation de Tau.

1 Structure des protéines Tau et formation des complexes NFTs (7 points)

Le **document 1** présente schématiquement le mode de formation des complexes NFTs et les enzymes intervenant dans les modifications de la structure des protéines Tau.

1.1 Expliquer les étapes conduisant à la formation des NFTs.

Il existe 6 isoformes majeures des protéines Tau. Elles sont toutes composées de deux domaines dont un permettant la fixation aux microtubules. Celui-ci contient un nombre variable de répétitions de séquences R, toutes identiques. Le **document 2** présente la structure des différentes isoformes des protéines Tau.

1.2 Argumenter la nomenclature utilisée pour les isoformes des protéines Tau en s'appuyant sur leur composition structurale. Dégager la notion de domaine protéique.

Les différents sites de phosphorylation présents sur ces protéines sont répertoriés dans le **document 3**.

1.3 Identifier les trois résidus aminoacyles pouvant être phosphorylés. Représenter la structure développée de l'un d'entre eux sous formes phosphorylée et non phosphorylée.

Le **document 4** présente une étude des différentes isoformes phosphorylées des protéines Tau chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

1.4 Présenter les étapes principales de la technique Western Blot.

1.5 Schématiser ou expliquer l'interaction des anticorps AT100 et AD2 avec une protéine Tau dans les deux situations présentées. Analyser précisément le document pour montrer la modification de la protéine Tau chez un patient atteint de la maladie.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2021
U.3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	BOE3BP	Page : 2/10

2. Production d'une protéine Tau recombinante (5 points)

Pour l'étude des fonctions moléculaires, biochimiques et cellulaires des protéines Tau, il est nécessaire de disposer d'une grande quantité de cette molécule. Pour ce faire, une production en bioréacteur est réalisée à partir d'une souche d'*E coli* transformée exprimant une protéine Tau couplée à une étiquette « 6His ». Les cellules sont lysées par sonication et le lysat est traité selon la procédure présentée dans le **document 5**.

2.1 Expliquer comment la sonication permet de lyser les cellules.

2.2 Préciser le rôle de chaque étape de la chromatographie Ni-NTA.

2.3 En déduire le principe de l'élution.

Après la purification sur colonne Ni-NTA de la protéine Tau, une seconde procédure décrite dans le **document 6**, est mise en œuvre.

2.4 Dégager le principe et l'intérêt de chacune des deux étapes de cette procédure.

3 Stratégies thérapeutiques (6 points)

Plusieurs pistes thérapeutiques sont envisagées pour traiter les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Modifications de la structure tridimensionnelle des protéines Tau

Une courte séquence de 6 aminoacides VQIVYK (séquence appelée PHF6) est impliquée dans l'autoassemblage organisé des protéines Tau.

Le bleu de méthylène, actuellement en essai clinique de phase 3 contre la maladie d'Alzheimer, est une molécule qui oxyde spécifiquement certaines cystéines des protéines Tau, notamment les C291 et C322. Cette oxydation conduit à la désagrégation des NFTs. Le **document 7** présente une partie de la séquence de la protéine Tau incluant ces cystéines.

3.1 Proposer une hypothèse expliquant la désagrégation des NFTs.

3.2 Schématiser ou expliquer le changement de conformation de Tau suite à l'oxydation des deux cystéines pour former une cystine intrachaine en précisant la localisation de la séquence PHF6.

Inhibition de la protéolyse des protéines Tau

Les caspases sont des protéases à cystéine clivant les protéines après un résidu aspartyle. Ces enzymes reconnaissent spécifiquement les motifs peptidiques « Xaa₁-Xaa₂-Asp » avec Xaa₁ hydrophile et Xaa₂ hydrophobe.

Les caspases sont impliquées dans des modifications post-traductionnelles des protéines Tau, favorisant leur agrégation. Il a été montré que le bleu de méthylène peut également inhiber l'action de ces enzymes. L'effet du bleu de méthylène sur la caspase a été déterminé par mesure des paramètres cinétiques de l'enzyme (**document 8**).

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2021
U.3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	BOE3BP	Page : 3/10

- 3.3 Montrer que le composé Ac-VEID-Afc est un substrat de la caspase.
- 3.4 Déterminer la vitesse initiale maximale dans chacune des conditions, en précisant la méthode utilisée.
- 3.5 Comparer les K_M de la caspase dans les trois conditions testées.
- 3.6 En déduire le mode d'action du bleu de méthylène.

Sélection de peptides ayant une action sur l'agrégation des protéines Tau

Certains peptides pourraient être utiles pour développer de nouvelles voies thérapeutiques. Ces peptides se fixent sur la séquence PHF6 des protéines Tau.

- 3.7 Montrer, à partir du **document 1**, comment ces peptides limitent la formation des NFTs.

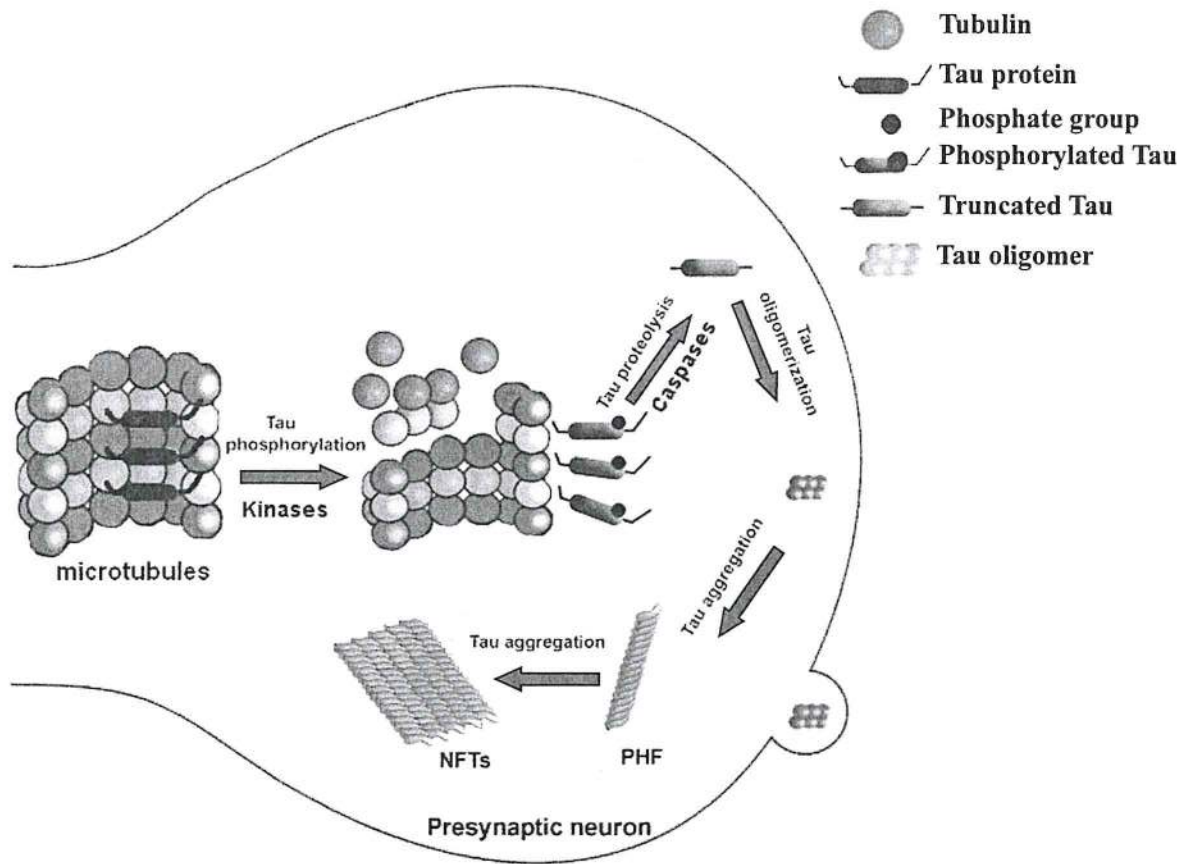
L'efficacité de trois peptides a été testée en utilisant un marqueur fluorescent dont la fluorescence est intensifiée en présence d'agrégats de Tau (**document 9**).

- 3.8 Analyser le document pour identifier le peptide ayant l'efficacité maximale. Proposer une explication de la différence observée sur l'effet de TD28 et TL28.

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

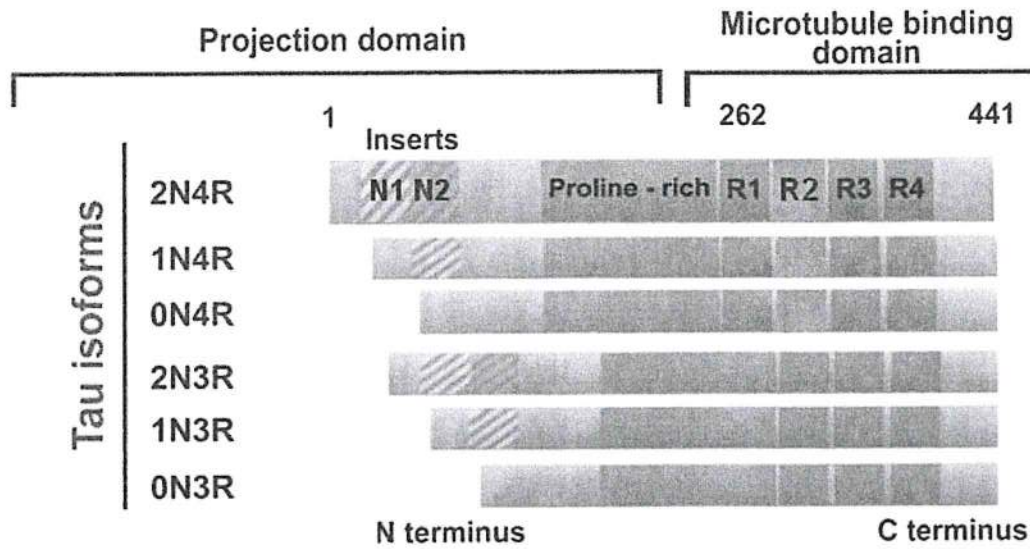
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : Représentation schématique du mode de fonctionnement des protéines Tau

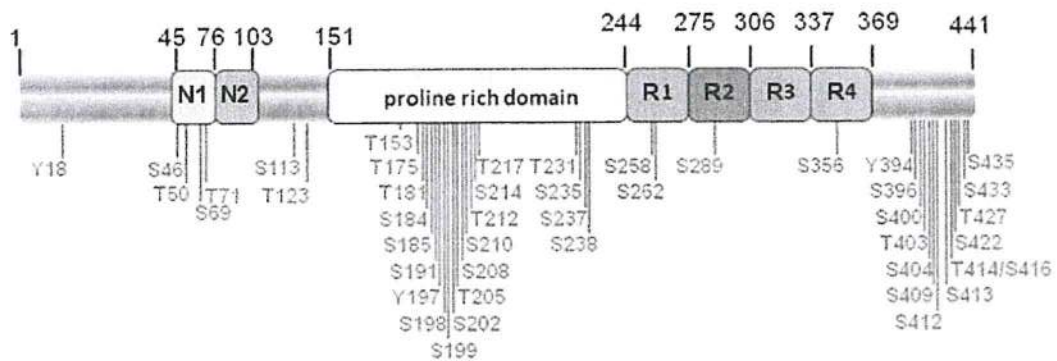


PHF : paired helical filament
 NFTs : NeuroFibrillary Tangles

Document 2 : Structure des isoformes des protéines Tau



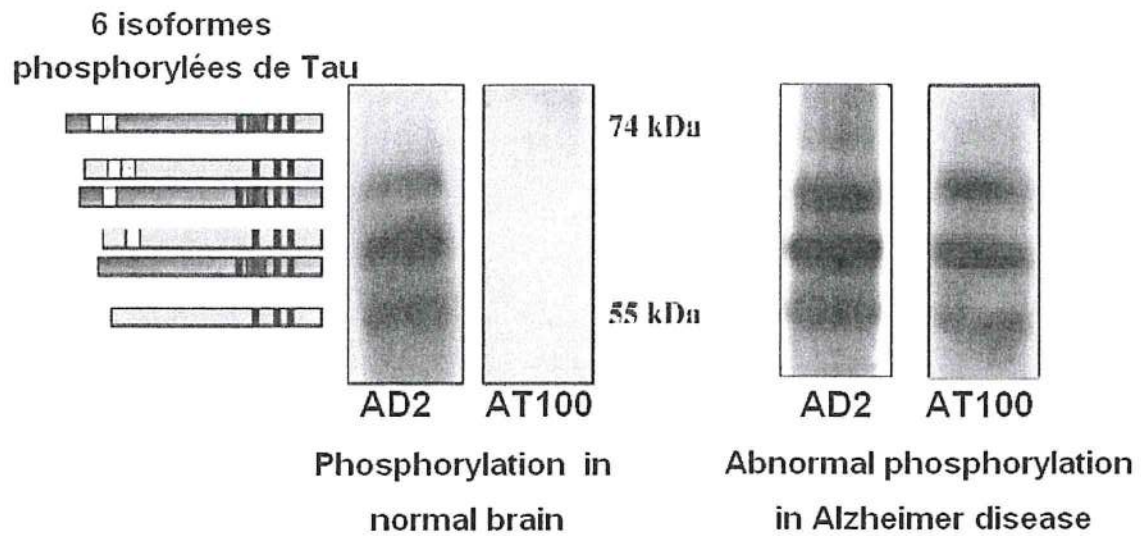
Document 3 : Sites Potentiels de phosphorylation des protéines Tau



Ala	A	Gly	G	Pro	P
Arg	R	His	H	Ser	S
Asn	N	Ile	I	Thr	T
Asp	D	Leu	L	Trp	W
Glu	E	Lys	K	Tyr	Y
Cys	C	Met	M	Val	V
Gln	Q	Phe	F		

Code international des acides aminés

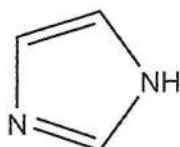
Document 4 : Étude par Western Blot de la phosphorylation des isoformes de Tau dans la maladie d'Alzheimer



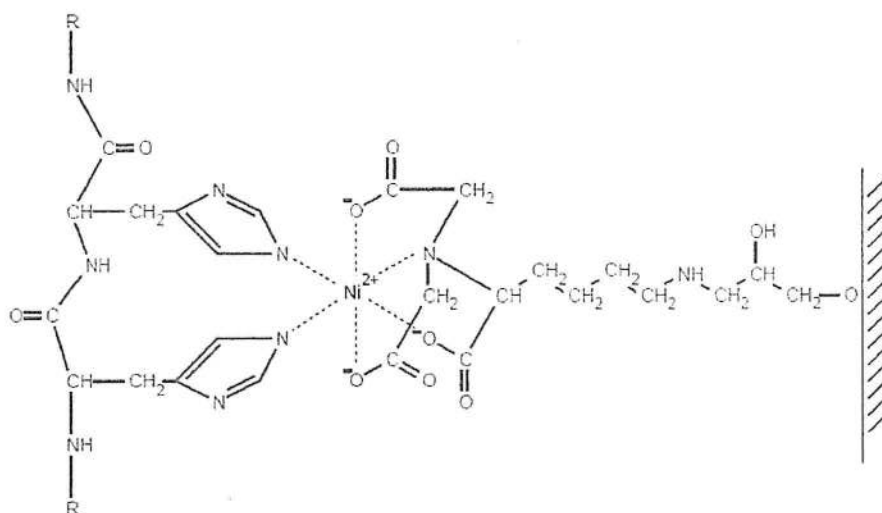
Les phosphorylations sont révélées avec les anticorps radiomarqués AT100 (spécifiques de l'épitope comprenant T212 et S214 phosphorylées) et AD2 (spécifiques de l'épitope comprenant S396 et S404 phosphorylées).

Document 5 : Protein purification by Ni-NTA chromatography

Imidazol :



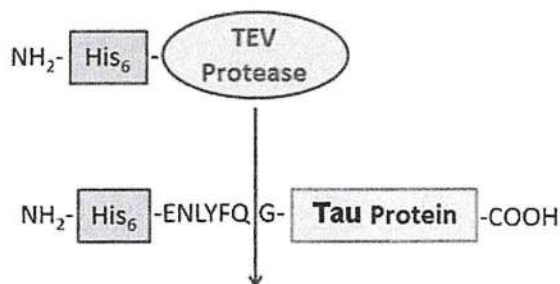
Ni-NTA interaction with 6His tag :



A Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) column was used. Chelating sepharose resin was charged with 10 mM $\text{NiCl}_2/\text{CH}_3\text{COONa}$ pH 4.0 and equilibrated with buffer A (50 mM Na_2PO_4 , pH 7.0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole) before addition of the lysat. The column was re-washed with buffer A, followed by buffer B (50 mM Na_2PO_4 pH 7.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole) and the protein eluted with buffer C (50 mM Na_2PO_4 pH 7.0, 500mM NaCl, 500mM imidazole).

Document 6 : Elimination de l'étiquette « 6His » de la protéine Tau

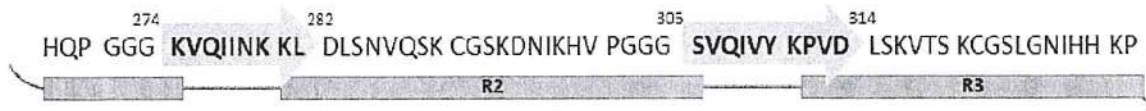
- La protéine "Tau-6His" éluée précédement est ensuite dialysée pendant 10 heures contre une solution tampon (50 mmol.L^{-1} , Tris HCl pH 7,5, 100 mmol.L^{-1} NaCl), en présence de 25 mg.mL^{-1} de protéase "TEV-6His*". Cette protéase permet de cliver l'étiquette histidine de "Tau-6His".



- Après dialyse, le contenu du boudin de dialyse est déposé sur colonne à Ni-NTA.

* Protéase extraite du tabac (*Tobacco Etch Virus*) et modifiée par une étiquette de 6 Histidines.

Document 7 : Séquence d'une partie de la protéine Tau



Document 8 : Etude cinétique de l'activité de la caspase en présence de bleu de méthylène

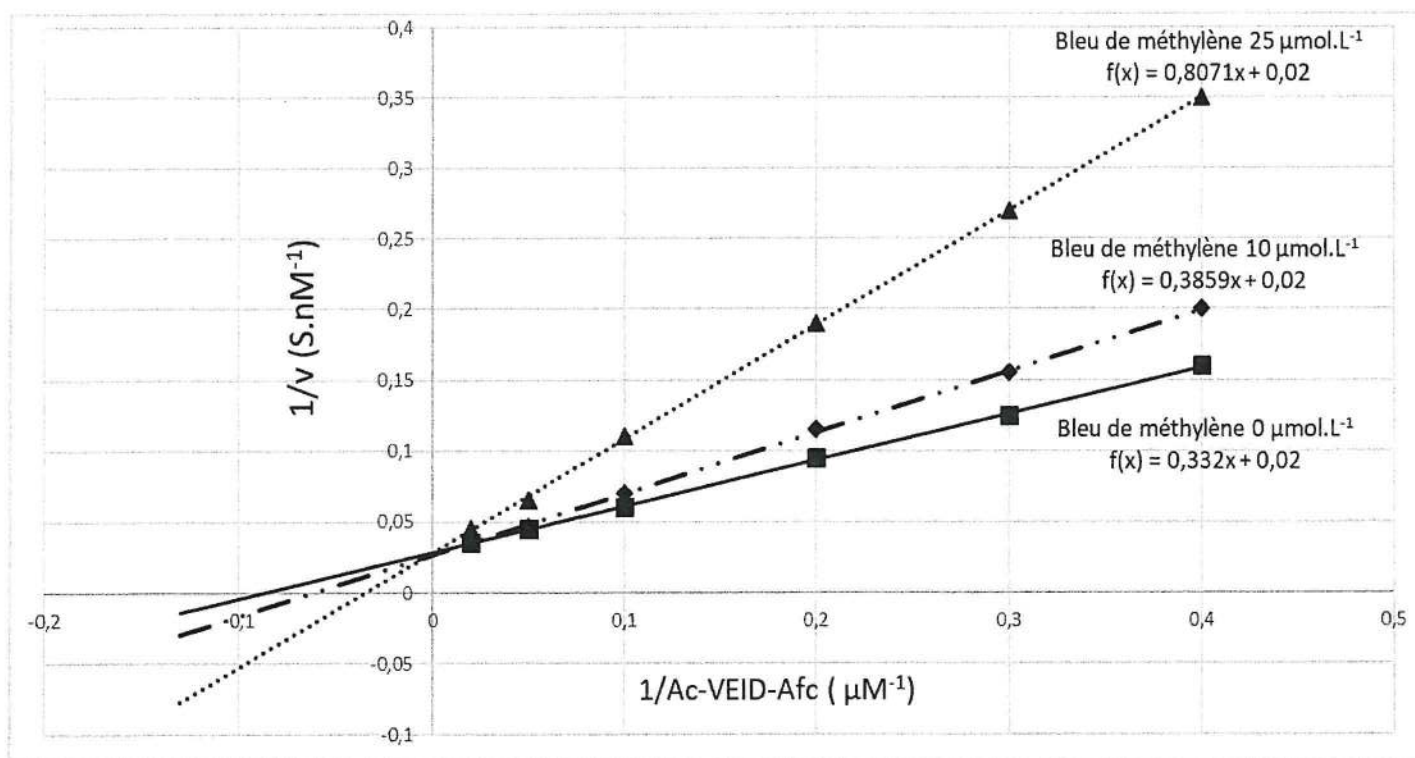
Méthode de dosage d'activité de la caspase

L'activité de la caspase a été mesurée *in vitro* par dosage fluorogénique avec le substrat Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-7-Amino-4-trifluorométhyl-couramin (Ac-VEID-Afc) dans du tampon pH 7,2.

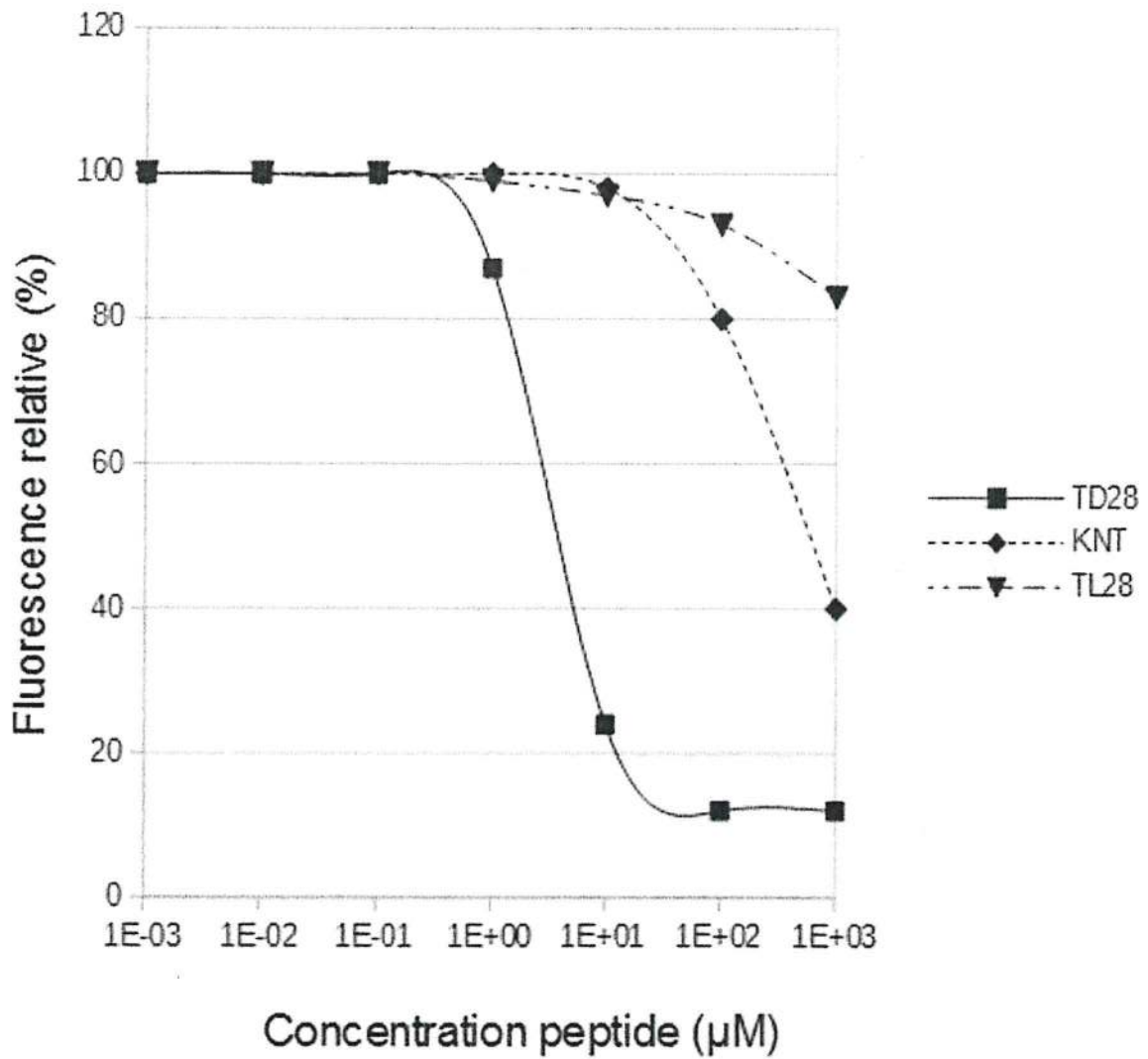
Le mélange réactionnel est constitué de 20 nmol.L⁻¹ de Caspase et de concentrations variables en substrat, pour trois concentrations en bleu de méthylène. L'activité est mesurée dans une plaque noire de 96 puits, incubée à 37°C et lue toutes les 2 minutes pendant 100 minutes.

L'Afc libre est fluorescente : λ_{\max} Excitation = 400nm, λ_{\max} Emission = 505nm.

Résultats



Document 9 : Action des peptides TD28, KNT et TL28 sur la protéine Tau



TD28 : TTSLQMRLYYPP (D-aminoacyls)

TL28 : TTSLQMRLYYPP (L-aminoacyls)

KNT : KNTQPQRKLRLS (D-aminoacyls)

