

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

SESSION 2023

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français.
- calculatrice sans mémoire, « type collègue ».

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.

	Intitulé des capacités évaluées	points
C1	Maitrise des connaissances scientifiques et techniques	3
C2	Aptitude à organiser et à exposer les connaissances	4
C3	Qualité de l'analyse et du traitement des données fournies	6
C4	Pertinence et cohérence des solutions proposées	5
C5	Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition	2

La carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), une enzyme cible pour le traitement de la « maladie du foie gras »

La « maladie du foie gras » ou stéatose hépatique résulte de l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes. Une enzyme candidate, la CPT1A ou carnitine palmitoyl transférase 1A, est une cible potentielle pour lutter contre la maladie. L'enzyme CPT1A est localisée dans la membrane externe des mitochondries. Elle est impliquée dans la première réaction de la β -oxydation, qui est la voie métabolique de dégradation des acides gras. Elle est notamment régulée par le malonyl CoA, un intermédiaire de la voie de synthèse des acides gras.

Information préliminaire :

Le document ressource en **annexe page 5** « Les 20 principaux acides aminés constitutifs des protéines » est utile pour traiter plusieurs questions du sujet.

1. Régulation de la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) par le malonyl-coA.

La carnitine palmitoyl transférase humaine se présente sous trois isoformes : hépatique (CPT1A), musculaire (CPT1B) et cérébrale (CPT1C).

1.1. Expliquer le terme d'isoforme. (C1)

Le **document 1** présente les premières étapes de la β -oxydation des acides gras à longues chaînes, impliquant notamment la CPT1A.

1.2. Identifier le groupement transféré par la CPT1A. (C2)

Une étude cinétique a été réalisée en présence de différentes concentrations en carnitine afin d'identifier le type d'inhibition exercé par le malonyl-CoA sur la CPT1A. Les résultats sont présentés dans le **document 2**.

1.3. Poser les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques pour déterminer le K_M et le v_{max} apparents pour les trois concentrations en malonyl-CoA testées. (C3, C4)

1.4. Analyser les résultats pour déduire le type d'inhibition exercé par le malonyl-CoA sur l'enzyme CPT1A. (C1, C3)

Le **document 3** présente un mécanisme simplifié de contrôle de la lipogenèse et de la β -oxydation des acides gras dans le foie. L'enzyme CPT1A est impliquée dans la β -oxydation et est régulée par le malonyl-CoA.

- 1.5. Expliquer en quoi la suppression de l'effet inhibiteur du malonyl-CoA sur la CPT1A, pourrait représenter une stratégie thérapeutique efficace dans la prévention des stéatoses hépatiques. (C4)

2. Production d'une enzyme CPT1A mutée

L'objectif est de vérifier que l'enzyme mutée insensible au malonyl-CoA est fonctionnelle. Dans ce but, il est nécessaire de produire en grande quantité l'enzyme mutée et l'enzyme sauvage pour les comparer. Des hépatocytes exprimant l'enzyme sauvage CPT1A ou exprimant l'enzyme mutée, CPT1Amt sont préparés.

Trois lots d'hépatocytes de rats sont transfectés par des adénovirus (Ad) recombinants codant soit pour une enzyme CPT1A sauvage (CPT1-wt), soit pour une enzyme CPT1A mutée (CPT1mt) soit par un adénovirus (Ad) recombinants codant pour cette enzyme (Ad- β -gal).

Après culture des hépatocytes transfectés, puis extraction de leur contenu cellulaire, un Western blot est mis en œuvre. Les résultats obtenus sont présentés sur le **document 4**.

Un autre lot d'hépatocytes non transfecté est également analysé.

Deux contrôles sont réalisés pour l'analyse par Western blot :

- des mesures de l'expression de la β galactosidase,
- des mesures de l'expression de CPT2, protéine constitutive des mitochondries.

- 2.1 Expliquer le rôle de chacun des contrôles. (C4)
- 2.2 Analyser les résultats obtenus par Western blot pour chacun des quatre lots d'hépatocytes pour un nombre de particules infectieuses de 2,5 ip/cell. Conclure sur l'efficacité d'expression de CPT1wt et de CPT1mt. (C3)

L'activité « carnitine palmitoyl transférase » (CPT) est déterminée pour chacun des extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes. En parallèle, un Western blot est mis en œuvre dans le but d'estimer les quantités d'enzyme contenues dans les extraits cellulaires. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5**.

- 2.3 Expliquer la présence d'une activité CPT non nulle pour les hépatocytes non transfectés et pour les hépatocytes transfectés par Ad- β -gal. (C4)
- 2.4 A partir des résultats du Western blot d'une part et des activités enzymatiques spécifiques de CPT d'autre part, montrer que ces activités sont équivalentes pour les enzymes mutée et sauvage. Conclure. (C3)

3. Mode d'action du malonyl-CoA sur la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A)

L'obtention d'une grande quantité de CPT1A sauvage et muté permet d'étudier le mécanisme d'inhibition par le malonyl-CoA au site de régulation. Ce mécanisme implique deux domaines de CPT1A, l'un positionné à l'extrémité N terminale, l'autre positionné à l'extrémité C terminale.

3.1 Expliquer la notion de domaine protéique. (C1)

Afin de montrer la participation des domaines Nter et Cter dans la fixation du malonyl-CoA, plusieurs enzymes mutantes ont été produites. Dans l'enzyme sauvage, il a été montré que les résidus Glu²⁶ et Lys⁵⁶¹, appartenant respectivement au domaine Nter et au domaine Cter, interviennent dans la fixation du malonyl-CoA à l'enzyme. Leur position spatiale dans l'enzyme en présence de malonyl-CoA, est présentée dans le **document 6**.

3.2 Représenter l'état d'ionisation de la chaîne latérale des acides aminés Glu et Lys, à pH 7. Argumenter la réponse. En déduire le type d'interaction possible entre ces deux résidus. (C2)

Pour étudier l'interaction entre CPT1A et le malonyl-CoA, des enzymes mutées pour l'un ou les deux résidus Glu²⁶ et Lys⁵⁶¹, ont été produites par mutagenèse dirigée :

- Dans l'enzyme « E26K » : le résidu E en position 26 est remplacé par un résidu K,
- Dans l'enzyme « K561E » : le résidu K en position 561 est remplacé par un résidu E,
- Dans l'enzyme « E26K/K561E » : les deux résidus sont mutés.

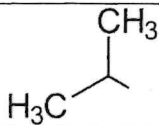
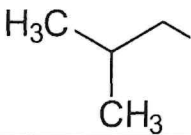
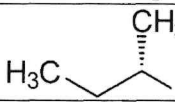

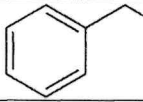
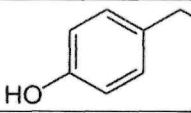
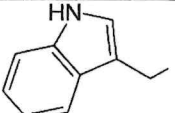
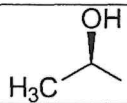
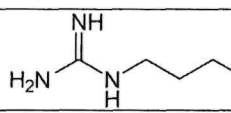
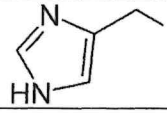
L'activité des quatre enzymes CPT sauvage ou mutantes est mesurée en présence de différentes concentrations en malonyl-CoA. Les résultats sont rapportés dans le **document 7**.

3.3 Analyser les résultats obtenus pour les enzymes « E26K » et « K561E » pour proposer une hypothèse expliquant la baisse d'activité observée dans les deux cas. (C3, C4)

3.4 Analyser le résultat obtenu pour le double mutant « E26K/K561E ». (C3)

3.5 Argumenter le fait que l'interaction entre les deux domaines terminaux est essentielle pour l'inhibition de la CPT1A par le malonyl-CoA. (C4)

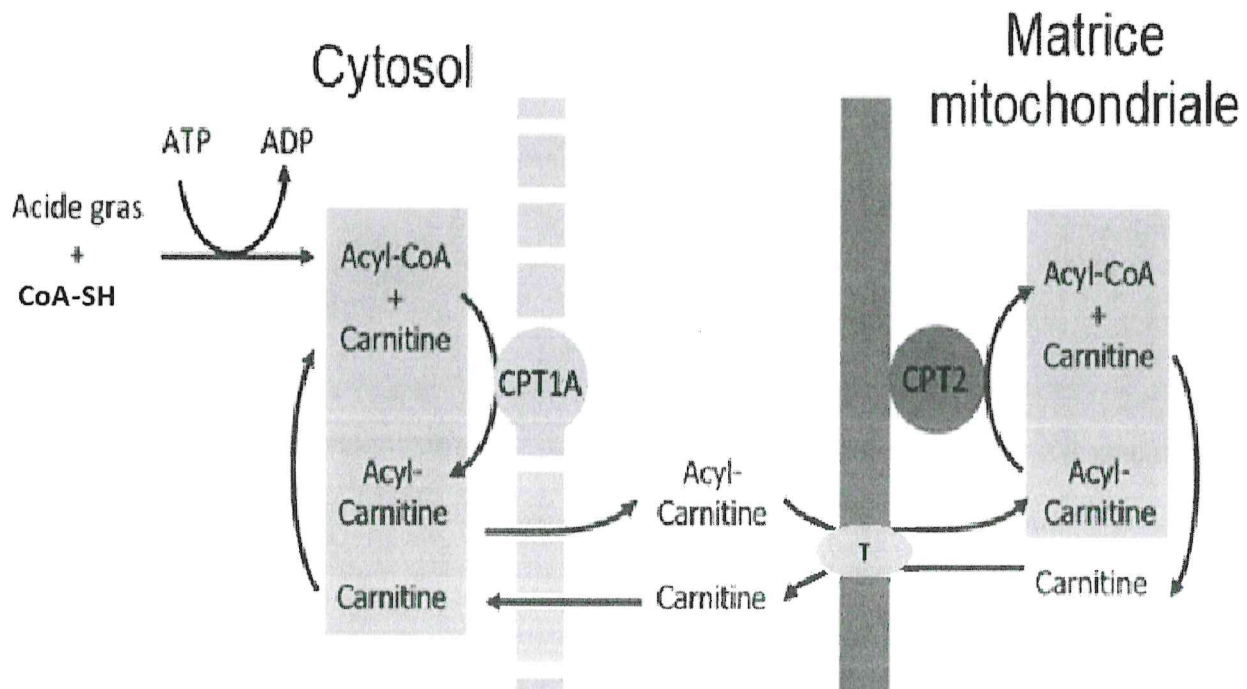
Annexe. Les 20 principaux acides aminés constitutifs des protéines.

Catégorie	Acide aminé	Chaîne latérale	Codes 3 lettres / 1 lettre	pKa ₁ α COOH	pKa ₂ α NH ₂	pKa chaîne latérale
Aliphatiques	Glycine	H -	Gly / G	2,4	9,8	-
	Alanine	CH ₃ -	Ala / A	2,4	9,9	-
	Valine		Val / V	2,3	9,7	-
	Leucine		Leu / L	2,3	9,7	-
	Isoleucine		Ile / I	2,3	9,8	-
Amine secondaire	Proline	 Formule complète	Pro / P	2,0	10,6	-
Aromatiques	Phénylalanine		Phe / F	2,2	9,3	-
	Tyrosine		Tyr / Y	2,3	9,2	10,5
	Tryptophane		Trp / W	2,5	9,4	-
Hydroxylés	Sérine	HO-CH ₂ -	Ser / S	2,2	9,2	-
	Thréonine		Thr / T	2,1	9,1	-
Soufrés	Cystéine	HS-CH ₂ -	Cys / C	1,9	10,7	8,4
	Méthionine	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	Met / M	2,1	9,3	-
Basiques	Lysine	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Lys / K	2,2	9,1	10,5
	Arginine		Arg / R	1,8	9,0	12,5
	Histidine		His / H	1,8	9,3	6,0
Acides carboxyliques	Acide aspartique	COOH-CH ₂ -	Asp / D	2,0	9,9	3,9
	Acide glutamique	COOH-CH ₂ -CH ₂ -	Glu / E	2,1	9,5	4,1
Amides	Asparagine	NH ₂ -CO-CH ₂ -	Asn / N	2,1	8,7	-
	Glutamine	NH ₂ -CO-CH ₂ -CH ₂ -	Gln / Q	2,2	9,1	-

Document 1. Transfert de l'acyl-CoA du cytosol à la matrice mitochondriale

Le système carnitine palmitoyl transférase est une étape essentielle de la bêta-oxydation des acides gras à longue chaîne. Avant leur dégradation, les acides gras sont tout d'abord activés en acyl-CoA sur la membrane mitochondriale externe. Avant d'être oxydés dans la matrice mitochondriale, les acides gras à longue chaîne doivent être transportés par la navette "carnitine palmitoyl transférase".

La carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) est le premier composant de cette navette. Une translocase fait ensuite passer l'acyl-carnitine à travers la membrane mitochondriale interne.



Légende :

CPT1A : Carnitine Palmitoyl Transferase 1A

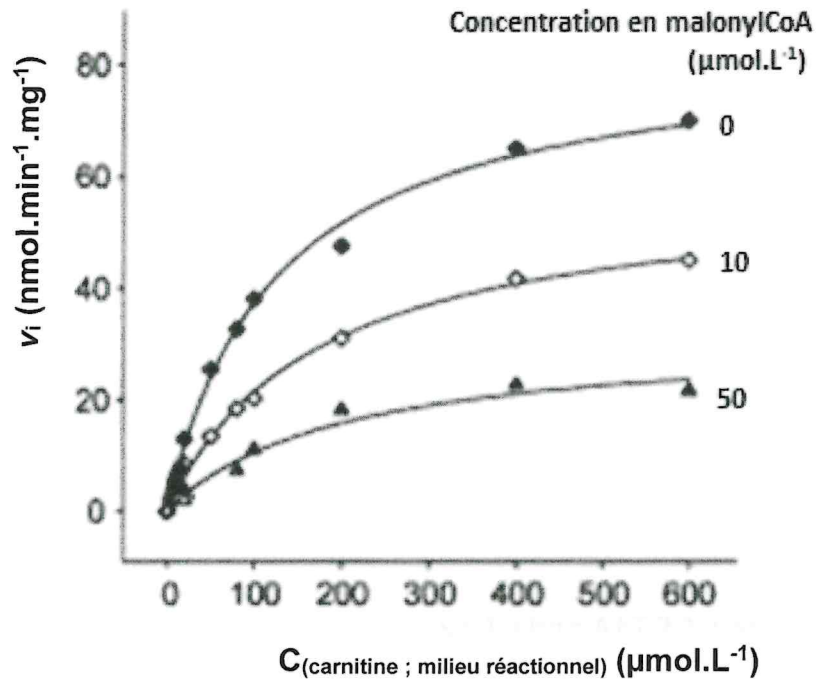
CPT2 : Carnitine Palmitoyl Transferase 2

T Translocase

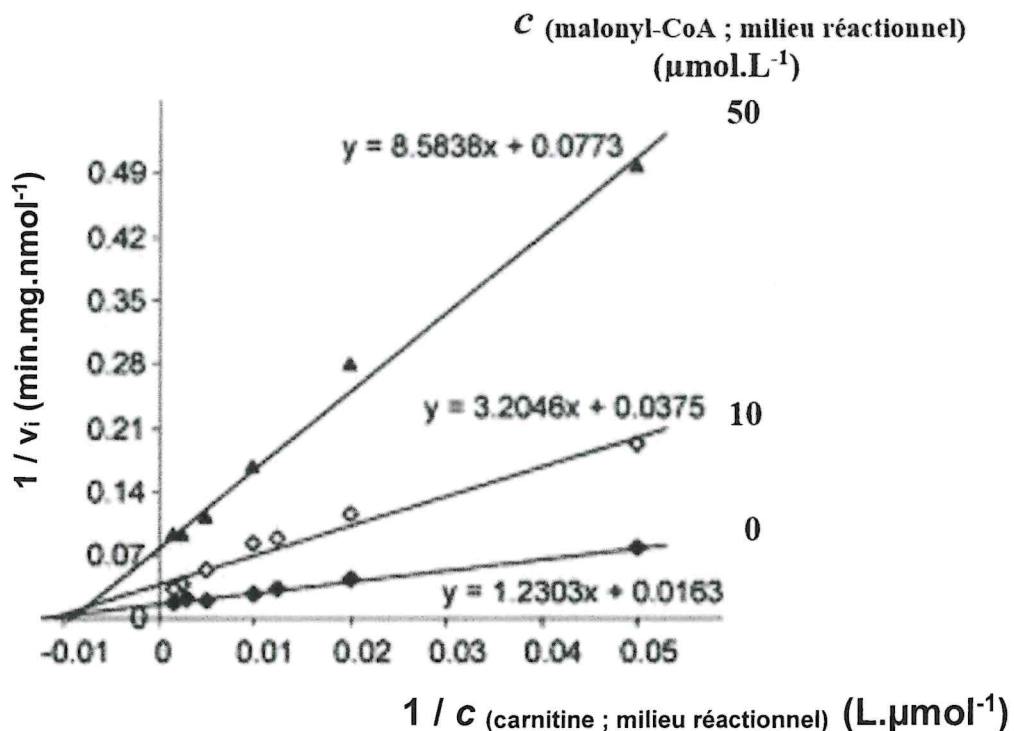
Document 2. Étude de l'influence du malonyl-CoA sur la vitesse de la réaction catalysée par la CPT1A

L'analyse cinétique de la CPT1A avec la carnitine comme substrat est réalisée en présence de différentes concentrations de malonyl-CoA.

Représentation de Michaelis-Menten

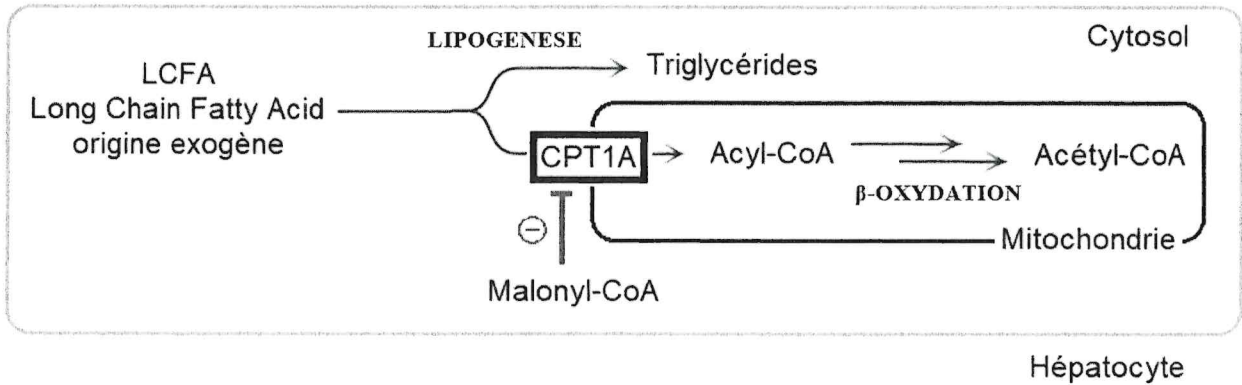


Représentation du tracé secondaire de Lineweaver-Burk



Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A Assia Bentebibel , Chandrashekar Gurnathan , Montserrat Morillas , Dolores de Arriaga , Dolores Serra , Guillermina Asins , Fausto G. Hegardt , and Paulino Gomez-Puertas

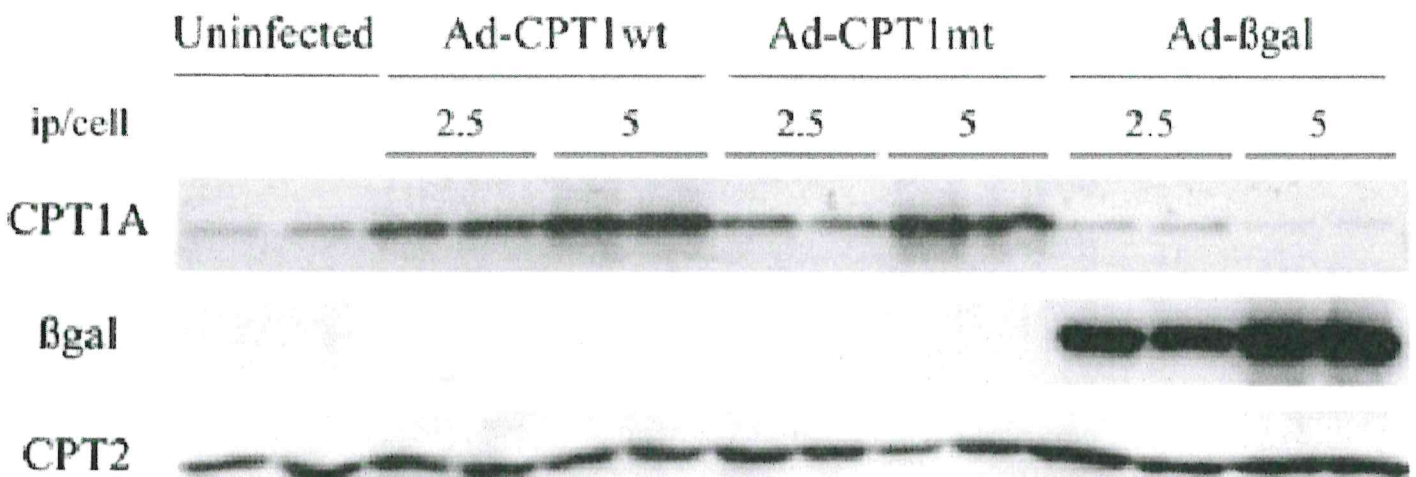
Document 3. Métabolisme simplifié des acides gras à longue chaîne (LCFA) dans le foie



Document 4. Results of overexpressed CPT1wt and CPT1mt proteins in cultured rat hepatocytes

Primary rat hepatocytes were infected with either uninfected, 2.5 or 5 infectious particles per cell (ip/cell) of the indicated adenovirus and cultured for 40 h in 5 mmol.L⁻¹ glucose. Immunoblot analysis of cellular extracts (30 µg of protein) using specific antibodies for β-galactosidase (βgal), CPT1A and CPT2.

Western blots are representative of four independent experiments performed in duplicates.



Modulation of hepatic malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids Marie Akkaoui, Isabelle Cohen, Catherine Esnous, Véronique Lenoir, Martin Sournac, Jean Girard, Carina Prip-Buus

Document 5. Caractérisation du mutant CPT1mt

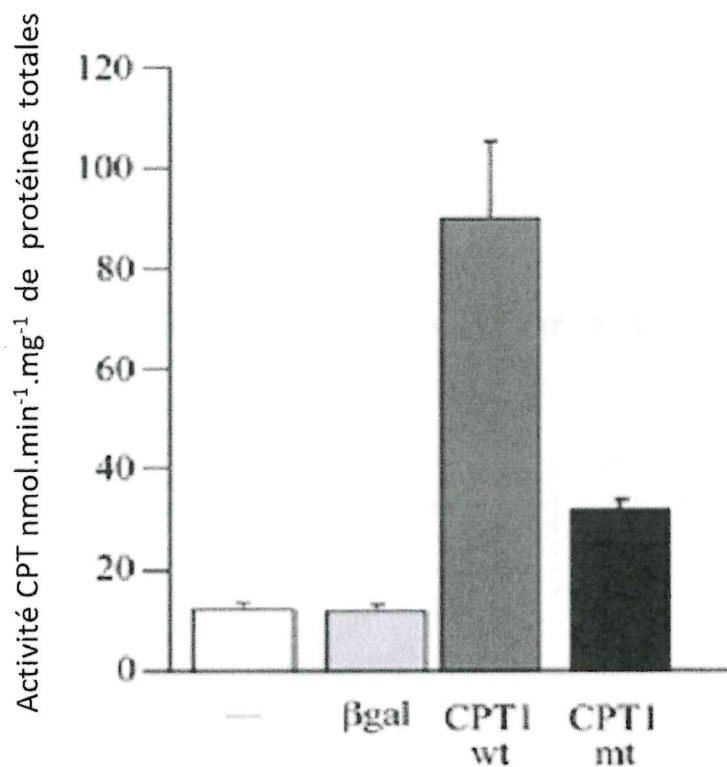
A. Résultats du Western blot obtenu sur les extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes transfectés par le vecteur à 2,5 ip/cell. L'anticorps utilisé est marqué par un fluorochrome et reconnaît indifféremment l'enzyme mutée et sauvage.

B. Résultats de mesure de l'activité CPT1 pour les extraits cellulaires des quatre lots d'hépatocytes (histogramme en dessous du Western Blot)

A. Intensités relatives des bandes correspondant à la protéine CPT1A

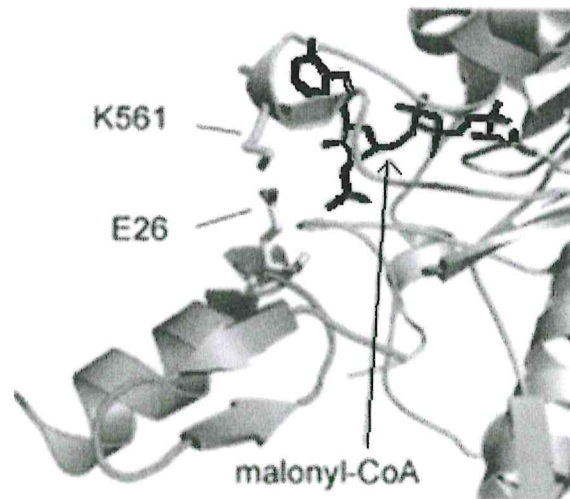


B.

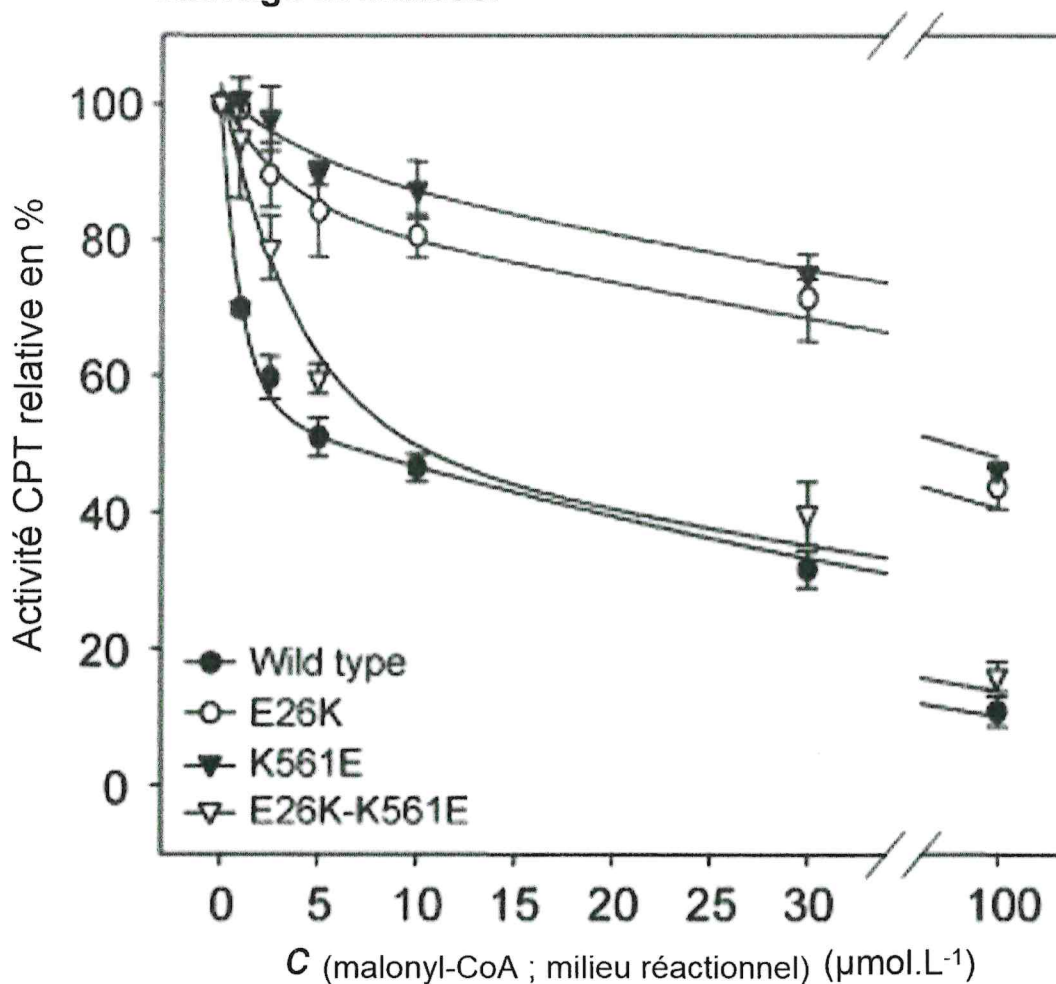


Modulation of hepatic malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids Marie Akkaoui, Isabelle Cohen, Catherine Esnous, Véronique Lenoir, Martin Sournac, Jean Girard, Carina Prip-Buus

Document 6. Position spatiale des domaines N-ter et C-ter de CPT1A, en présence du malonyl-CoA



Document 7. Effet du malonyl-CoA sur l'activité des enzymes CPT1A sauvage et mutées.



Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A* Received for publication, January 30, 2007, and in revised form, April 17, 2007 Published, JBC Papers in Press, April 23, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700885200