

EDE BGB 2

SESSION 2020

CAPET
CONCOURS EXTERNE

Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE

SECONDE ÉPREUVE

Durée : 5 heures

*Le dictionnaire anglais-français est autorisé.
L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre dictionnaire et de tout matériel électronique
(y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.*

*Si vous repérez ce qui vous semble être une erreur d'énoncé, vous devez le signaler très lisiblement sur
votre copie, en proposer la correction et poursuivre l'épreuve en conséquence. De même, si cela vous conduit à
formuler une ou plusieurs hypothèses, vous devez la (ou les) mentionner explicitement.*

**NB : Conformément au principe d'anonymat, votre copie ne doit comporter aucun signe distinctif, tel que
nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé consiste notamment en la rédaction d'un
projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de la signer ou de l'identifier.**

Tournez la page S.V.P.

A

Les enzymes : de la catalyse biologique à l'outil biotechnologique

Les enzymes jouent un rôle central dans le fonctionnement des systèmes biologiques car elles accélèrent efficacement et de manière très spécifique les réactions chimiques qui s'y déroulent. Ces biocatalyseurs sont également à l'origine d'applications biotechnologiques sophistiquées, parfois associées à des enjeux économiques très importants.

Première partie :

À l'aide du dossier documentaire et de l'analyse de résultats expérimentaux fournis, dégager les caractéristiques que doivent présenter les enzymes pour constituer des outils exploitables en biotechnologie, les limites liées à leur nature biologique, ainsi que quelques stratégies utilisées pour permettre leur amélioration.

Présenter ensuite les adaptations qui permettent d'en faciliter le transfert technologique, pour une utilisation aussi bien dans le domaine de la production en bio-industries que dans celui de l'analyse.

Seconde partie :

En s'appuyant sur le dossier documentaire fourni, et dans la perspective d'un enseignement en BTS Biotechnologies, proposer une démarche pédagogique sur le thème de la catalyse enzymatique et de ses applications biotechnologiques, permettant de répondre à des objectifs de formation choisis parmi ceux présentés dans le document 10.

Liste des documents du dossier technique :

Document 1 : L'importance des enzymes en biotechnologie

Document 2 : Approche multidisciplinaire utilisée pour l'optimisation de processus biocatalytiques

Document 3 : Comparaison des caractéristiques cinétiques de mutants de l'HydroxyButyryl-CoA Déshydrogénase de *Clostridium butyricum* (CbHBD)

Document 4 : Caractérisation d'une protéase purifiée à partir d'une souche de *Bacillus cereus*

Document 5 : Différentes stratégies d'amélioration des propriétés d'une enzyme par génie génétique en fonction des informations disponibles la concernant

Document 6 : Création *de novo* d'une enzyme par modélisation bioinformatique de site actif

Document 7 : Étude de l'immobilisation de la phosphatase alcaline sur nanoparticules de chitosane par pontages covalents et caractérisation de l'enzyme immobilisée

Document 8 : Utilisation d'enzymes immobilisées en réacteur enzymatique pour la clarification et la fluidification d'un jus de fruits

Document 9 : Les biocapteurs à acétylcholinestérase appliqués à la détection et au dosage des composés organophosphorés

Document 10 : Extraits du référentiel du BTS Biotechnologies

INFORMATION AUX CANDIDATS

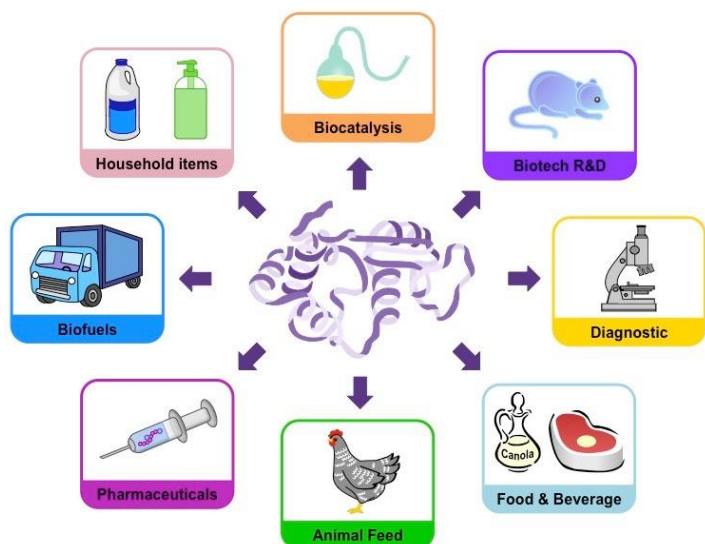
Vous trouverez ci-après les codes nécessaires vous permettant de compléter les rubriques figurant en en-tête de votre copie.

Ces codes doivent être reportés sur chacune des copies que vous remettrez.

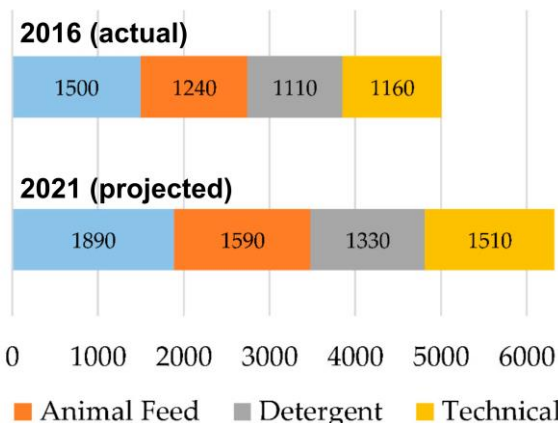
► **Concours externe du CAPET de l'enseignement public :**

Concours	Section/option	Epreuve	Matière
EDE	7100E	102	5851

Document 1 : L'importance des enzymes en biotechnologie



Global Enzyme Market (data in millions)



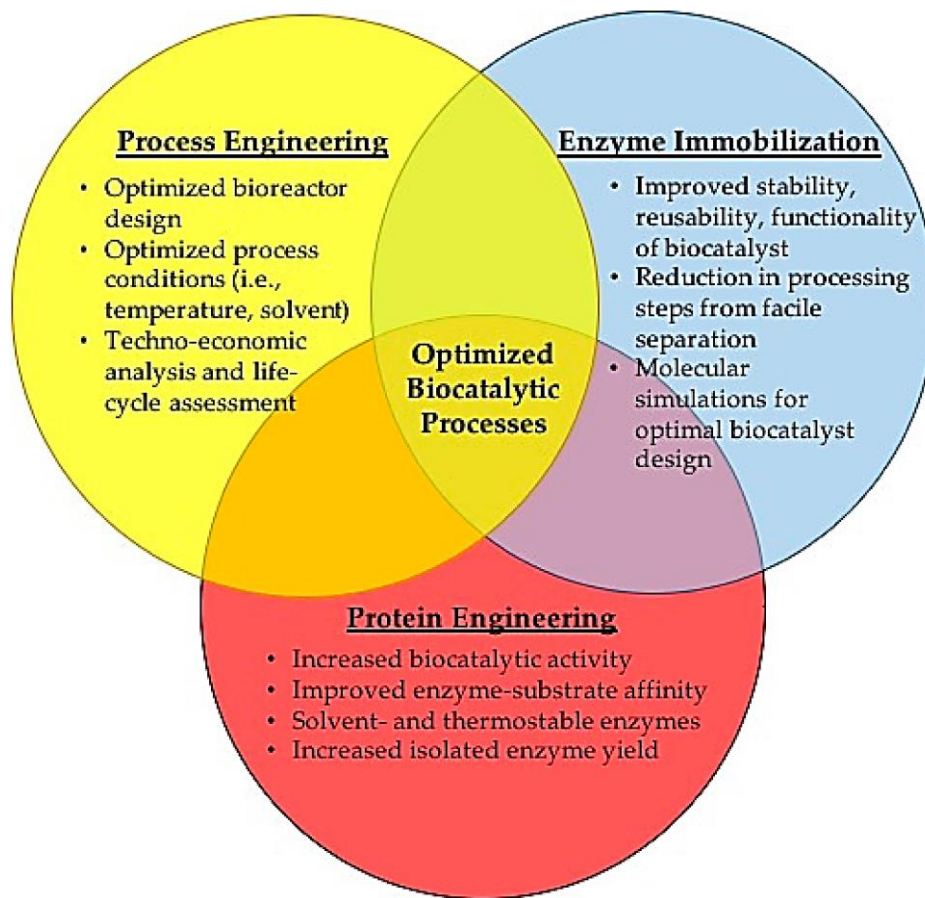
Source : Transparency Market Research, 2017

Source : d'après Chapman et coll. 2018. Catalysts. 8, 238

Enzyme	Source	Application
<i>Derived from microbes</i>		
Proteases	<i>Bacillus amyloliquefaciens, B. subtilis, Aspergillus oryzae, Streptomyces spp.</i>	Enzymatic hydrolysis of proteins
α -amylase	Various <i>bacilli</i> and <i>Aspergillus oryzae</i>	Hydrolysis of starch
β -amylase	Various <i>bacilli</i> , barley	Degradation of starch
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger, Rhizopus species</i>	Starch hydrolyzed to glucose syrup.
Glucose isomerase	Various <i>bacilli, Streptomyces spp.</i>	Glucose isomerized to fructose
Invertase	<i>Saccharomyces spp.</i>	Sucrose hydrolyzed to glucose and fructose
Penicillin acylase	<i>E. coli, various bacilli, Streptomyces spp.</i>	Production of semisynthetic penicillins
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	Enzymatic hydrolysis of pectin
Lipase	<i>Candida antarctica</i>	Hydrolysis of triglycerides
<i>Derived from plants</i>		
Papain	<i>Carica papaya</i>	Meat tenderization
Bromelain	Pineapple fruit/stem	Chill proofing of beers
Actinidin	Kiwi fruit	Meat tenderization
Lipoxygenase	Soybean	Bread making and aroma production
<i>Derived from animal sources</i>		
Chymosin (rennet)	Stomach of calves	Cheese manufacture
Ancrod	Snake venom	Anticoagulant
Urokinase	Urine	Thrombolytic
Trypsin	Animal pancreas	Digestive aid
Pancreatin (amylase, protease, lipase)	Pancreatic extract	Digestive aid
Pepsin	Stomach of animals	Digestive aid
Acetyl-cholinesterase	Bovine erythrocytes	Analysis of organophosphorus compounds such as pesticides
Cholesterol esterase	Porcine pancreas	Detect serum cholesterol levels

Source : Young Je Yoo, Yan Feng, Yong-Hwan Kim - Fundamentals of Enzyme Engineering (2017, Springer Netherlands)

Document 2 : Approche multidisciplinaire utilisée pour l'optimisation de processus biocatalytiques



Source : Chapman et coll. 2018. *Catalysts*. 8, 238

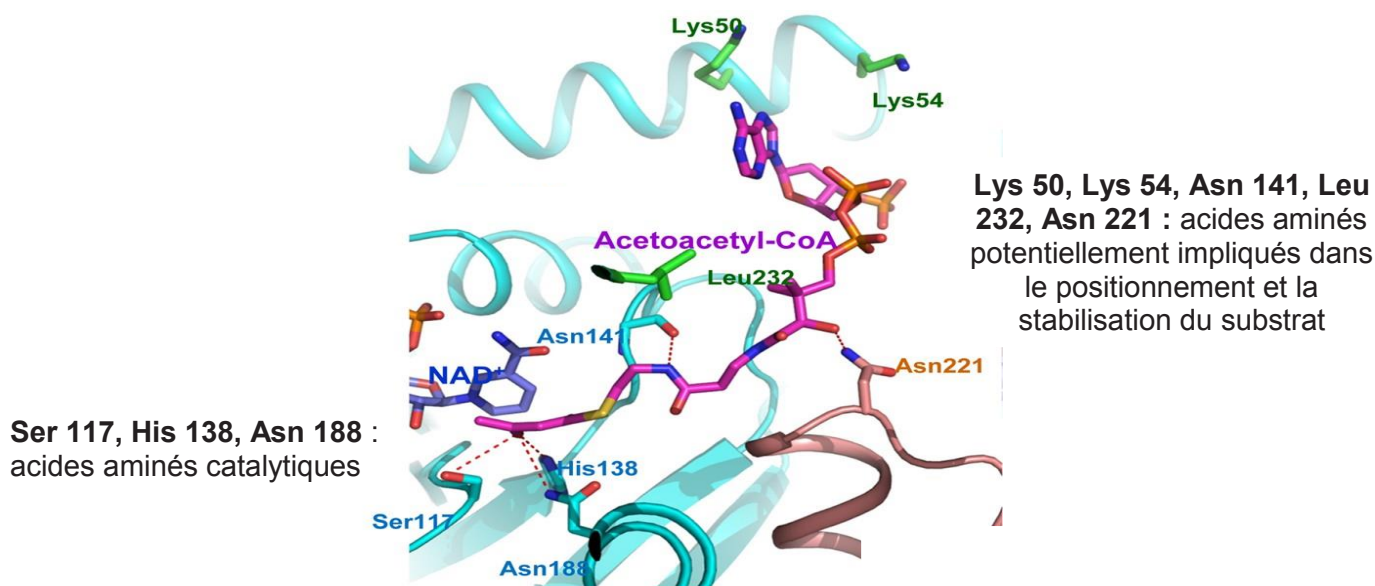
Document 3 : Comparaison des caractéristiques cinétiques de mutants de l'HydroxyButyryl-CoA Déshydrogénase de *Clostridium butyricum* (CbHBD)

Le *n*-butanol présente un intérêt dans différents secteurs : biocarburants, cosmétiques, pharmaceutiques. Les rendements de production de *n*-butanol par fermentation microbienne sont limités, du fait de la production concurrente d'acétone et d'éthanol par les bactéries et de la toxicité de ces solvants pour celles-ci. Une alternative à la culture consiste à reconstituer *in vitro* une voie de synthèse artificielle associant les enzymes nécessaires à la production du *n*-butanol. La 3-HydroxyButyryl-CoA Déshydrogénase (HBD) est l'une des enzymes impliquées dans cette synthèse. Elle catalyse la réaction suivante :

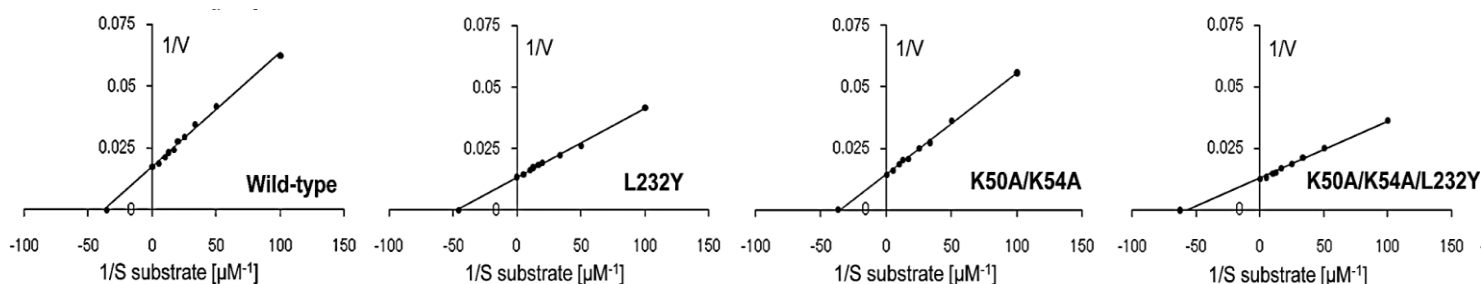


La structure de l'enzyme étant connue, les caractéristiques cinétiques de l'enzyme native (Wild-type) et de trois mutants produits par génie génétique (L232Y, K50A/K54A et K50A/K54A/L232Y) sont comparées.

3-A : Représentation partielle du site actif de la CbHBD



3-B : Courbes de Lineweaver et Burk obtenues pour l'enzyme native et les trois mutants



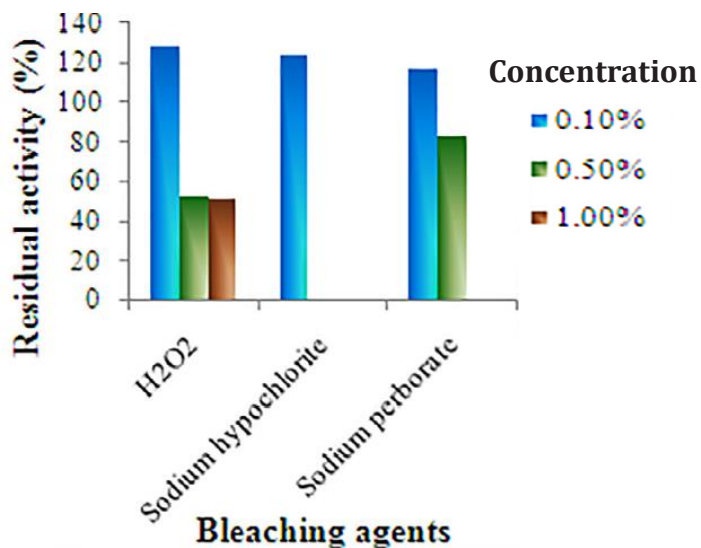
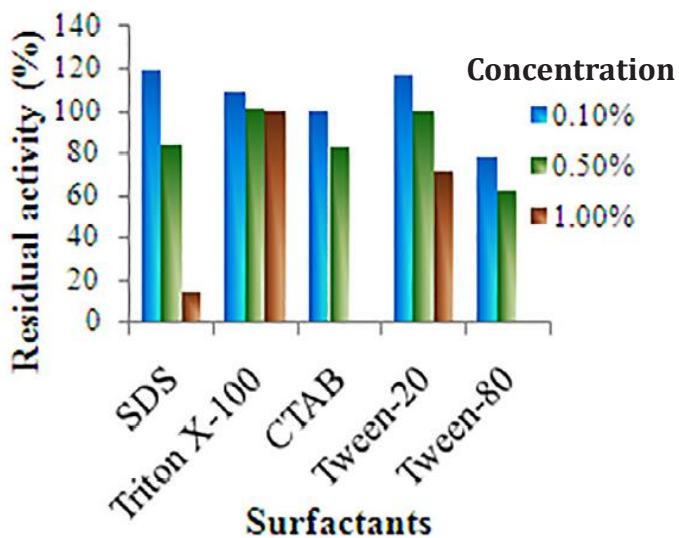
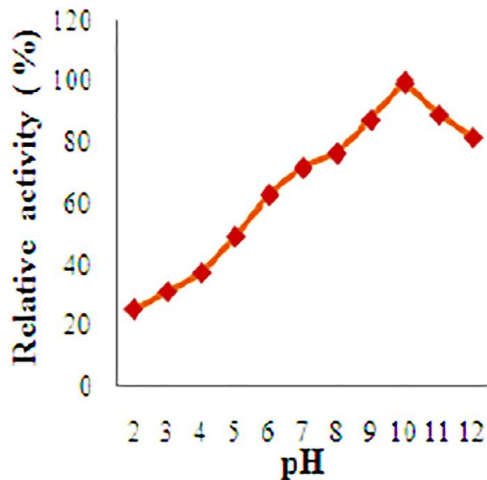
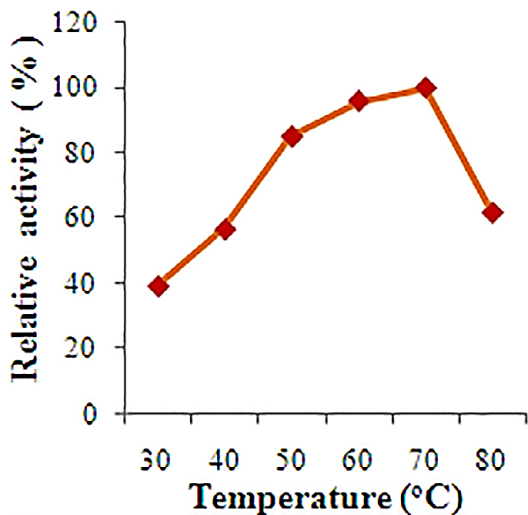
3-C : Paramètres cinétiques calculés pour l'enzyme native et les trois mutants

CbHBD Protein	K_m (mM)	v_{max} (mM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{cat}/K_m (fold) ^a
Wild type	0.028	56.81	3.4×10^3	1.2×10^5	1
L232Y	0.022	72.46	4.5×10^3	2.0×10^5	1.7
K50A/K54A	0.027	69.44	8.3×10^3	3.0×10^5	2.5
K50A/K54A/L232Y	0.016	79.36	9.5×10^3	5.9×10^5	4.9

^a The values of the CbHBD mutants were calculated based on the k_{cat}/K_m value of the CbHBD wild type as 1.
 Source : d'après Kim Eun-Jung et coll., 2014. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(12), 1636–1643.

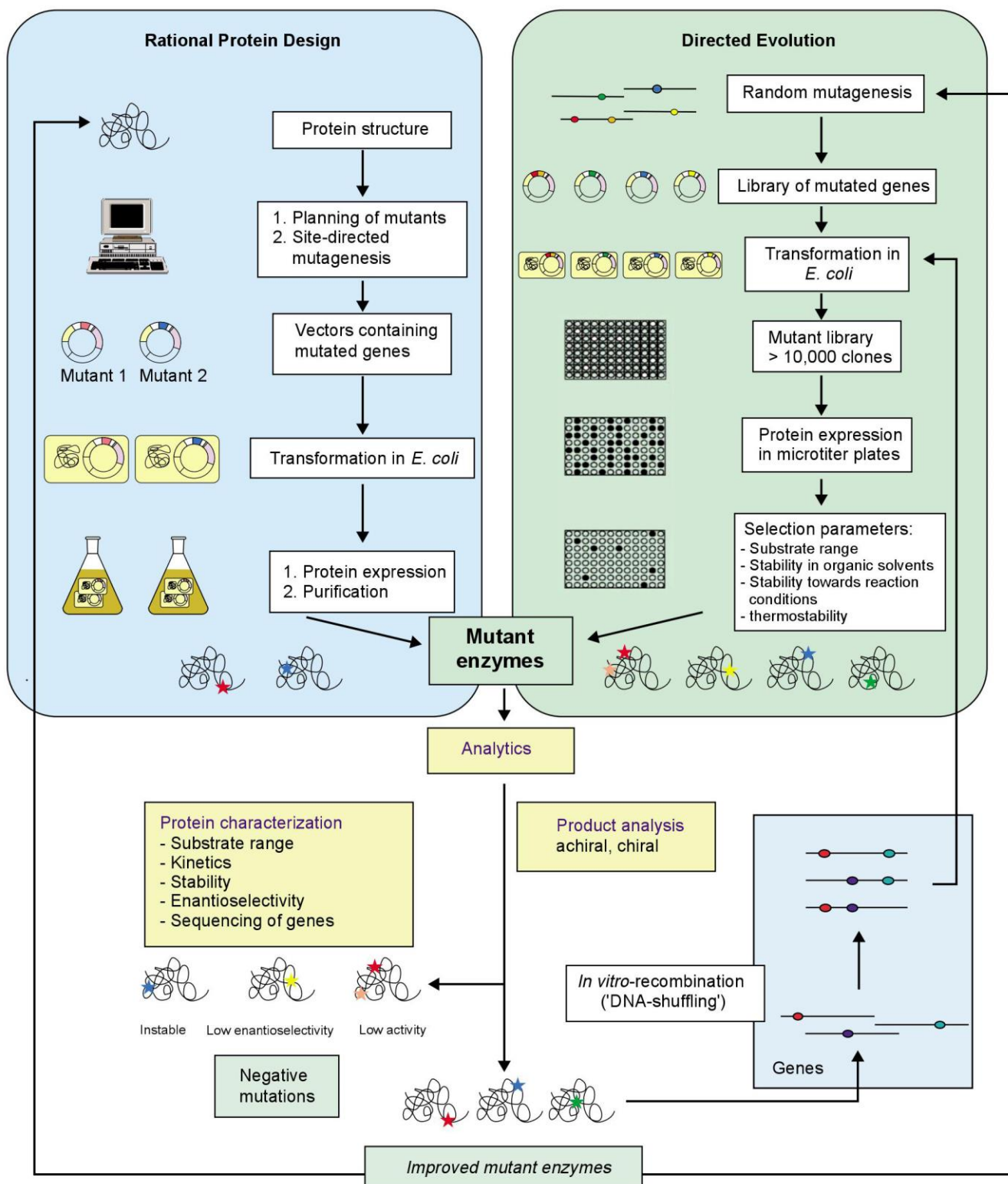
Document 4 : Caractérisation d'une protéase purifiée à partir d'une souche de *Bacillus cereus*

Les protéases sont des enzymes utilisées en industrie chimique pour la fabrication de lessives, ainsi que dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Une protéase isolée de *Bacillus cereus* a été étudiée en vue de son transfert dans un processus industriel. Dans ce but, les effets de la température, du pH et de plusieurs molécules à différentes concentrations sur l'activité de l'enzyme, ont été évalués.



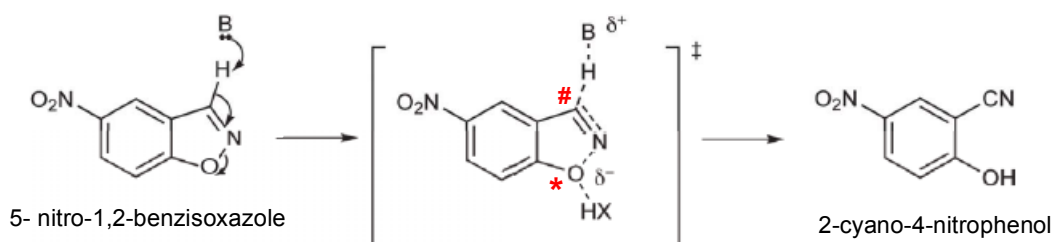
Source : Lakshmi, B. K. M. et coll. 2018. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16(2):295-304.

Document 5 : Différentes stratégies d'amélioration des propriétés d'une enzyme par génie génétique, en fonction des informations disponibles la concernant

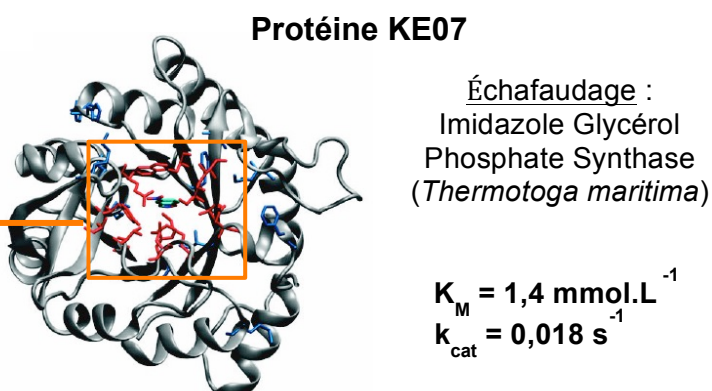
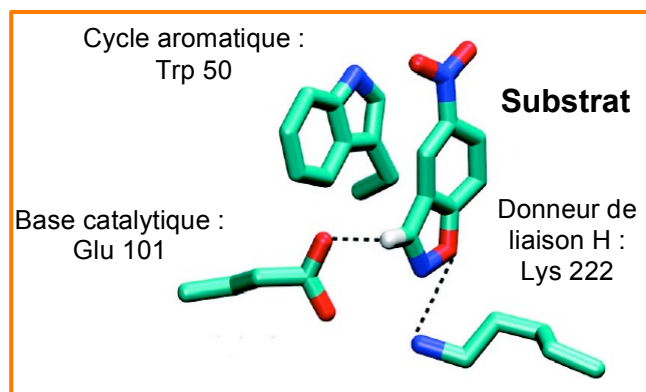


Document 6 : Création *de novo* d'une enzyme par modélisation bioinformatique de site actif

Le cycle Benzisoxazole est un motif rencontré dans plusieurs actifs pharmacologiques (antipsychotiques et anticonvulsifs). L'ouverture de ce cycle (élimination de Kemp), catalysée chimiquement par une base, passe par un unique intermédiaire réactionnel. Celui-ci est instable, du fait de la création d'une charge négative partielle sur l'oxygène* du cycle isoxazole lors du retrait d'un proton sur le carbone attaqué par la base (#). Cet intermédiaire peut être stabilisé par des interactions hydrophobes d'empilement entre son cycle plan et un autre cycle aromatique, entraînant la dispersion de la charge négative créée. Une stabilisation supplémentaire peut être obtenue par interaction entre l'atome d'oxygène* du cycle isoxazole et un groupement donneur de liaison hydrogène. Il n'existe pas d'enzyme naturelle connue catalysant cette réaction.



Création *de novo* d'une enzyme catalysant l'élimination de Kemp : exemple de structure de site actif théorique d'une « Kemp Éliminase » créée par bioinformatique (« Théozyme ») et résultat du positionnement des acides aminés de ce Théozyme, dans une protéine échafaudage receveuse. Les caractéristiques de l'enzyme ont été évaluées après expression chez *E. coli* de la protéine échafaudage dans laquelle les acides aminés catalytiques ont été introduits par mutagenèse dirigée.



Facteur d'accélération de la réaction = $1,6 \cdot 10^4$

Sources : d'après des données tirées de Røthlisberger et coll., 2008. *Nature*, 453. 190-195 et Bhowmick et coll., 2016. *Phys Chem. Chem Phys.* Jul 28;18(28):19386-96

Document 7 : Étude de l'immobilisation de la phosphatase alcaline sur nanoparticules de chitosane par pontages covalents et caractérisation de l'enzyme immobilisée

7-A : Évaluation de l'efficacité de fixation de la phosphatase alcaline sur les nanoparticules de chitosane

Total enzyme		Immobilized enzyme		Total protein		Retained protein		Binding efficiency ^b
U ^a (1000 U/mg)	%	U(546 U/mg)	%	mg	%	mg	%	
1000±11.8	100	546±9.3	54.6%	1.0±0.4	100	0.762±0.06	76.23%	0.71

Average ± standard deviation (n = 5)

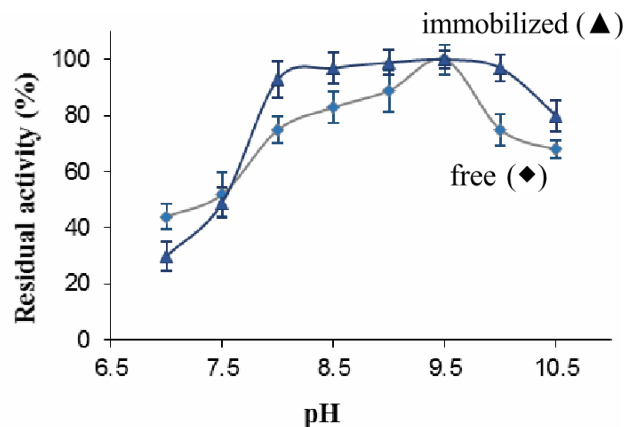
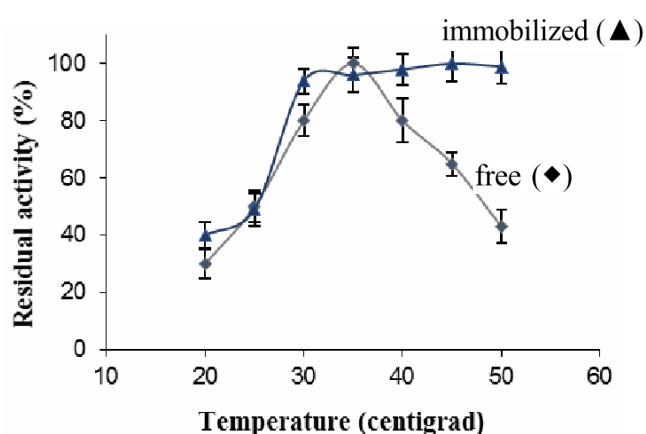
^aU means the enzyme unit

^bBinding efficiency calculated as the percentage of U(54.6%) / percentage of retained protein (76.23%).

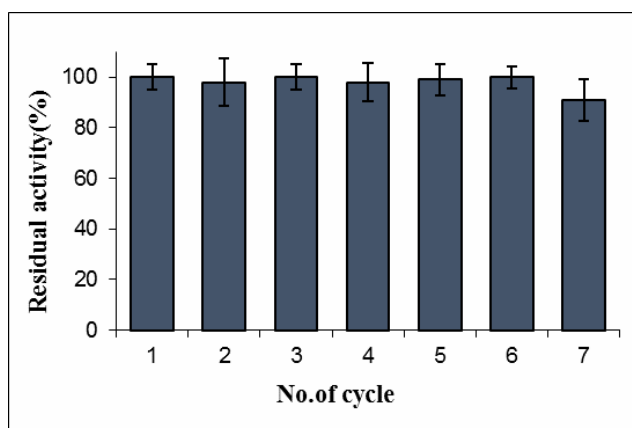
7-B : Mesure des paramètres cinétiques des formes libre et immobilisée la phosphatase alcaline (ALP) en utilisant le para-nitrophénylphosphate comme substrat

Parameters	Free ALP	Immobilized ALP
K_m and $K_{m,app}$ (mol L ⁻¹)	0.21±0.05	0.38±0.06
V_{max} and $V_{max,app}$ (mol L ⁻¹ min ⁻¹)	0.60 ± 0.04	0.87±0.08

7-C : Activités de l'ALP libre et de sa forme immobilisée en fonction de la température et du pH



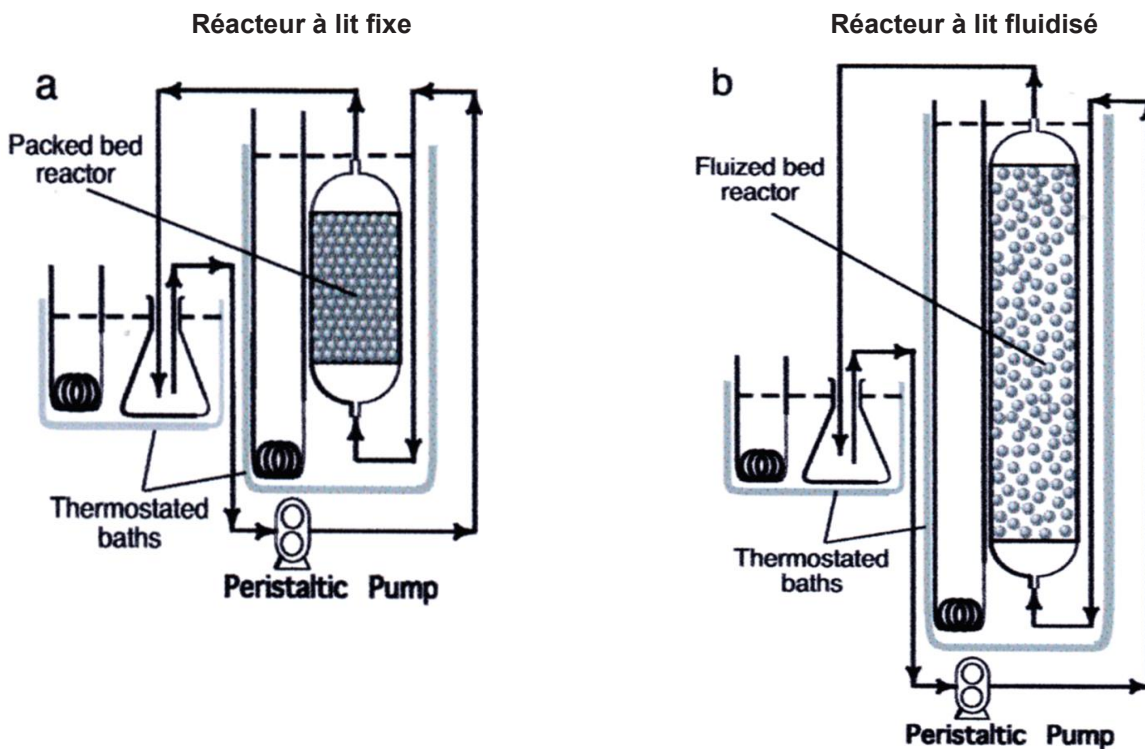
7-D : Activité résiduelle de l'ALP immobilisée après plusieurs cycles successifs de réutilisations



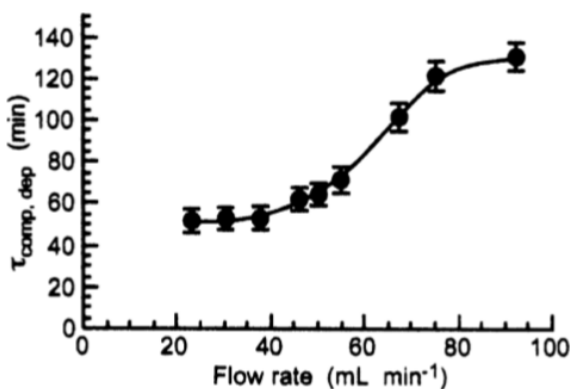
Document 8 : Utilisation d'enzymes immobilisées en réacteur enzymatique pour la clarification et la fluidification d'un jus de fruits

Le jus obtenu par pressage des fruits est un liquide trouble et visqueux du fait de colloïdes liés à la présence de pectines. Ces polysides, naturellement présents dans le fruit, doivent être hydrolysés afin de fluidifier et de clarifier celui-ci. Cette hydrolyse peut être réalisée par un mélange d'enzymes pectinolytiques immobilisées sur support solide et utilisées dans divers types de réacteurs enzymatiques. Les paramètres de fonctionnement de chaque type de réacteur utilisé doivent alors être eux-mêmes optimisés pour améliorer le processus.

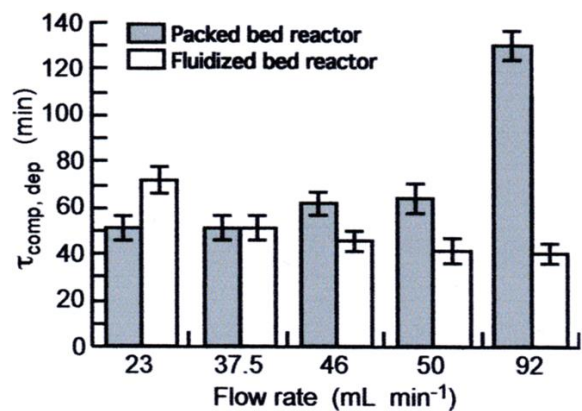
8-A : Exemples de réacteurs enzymatiques expérimentaux utilisés pour traiter le jus de fruit brut



8-B : Temps de traitement complet de 50 mL d'un jus en fonction du débit pour le réacteur à lit fixe



8-C : Comparaison des temps de traitement d'un jus (50 mL) selon le type de réacteur



Document 9 : Les biocapteurs à acétylcholinestérase appliqués à la détection et au dosage des composés organophosphorés

Les organophosphorés sont des composés neurotoxiques entrant dans la composition d'insecticides (exemples : Malathion, Chlorpyrifos-éthyl, Méthidathion) et de gaz de combat (exemples : Sarin, Tabun). Leur présence dans l'environnement peut être détectée à l'aide de biocapteurs à acétylcholinestérase immobilisée, enzyme dont ils inhibent l'activité en se fixant sur son site actif.

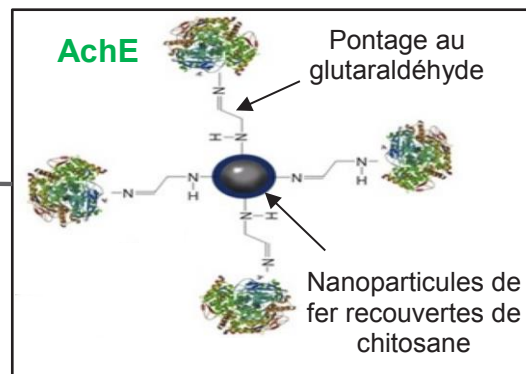
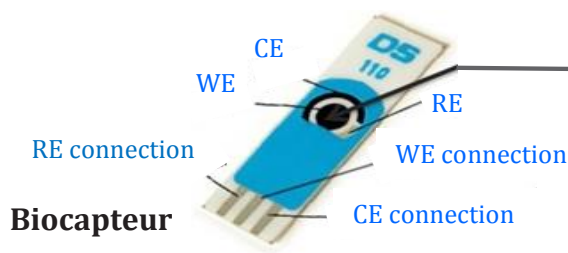
9-A : Structure d'un biocapteur à Acétylcholinestérase

AchE = acétylcholinestérase fixée sur l'électrode de travail

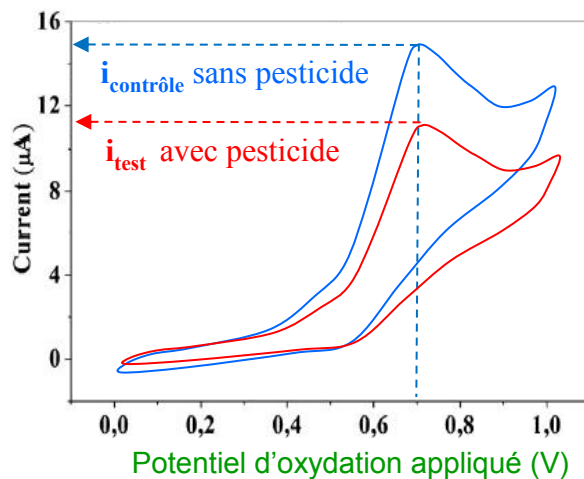
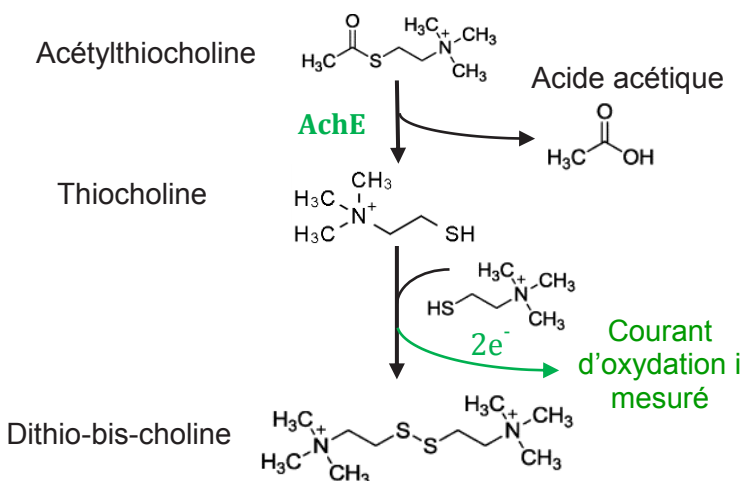
WE = Électrode de travail

RE = Électrode de référence (Ag/AgCl)

CE = Contre-électrode

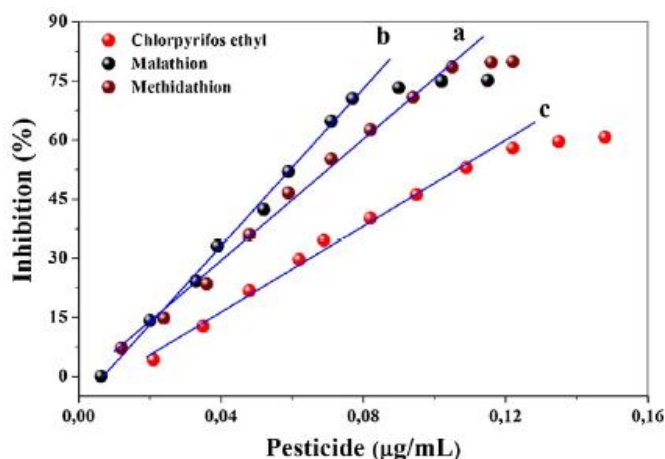


9-B : Principe de la mesure



$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{i_{\text{contrôle}} - i_{\text{test}}}{i_{\text{contrôle}}} \times 100$$

9-C : Réponse d'un biocapteur à acétylcholinestérase pour trois pesticides organophosphorés



Sources : d'après des données tirées de Rodrigues et coll., 2018. Biosensors., 8(1) 16 (Graphical abstract) et d'après Guler et coll., 2017. Electrochimica Acta. 240:129-35.

Document 10 : Extraits du référentiel du BTS Biotechnologies

ANNEXE Ib : SAVOIRS ET SAVOIR-FAIRE

Les savoirs associés technologiques, professionnels et généraux sont organisés en 10 modules :

Module 1 : Biologie moléculaire et génie génétique

Module 2 : Biochimie analytique

Module 3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Module 4 : Microbiologie et génie fermentaire

Module 5 : Biologie et technologies cellulaires

Module 6 : Bio-informatique et informatique de laboratoire

Module 7 : Qualité, Santé et sécurité au travail

Module 8 : Mathématiques et sciences physiques

Module 9 : Anglais

Module 10 : Expression française

Module 3 : Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

- Première année : 1 heure de cours hebdomadaire

- Deuxième année : 2 heures de cours + 3,5 heures de travaux pratiques hebdomadaires

Module 3 section 5 : Les enzymes, biomolécules catalytiques

INTITULE DU PROGRAMME	COMMENTAIRES		COURS	TP
	COURS	TRAVAUX PRATIQUES		
5-1- Structure et classification des enzymes				
Spécificité de la catalyse enzymatique			X	
Classification internationale des enzymes	- Principe - Choix de quelques exemples (kinases, deshydrogénases ...) dans des classes et des métabolismes différents pour illustrer les rôles <i>in vivo</i> des enzymes		X	
Isoenzymes			X	
Complexes multienzymatiques	A l'aide d'un exemple comme le système « pyruvate déshydrogénase ».		X	
5-2- L'activité enzymatique				
Grandeurs et unités d'enzyme			X	
Les différentes méthodes et techniques de mesure		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Techniques absorptiométriques, (pHmétriques, fluorimétriques, ...) de détermination ▪ Méthodes par prélèvements, en deux points et en cinétiques 	X	X
5-3- Cinétique enzymatique Michaélienne		Détermination des constantes cinétiques d'une enzyme	X	X
5-4- Effecteurs physicochimiques				
Température, pH		Effets de la température et du pH	X	X
Effecteurs michaeliens (inhibiteurs) Composition du milieu réactionnel (force ionique, cations, conservateurs)		Caractérisation d'un inhibiteur compétitif	X	X
5-5- Exemples de mécanismes d'action des enzymes ; exemples de coenzymes		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ribonucléase pancréatique ou alpha chymotrypsine ; aminotransférases ; lysozyme ; endonucléases de restriction.... <i>A partir de l'analyse de documents ; les méthodes d'étude seront évoquées.</i> ▪ Les deux catégories de co-enzymes ; exemples : ATP, NAD, FAD, PLP ... 	X	

Module 3 section 6 : Les enzymes, outils d'analyse et de bioconversion

6-3- L'immobilisation des enzymes				
Méthodes d'immobilisation		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immobilisations d'enzymes par méthodes physiques et chimiques ▪ Caractérisation et étude d'une enzyme immobilisée 	X	X
Propriétés des enzymes immobilisées		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Détermination d'un rendement d'immobilisation ▪ Mise en évidence de limitations diffusionnelles, de thermostabilisation.. 	X	X
6-4- Les biocapteurs				
Principe et technologies	Exemple d'un biocapteur enzymatique Généralisation	Illustration d'un biocapteur enzymatique (à glucose par exemple)	X	X
Exemples d'applications			X	
6-5- Les bioréacteurs enzymatiques				
Différents types, mise en œuvre et modélisation		Réalisation et mise en œuvre d'un bioréacteur simple	X	X
Exemples d'applications			X	
Le recyclage des cofacteurs			X	