

Repère : BCFTU

SESSION 2004

Durée : 4 H

Page : 0/17

Coefficient : 4

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOCHIMISTE

EPREUVE : ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51.
ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES
Calculatrice autorisée

ETUDE DE PEPTIDES BIOACTIFS

Les peptides bioactifs sont le thème de recherche de nombreux laboratoires dans des domaines variés.

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE DES HÉMORPHINES (35 points).

Parmi les peptides issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine, les hémorphines sont des peptides doués entre autres de propriétés morphinomimétiques (d'où leur nom).

Les hémorphines proviennent d'une même région de la chaîne β de l'hémoglobine (**document n° 1a**). Leurs séquences sont présentées dans le **document n° 1b**.

On évoquera successivement :

- la réalisation d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine et la détermination de son degré d'hydrolyse,
- la purification par HPLC des hémorphines contenues dans un hydrolysats d'hémoglobine,
- l'étude d'une inhibition enzymatique provoquée par les hémorphines.

1-1) Obtention d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine bovine et détermination de son degré d'hydrolyse (DH)

• **Obtention d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine.**

L'hydrolyse partielle de l'hémoglobine bovine en peptides peut être réalisée par voie enzymatique en utilisant la pepsine extraite de l'estomac de porc.

Le protocole d'hydrolyse mis en œuvre ainsi que des informations concernant les produits utilisés sont donnés dans le **document n° 2**.

• **Détermination du Degré d'Hydrolyse (DH) d'un hydrolysats pepsique de protéine.**

On définit pour un hydrolysats enzymatique de protéine un **Degré d'Hydrolyse (DH)** correspondant au pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques présentes dans la protéine.

1-1-1) Détermination du coefficient de dissociation moyen (α) de la fonction acide carboxylique à pH = 2 :

- Donner l'expression de la constante d'équilibre K_a pour la fonction acide carboxylique.
- En déduire l'expression de l'équation de Henderson-Hasselbalch et définir le pK_a d'une fonction acide/base. En admettant que le pK_a moyen de la fonction acide carboxylique soit de 2,3 donner la forme majoritaire à pH = 2.
- Calculer le coefficient de dissociation moyen (α) de cette fonction à pH = 2.

1-1-2) Etablissement de l'expression littérale du DH d'un hydrolysats pepsique d'hémoglobine obtenu par la méthode pH stat :

Une lecture attentive des trois parties du document n° 2 est indispensable.

- Calculer le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (N_{LPH}) en fonction des paramètres : C_{HCl} , V_{HCl} et α .
- Rechercher le nombre de liaisons peptidiques (N_{LPT}) présentes dans la totalité de l'hémoglobine portée dans le milieu réactionnel.
- Donner l'expression littérale du Degré d'Hydrolyse (DH en %) de l'hydrolysats pepsique d'hémoglobine.

1-1-3) Détermination du DH de l'hémoglobine après une hydrolyse maximale par la pepsine :

Après trois heures d'incubation, à 40°C et à pH 2, de la solution d'hémoglobine en présence de pepsine, il a été ajouté $V_{\text{HCl}} = 5,50$ mL de solution d'acide chlorhydrique.

- Montrer que dans les conditions opératoires utilisées, l'expression littérale du DH (en %) peut être avantageusement réduite en :

$$\text{DH (en \%)} = K \times V_{\text{HCl}} \text{ (en mL)} \quad \text{avec } K = 3,40$$

- Calculer le DH de cet hydrolysats pepsique d'hémoglobine.

1-2) Séparation et purification par H.P.L.C. des hémorphines.

Pour obtenir des quantités notables purifiées de LVV-hémorphine-7 et de VV-hémorphine-7, on procède sur l'hydrolysats à 2 chromatographies successives.

Les conditions chromatographiques et les chromatogrammes sont fournis dans le **document n° 3** :

- Première étape : **GP-HPLC**. L'hydrolysats pepsique total injecté en tête d'une colonne de **Gel Perméation** (Gel filtration ou Chromatographie d'Exclusion) permet d'obtenir 9 fractions (de I à IX) – Voir Chromatogramme GP du **document n° 3**.
- Deuxième étape : **RP-HPLC**. Chaque fraction peptidique obtenue par GP-HPLC est ensuite analysée plus finement par RP-HPLC. Le profil chromatographique ainsi obtenu avec la fraction VII correspond au Chromatogramme F VII du **document n° 3**.

1-2-1) Première étape : GP-HPLC :

Bien que de structures tertiaires non globulaires, les peptides de l'hydrolysats peuvent être séparés par GP-HPLC.

- Présenter le principe de la Chromatographie d'Exclusion-Diffusion.
- A l'aide des **documents 1, 2 (c) et 4**, indiquer le gel le plus approprié pour réaliser la GP-HPLC correspondant à cette première étape ?

Justifier votre réponse.

1-2-2) Seconde étape : RP-HPLC :

1-2-2-1) Que signifie le sigle RP-HPLC ? En quoi consiste une colonne C 18 ?

1-2-2-2) En précisant la nature et les différences de polarité des deux phases intervenant dans cette chromatographie, indiquer le principe chromatographique utilisé ici et expliquer la migration et la séparation des différents composants d'un mélange quelconque analysé.

1-2-2-3) Qu'est-ce qu'une chromatographie en mode gradient ? Expliquer concrètement en utilisant les informations données dans les conditions chromatographiques (**document n° 3**).

Quel est l'autre mode utilisé en HPLC et le définir ?

1-2-2-4) En admettant que la phase mobile occupe 70 % du volume intérieur de la colonne, et grâce aux informations données dans les conditions chromatographiques (**document n° 3**), calculer le volume mort théorique (V_0) de la colonne ainsi que le temps mort (t_0) correspondant.

1-2-3) Analyse du chromatogramme de FVII :

1-2-3-1) L'identification des pics a permis de préciser la position des 2 hémorphines (pics identifiés sur le chromatogramme de FVII).

L'ordre de sortie de LVV-hémorphine-7 par rapport à VV-hémorphine-7 vous paraît-il conforme au principe chromatographique précédemment présenté ? Expliquer.

1-2-3-2) La séparation/purification vous semble-t-elle satisfaisante ?

Justifier votre réponse.

1-3) Etude d'une propriété particulière des hémorphines.

Certains peptides provenant de l'hydrolyse partielle de protéines sont des inhibiteurs de l'enzyme catalysant la conversion d'angiotensine I (10 acides aminés) peu active en angiotensine II (8 acides aminés) très active :

- l'angiotensine II provoque une importante vasoconstriction des artérioles entraînant ainsi une hypertension,
- l'enzyme est l'ACE (Angiotensin Converting Enzym = **Enzyme de Conversion de l'Angiotensine**), qui avec la rénine, est un des enzymes clés du système rénine-angiotensine.

Afin de mettre en évidence un rôle inhibiteur éventuel des hémorphines vis-à-vis de l'ACE, on effectue le **Test ACE** en absence puis en présence des 2 hémorphines isolées précédemment.

1-3-1) Le test ACE :

Le principe du test repose sur l'hydrolyse d'un substrat synthétique :

le 2-Furan Acryloyl-L-Phénylalaninyl Glycyl Glycine (**FAPGG**)

Le protocole opératoire du test et les réactifs utilisés sont présentés dans le **document n° 5**.

Réalisation du Test :

1-3-1-1) Calculer le volume de solution mère de substrat à utiliser pour effectuer le test.

1-3-1-2) Calculer le volume de solution d'enzyme à introduire.

1-3-1-3) Présenter de façon détaillée la procédure à mettre en œuvre pour effectuer ce test de façon rigoureuse.

1-3-2) Inhibition de l'ACE par la LVV-hémorphine-7 :

Le test ACE est effectué en ajoutant au milieu réactionnel différentes concentrations en inhibiteur. Pour chaque concentration en inhibiteur, on fait varier la concentration en substrat.

Les résultats obtenus sont représentés par le graphique du **document n° 6** :

1-3-2-1) A quel type de représentation correspond ce graphique ?

1-3-2-2) Les 3 droites **a**, **b** et **c** du graphique coupent l'axe des ordonnées en 3 points **A**, **B** et **C** et l'axe des abscisses en un point **P**. Les coordonnées de ces différents points sont les suivantes :

$$\mathbf{A} (x = 0 ; y = 28)$$

$$\mathbf{B} (x = 0 ; y = 42)$$

$$\mathbf{C} (x = 0 ; y = 70)$$

$$\mathbf{P} (x = - 0,008 ; y = 0)$$

Calculer la constante de Michaelis (K_M) de l'enzyme vis-à-vis du FAPGG.

Déterminer les pourcentages d'inhibition en présence de $1,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $2,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de LVV-hémorphine-7.

1-3-2-3) La LVV-hémorphine-7 joue effectivement un rôle inhibiteur vis-à-vis de l'ACE ; de quel type d'inhibition s'agit-il ? Expliquer.

1-3-3) Inhibition de l'ACE par les deux hémorphines :

Les graphiques A et B du **document n° 7** montrent les pourcentages d'inhibition obtenus respectivement avec la VV-hémorphine-7 et la LVV-hémorphine-7.

On peut définir pour chaque inhibiteur une **Concentration Inhibitrice 50 % (CI_{50})** conduisant à une baisse de l'activité enzymatique de 50 %.

1-3-3-1) Déterminer graphiquement la CI_{50} pour les 2 hémorphines testées (**joindre ce document à la copie**). Quelle est l'hémorphine la plus active ?

1-3-3-2) Quel serait l'effet physiologique intéressant si de telles substances apparaissaient naturellement in vivo ?

DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DE L'ACTIVITE DE PEPTIDES SUR DES CULTURES CELLULAIRES (25 points).

2-1) Préparation de milieux de culture

Des fibroblastes de souris (lignée continue 3T₃) sont mis en culture en milieu MEM (Minimal Essential Medium) additionné de :

- 10 % (V/V) de sérum de veau foetal (SVF),
- L-glutamine pour obtenir une concentration finale de 0,292 g.L⁻¹,
- Pénicilline-streptomycine de façon à obtenir une concentration de 100 unités de pénicilline et 100 µg de streptomycine par millilitre.

2-1-1) Pour quelle raison est-il préférable d'ajouter la L-glutamine au milieu de culture juste avant l'emploi ?

2-1-2) Quels éléments apportent le SVF ?

2-1-3) Pour l'entretien des cultures, on prépare 500 mL de milieu complet. Calculer les différents volumes d'additifs et de milieu de base à placer dans un flacon stérile.

Données :

- la L-glutamine stérile est à une concentration de 200 mmol.L⁻¹.
- La masse molaire de la L-glutamine est de 146 g.mol⁻¹.
- Le mélange pénicilline-streptomycine titre 10 000 unités de pénicilline et 10 mg de streptomycine par millilitre.

2-2) Entretien de cultures cellulaires.

Les cellules sont entretenues au rythme de un repiquage par semaine en flacon de culture.

La manipulation se fait dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.

2-2-1) Donner un mode opératoire pour un repiquage de cellules adhérentes en indiquant précisément le rôle de chaque étape et de chaque solution utilisée.

2-2-2) Un schéma de circulation de l'air dans un PSM de type II est donné (**document n° 8**). Commenter ce schéma et en déduire les différentes protections par un PSM de type II.

2-3) On cherche l'effet éventuel d'hydrolysats d'hémoglobine bovine sur les cultures de cellules.

2-3-1) On utilise la lignée continue 3T₃. Indiquer les différences entre lignée continue et lignée normale.

2-3-2) Pour cette étude, il est nécessaire d'utiliser un milieu défini additionné de SVF, d'antibiotiques et de L-glutamine.

Qu'est-ce qu'un milieu défini ? Certains milieux définis ne nécessitent pas l'addition de SVF, quels sont les avantages d'utiliser de tels milieux.

2-3-3) Pour l'étude proprement dite, on cultive les cellules en microplaque à 96 puits à fond plat. La suspension cellulaire est dénombrée en cellule de Malassez puis diluée de façon à obtenir 1 500 cellules vivantes dans chaque puits des différentes plaques. On placera 100 µL de suspension cellulaire par puits.

Pour le dénombrement, les cellules sont préalablement diluées dans du bleu de Funk :

- 100 µL de suspension cellulaire,
- 400 µL de solution de bleu de Funk (colorant vital).

Le comptage en cellule de Malassez donne les résultats suivants

Nombre de cellules vivantes par bande	29	31	29	26	27	29	32	30	33	34
Nombre de cellules mortes par bande	3	3	2	2	2	3	4	2	3	4

Caractéristiques de la cellule de Malassez :

H = 0,2 mm

Nombre de bandes : 10

l = 2 mm

L = 2,5 mm

- 2-3-3-1)** Donner l'aspect des cellules dans le champ microscopique. Justifier.
- 2-3-3-2)** Calculer la dilution de la suspension cellulaire à effectuer afin de préparer le volume nécessaire à la réalisation de 10 microplaques.
- 2-3-3-3)** Quel est l'intérêt de la numération des cellules mortes ?
- 2-3-3-4)** Afin de montrer l'influence d'hydrolysats d'hémoglobine bovine sur la sécrétion protéique des fibroblastes en culture, sept fractions obtenues en gel perméation HPLC sont testées.
Les protéines des surnageants sont dosées après 8 jours de culture en présence et en absence d'hydrolysat.
Les résultats sont donnés dans le **document n° 9**.
Analyser ces résultats.

TROISIÈME PARTIE : AUTRES PEPTIDES BIOACTIFS : LES MICROCINES (20 points)

Actuellement, des études sont en cours sur les microcines. Ce sont de petits peptides produits par *Escherichia coli*, qui ont une activité anti-salmonelle.

3-1) Production de microcines.

La microcine E492 est produite dans des conditions optimales par culture de la souche E492 d'*Escherichia coli* en milieu approprié (bouillon M 63).

Des prélèvements de cette culture sont effectués toutes les heures. Sur chaque prélèvement :

- on mesure l'absorbance à 600 nm, afin de suivre la croissance de la souche,
- on détermine la concentration de microcine produite en mesurant son activité sur une souche *Salmonella* sensible. L'activité des différents prélèvements est testée par la méthode de diffusion radiale (**document n° 10**).

3-1-1) Indiquer la composition et le rôle des témoins.

3-1-2) Quelles sont les conditions à respecter pour que les résultats obtenus, au cours de la mesure de l'activité, soient reproductibles ?

3-1-3) On dispose d'une suspension de la souche *Salmonella* ayant 0,45 unité d'absorbance à 600 nm. Calculer le volume de suspension bactérienne à incorporer à la gélose pour préparer une boîte (120mm/120mm) de milieu. En déduire un protocole adapté à la préparation des boîtes.

Donnée : Une unité d'absorbance correspond à 10^9 UFC.mL⁻¹.

3-1-4) Les résultats obtenus pour le suivi de la production de microcine E492 sont donnés dans le **document n° 11**.

Pendant quelle phase de croissance la microcine est-elle produite ? Justifier.

3-1-5) Déterminer à partir du document n° 11 :

- la vitesse maximale de production de microcine,
- la productivité volumique horaire totale.

3-2) Détermination de l'effet bactéricide de différentes microcines vis-à-vis des salmonelles.

En fonction de la souche d'*Escherichia coli* utilisée, on peut produire puis purifier différentes microcines.

On se propose de déterminer la microcine qui a la plus grande activité anti-salmonelle.

Le document n° 12 présente les résultats de mesure de l'effet bactéricide, sur des cultures de *Salmonella* en milieu liquide, de trois microcines.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de survivants par rapport à une culture témoin.

3-2-1) Définir le terme « bactéricide ».

3-2-2) Sur chaque graphe, on détermine approximativement, la concentration effective 50 (CE₅₀) de la microcine.

Définir cette valeur et préciser son intérêt par rapport à la CE₁₀₀.

Déterminer approximativement la CE₅₀ de chaque microcine. Classer ces trois microcines par ordre d'intérêt. Justifier.

DOCUMENT N° 1**a – Séquence primaire de la chaîne de l'hémoglobine**

1	Met - Leu - Thr - Ala - Glu - Glu - Lys - Ala - Ala - Val - Thr - Ala - Phe - Trp -
15	Ser - Lys - Val - His - Val - Asp - Glu - Val - Gly - Gly - Glu - Ala - Leu - Gly -
29	Arg - Leu - Leu - Val - Val - Tyr - Pro - Trp - Thr - Gln - Arg - Phe - Phe - Glu -
43	Ser - Phe - Gly - Asp - Leu - Ser - Thr - Ala - Asp - Ala - Val - Met - Asp - Asn -
57	Pro - Lys - Val - Lys - Ala - His - Gly - Lys - Lys - Val - Leu - Asp - Ser - Phe -
71	Ser - Asp - Gly - Met - Lys - His - Leu - Asp - Asp - Leu - Lys - Gly - Thr - Phe -
85	Ala - Ala - Leu - Ser - Glu - Leu - His - Cys - Asp - Lys - Leu - His - Val - Asp -
99	Pro - Glu - Asn - Phe - Lys - Leu - Leu - Gly - Asn - Val - Leu - Val - Val - Val -
113	Leu - Ala - Arg - Asn - Phe - Gly - Asn - Glu - Phe - Thr - Pro - Val - Leu - Gln -
127	Ala - Asp - Phe - Gln - Lys - Val - Val - Ala - Gly - Val - Ala - Asn - Ala - Leu -
141	Ala - His - Arg - Tyr - His
	145

La zone encadrée correspond à la zone stratégique de la chaîne

b – Séquences de quelques hémorphines

hémorphine 4 :	Tyr-Pro-Trp-Thr
hémorphine 5 :	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln
hémorphine 6 :	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg
hémorphine 7 :	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
VV-hémorphine-7 :	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
LVV-hémorphine-7 :	Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe

DOCUMENT N° 2**a - Protocole de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine.**

L'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine est réalisée dans un flacon thermostaté sous agitation continue dont les paramètres sont contrôlés par un appareil pH-stat automatique. Cet appareil comprend essentiellement :

- Une sonde de température reliée à un dispositif de maintien de T à 40°C.
- Deux éléments constituant une boucle de régulation :
 - une électrode combinée de pH mesurant en continu le pH du milieu réactionnel,
 - un flacon de solution acide relié à une burette (précision au 1/100 mL) dont l'écoulement s'effectue automatiquement afin de maintenir le pH du milieu réactionnel à 2.

La réaction de protéolyse est initiée par l'addition de 40 mg de pepsine ajoutée à une solution d'hémoglobine à 5 % (p/v) dans de l'eau distillée et acidifiée à pH 2 par une solution d'acide chlorhydrique à 4 mol/L. On utilise classiquement 20 mL de solution d'hémoglobine de façon à travailler sur $m_{Hb} = 1 \text{ g}$.

Le flacon d'acide permettant de maintenir le pH à 2 contient une solution d'acide chlorhydrique de concentration $C_{HCl} = 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Le volume de cette solution versée pour chaque hydrolyse est V_{HCl} (en mL).

La réaction d'hydrolyse est stoppée en remontant le pH jusqu'à 6 par l'addition d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$. Le mélange final est immédiatement congelé à -20°C puis lyophilisé.

Le lyophilisat est conservé à -20°C avant d'être analysé et/ou purifié.

b - Principe de la détermination du DH d'un hydrolysats pepsique de protéine.

La pepsine est une endoprotéase permettant l'hydrolyse de certaines liaisons peptidiques au sein d'une chaîne polypeptidique. Son pH optimum d'action est pH = 2.

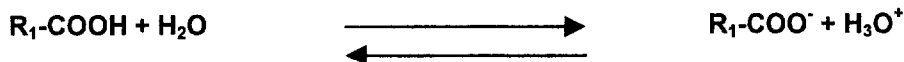
Grâce à la méthode du pH-stat, l'hydrolyse se déroule dans un milieu non tamponné dont le pH est cependant maintenu à 2.

La réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique est la suivante :



En réalité, la pepsine exerçant son action à pH = 2, l'ionisation des deux nouvelles fonctions apparues est tributaire du pK_a de chacune de ces fonctions :

- pour la fonction amine, dont le $pK_a > 9$, elle se trouve à 100 % sous forme -NH_3^+ ,
- mais pour la fonction acide carboxylique, dont le pK_a moyen = 2,3, il y a un équilibre chimique :



Soit α le coefficient de dissociation moyen de cette fonction à pH = 2.

Le maintien de l'équilibre à pH=2 avec :

$$\begin{aligned} \alpha &= \text{fraction ionisée (R1-COO}^-) \\ (1 - \alpha) &= \text{fraction non ionisée (R1-COOH)} \end{aligned}$$

nécessite un apport de $(1 - \alpha)$ mole d'ions H_3O^+ par mole de liaisons peptidiques hydrolysées.

c - Informations concernant l'hémoglobine bovine.

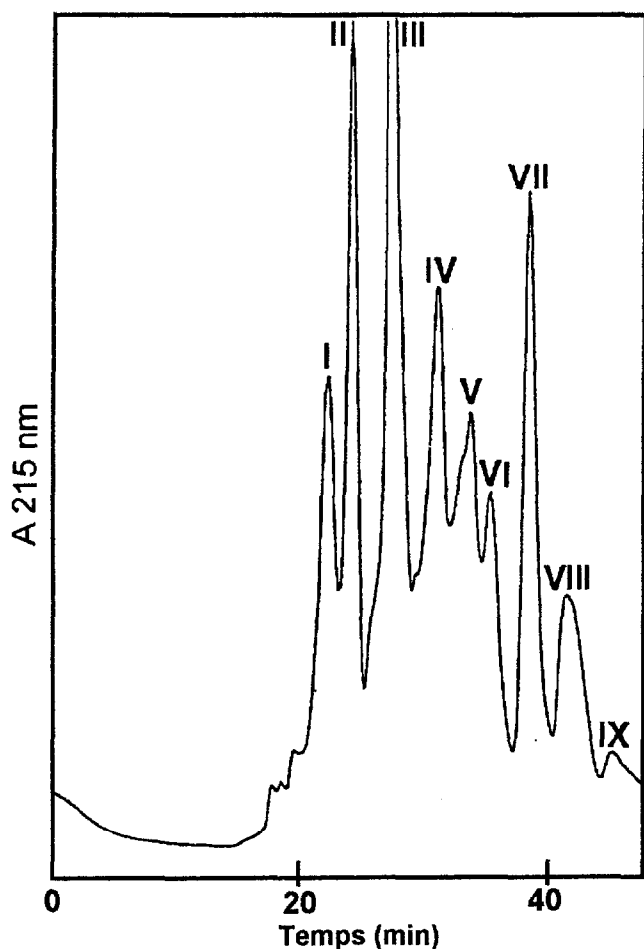
L'hémoglobine bovine est une hétéroprotéine tétramérique dont le groupement prosthétique est un noyau hème présent au niveau de chaque monomère. Elle est constituée de 2 chaînes polypeptidiques α (à 141 acides aminés) et de 2 chaînes polypeptidiques β (à 145 acides aminés).

La masse molaire de l'hémoglobine est $M_{Hb} = 64500 \text{ g mol}^{-1}$.

Le nombre de liaisons peptidiques dans une molécule d'hémoglobine est $n = 568$.

On peut constater grâce à ces deux dernières informations que la masse molaire moyenne d'un résidu d'acide aminé est de l'ordre de 110 à 120 g mol^{-1} .

Lorsque l'hémoglobine est mise en solution dans de l'eau à pH = 2, elle subit une dénaturation irréversible qui dissocie les 4 monomères ($2\alpha + 2\beta$) et sépare les noyaux hème des chaînes polypeptidiques.

DOCUMENT N° 3**Première Etape : GP-HPLC**

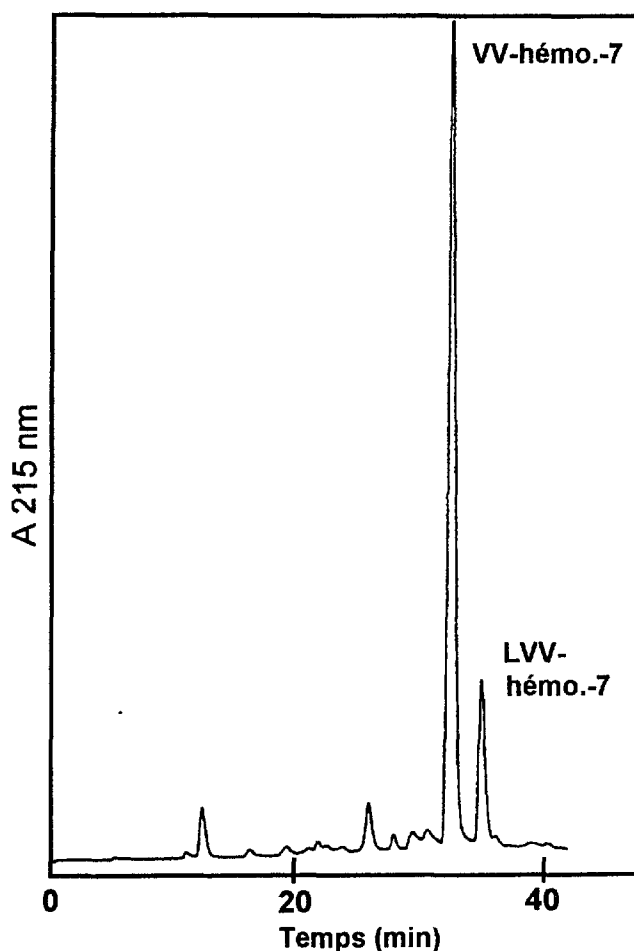
Profil d'élution de l'hydrolysats total sur colonne TSK-Gel (60 cm X 21,5 mm i.d.)

Conditions :

Tampon acétate d'ammonium 0,01 mol.L⁻¹, pH 6.

Débit : 6 mL.min⁻¹

Quantité injectée : 50 mg/250 µL

Seconde Etape : RP-HPLC (F VII)

Profil d'élution de la fraction peptidique FVII issue de la colonne TSK-Gel, sur une colonne Waters Delta Pak C18 (30 cm X 19 mm i.d.)

Conditions :

Eluant A : acétate d'ammonium 10mmol.L⁻¹, pH 6.

Eluant B : acétonitrile pur

Gradient linéaire de B de 0 - 40% en 40 minutes

Débit : 12 mL.min⁻¹.

Quantité injectée : 100 mg/500 µL

DOCUMENT N° 4**Caractéristiques des colonnes TSK-Gel pour la Gel-Perméation**

TSK Gel Type	Particle Size (µm)	Pore Size (angström)	Sample MW (Globular Protein)
G2000SW _{XL}	5	125	5-100 x 10 ³
G2000SW	10	125	5-100 x 10 ³
G3000SW _{XL}	5	250	10-500 x 10 ³
G3000SW	10	250	10-500 x 10 ³
G4000SW _{XL}	8	450	20-10,000 x 10 ³
G4000SW	13	450	20-10,000 x 10 ³

Mobile Phase : 0.03M NaCl in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0

Référence : catalogue SUPELCO 2002

un angström = 0,1 nm

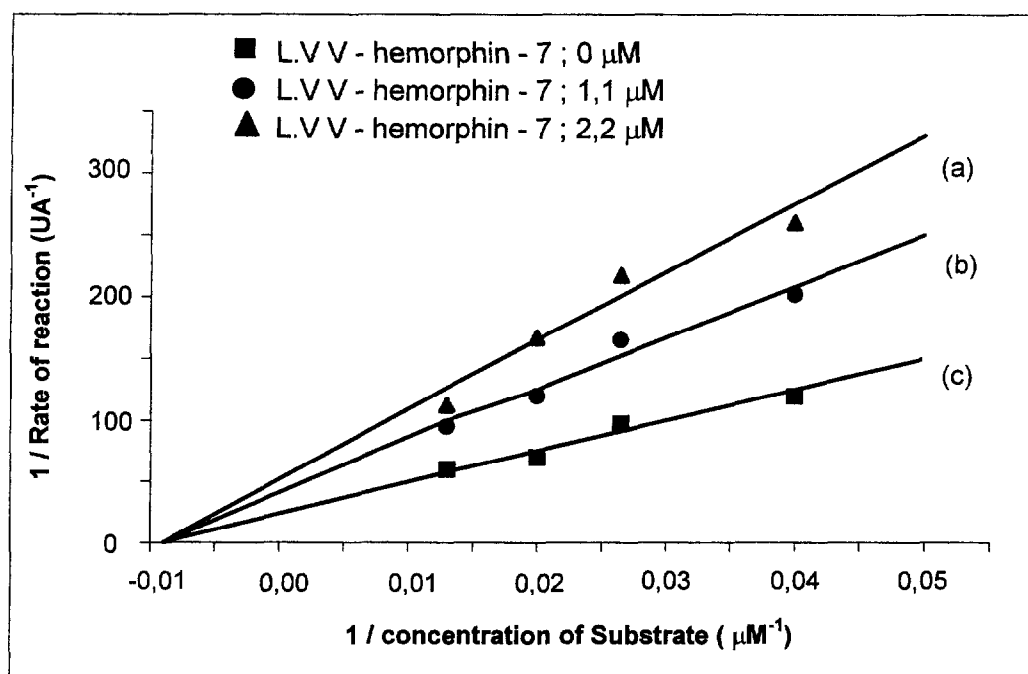
M = mol.L⁻¹

DOCUMENT N° 5**Test ACE****Protocole opératoire**

ACE activities were routinely measured with $5 \cdot 10^{-5}$ M FAPGG as substrate in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.3 M NaCl by the method of HOLMQUIST. In a typical run, 1.2 mL was placed in the spectrophotometer and allowed to reach thermal equilibrium at 25°C. ACE 7.5 mU was added to initiate hydrolysis. The absorbance decrease at 328 nm in the first 5 min was monitored with a spectrophotometer.

Réactifs utilisés

Tampon : tampon Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ ; NaCl 0,3 mol.L⁻¹ ; pH = 7,5
Solution mère de substrat : FAPGG à $3 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ dans du tampon
Solution d'enzyme : ACE à 0,5 U.mL⁻¹ dans de l'eau ultrapure.

DOCUMENT N° 6**Inhibition de l'ACE par la LVV-hémorphine-7**

Référence : Biochemical and biophysical research communications

Vol.204 ; N° 1, 1994 ; page 221

Remarque : M = mol.L⁻¹.

UA = unité arbitraire

DANS CE CADRE

Académie : _____ Session : _____
Examen ou Concours _____ Série* : _____
Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____
Épreuve/sous-épreuve : _____
NOM : _____
(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)
Prénoms : _____ N° du candidat
Né(e) le : _____ (le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

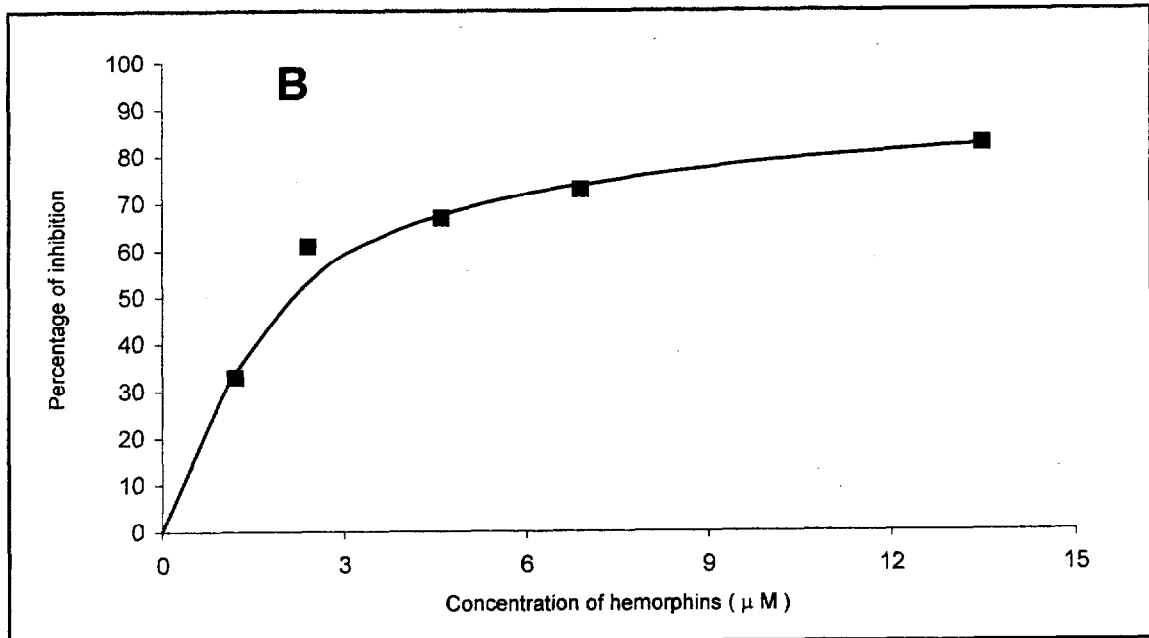
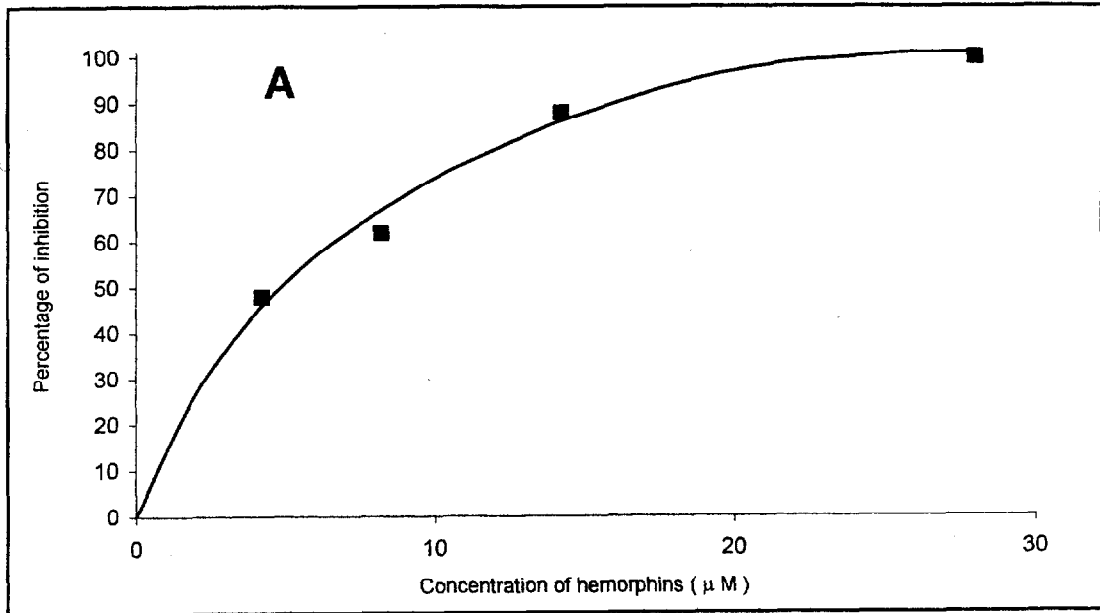
* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BCFTU
Page : 12/17

SESSION 2004

Durée : 4 H
Coefficient : 4

DOCUMENT N° 7
Document à rendre avec la copie



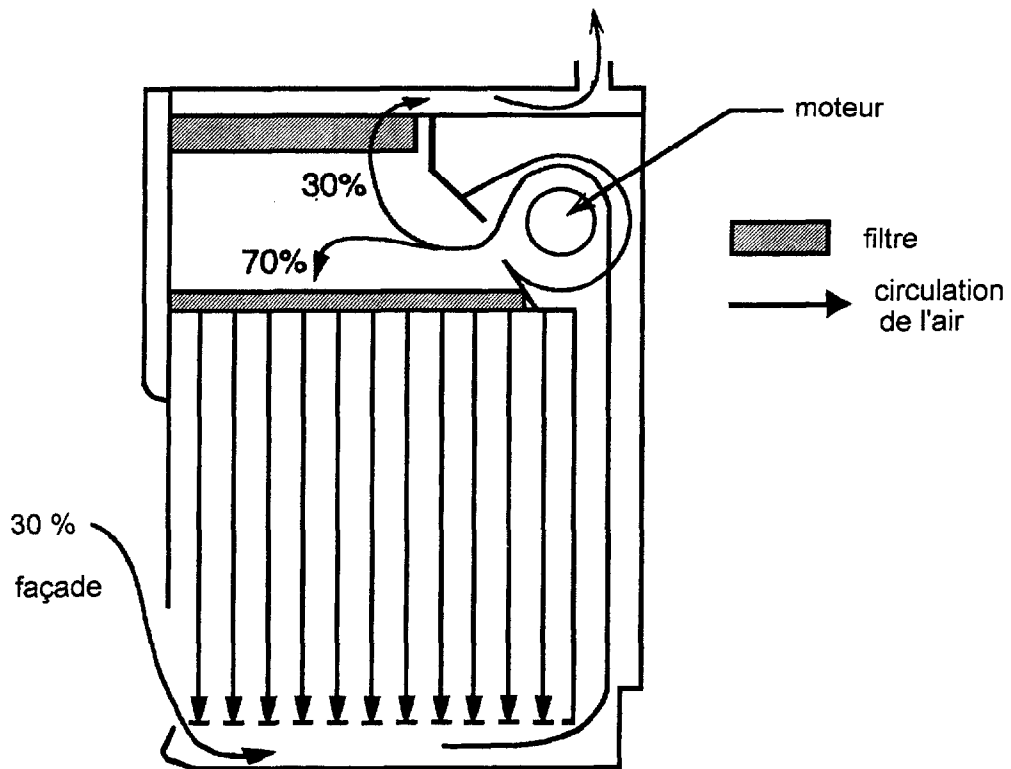
Référence : Biochemical and biophysical research communications

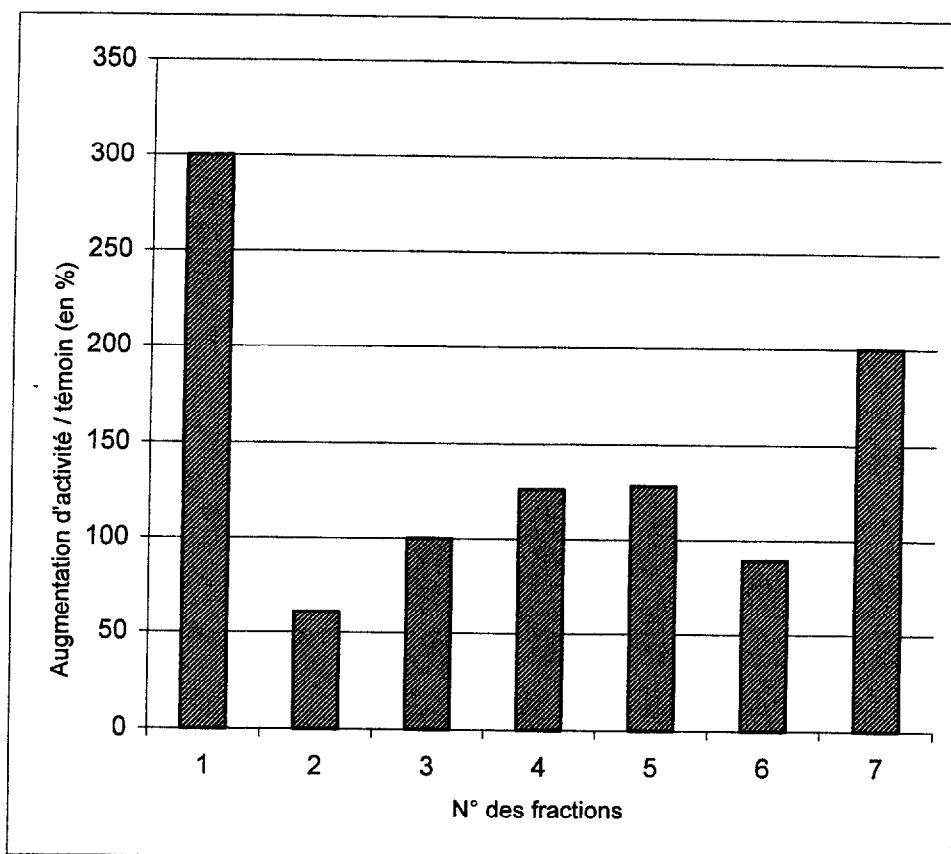
Vol.204 ; N° 1, 1994 ; page 219

NE RIEN ÉCRIRE

DOCUMENT N° 8

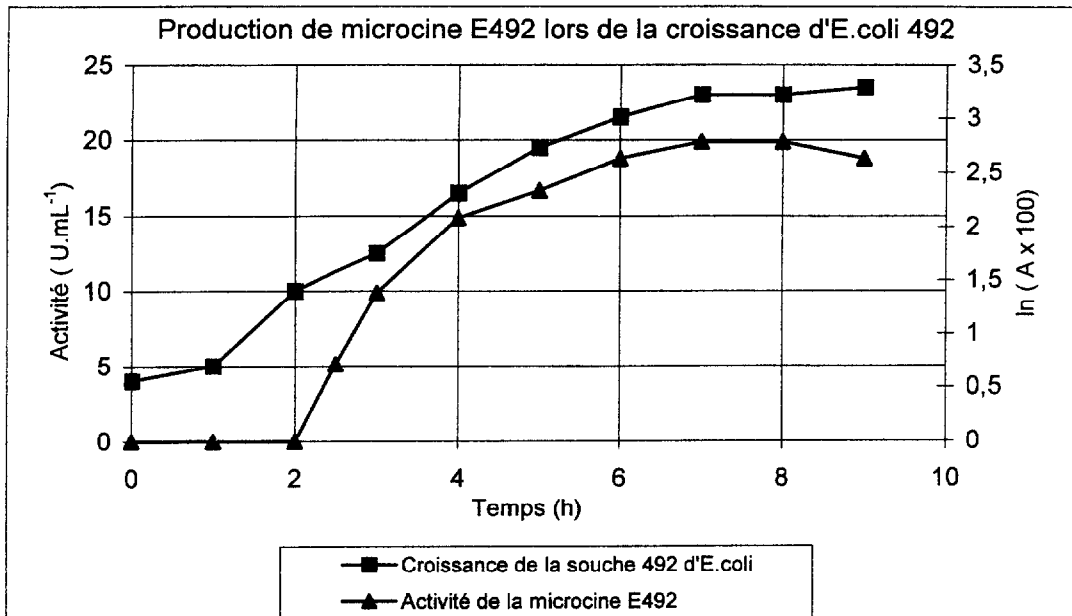
Schéma de circulation de l'air dans un PSM de type II



DOCUMENT N° 9**Influence d'hydrolysats d'hémoglobine bovine sur la sécrétion protéique de fibroblastes en culture.**

DOCUMENT N° 10**Protocole de détermination de l'activité de la microcine produite
(méthode de diffusion radiale)**

- Préparer 60 mL de gélose M63 contenant la souche *Salmonella* à la concentration de 2.10^5 bactéries.mL⁻¹. Couler cette gélose dans une boîte de 120 mm x 120 mm.
- Creuser des puits à l'aide d'un emporte pièce, prévoir deux puits pour les témoins.
- Déposer dans chaque puits 20 µL de chaque prélèvement.
- Laisser diffuser pendant 15 minutes à la température du laboratoire.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Mesurer les diamètres d'inhibition de la culture.
- Les résultats sont exprimés en unité d'activité (0,1 mm d'inhibition de la culture correspond à 1 U.mL⁻¹).

DOCUMENT N° 11

DOCUMENT N° 12

