



**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.

CORRIGE

Ces éléments de correction n'ont qu'une valeur indicative. Ils ne peuvent en aucun cas engager la responsabilité des autorités académiques, chaque jury est souverain.

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
DES PROTEINES

SESSION 2012

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

CORRIGE

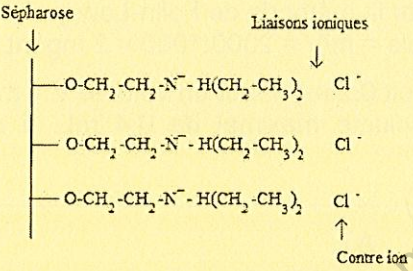
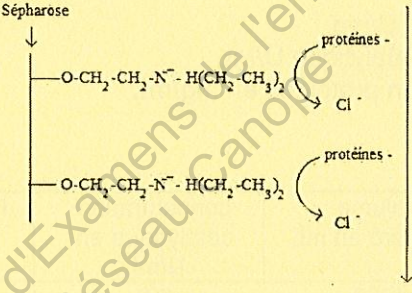
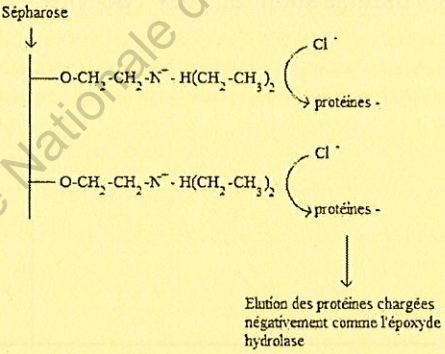
Ce corrigé comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5.

| | | |
|--|------------|--------------|
| BTS BIOTECHNOLOGIES | | Session 2012 |
| Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines | BOE3BP bis | Page : 1/5 |

Caractérisation et purification de l'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger*

| N° | Réponse | Points |
|-----------|--|--|
| 1. | Généralités de l'époxyde hydrolase d'<i>Aspergillus niger</i> | 12 points |
| 1.1. | C'est une hydrolase donc classe 3. | 1 point |
| 1.2. | <p>Le site actif d'un enzyme est la région qui lie les substrats et qui contient les résidus ou groupes catalytiques qui participent directement à la formation ou au clivage des liaisons.</p> <p>Les aminoacyles qui participent à ce site actifs sont : Asp 192, Tyr 251, Tyr314, Asp 348, His 374.</p> <p>Les groupes hydroxyls des Tyr 251 et 314 permettent la liaison et le positionnement du substrat dans le site actif de l'enzyme par liaison H. Le groupement carboxylique de Asp 192 permet l'attaque nucléophile. Les chaînes latérales d'His 374 et Asp 348 permettent d'activer une molécule d'eau.</p> | <p>1 point</p> <p>0,5 point</p> <p>1,5 point</p> |
| 1.3. | <p>Deux rôles attendus parmi :</p> <ul style="list-style-type: none"> • réguler l'activité des protéines • les "étiqueter" afin qu'elles soient reconnues par d'autres molécules ou par des systèmes de dégradation • les ancrer dans une membrane • les intégrer à une cascade de signalisation • les "adresser" à un compartiment cellulaire • définir une identité immunologique (groupes sanguins) | 2 points |
| 1.4. | Lieu : RER et appareil de golgi | 0,5 point |
| 1.5. | <p>1 : Hélice α</p> <p>2 : Feuillet β</p> <p>3 : Coude β</p> <p>Préciser le niveau d'organisation de ces éléments structuraux ainsi que les liaisons mises en jeu.</p> <p>Structure secondaire. Liaisons H entre les CO et NH des liaisons peptidiques.</p> | 3 points |
| 1.6. | <p>Dégradation cyclique récurrente à partir du NH₂ terminal puis séparation et identification des PTH-AA par chromatographie en phase inverse.</p> | 1,5 point |
| 1.7. | Dans les conditions testées, détermination du pH optimum : pH=7 et de la température optimale = 40°C. | 1 point |

| 2. | Préparation d'extrait soluble brut | 8 points | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------|------|-----|------|-----|-----------------|------|-----|------|-----|-----------------|-----|------|-----|------|
| 2.1. | <p>Ce sont les seuils de coupure des deux techniques qui diffèrent. La microfiltration permet de retenir les cellules intactes et les débris cellulaires et permet la séparation de particules de l'ordre du micromètre. (Pores de 0,1 à 8 µm de diamètre).</p> <p>L'ultrafiltration permet la séparation, la concentration de macromolécules, le dessalage de solutions. Diamètre des pores plus petits (de 5 à 35 nm voire 100 nm).</p> | 2 points | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.2. | <p>Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry [protéines] fraction soluble = $m/V = 2000/1000 = 2 \text{ mg/mL}$</p> <p>Pour avoir $m = 200 \text{ µg}$ soit 0,2 mg il faut un volume $V = m/C = 0,2/2 = 0,1 \text{ mL}$ soit 100 µL donc inférieur au volume maximal de 0,4 mL. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une dilution.</p> | 2 points | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.3. | $AS = \frac{\text{Cat conc}}{[\text{protéine}]} = \frac{AT}{\text{masse protéine}}$ <p>exemple de calcul : $AS \text{ fraction soluble} = 6.0 / (2000/1000) = 3$</p> <p>Avec AS : Activité Spécifique en U/mg Cat conc : concentration catalytique U/mL [protéine] : concentration en protéines en mg/mL Masse protéine en mg</p> | 2,5 points | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="228 1137 491 1227">Etapas</th> <th data-bbox="491 1137 715 1227">Volume récupéré en mL</th> <th data-bbox="715 1137 946 1227">concentration catalytique en U/mL</th> <th data-bbox="946 1137 1193 1227">Protéines totales en mg</th> <th data-bbox="1193 1137 1487 1227">Activité spécifique en U/mg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="228 1227 491 1261">Fraction soluble</td> <td data-bbox="491 1227 715 1261">1000</td> <td data-bbox="715 1227 946 1261">6,0</td> <td data-bbox="946 1227 1193 1261">2000</td> <td data-bbox="1193 1227 1487 1261">3,0</td> </tr> <tr> <td data-bbox="228 1261 491 1294">Microfiltration</td> <td data-bbox="491 1261 715 1294">4000</td> <td data-bbox="715 1261 946 1294">1,6</td> <td data-bbox="946 1261 1193 1294">1000</td> <td data-bbox="1193 1261 1487 1294">6,4</td> </tr> <tr> <td data-bbox="228 1294 491 1323">Ultrafiltration</td> <td data-bbox="491 1294 715 1323">380</td> <td data-bbox="715 1294 946 1323">15,0</td> <td data-bbox="946 1294 1193 1323">380</td> <td data-bbox="1193 1294 1487 1323">15,0</td> </tr> </tbody> </table> | | | | | Etapas | Volume récupéré en mL | concentration catalytique en U/mL | Protéines totales en mg | Activité spécifique en U/mg | Fraction soluble | 1000 | 6,0 | 2000 | 3,0 | Microfiltration | 4000 | 1,6 | 1000 | 6,4 | Ultrafiltration | 380 | 15,0 | 380 | 15,0 |
| Etapas | Volume récupéré en mL | concentration catalytique en U/mL | Protéines totales en mg | Activité spécifique en U/mg | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fraction soluble | 1000 | 6,0 | 2000 | 3,0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Microfiltration | 4000 | 1,6 | 1000 | 6,4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ultrafiltration | 380 | 15,0 | 380 | 15,0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.4. | <p>Taux de purification ou d'enrichissement global :</p> $T_n = \frac{AS_n}{AS_0}$ <p>avec AS_n l'activité spécifique après l'ultrafiltration et AS_0 l'activité spécifique de départ</p> <p>$T = 15.0 / 3.0 = 5$</p> | 1,5 point | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|------|---|------------------|
| 3. | Purification de l'époxyde hydrolase d'<i>A. niger</i> | 18 points |
| 3.1. | Ce sont des échangeurs d'anions car les groupements fixés sur la colonne ont une charge positive | 1 point |
| 3.2. | <p>A l'équilibre :</p>  <p>Injection de l'extrait soluble : Les protéines chargées négativement sont retenues par la colonne. Les autres sont éluées.</p>  <p>Molécules non retenues : protéines chargées - ou neutres (pH de travail < pH)</p> <p>Elution des protéines retenues : Gradient croissant de force ionique. Compétition entre les Cl⁻ et les protéines chargées</p>  | 1 point |
| 3.3. | Gradient continu ou linéaire de concentration en contre ion Cl ⁻ . | 1 point |
| 3.4. | La présence d'un pic d'activité époxyde hydrolase montre qu'elle est récupérée dans les fractions 60 à 75. L'époxyde hydrolase est éluée pour une concentration en KCl entre 0,22 et 0,26 mol/L | 2 points |

| | | |
|--|---|------------------|
| 3.5. | Gel de séparation : pourcentage en acrylamide-bisacrylamide = 15% et concentration en Tris-HCl pH 8,8 = 0,375 mol/L | 3 points |
| 3.6. | Le tampon d'échantillon contient du : <ul style="list-style-type: none"> • SDS : permet la linéarisation des chaînes polypeptidiques et les recouvre de charges négatives à densité de charge constante. | 2 points |
| | <ul style="list-style-type: none"> • β-mercaptoéthanol : est un agent réducteur qui coupe les ponts disulfures • Tampon Tris-HCl : maintien du pH • glycérol : alourdit l'échantillon • bleu de bromophénol visualise la migration | 2 points |
| 3.7. | Lors de la purification, on observe la disparition des bandes contaminantes et une augmentation de la bande d'intérêt. La purification paraît correcte notamment au niveau de la pureté. | 1 point |
| | Après purification, une seule bande d'environ 45 KDa est En SDS – Page, la masse moléculaire est de 45 KDa tandis qu'en gel filtration celle-ci est de 187 KDa. Les conditions utilisées pour le gel filtration permettent de garder l'époxyde hydrolase sous forme native, non dénaturée contrairement au SDS-Page qui dénature les structures secondaire, tertiaires et quaternaires des protéines. La comparaison des masses permet de conclure que l'époxyde hydrolase est tétramérique. | 1 point |
| Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition | | 2 points |
| Total | | 40 points |

Le total des points est à diviser par 2 pour obtenir une note sur 20 points.

| Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire) : 1 point | |
|--|--|
| 1 point | 0 point |
| Peu de fautes (maxi 3 à 5 par pages), les termes scientifiques usuels sont correctement orthographiés. | Très nombreuses fautes d'orthographe et/ou de grammaire (au moins 10 par pages), des erreurs pour l'orthographe des termes scientifiques usuels. |
| Vocabulaire adapté, pas de contresens. | Vocabulaire inadapté, contresens. |
| Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture : 1 point | |
| 1 point | 0 point |
| Copie présentée de façon soignée, facilitant le travail de lecture du correcteur (textes et schémas) | Copie « bâclée », lecture fastidieuse liée à un manque de soin apporté au traitement des questions (textes et schémas) |
| Lecture fluide, texte facilement compréhensible. | Formulations non claires nécessitant une relecture. |

