



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Campagne 2012

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
DES PROTEINES

SESSION 2012

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
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 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2012
Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	BOE3BP	Page : 1/7

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

Les époxydes sont des intermédiaires clés pour la synthèse des composés pharmaceutiques, agrochimiques et phytosanitaires. Les époxyde hydrolases sont abondants dans la nature, chez les mammifères, les invertébrés, les plantes et les microorganismes. En effet, ils sont impliqués dans les phénomènes de détoxification notamment chez les mammifères et les insectes. Ils peuvent également intervenir dans la biosynthèse d'acides gras hydroxylés chez les plantes entrant notamment dans la composition de la cuticule ou jouant un rôle dans la protection contre certains champignons parasites.

L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* est particulièrement intéressant en termes d'activité et de spécificité de substrat mais aussi en terme de production facilitée par des souches recombinantes.

1. Caractéristiques de l'enzyme époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* (6 points)

L'époxyde hydrolase d'*A. niger* est un enzyme michaelien qui catalyse l'hydrolyse des époxydes en diols à l'aide d'un mécanisme enzymatique en deux étapes (**document 1**).

1.1. Indiquer la classe de ces enzymes dans la classification internationale.

1.2. Définir le site actif d'un enzyme.

A l'aide du **document 1a**, indiquer le ou les aminoacyles participant à ce site. Préciser le rôle de chaque chaîne latérale de ces aminoacyles lors de la catalyse.

Chez les organismes supérieurs, les époxydes hydrolases subissent des modifications post traductionnelles et notamment des N-glycosylations.

1.3. Indiquer deux rôles possibles des modifications post traductionnelles des protéines.

1.4. Indiquer la localisation cellulaire de ces N-glycosylations.

1.5. Légender les éléments structuraux numérotés de 1 à 3 sur le **document 1b**. Préciser le niveau d'organisation de ces éléments structuraux ainsi que les liaisons mises en jeu.

Le séquençage de la partie N terminale de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* a été réalisé par dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur automatisé.

1.6. Présenter le principe de cette technique (la formule du réactif n'est pas demandée).

1.7. A l'aide du **document 1c**, indiquer les paramètres physicochimiques optimaux d'activité de l'enzyme.

2. Préparation d'extrait soluble brut de l'enzyme (4 points)

L'extrait soluble brut est obtenu à partir d'un réacteur de 5 litres d'une culture d'*Aspergillus niger* recombinante. Trois étapes sont nécessaires :

- Lyse des cellules et centrifugation.
- Récupération de la fraction soluble.
- Concentration par microfiltration et ultrafiltration tangentielle.

Le dosage de l'activité époxyde hydrolase et le dosage des protéines ont été réalisés sur ces différentes fractions. Les résultats sont présentés dans le **document 2**.

2.1. Préciser la différence entre la microfiltration et l'ultrafiltration:

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Folin-Lowry. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution étalon de sérum d'albumine bovine étalon à 0,5 mg/mL. Elle permet de couvrir une gamme de masse allant de 0 à 400 µg de protéines pour un volume maximal de solution protéique de 0,4 mL.

2.2. A l'aide des résultats du **document 2**, indiquer le volume de fraction soluble à prélever pour avoir une masse de protéine se situant au milieu de la gamme étalon.

Préciser si une dilution préalable est nécessaire. Justifier la réponse

2.3. À partir du **document 2**, calculer les activités spécifiques des trois fractions en précisant préalablement la formule littérale employée.

2.4. Définir et calculer le taux de purification global ou l'enrichissement global.

3. Purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* (9 points)

La purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger* recombinante est réalisée en quatre étapes successives, décrites dans le **document 3**.

3.1. A l'aide du **document 3**, indiquer le type de phase stationnaire utilisé dans les chromatographies de la 1^{ère} et de la 3^{ème} étape.
Justifier la réponse.

3.2. A l'aide de **l'étape 1** du **document 3**, présenter, sous forme d'un schéma chronologique, le mouvement des molécules ionisées entre les deux phases de la chromatographie.

3.3. Qualifier la méthode d'élution utilisée lors de cette étape 1.

Le **document 4** présente le profil d'élution des différentes protéines ainsi que l'activité époxyde hydrolase après séparation sur DEAE-Sépharose.

3.4. Identifier les fractions contenant l'époxyde hydrolase.

Justifier la réponse et préciser l'intervalle de concentration en KCl permettant son élution.

Dernière étape de la purification, la chromatographie d'exclusion a également permis la détermination de la masse moléculaire de l'époxyde hydrolase native, ceci grâce à un étalonnage de la colonne. Le résultat obtenu est de 187 kDa.

L'électrophorèse de contrôle de pureté par SDS-Page (**document 5**) permet également de déterminer des caractéristiques structurales.

3.5. A l'aide du **document 5a**, calculer les concentrations en acrylamide-bisacrylamide (T%) et en Tris-HCl utilisés pour le gel de séparation.

3.6. Préciser le rôle de chaque constituant dans le tampon d'échantillon.

3.7. A partir du **document 5b**, conclure sur la qualité de la purification et préciser la structure de l'enzyme.

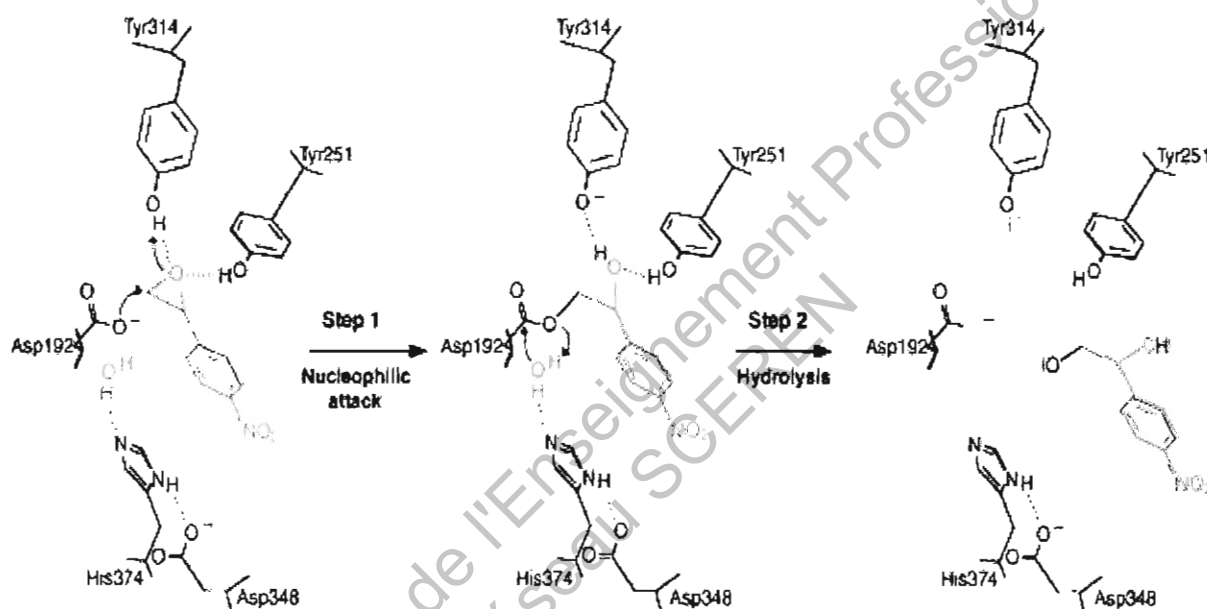
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

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 : Structure et mécanisme de catalyse de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*

1a. Réaction catalysée par l'époxyde hydrolase d'*A. niger*

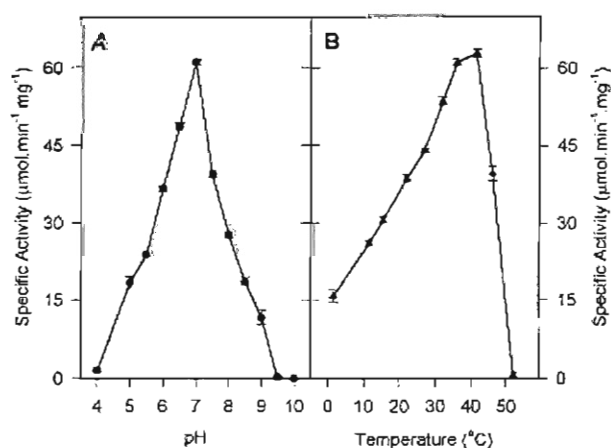
Mechanism of 4-nitrostyrene oxide hydrolysis by EH; residues are shown as close as possible to their actual relative orientation and position. Initial binding and positioning of the substrate in the active center of the enzyme is thought to be directed by hydrogen bonding between the epoxide ring oxygen and the hydroxyl groups of Tyr251 and Tyr314. In the first step of the enzymatic reaction, the carboxylate sidechain of the catalytic nucleophile Asp192 attacks the unsubstituted carbon atom of the oxirane ring, forming an ester bond and opening the ring. The process is facilitated through simultaneous proton donation by one of the tyrosine residues. The second step of the reaction consists of the hydrolysis of the ester intermediate via the attack of a water molecule. This water is activated through proton abstraction by the His374/Asp348 charge-relay system, possibly further assisted by Glu123 (not shown).



1b. Structure de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.



1c. Caractérisation de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*



Document 2 : Détermination de la concentration catalytique de l'époxyde hydrolase et de la quantité de protéines

Étapes	Volume récupéré en mL	Concentration catalytique en U/mL	Protéines totales en mg
Fraction soluble	1000	6,0	2000
Microfiltration	4000	1,6	1000
Ultrafiltration	380	15,0	380

Document 3 : Les différentes étapes permettant la purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.

- Etape 1 : chromatographie échangeuse d'ions, DEAE-Sépharose *

380 mL d'extrait soluble brut sont déposés sur une colonne de DEAE-Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 1 mM d'EDTA, 1mmol/L de cystéine et de 0,5 mmol/L de PMSF appelé tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,35 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées par un système d'ultrafiltration jusqu'à un volume de 25 mL. Après avoir ajouté le sulfate d'ammonium à 60% de saturation et agité, la solution est centrifugée à 15000 trs/min pendant 30 min. Le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon A contenant 0,5 mol/L de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

- Etape 2 : chromatographie d'interaction hydrophobe, Phényl-Sépharose

Les 5 mL de concentrat précédemment obtenu sont déposés sur la colonne de Phényl-Sépharose équilibrée avec le tampon Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,1 additionné de 0,5 mol/L de sulfate d'ammonium, les protéines retenues sont éluées avec le tampon A. L'enzyme est éluée dans les fractions 1 à 20, rassemblées et concentrées par ultrafiltration. Ce pool est dialysé et le volume obtenu de 11,5 mL qui constitue la charge de la colonne mono Q.

- Etape 3 : chromatographie échangeuse d'ions, Mono-Q *

Le dialysat est déposé sur la colonne mono Q équilibrée avec du tampon A. Les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de 0 à 0,25 mol/L de KCl dans le tampon A. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées jusqu'au volume de 200 μL .

- Etape 4 : chromatographie d'exclusion ou gel filtration, Supérose 12

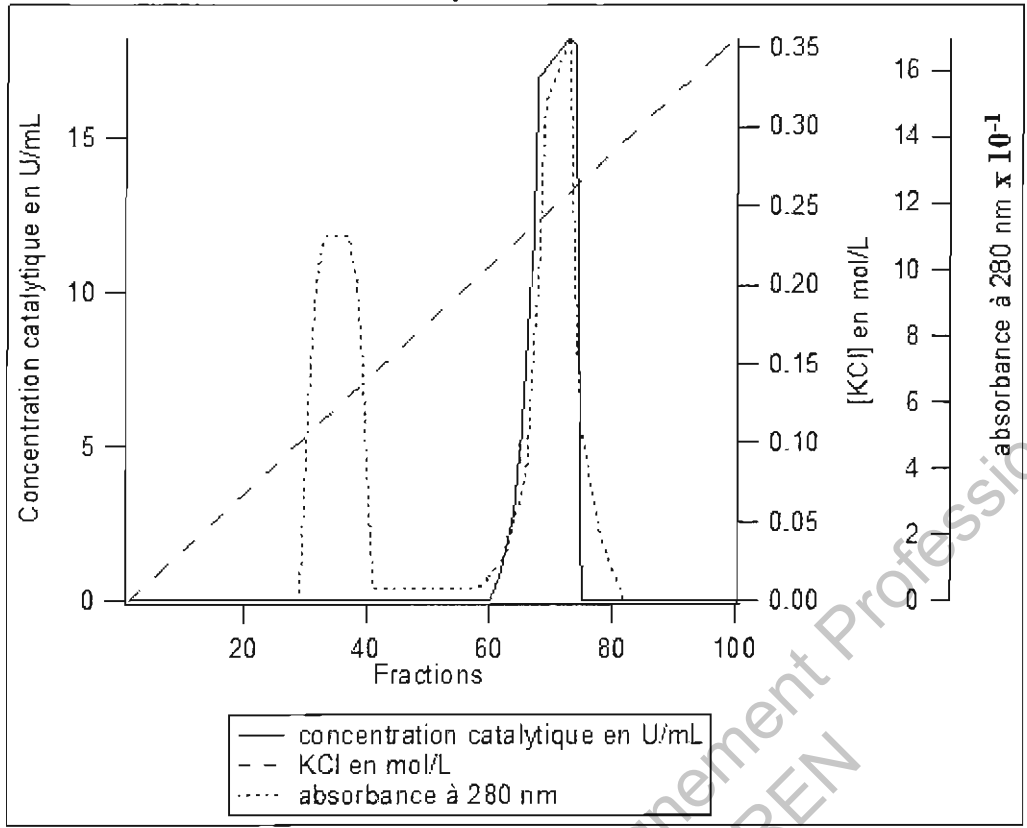
Le concentrat (200 μL) est injecté dans la colonne de Supérose 12 équilibrée avec du tampon A. Les fractions actives sont rassemblées puis conservées dans 20% de glycérol à -80°C. Une fraction aliquote est prélevée pour faire la caractérisation de l'enzyme.

*Remarque :

DEAE ou Diéthylaminoéthyl : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$

Mono-Q ou ammonium quaternaire : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$

Document 4 : Suivi de l'éluion après injection de l'extrait brut sur DEAE-Sépharose.



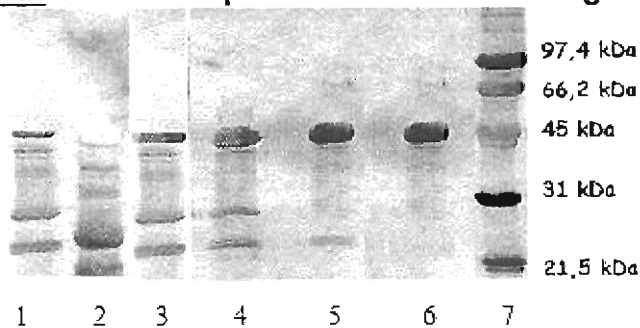
Document 5 : Suivi de la purification par SDS-Page

5a. Conditions utilisées pour la réalisation du SDS-Page

	Gel de séparation	Gel de concentration
Tris-HCl pH 8,8 (1 mol/L)	3,75 mL	/
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 mol/L)	/	1,25 mL
Eau ultrapure	1,09 mL	3 mL
SDS (10 %)	100 μ L	50 μ L
Acrylamide-bisacrylamide (30 % T)	5 mL	0,65 mL
Persulfate d'ammonium (10 %)	50 μ L	40 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

- Le tampon d'électrophorèse est composé de Tris-HCl pH 8,3, de glycine et de SDS.
- Le tampon d'échantillon contient du Tris-HCl pH 6,8, du SDS, du β -mercaptoéthanol, du glycérol et du bleu de bromophénol.

5b. Suivi de la purification sur SDS-Page



Préparation de l'extrait brut soluble :

1 : Rétenant obtenu après ultrafiltration ou extrait brut soluble

2 : Perméat obtenu après ultrafiltration

Purification de l'époxyde hydrolase d'*A. niger*.

3 : Après étape 1

4 : Après étape 2

5 : Après étape 3

6 : Après étape 4

7 : Marqueur de taille