



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV®](#)

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

CORRIGÉ

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*

<i>N°</i>	<i>Réponse</i>	<i>Points</i>
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 aminoacyls 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>	1 point 0,5 point 1,5 point
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 2 : Feuillet β 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 NH_2 terminal puis séparation et identification des PTH-AA par chromatographie en phase inverse.</p> <p>identification</p> <p>chain à $n-1$ résidus</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.	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). 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).	2 points																				
2.2.	Dosage des protéines par la méthode de Folin-Lowry [protéines] fraction soluble = m/V = 2000/1000 = 2 mg/mL Pour avoir m = 200 µg soit 0,2 mg il faut un volume V = m/C = 0,2/2 = 0,1mL soit 100 µL donc inférieur au volume maximal de 0,4 mL. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une dilution.	2 points																				
2.3.	$AS = \frac{\text{Cat conc}}{[\text{protéine}]} = \frac{AT}{\text{masse protéine}}$ <p>exemple de calcul : AS fraction soluble=6,0 / (2000/1000) =3 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> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Etapes</th> <th>Volume récupéré en mL</th> <th>concentration catalytique en U/mL</th> <th>Protéines totales en mg</th> <th>Activité spécifique en U/mg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Fraction soluble</td> <td>1000</td> <td>6,0</td> <td>2000</td> <td>3,0</td> </tr> <tr> <td>Microfiltration</td> <td>4000</td> <td>1,6</td> <td>1000</td> <td>6,4</td> </tr> <tr> <td>Ultrafiltration</td> <td>380</td> <td>15,0</td> <td>380</td> <td>15,0</td> </tr> </tbody> </table>	Etapes	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	2,5 points
Etapes	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.	Taux de purification ou d'enrichissement global : $T_n = \frac{AS_n}{AS_0}$ avec AS _n l'activité spécifique après l'ultrafiltration et AS ₀ l'activité spécifique de départ $T = 15,0 / 3,0 = 5$	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>	1 point
	<p>Injection de l'extrait soluble : Les protéines chargées négativement sont retenues par la colonne. Les autres sont eluées.</p>	2 points
	<p>Elution des protéines retenues : Gradient croissant de force ionique. Compétition entre les Cl- et les protéines chargées</p>	2 points
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 eluée 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-mercaptopropanoate de méthyle : 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.	<p>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.</p> <p>Après purification, une seule bande d'environ 45 KDa est</p> <p>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.</p>	1 point 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 soigneuse, 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.

