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

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTEINES

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

SESSION 2014

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire français - anglais autorisé,

Calculatrices autorisées,

Tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9 .

Conception et validation d'un biosenseur à éthanol

Le premier biosenseur, ou biocapteur, date de 1962 avec les travaux de Clark et Lyons qui ont mis au point un nouveau système de dosage du glucose en combinant des électrodes électrochimiques et une enzyme, la glucose oxydase. Depuis ce premier montage, les champs d'application de ces appareils n'ont cessé de se développer, les principaux débouchés restant avant tout le domaine médical et les biotechnologies de pointe.

La conception d'un biosenseur nécessite de réaliser plusieurs étapes consistant notamment à choisir l'enzyme adaptée, à la fixer sur une électrode, à évaluer son efficacité après immobilisation, et finalement à valider les résultats fournis par le biosenseur.

On se propose d'étudier le biosenseur Aox actuellement en cours de mise au point. Il devrait permettre à terme de doser l'éthanol en temps réel dans les liquides biologiques cervicaux *in vivo* après implantation chez l'animal.

L'électrode indicatrice utilisée est en platine, le montage de type ampérométrique est sensible au couple O_2/H_2O_2, l'enzyme fixée est une alcool oxydase (Aox) EC 1.1.3.13 qui catalyse la transformation de l'éthanol en éthanal avec consommation d'O_2 et production de H_2O_2.

1. L'alcool oxydase : composante biologique du biosenseur (5 points)

L'alcool oxydase (Aox) EC 1.1.1.13 de *Hansenula polymorpha* est une flavoprotéine constituée de **8 sous-unités**, chacune contenant une Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).

Le **document 1** présente le site actif de l'alcool oxydase de *Hansenula polymorpha.*

1.1. Préciser si le FAD est un coenzyme « groupement prosthétique » ou un coenzyme « cosusbtrat ». Justifier la réponse.

1.2. Préciser la nature des interactions matérialisées par des pointillés sur le **document 1**.

1.3. Identifier trois résidus d'acides aminés interagissant avec le FAD, préciser leur position dans la chaîne peptidique.

1.4. Ce site actif présente une « poche hydrophobe ». Justifier cette affirmation.

L'alcool oxydase utilisée comprend plusieurs domaines dont l'un est présenté en **document 2**.

1.5. Rappeler la signification des cylindres et des flèches pleines du **cadre A** du **document 2**.

1.6. Identifier et Indiquer le rôle des liaisons et interactions repérées par une flèche (type 1 et type 2) dans les **cadres B et C** du **document 2**.

1.7. Préciser si les feuillets β de ce domaine sont de type parallèles, anti-parallèles ou mixtes. Justifier la réponse.

1.8. En déduire la notion de domaine.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

2. Conception du biosenseur Aox (2,5 points)

Le **document 3** présente quelques extraits de la publication présentant les dernières avancées des travaux sur le « biosenseur Aox ».
L'enzyme doit dans un premier temps être immobilisée à la surface de l'électrode indicatrice de platine.

2.1. Présenter succinctement les différentes stratégies d'immobilisation d'une enzyme.

2.2. A partir du **document 3**, dégager une hypothèse quant au type d'immobilisation retenue. Justifier la réponse.

2.3. Proposer un avantage et un inconvénient de ce type d'immobilisation.

2.4. Le montage ampérométrique utilisé s'appuie sur une électrode polarographique dite de « Clark ».
Synthétiser les données fournies dans le **document 3** en réalisant un schéma présentant le fonctionnement général du biosenseur Aox et faisant apparaître les réactions mises en jeu.

3. Evaluation de l'efficacité du biosenseur Aox (5,5 points)

Les données regroupées les **documents 4 et 5** présentent les résultats des tests d'évaluation du biosenseur *in vitro*. L'enzyme alcool oxydase utilisée est considérée comme michaélienne.

Plusieurs protocoles d'immobilisation sont mis en œuvre, leur efficacité est testée par détermination des paramètres cinétiques de l'Aox fixée à l'électrode. Le **document 4** regroupe les données collectées.

3.1. Rappeler la relation de Michaélis Menten et définir les paramètres cinétiques de cette équation.

3.2. Préciser l'intérêt de déterminer chacun de ces paramètres dans le cadre de l'évaluation d'un biosenseur à enzyme.

3.3. A partir du **document 4**, identifier la concentration d'activité catalytique optimale de l'enzyme du point de vue des paramètres cinétiques. Argumenter la réponse.

Le **document 5** propose les résultats d'une étude métrologique de la capacité de dosage de l'éthanol par le biosenseur Aox *in vitro*.
Plusieurs paramètres métrologiques ont été déterminés :

- Le coefficient directeur et le coefficient de détermination de la régression représentant l'intensité du signal délivré par le biosenseur en fonction de la concentration en éthanol ;
- la limite ou seuil de détection ;
- limite de quantification ou seuil de saturation.

L'ensemble de ces paramètres a été déterminé selon la procédure suivante : cinq biosenseurs ont été préparés à l'aide de cinq solutions d'enzyme AoX de concentration d'activité catalytique différentes. Pour chaque biosenseur, l'intensité du signal a été mesurée pour différentes concentrations en éthanol.

3.4. Dans le cadre d'une étude métrologique du biosenseur, expliquer l'intérêt de déterminer chacun de ces paramètres.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

3.5. Les résultats obtenus par cette étude sont-ils en accord avec le choix effectué en 3.3 ?

Le biosenseur Aox réalise un dosage de substrat grâce à une mesure d'activité enzymatique. Les deux méthodes généralement utilisées pour un dosage de substrat par voie enzymatique sont le dosage « en point final » et le dosage par « méthode cinétique ».

3.6. Proposer une hypothèse concernant la méthode utilisée pour le dosage de l'éthanol par le biosenseur Aox.

4. Extraction, purification et caractérisation d'une alcool oxydase alternative (5 points)

Une alcool oxydase alternative, extraite d'*Aspergillus ochraceus*, a été purifiée et caractérisée par une autre équipe. Elle pourrait devenir à terme une enzyme de substitution à l'alcool oxydase de *Hansenula polymorpha* dans le biosenseur.
La procédure d'extraction-purification de cette alcool-oxydase alternative repose sur 3 étapes

Le **document 6** regroupe les résultats de l'évaluation des étapes de purification.

4.1. Calculer le rendement et le taux de purification ou enrichissement de chacune des étapes de purification.

4.2. La chromatographie sur hydroxyapatite est apparentée à une chromatographie d'affinité. Montrer que l'enrichissement obtenu à la dernière étape de la purification est conforme avec le principe de la chromatographie d'affinité.

L'alcool oxydase d'*Aspergillus ochraceus* a été finalement caractérisée par gel filtration et par SDS PAGE. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 7**.

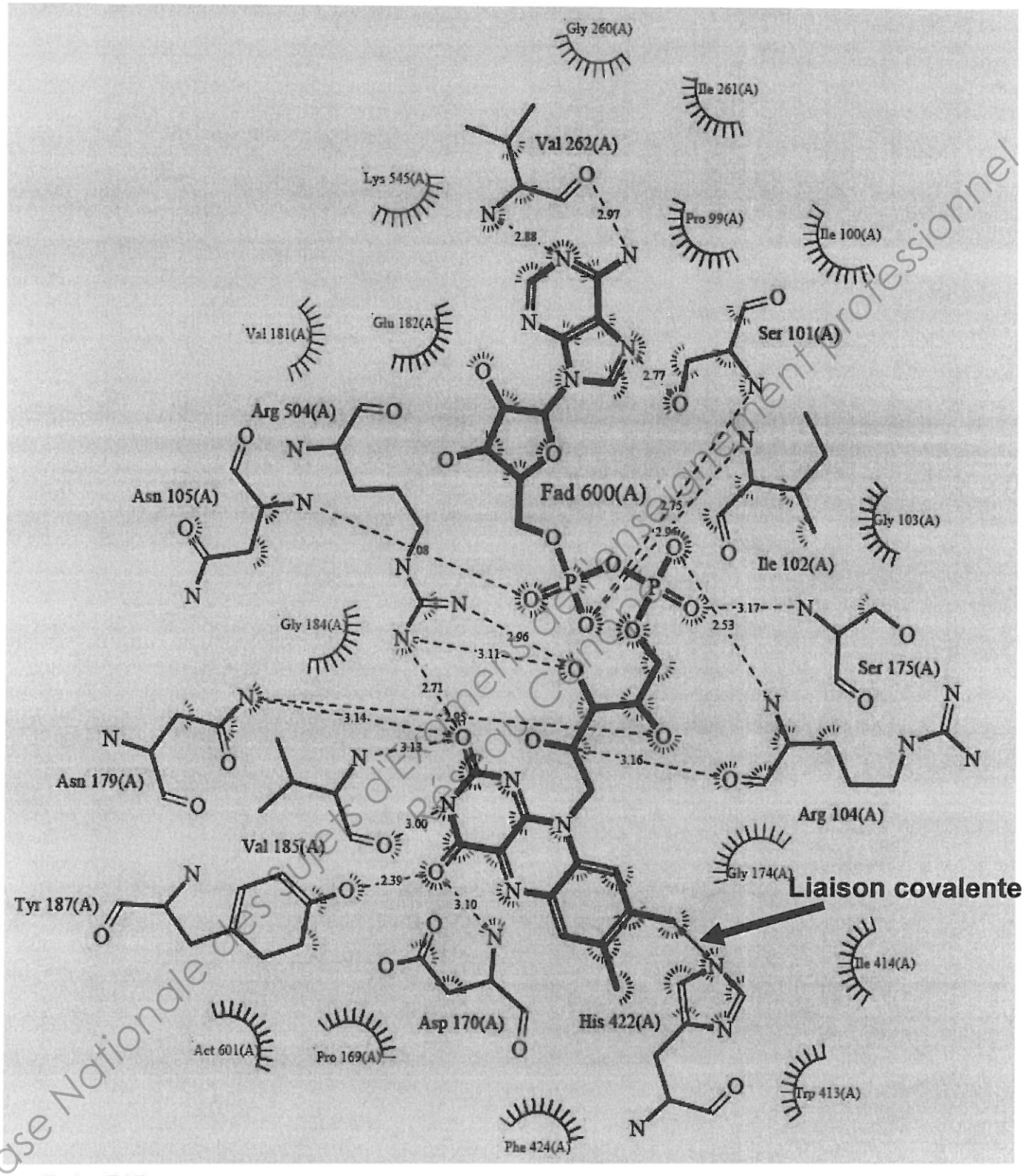
4.3. Déterminer la masse moléculaire de l'alcool oxydase d'*Aspergillus ochraceus* selon chacune des techniques employées.

4.4. Expliquer la différence de masses moléculaires déterminée selon la méthode de caractérisation. En déduire la structure générale de l'alcool oxydase d'*Aspergillus ochraceus*.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)
Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire), clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 1 : Site actif de l'alcool oxydase de *Hansenula polymorpha*

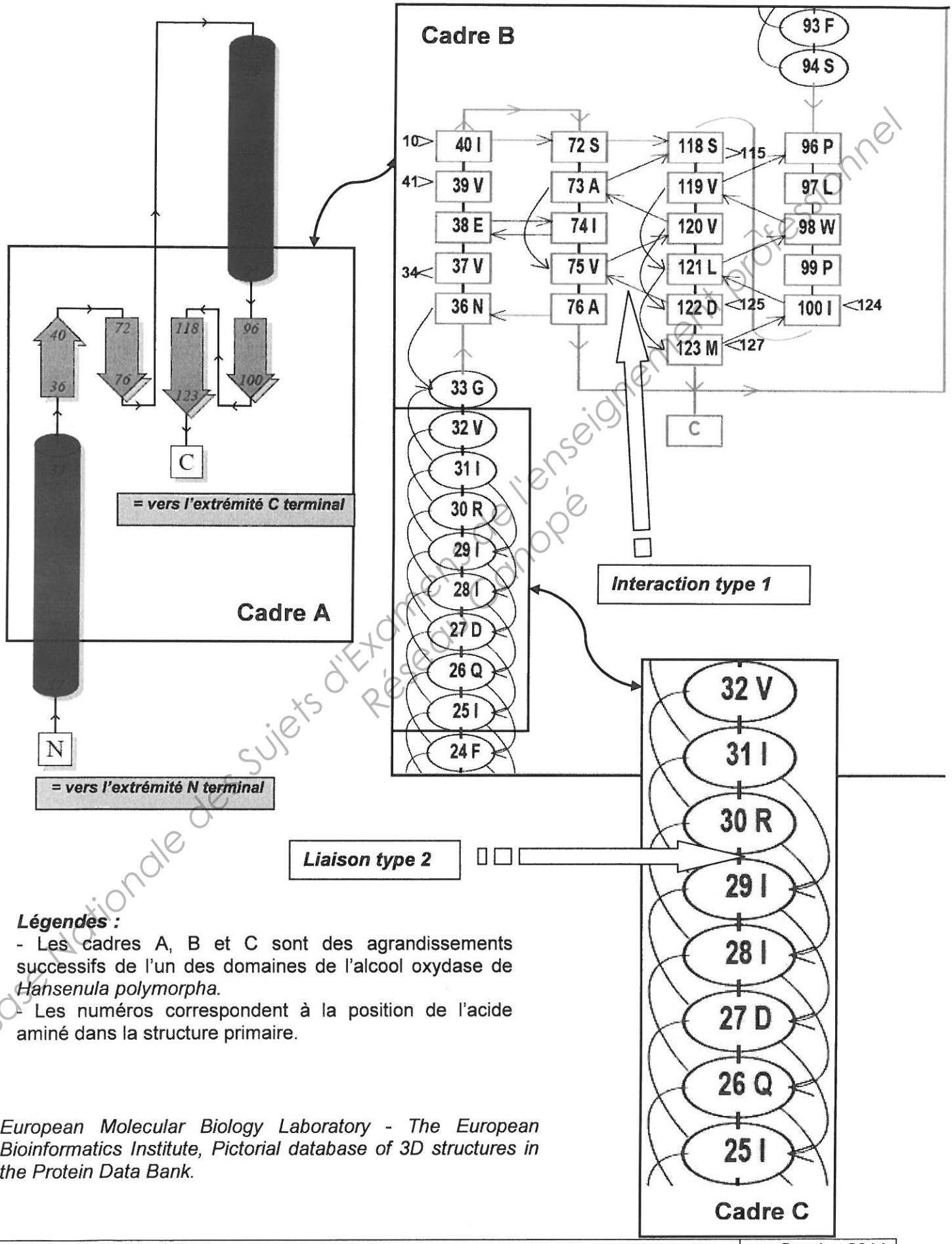


Fad = FAD =
Les atomes d'Hydrogène n'ont pas été représentés sur ce document.
Tous les acides aminés représentés ont un rôle dans le site actif.

European Molecular Biology Laboratory - The European Bioinformatics Institute, Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank.

Base Nationale des sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 2 : Détails de l'un des domaines de l'alcool oxydase étudiée



Légendes :

- Les cadres A, B et C sont des agrandissements successifs de l'un des domaines de l'alcool oxydase de *Hansenula polymorpha.*
- Les numéros correspondent à la position de l'acide aminé dans la structure primaire.

European Molecular Biology Laboratory - The European Bioinformatics Institute, Pictorial database of 3D structures in the Protein Data Bank.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 3 : Extraits de la publication présentant les dernières avancées des travaux sur le biosenseur Aox

"In a previous paper, we introduced a biosensor suitable for monitoring ethanol concentration in brain in real time. In that study, different designs were investigated, all manufactured using a fixed concentration for enzyme stock solution (200 $U \cdot mL^{-1}$ of alcohol oxidase), and we also investigated the role of polyethyleneimine or glycerol (or a combination of both) as enzyme enhancers and stabilizers ../.. Enzyme molecules are entrapped in a 1% polyurethane (PU) solution."

"AOx is capable of catalyzing the oxidation of primary, aliphatic short-chain alcohols (such as ethanol and methanol) to their respective aldehydes as follows:

$RCH_2OH + AOx/FAD \rightarrow RCHO + AOx/FADH_2$ (1)

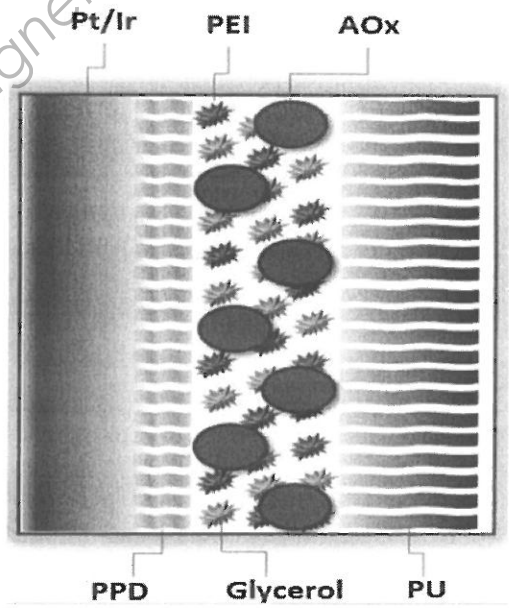
$AOx/FADH_2 + O_2 \rightarrow AOx/FAD + H_2O_2$ (2)

$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$ (3)

The hydrogen peroxide produced by Reaction (2) can be detected at a Platinum (Pt) surface by applying an anodic potential of +0.7 V vs. Ag/AgCl (Reaction (3))."

"Schematic representation of the main design of implantable alcohol biosensors developed and characterized in this study:

- Pt/Ir : 1 mm long, 125 µm diameter Pt/Ir cylinder,
- AOx: alcohol oxidase,
- PPD: poly-*ortho*-phenylenediamine,
- PU: polyurethane,
- PEI: polyethyleneimine,
- Different enzyme stock solutions were used, the concentration of which ranged from 100 to 800 $U \cdot mL^{-1}$."



Further In vitro Characterization of an Implantable Biosensor for Ethanol Monitoring in the Brain, Ottavio Secchi et al, Sensors 2013, 9522-9535, 23 July 2013

Base nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 4 : Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme Aox immobilisée dans le biosenseur

AOx Loading Solution ($U \cdot mL^{-1}$)	Michaelis–Menten Kinetics EtOH I_{MAX} (nA)	EtOH K_M (mM)
100	75 ± 6	34 ± 7
200	114 ± 7	44 ± 4
400	308 ± 10	56 ± 6
600	67 ± 13	52 ± 11
800	46 ± 10	59 ± 9

Légendes :

- EtOH = éthanol
- I_{MAX} exprimée en nano Ampères correspond à l'activité enzymatique maximale.
- L'unité « mM » correspond à des « $mmol \cdot L^{-1}$ ».

Document 5 : Etude métrologique de la méthode de dosage de l'éthanol par le biosenseur

Concentration d'activité catalytique de la solution d'enzyme Aox utilisée pour préparer le biosenseur (en $U.mL^{-1}$)	Etude de l'évolution de l'intensité du signal délivré par le biosenseur en fonction de la concentration en éthanol		Seuil de détection $\mu mol \cdot L^{-1}$	Seuil de saturation ou limite de quantification $\mu mol \cdot L^{-1}$
	Coefficient directeur de la droite de régression $nA \cdot mmol \cdot L^{-1}$	Coefficient de détermination R^2		
100	1,09	0,996	6	20
200	1,77	0,997	11	30
400	3,94	0,996	17	56
600	0,92	0,995	32	106
800	0,67	0,991	53	164

Source des documents 4 & 5 :
Further In vitro Characterization of an Implantable Biosensor for Ethanol Monitoring in the Brain, Ottavio Secchi et al, Sensors 2013, 9522-9535, 23 July 2013

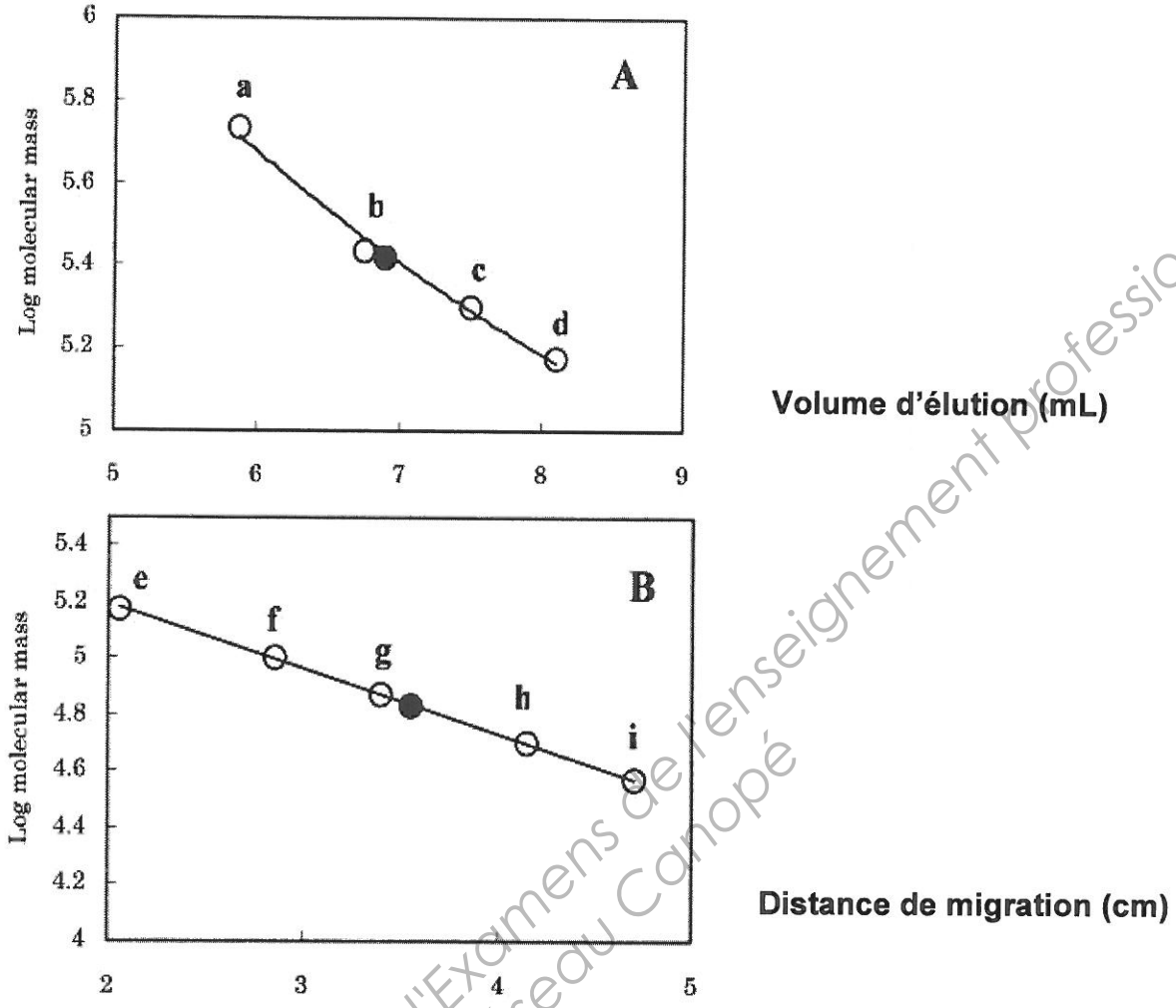
Document 6 : Suivi des étapes de purification

Step	Activity[a] (unit)	Protein (mg)
Cell-free extract	0.204	142
DEAE	0.090	4.0
Hydroxyapatite	0.046	0.057

[a] Enzyme activity was assayed under standard assay conditions.

Base Nationale des sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 7 : Détermination de la masse moléculaire de l'Aox d'A. ochraceus



Légendes :

(A) : Résultats obtenus par gel filtration sur colonne TSK gel G3000SWXL.

(B) : Résultats obtenus par la technique SDS PAGE.

Nature des étalons utilisés :
a) uréase (hexamère, 545 kDa),
b) uréase (trimer, 272 kDa),
c) β-amylase (200 kDa),
d) alcool déshydrogénase (150 kDa),
e) protéine de 150 kDa,
f) protéine de 100 kDa,
g) protéine de 70 kDa,
h) protéine de 50 kDa
i) protéine de 37 kDa.

L'alcool oxydase d'Aspergillus ochraceus est matérialisée par un disque plein.

Documents 5, 6 & 7 : Characterization of alcohol oxidase from Aspergillus ochraceus. Kimiyasu Isobe et al. J. Gen. Appl. Microbiol.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.