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

SESSION 2016

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériels autorisés :

- calculatrice
- dictionnaire anglais/français

Tout autre matériel est interdit.

Documents à rendre avec la copie :

- document 6 ……page 8/8

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 8 pages numérotées de 1/8 à 8/8.

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

La peroxydase du raifort (HRP)
Une enzyme multifonctionnelle à l'avenir encore prometteur

Les peroxydases sont retrouvées dans de très nombreux organismes, notamment chez les plantes.
La peroxydase de raifort ou HRP pour *horseradish peroxidase*, est la plus étudiée. Elle constitue notamment un auxiliaire incontournable de nombreuses techniques d'analyse couramment utilisées dans les laboratoires de biotechnologies (kits de diagnostic médical, immuno-essais…).
Elle est également étudiée en tant qu'auxiliaire de dépollution des eaux usées riches en phénols. Elle semble également être un outil prometteur en vue du traitement ciblé de tumeurs cancéreuses.

1. Caractéristiques structurales de la protéine HRP (6 points)

Le **document 1** présente les caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la peroxydase de raifort (**HRP**).

1.1. Indiquer la classe d'enzyme à laquelle appartient l'HRP.

1.2. Proposer un rôle pour le groupement prosthétique de l'HRP.

1.3. Décrire la structure de l'HRP.

Le **document 2** présente l'alignement des séquences de trois isoenzymes de l'HRP réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL.

1.4. Indiquer la signification des astérisques (*) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 118 de l'isoenzyme dont le numéro d'accession est P00433.

1.5. Rappeler la nature et les propriétés de la chaîne latérale de la phénylalanine (F) et de celle de la tyrosine (Y).

1.6. Expliquer la signification des deux points (:) situés sous les séquences en vous appuyant sur l'analyse de la position 296 de l'isoenzyme dont le numéro d'accession est P00433.

1.7. Expliquer les termes « identity » et « similar positions » fournis par le logiciel CLUSTAL.

1.8. Indiquer les modifications post-traductionnelles que subit l'HRP.

1.9. En déduire une définition pour le terme d'isoenzyme.

2. Caractéristiques de la catalyse enzymatique médiée par l'HRP (5 points)

De nombreux substrats chromogènes ont été développés afin de suivre l'activité de la peroxydase. Les paramètres k_{cat} et K_M de trois d'entre eux (ABTS, TMB et gaïacol) sont indiqués dans le **document 3**.

2.1. Comparer l'affinité de l'enzyme pour les trois substrats. Justifier la réponse.

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

2.2. Considérant la signification de $1/K_M$ et de la k_{cat}, indiquer la signification du rapport k_{cat}/K_M.

2.3. Calculer le rapport k_{cat}/K_M pour les trois substrats étudiés.

2.4. Identifier le substrat pour lequel l'enzyme est la plus efficace.

L'aminoantipyrine est un substrat alternatif utilisé pour déterminer l'activité de la peroxydase.
Le **document 4** présente un mode opératoire permettant de déterminer la concentration d'activité catalytique notée *b* de l'HRP.

2.5. Argumenter que la mesure de la vitesse initiale est déterminée en condition de $v_{i\,max}$.

2.6. Indiquer la signification d'une unité d'activité enzymatique utilisée dans cette procédure opératoire.

2.7. Indiquer les compositions qualitative et quantitative du milieu réactionnel et en déduire son volume.

La vitesse initiale (mesurée par un $\Delta A/\Delta t$) est égale à 0,06 min^{-1}. L'équation aux grandeurs utilisée pour le calcul de la concentration d'activité catalytique b de l'HRP est :

$$b = 2 * \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\varepsilon * l} * V_{ML} * \frac{1}{V_E}$$

2.8. Justifier la présence du facteur **2** présent dans cette équation aux grandeurs.

2.9. Poser l'équation aux valeurs numériques et calculer la concentration d'activité catalytique *b* en unité (U) par millilitre de solution d'enzyme.

3. Développement d'outils de dépollution par immobilisation de l'HRP (4 points)

L'HRP est capable de transformer de nombreux polluants aromatiques en polymères moins dangereux et facilement éliminables. Son immobilisation devrait permettre de développer des bioréacteurs capables de traiter les effluents pollués.
Le **document 5** présente le procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules de magnétite.

3.1. Identifier le type d'immobilisation mis en jeu dans ce document.

3.2. Citer deux avantages et deux inconvénients de cette immobilisation.

Le **document 6** montre la représentation de Lineweaver-Burk pour la détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée.

3.3. Sur le **document 6** à rendre avec la copie, déterminer graphiquement les valeurs de K_M pour les formes libre et immobilisée de l'HRP.

3.4. Commenter les valeurs obtenues.

Après utilisation, les nanoparticules magnétiques sont recyclées par simple lavage à l'eau distillée. Le **document 7** présente les activités résiduelles relatives de l'HRP immobilisée après chacun des quatre cycles de récupération.

3.5. Analyser et interpréter les résultats.

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

4. Utilisation de l'HRP comme outil thérapeutique (3 points)

L'HRP est actuellement testée pour développer des outils de lutte anticancéreuse, par exemple la stratégie« ADEPT » (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy).
Cette stratégie permet de libérer un composé toxique au contact des cellules ciblées. Elle met en œuvre des anticorps conjugués à l'HRP, spécifiquement dirigés contre les cellules tumorales. L'acide indole acétique (IAA), substrat de l'enzyme, est employé comme prodrogue.

4.1. Schématiser une molécule d'anticorps de type Ig G mettant en évidence les chaînes polypeptidiques orientées et identifiées, les ponts disulfures, les domaines et les paratopes.

4.2. Illustrer la stratégie thérapeutique par un schéma annoté et commenté.

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 : Caractéristiques structurales de l'isoenzyme C1A de la péroxydase de raifort

1a : Horseradishperoxidase (HRP)

Classification : EC Number : 1.11.1.7 (Peroxidase)

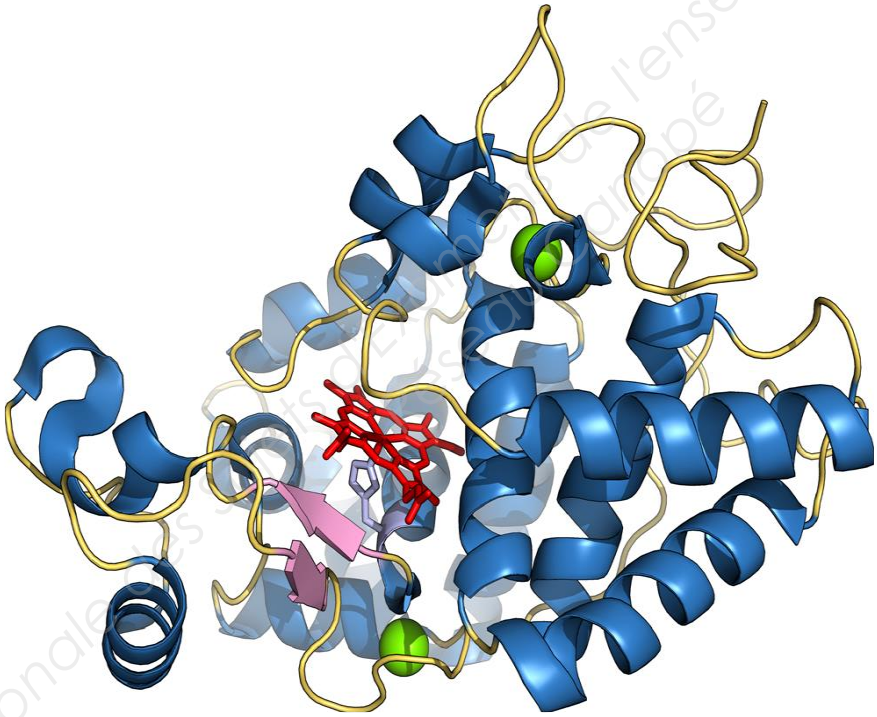
Reaction: 2 phenolic donor + H_2O_2 = 2 phenoxyl radical of the donor + 2 H_2O

HRP exists in at least 15 different isoenzymes in the horseradish root, of which the isoenzyme C1A is the most abundant and thus the most studied.

The monomeric isoenzyme C1A is a 34 kDa polypeptide comprising 308 aminoacids.

It contains a heme-group (with a Fe^{3+} ion) as prosthetic groups and 2 Ca^{2+} ions. It contains also four disulphide bridges.

1b : Structure of HRP C1A



The two calcium ions are shown as spheres.
The heme group lies between the distal and the proximal domain.

Florian W. Krainer & Anton Glieder An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. ***Appl Microbiol Biotechnol*** (2015) 99:1611–1625

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

Document 2 : Alignement des séquences de trois isoenzymes de l'HRP

http://www.uniprot.org/align/

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment

```
P00433 MHFSSSSTLFTC--ITLIPLVCLILHASLSDAQLTPTFYDNSCPNVSNIVRDTIVNELRS 58
Q42517 --MKTQTKVMGG--HVLLTVFTLCMLCSAVRAQLSPDIYAKSCPNLLQIVRDQVKIALKA 56
P17180 MGF---SPLISCSAMGALILSCLLLQASNSNAQLRPDFYFRTCPSVFNIIGDIIVDELRT 57
         :   : ::       : :  * : .*   *** * :* .:**.: :*: * :   *::

P00433 DPRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDNTTSFRTEKDAFGNANSARGFPVIDRMKAAVE 118
Q42517 EIRMAASLIRLHFHDCFVNGCDASVLLDGTN---SEKLAIPNVNSVRGFEVIDTIKAAVE 113
P17180 DPRIAASLLRLHFHDCFVRGCDASILLDNSTSFRTEKDAAPNANSARGFGVIDRMKTSLE 117
       : *:***::*********.*****:*** :.   :** *  *.**.*** *** :*:::*

P00433 SACPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPSWRVPLGRRDSLQAFLDLANANLPAPFFTLPQL 178
Q42517 NACPGVVSCADILTLAARDSVYLSGGPQWRVALGRKDGLVANQSS-ANNLPSPFEPLDAI 172
P17180 RACPRTVSCADVLTIASQISVLLSGGPWWPVPLGRRDSVEAFFDLANTALPSPFFTLAQL 177
        *** .*****:**:*:: ** *:*** * * ***:*.: *  .     **:**  *  :

P00433 KDSFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPTLNTTYLQTLRGL 238
Q42517 IAKFAAVGLNV-TDVVALSGAHTFGQAKCDLFSNRLFNFTGAGTPDSTLETTLLSDLQTV 231
P17180 KKAFADVGLNRPSDLVALSGGHTFGRAQCQFVTPRLYNFNGTNRPDPTLDPTYLVQLRAL 237
          *  ****  :*:*****.****: :* :.  **:**. :  ** **: * *  *: :

P00433 CPLNGNLSALVDFDLRTPTIFDNKYYVNLEEQKGLIQSDQELFSSPNATD-TIPLVRSFA 297
Q42517 CPIGGNGNKTAPLDRNSTDAFDNNYFKNLLEGKGLLSSDQILFSSDLAVNTTKRLVEAYS 291
P17180 CPQNGNGTVLVNFDVVTPNTFDRQYYTNLRNGKGLIQSDQELFSTPGA-D-TIPLVNLYS 295
       **  ** .  . :*  :   **.:*: ** : ***:.*** ***:  * : *  **. ::

P00433 NSTQTFFNAFVEAMDRMGNITPLTGTQGQIRLNCRVVNSNSLLHDMVEVVDFVSSM     353
Q42517 RSQYLFFRDFTCSMIRMGSL--VNGASGEVRTNCRVIN------------------     327
P17180 SNTFAFFGAFVDAMIRMGNLRPLTGTQGEIRQNCRVVNSRIRG--MENDDGVVSSI     349
        .   **  *. :* ***.:  :.*:.*::* ****:*
```

Signal peptide is framed.
Propeptide sequence is underlined.
Post-translationnally modified aminoacids are indicated in **bold**.

Identical positions : 141
Identity : 39,607 %
Similar positions : 85

Protein which is post-translationally modified by the cyclization of a N-terminal glutamine.
Protein containing covalently linked carbohydrates of various types.
Protein which is modified by the formation of four disulfur bonds.

Base d'utilisation des sujets d'examen de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 3 : Paramètres cinétiques de l'HRP pour différents substrats

http://www.brenda-enzymes.org/

	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})
ABTS	0,18	736
Gaïacol	4,7	990
TMB	0,09	172

ABTS: 2,2' azino bis 3'ethyl benthiazoline 6 sulfonic acid
TMB: 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine

Document 4 :Protocole de dosage de l'HRP

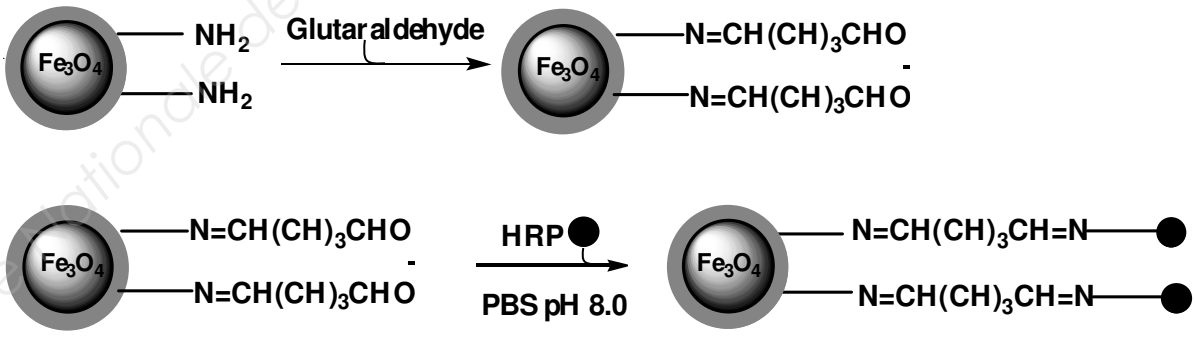
Reaction

2 H_2O_2 + phenol + 4-aminoantipyrine ⟶ 4 H_2O + quinoneimine

HRP enzyme activity was measured using phenol, 4-aminoantipyrine (AAP), and hydrogen peroxide as substrates. The assay mixture contained 250 µL 9.6 mM AAP, 100 µl 100 mM phenol, 100 µL 2 mM hydrogen peroxide, 450 µl 100 mM phosphate buffer pH 7.4, and 100 µL enzyme solution. The approach in this assay was to provide all substrate concentrations at 10.K_M or more. The rate of reaction was measured by monitoring the rate of formation of the product which absorbed light at a peak wavelength of 510 nm upon addition of the enzyme; thus, one unit of activity (U) used in this study is defined as the number of µmol peroxide converted per min at pH 7.4 and 25°C. The extinction coefficient for quinoneimine is 6,000 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$.

WuY., TaylorK. E.,BiswasN., and BewtraJ. K.. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. ***Enzyme and Microbial Technology***, 1998. 22(5):315-322.

Document 5 : Procédé d'immobilisation de l'HRP sur des nanoparticules magnétiques



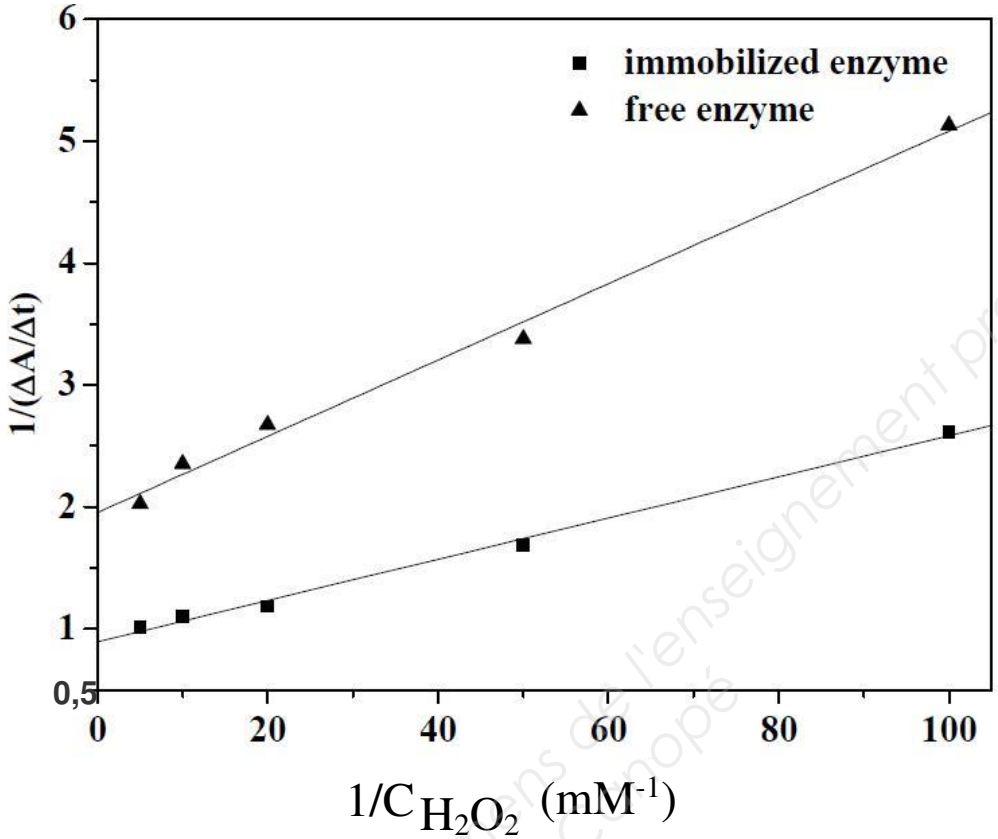
Des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) sont recouvertes d'un polymère aminé puis soumises à l'action du glutaraldéhyde. L'HRP est finalement ajoutée en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 8.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of HorseradishPeroxidase on NH2-Modified Magnetic Fe3O4/SiO2 Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. ***Molecules***, 2014, *19*, 15768-15782.

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

Document 6 à rendre avec la copie

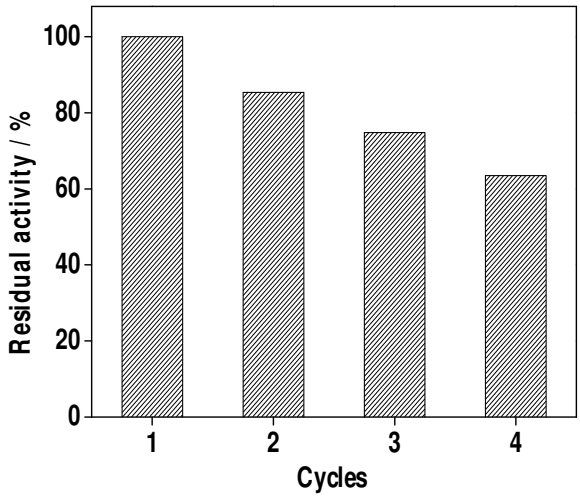
Document 6 : Détermination des constantes cinétiques de l'HRP immobilisée



Les activités enzymatiques ont été déterminées par une méthode colorimétrique.

Chang, Q., Tang, H. Immobilization of HorseradishPeroxidase on NH2-Modified Magnetic Fe3O4/SiO2 Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. ***Molecules***, 2014, *19*, 15768-15782.

Document 7 : Étude de l'activité enzymatique résiduelle après recyclage de l'HRP immobilisée



Chang, Q., Tang, H. Immobilization of HorseradishPeroxidase on NH2-Modified Magnetic Fe3O4/SiO2 Particles and Its Application in Removal of 2,4-Dichlorophenol. ***Molecules***, 2014, *19*, 15768-15782.

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.