

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 6

SCIENCES BIOLOGIQUES
FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

Le sujet comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5

L'usage de la calculatrice est interdit

β -GALACTOSIDASE ET BIOTECHNOLOGIES

Introduction

La β -galactosidase est utilisée dans de nombreux domaines touchant aux biotechnologies, de la recherche à l'industrie.

Quelques aspects de cette enzyme et de l'utilisation qui peut en être faite sont abordés ici. Ainsi seront étudiés successivement :

- la structure et fonction de la β -galactosidase ;
- l'utilisation de la β -galactosidase au laboratoire comme outil technologique ;
- l'utilisation de l'activité β -galactosidase à l'échelle industrielle pour l'hydrolyse du petit-lait ;
- le syndrome de Goldberg, qui résulte chez l'homme d'un défaut d'une protéine protectrice de la β -galactosidase.

1. Structure et fonction de la β -galactosidase (20 points)

La β -galactosidase d'*E.coli* (E.C.3.2.1.23) est une exoenzyme tétramérique dont la masse molaire est de 540 000 g.mol⁻¹.

- 1.1 Définir les différents niveaux d'organisation structurale de cette molécule en citant à chaque fois les types de liaisons impliquées.
- 1.2 Après avoir cité les différentes classes d'enzymes, indiquer celle à laquelle appartient la β -galactosidase et justifier la réponse.

L'ONPG (orthonitrophényl- β -D-galactoside) est un substrat synthétique qui permet d'étudier les paramètres cinétiques de cette enzyme.

- 1.3 Écrire l'équation de la réaction (formules semi-développées exigées).
- 1.4 Justifier l'intérêt pratique de ce substrat pour suivre l'évolution de la réaction.
- 1.5 Définir l'activité enzymatique.

2. Utilisation de la β -galactosidase en biochimie analytique (12 points)

Le dosage du lactose dans le petit-lait et dans les aliments utilise une première réaction enzymatique mettant en œuvre la β -galactosidase. Une deuxième réaction intervient : elle est catalysée par la galactose déshydrogénase (qui transforme le galactose en acide galactonique). Lorsque la réaction enzymatique est terminée, l'absorbance du milieu réactionnel enzymatique est mesurée à 340 nm.

- 2.1 Expliquer le principe de cette méthode de dosage.
- 2.2 Schématiser la structure de ce coenzyme et justifier son nom.
- 2.3 Justifier la longueur d'onde de lecture en précisant les caractéristiques spectrales du coenzyme impliqué.
- 2.4 Donner la réaction d'oxydo-réduction en faisant apparaître la partie réactive du coenzyme.

3. Utilisation de la β -galactosidase à l'échelle industrielle : l'hydrolyse du lactose du petit-lait (30 points)

Le « petit-lait » est un sous produit de l'industrie fromagère obtenu lors de la première étape du traitement du lait. C'est un liquide riche en sucre et en sels minéraux.

- 3.1 Présenter l'importance des sels minéraux dans la réaction enzymatique. Justifier le fait que les ions minéraux à concentration élevée soient gênants pour une hydrolyse enzymatique efficace.
- 3.2 Nommer et exposer le principe d'une méthode de déminéralisation du petit-lait susceptible d'être mise en œuvre à grande échelle préalablement à l'hydrolyse du lactose.

L'hydrolyse du lactose est catalysée en bioréacteur avec l'enzyme immobilisée.

L'enzyme est obtenue à partir d'une culture d'*Aspergillus niger*. Les moisissures exigent pour leur culture des conditions nutritives et physico-chimiques particulières.

- 3.3 Réaliser un schéma annoté d'une fructification d'*Aspergillus* observé au microscope optique.
- 3.4 Citer les principales conditions physicochimiques et nutritionnelles permettant la culture des moisissures.

La culture de moisissures en bioréacteur discontinu et agité exige des précautions différentes de celles des cultures bactériennes.

- 3.5 Définir la notion de bioréacteur discontinu et agité. Justifier la nécessité de l'agitation dans ce cas précis.
- 3.6 Indiquer les contraintes de la culture de moisissures en bioréacteur. Proposer un dispositif adapté à la culture de moisissures.

BOSBFGB

L'enzyme est extraite et purifiée, puis immobilisée par réticulation.

- 3.7 Exposer les étapes d'une méthode d'extraction d'enzyme intracellulaire susceptible d'être mise en œuvre à l'échelle industrielle.
- 3.8 Donner le principe de l'immobilisation par réticulation et justifier l'augmentation de la stabilité thermique de l'enzyme réticulée.
- 3.9 Présenter, sous forme de tableau, la classification des principales méthodes d'immobilisation d'enzymes.

4. Utilisation de la β -galactosidase comme outil en biologie moléculaire (38 points)

La β -galactosidase est souvent utilisée comme marqueur de repérage des clones d'*Escherichia coli*. Cette utilisation a nécessité la connaissance du fonctionnement de l'opéron lactose transformé par un plasmide recombinant : le vecteur pUC18.

- 4.1 Définir la notion d'opéron et préciser l'intérêt de ce mode d'organisation pour la cellule.
- 4.2 À l'aide de schémas légendés, expliquer le fonctionnement de cet opéron :
 - en présence de lactose uniquement ;
 - en présence de glucose et de lactose.

Le plasmide pUC18 est utilisé comme vecteur de clonage. Il contient une partie de l'opéron lactose.

- 4.3 Réaliser une carte simplifiée du vecteur pUC 18 montrant les différentes boîtes fonctionnelles.
- 4.4 Justifier la position du site multiple de clonage dans le plasmide.
- 4.5 Donner les caractéristiques phénotypiques majeures obligatoires de la bactérie hôte pour que ce clonage soit opérationnel.

Le plasmide recombinant est obtenu par l'insertion d'un fragment de 1 kilobase. Il est ensuite introduit dans une souche d'*E. coli* Lac (-).

Les bactéries transformées sont cultivées sur un milieu gélosé en présence d'ampicilline, d'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) et d'X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside). Après incubation dans les conditions adéquates, on observe quelques colonies bleues et de très nombreuses colonies blanches.

- 4.6 Préciser le rôle de l'ampicilline.
- 4.7 En s'appuyant sur la structure de l'IPTG et de X-gal, préciser le rôle de chacune de ces molécules dans le test réalisé.

4.8 Expliquer les mécanismes conduisant à la différence de couleur des colonies.

D'autres types de vecteurs sont utilisés couramment en biologie moléculaire.

4.9 Donner les caractéristiques d'un vecteur d'expression navette utilisable chez les moisissures.

5. La β -galactosidase dans la cellule eucaryote (20 points)

Il existe une maladie génétique rare appelée syndrome de Goldberg. Elle se caractérise par une accumulation anormale de β -galactosides dans les lysosomes. Cette galactosialidose résulte d'un déficit en une protéine lysosomale protectrice : la PPCA, Protéine Protectrice contre la Cathepsine A (la cathepsine étant elle-même une protéase lysosomale). La PPCA protège la β -galactosidase et la neuraminidase (autres hydrolases acides lysosomales) contre la cathepsine A.

5.1 Présenter les principales différences structurales entre une cellule eucaryote et une cellule procaryote.

5.2 Rappeler le rôle du lysosome dans la cellule eucaryote.

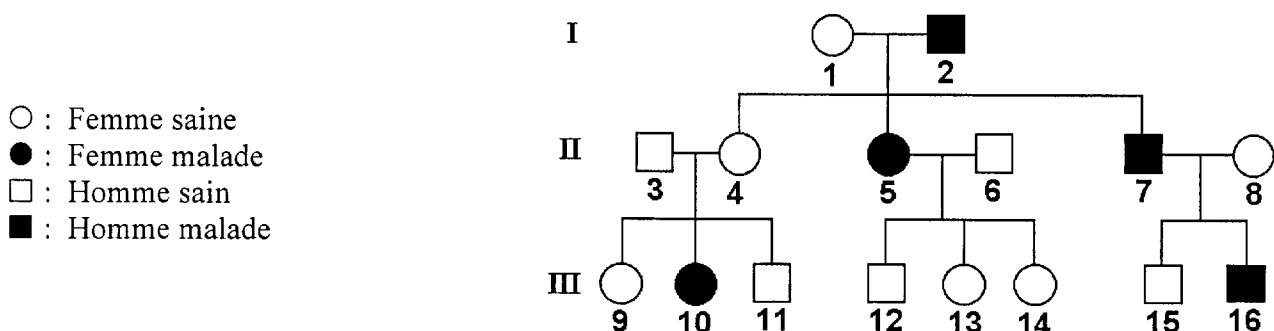
5.3 Expliquer, à l'aide d'un schéma, comment sont créées les conditions physico-chimiques indispensables à l'activité des hydrolases contenues dans cet organe.

5.4 Sachant que ces hydrolases lysosomales sont susceptibles d'être libérées du lysosome, préciser quel peut être l'intérêt pour la cellule de telles conditions physico-chimiques.

Des fibroblastes cultivés à partir de la peau de patients atteints du syndrome de Goldberg peuvent se multiplier et montrent la même déficience lysosomale que chez le patient. Cependant, lorsque des fibroblastes synthétisant normalement la PPCA sont cultivés avec ceux d'un malade atteint par cette maladie, les lysosomes de ces derniers ne sont plus encombrés de substances accumulées de façon anormale.

5.5 Analyser et interpréter ces observations expérimentales.

L'arbre généalogique de la famille atteinte par cette pathologie est détaillé ci-dessous.



5.6 Réaliser une analyse précise de ce document. En déduire si le mode de transmission de cette maladie est récessif ou dominant et s'il s'agit d'un cas d'hérédité liée au sexe.