



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 2013**

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR  
BIOTECHNOLOGIES**

**BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE  
DES PROTEINES**

---

**SESSION 2013**

---

**DUREE DE L'EPREUVE : 2h00**

**COEFFICIENT : 1**

---

**Matériel autorisé** : Dictionnaire français/anglais.

**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.

# Les lectines : une histoire d'affinité

Le terme « lectine » vient du latin « *legere* » qui signifie « sélectionner ». Les lectines sont des protéines qui ont la propriété de se lier à des glucides. Cette propriété leur permet notamment de provoquer l'agglutination des hématies, d'où le terme « hémagglutinine », employé si la spécificité glucidique de la protéine n'est pas connue. Un grand nombre de lectines ayant des affinités pour des oses ou des oligosides spécifiques ont pu être isolées de différents organismes vivants, en particulier des plantes. Leur utilisation en biotechnologie est croissante.

## 1. Extraction et purification d'une lectine (4,5 points)

C'est à partir des plantes que sont obtenus les meilleurs rendements d'extraction des lectines. Le **document 1** présente l'étape d'extraction et les premières étapes de purification d'une lectine nommée lectine A.

- 1.1. Expliquer le rôle du sulfate d'ammonium dans cette première étape de purification.
- 1.2. Indiquer les principes respectifs de la dialyse et de la lyophilisation.

Pour purifier la lectine A, une étape de chromatographie est réalisée. Le chromatogramme obtenu est présenté en **document 2**. L'activité de la lectine A dans les fractions recueillies a été mise en évidence par des tests d'hémagglutination.

- 1.3. Préciser le type de chromatographie réalisée et nommer la partie réactive de la phase stationnaire utilisée.
- 1.4. Citer les différentes étapes de cette chromatographie.
- 1.5. Préciser les volumes d'élution correspondant aux fractions riches en lectine A. Justifier la réponse.
- 1.6. Conclure quant à l'efficacité de cette étape de purification.

## 2. Estimation de la taille et de la structure d'une lectine (4 points)

La masse molaire de la lectine A purifiée a été estimée par chromatographie d'exclusion stérique sur gel de sephacryl S200. Les résultats sont présentés en **document 3**.

- 2.1. Expliquer le principe de la séparation par chromatographie d'exclusion.
- 2.2. Déterminer la masse moléculaire de la lectine A en kDa. Détailler les étapes du raisonnement mené.

Pour connaître la structure globale de la lectine A, une SDS-PAGE est réalisée. L'électrophorégramme est présenté **document 4**.

- 2.3. A partir des résultats des **document 3 et 4**, déduire la structure quaternaire de la lectine A. Justifier la réponse en explicitant la démarche d'analyse.

### 3. La concanavaline A et son utilisation dans les capteurs de glucose (8 points)

#### 3.1. Structure de la concanavaline A

La concanavaline A est une glycoprotéine de la famille des lectines. Produite par le haricot sabre (*Canavalia ensiformis*), c'est la première lectine à avoir été identifiée et extraite. Elle se lie spécifiquement au D-mannose et au D-glucose.

La concanavaline A est un homotétramère. Sa structure tertiaire a été élucidée et les bases moléculaires de son affinité pour le mannose et le glucose sont connues.

- 3.1.1. Expliquer le terme « homotétramère ».
- 3.1.2. Expliquer la notion de « structure tertiaire » et préciser les interactions impliquées dans le maintien de sa conformation.
- 3.1.3. A partir de la représentation de la concanavaline A en **document 5**, préciser le type de structure secondaire principalement retrouvée dans les sous-unités.

#### 3.2. Utilisation de la concanavaline A dans la mise au point d'un biocapteur de glucose

Les biocapteurs de glucose permettent le suivi des variations de la glycémie afin d'adapter la libération d'insuline (hormone hypoglycémiante) chez les diabétiques.

Différents axes de recherche sont développés pour améliorer la sensibilité des biocapteurs, en particulier l'utilisation de la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou fluorescence résonance energy transfer (FRET).

De nombreux modèles en développement comprennent des biocapteurs à fibres optiques avec de la concanavaline immobilisée. L'exemple du biocapteur FAS est présenté dans le **document 6**.

- 3.2.1. Expliquer le principe général de la technique FRET.
- 3.2.2. Citer deux méthodes d'immobilisation de protéines basées sur des principes physico-chimiques différents.
- 3.2.3. Décrire le fonctionnement du biocapteur FAS présenté en **document 6** en absence, puis en présence de glucose.

Avant commercialisation, il faut s'assurer de la réponse efficiente de ces biocapteurs vis à vis des variations de la glycémie *in vivo*. Les résultats d'essais chez le rat, présentés **document 7**, permettent de comparer les performances du biocapteur FAS et d'un biocapteur nommé X.

- 3.2.4. Décrire et analyser les résultats.

#### 4. Les lectines : de potentiels candidats anti VIH (2,5 points)

Une voie de recherche pour lutter contre la propagation du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est d'empêcher la pénétration du virus dans les cellules hôtes. La fixation du virus sur les cellules humaines se fait, notamment, par interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH et le récepteur cellulaire CD4. Les lectines, en interagissant avec la gp120, pourraient empêcher cette fixation. Elles sont donc des candidats sérieux à la prévention de la maladie.

La lectine BanLec, isolée de la banane (*Musa acuminata* cultivars), présente une affinité pour les structures riches en mannose.

L'objectif est de mettre en évidence une éventuelle interaction spécifique entre BanLec et gp120. Cette interaction a été étudiée selon le protocole fourni en **document 8**.

- 4.1. Réaliser un schéma du contenu d'un puits au moment de la mesure d'absorbance dans le cas où l'interaction entre BanLec et gp120 est effective. Effectuer en parallèle le schéma du contenu d'un puits en absence de gp120.
- 4.2. Préciser le site de fixation de l'anticorps anti-mouton conjugué sur l'anticorps anti-gp120. Justifier la réponse.

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

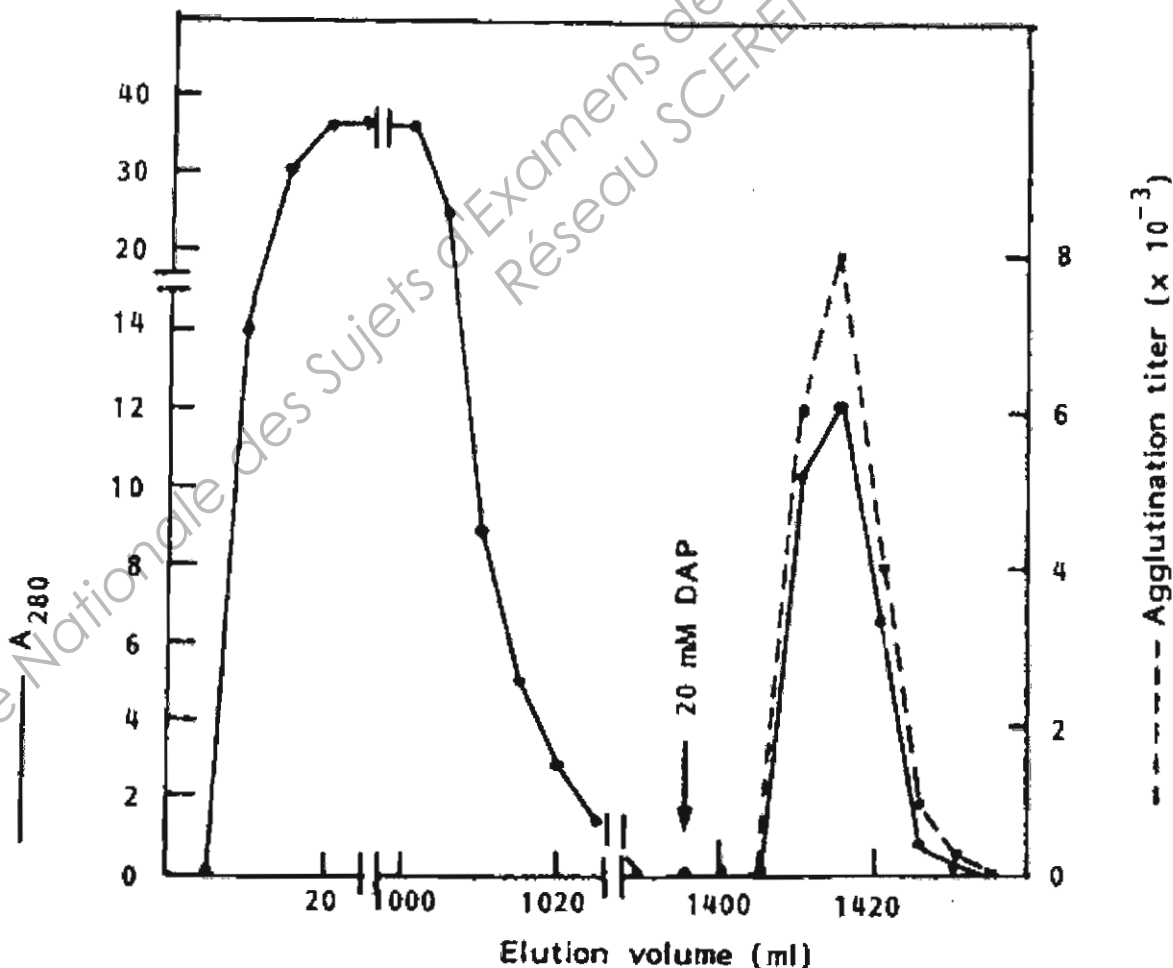
- justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire),
- clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture.

## Document 1 : Isolation of Lectin A

Lectin A was isolated from the crude extract of bulbs of spring flowering crocus. The peeled bulbs were homogenized with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.8) containing 0.1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution overnight at 10 °C, and the PBS extract was centrifuged. To the supernatant of the extract was added  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to 30% saturation, and the precipitate was collected, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

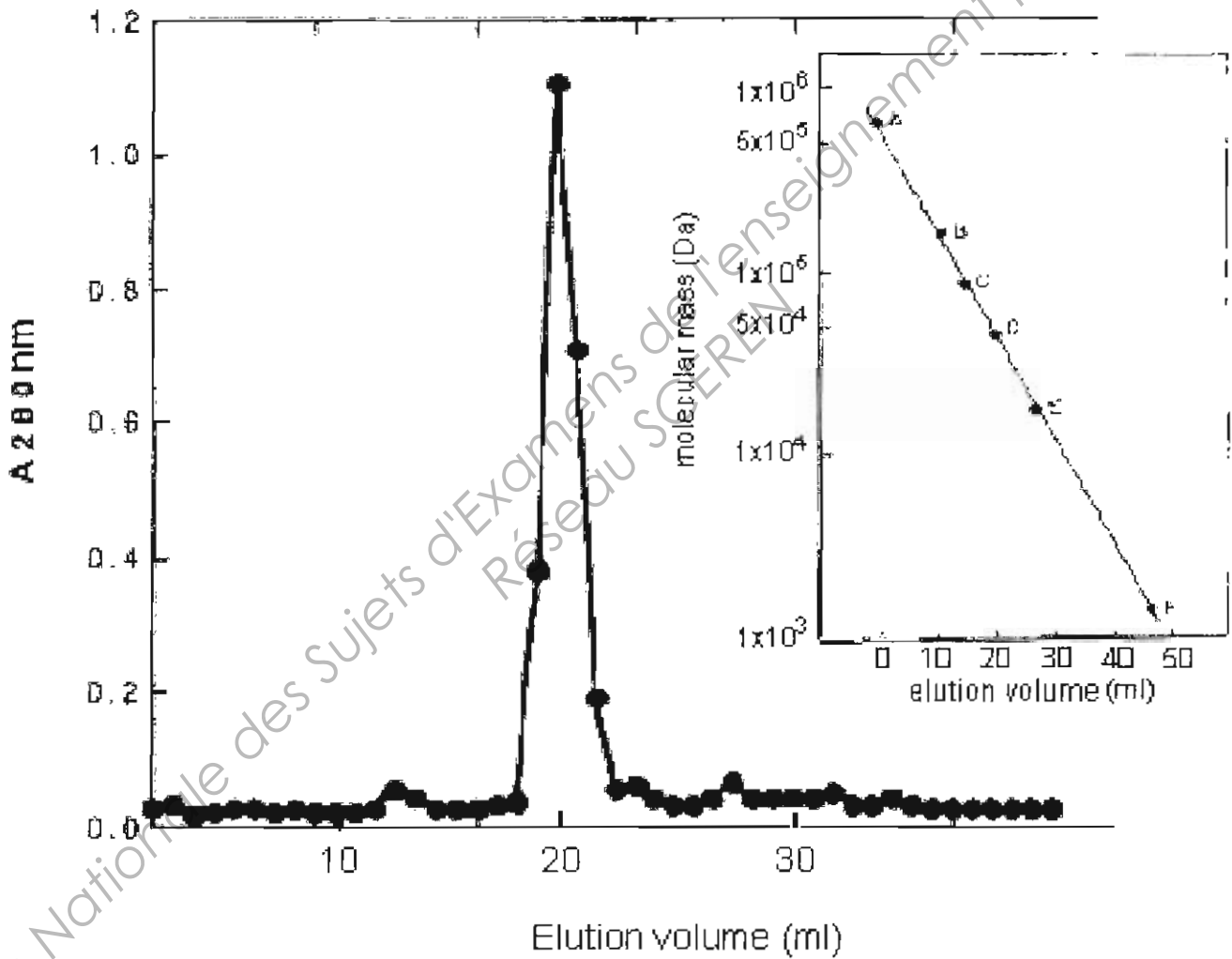
## Document 2 : Chromatographie de la lectine A sur mannose immobilisé

L'extrait brut de lectine (100 mg de protéines totales contenant environ 20% de lectine A) obtenu par précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a été dissous dans un volume minimal de PBS et déposé sur une colonne de mannose immobilisé, équilibrée avec du NaCl 1 M. Les protéines non fixées sont éluées par du NaCl 1 M jusqu'à obtenir un effluent ayant une  $A_{280}$  inférieure à 0.01. Puis, la lectine est désorbée avec une solution de diaminopropane (DAP) 20 mM. Des fractions de 5 ml sont collectées et l' $A_{280}$  et le titre d'agglutination sont déterminés (en utilisant des érythrocytes de lapin traités à la trypsine). 10 mg de lectine A sont récupérés.

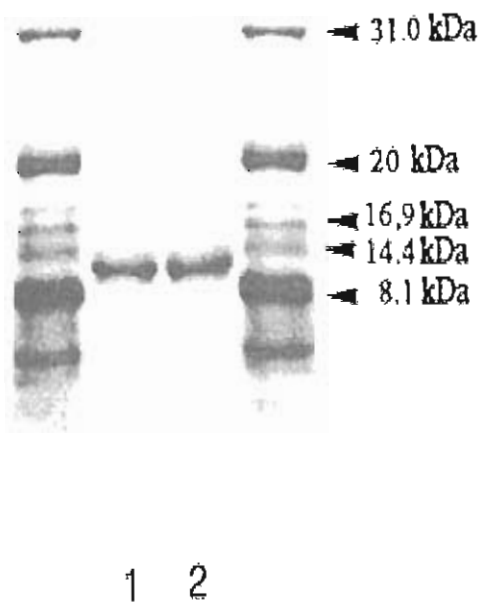


### Document 3 : Gel filtration of lectin A on Sephacryl S200

The column (1.5 x 120 cm) was loaded with 2 mg of the purified lectin and eluted with 0.05 M PBS (pH 6.8). The molecular mass standards were thyroglobulin (670 kDa) (A); gamma globulin (158 kDa) (B); bovine serum albumin (66.2 kDa) (C); ovalbumin (45 kDa) (D); myoglobin (17 kDa) (E); and vitamin B12 (F). Fractions of 1 ml were collected, and proteins were assayed by absorbance at 280 nm.



## Document 4 : SDS-PAGE of purified lectin A



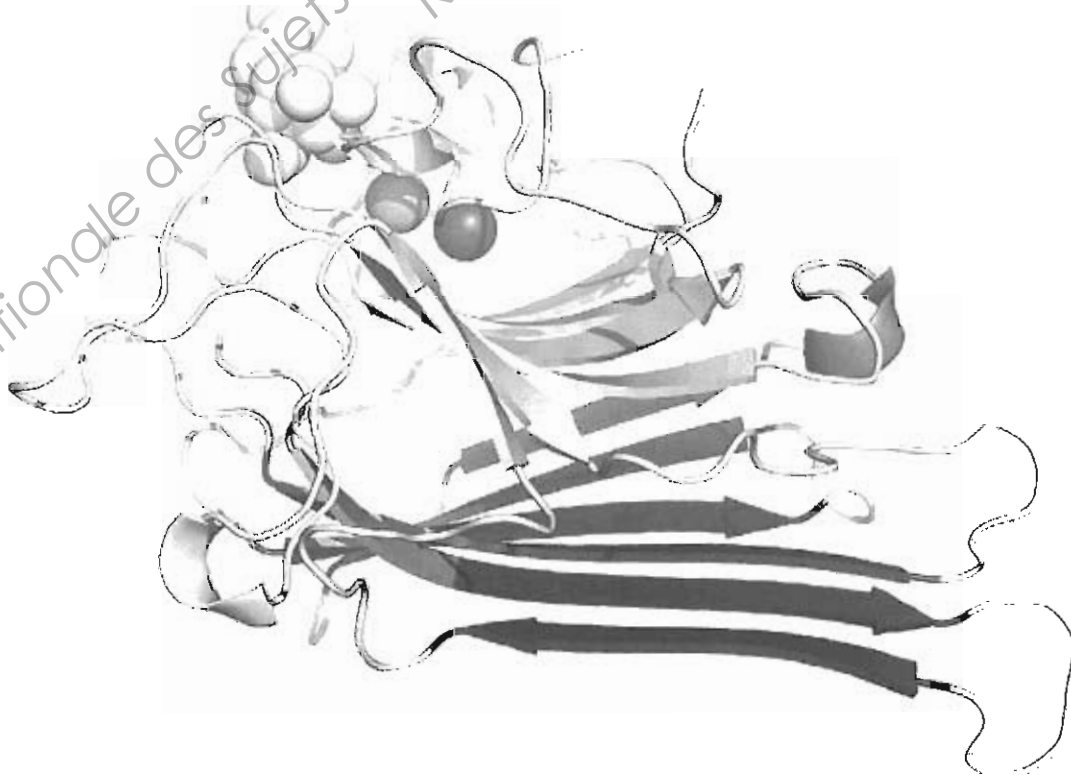
Left and right lanes, standards: carbonic anhydrase (31 kDa); soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa); myoglobin (16.9 kDa); lysozyme (14.4 kDa); and CNBr-cleaved myoglobin (8.1 – 6.2 kDa).

Lane 1, lectin A in the absence of  $\beta$  mercaptoethanol.

Lane 2, lectin A in the presence of  $\beta$  mercaptoethanol.

## Document 5 : Monomeric Concanavalin A representation

The light-colored spheres depict the trimannoside molecule, and the adjacent dark spheres represent the calcium and manganese ions.

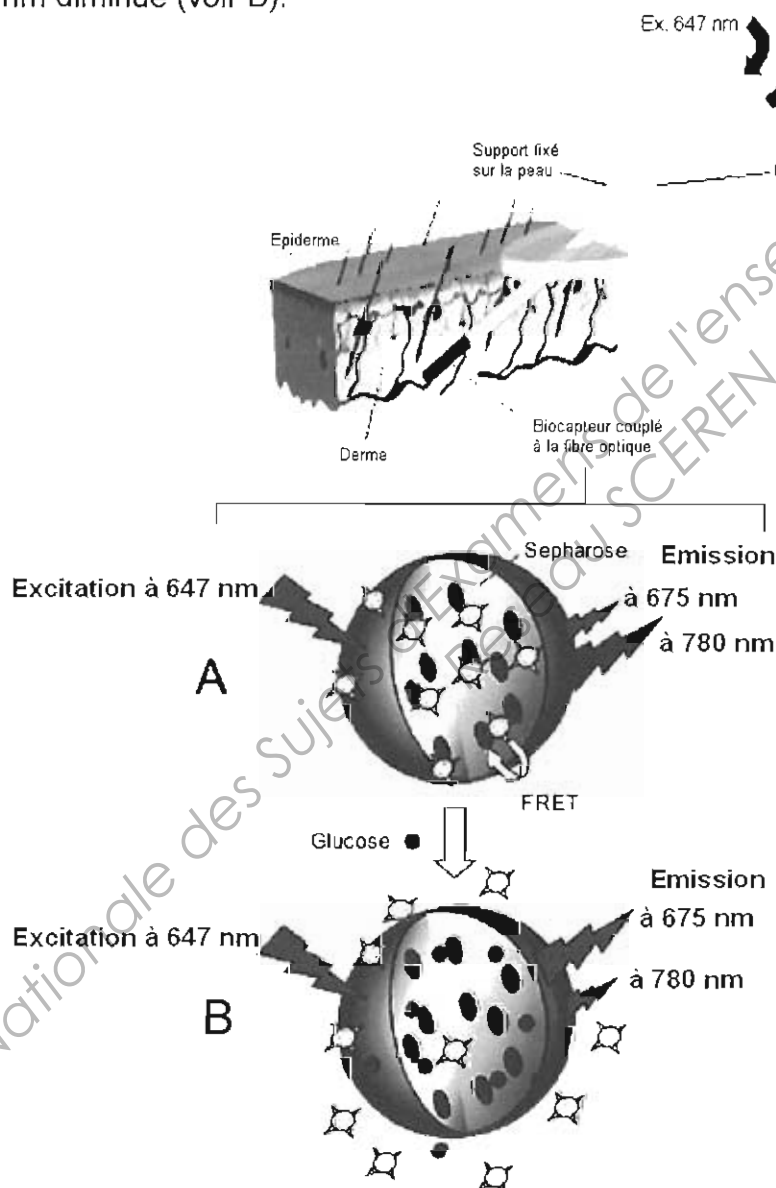




## Document 6 : Mécanisme de l'émission du signal de fluorescence dans les capteurs FAS (Fluorescence Affinity Sensors)

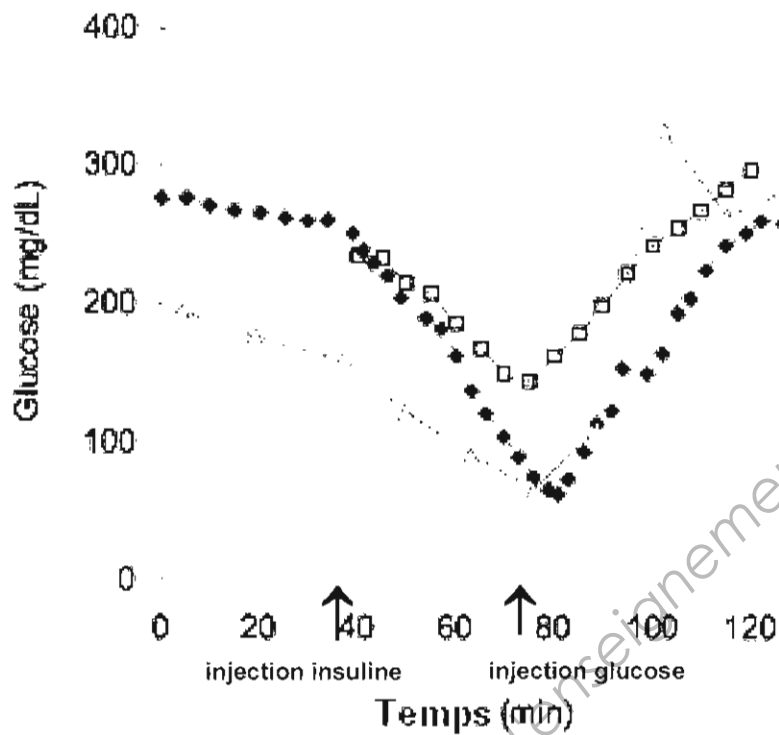
Le spectre d'absorption du chromophore accepteur Alexa 750 recouvre partiellement le spectre d'émission de fluorescence du donneur Alexa 647.

Quand le chromophore donneur lié à l'analogue du glucose (dextrane) est à proximité du chromophore accepteur lié à la concanaviline A immobilisée, l'émission de fluorescence à 675 nm diminue et celle à 780 nm augmente à cause du phénomène de FRET (voir A). Lorsque le dextrane fluorescent se dissocie de la concanaviline A suite à un phénomène de compétition avec le glucose, l'émission de fluorescence à 675 nm augmente et celle à 780 nm diminue (voir B).



- Concanaviline immobilisée sur du Sépharose et liée au fluorophore accepteur Alexa 750
- Glucose
- ⊛ Dext Dextrane lié au fluorophore donneur Alexa 647

**Document 7 : Performance in vivo de deux capteurs à fibres optiques chez le rat**



- ◆ capteur FAS.
  - ◻ capteur X.
- Concentration en glucose déterminée *ex-situ* par une méthode de référence (prélèvements sanguins).

Le temps 0 min sur l'axe des ordonnées correspond au moment de l'implantation des capteurs X et FAS sur l'animal. Les flèches indiquent l'introduction de modulateurs de la glycémie (insuline ou glucose).

**Document 8 : Study of BanLec and Glycosylated HIV-1 gp120 Interaction by ELISA**

96 wells ELISA plates were coated by adding 50 µl of 5 µg/ml BanLec per well and incubated overnight at room temperature. The next day plates were blocked for 1.5 h at room temperature with PBS containing 1 % bovine serum albumin and 0.05 % sodium azide and then rinsed with wash buffer (PBS containing 0.05 % Tween 20, pH7.4) 3 times before the addition of recombinant, glycosylated gp120 protein diluted in blocking buffer (different concentrations of gp120 are tested). After a 1 h incubation at room temperature, the plates were washed 3 times before the addition of the detection antibodies. A sheep anti-gp120 anti-body (AIDS Research and Reference Reagent Program) was diluted 1:2000 in dilution buffer (wash buffer containing 0.1% bovine serum albumin) and added to the wells and incubated for 1 h. The plate was washed again before a 1 h incubation with an anti-sheep antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:40,000 in dilution buffer. After the plate was washed, p-nitrophenyl phosphate (Sigma) was added for colorimetric analysis, and the absorbance was measured at 405 nm.