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
BIOANALYSES ET CONTRÔLES

EPREUVE E3 – UNITE U31
BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2018

_____

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

_____

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais-français

L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Tout autre matériel est interdit.

Compétences évaluées :

C2.1. Analyser une problématique	**14 points**
C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents	**11 points**
C2.4. Présenter des informations, analyser, interpréter, valider des résultats	**21 points**
C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés	**11 points**

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux…) seront évalués à hauteur de 3 points sur 60.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 13 pages, numérotées de 1/13 à 13/13.

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

ÉTUDE D'UN EXTRAIT COAGULANT D'ORIGINE VÉGÉTALE, UTILISABLE EN FROMAGERIE

La présure, coagulant du lait utilisé dans l'industrie fromagère, est traditionnellement extraite à partir de la caillette (4ème estomac) de jeunes ruminants abattus avant le sevrage. Elle est constituée d'enzymes actives appelées chymosine et pepsine.

Dans certains pays d'Afrique, comme au Cameroun, l'abattage de jeunes ruminants est proscrit par la législation afin de préserver le cheptel. D'autre part, l'importation de la présure peut poser des problèmes économiques, car ce constituant coûte cher, ses conditions d'approvisionnement restent difficiles et le produit est très souvent défectueux à l'arrivée.

L'Institut de Recherche Agronomique pour le Développement (IRAD) camerounais cherche donc des substituts de la présure, capables d'être utilisés en fromagerie. Ces ersatz peuvent provenir des feuilles de plantes, de la sève et des écorces d'arbres, mais cela présente des inconvénients pour l'environnement en participant à la déforestation. Une solution est alors possible pour résoudre ce problème : l'utilisation d'un extrait coagulant protéolytique issu des fruits du dattier du désert.

L'IRAD, dans le cadre d'une collaboration, a donc confié à un laboratoire de recherche universitaire français, le soin d'étudier les propriétés de cet extrait de nature protéique.

I. Préparation de l'extrait coagulant contenu dans les fruits

Le schéma d'obtention de l'extrait coagulant est donné par le **document n°1**.

La première étape consiste à préparer un extrait brut (EB) à partir de fruits débarrassés de leur écorce.

Q1 : Expliquer pourquoi les différentes manipulations de l'étape 1 sont menées à 4 °C et en milieu tamponné.

La deuxième étape correspond à une précipitation des protéines en présence de sulfate d'ammonium puis à une centrifugation pour séparer le surnageant du culot.

Q2 : Nommer et expliquer le mécanisme conduisant à la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium. Préciser le contenu du surnageant et du culot.

Lors de la troisième étape, le culot de précipitation est placé en solution en présence de tampon phosphate de sodium, pH 6 dans un boudin de dialyse. Le bain de dialyse est remplacé plusieurs fois pendant au moins 12 h et est maintenu à 4 °C.

Q3 : Indiquer le rôle de l'étape de dialyse.

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

Lors de la quatrième étape, le contenu du boudin de dialyse subit une ultrafiltration frontale basée sur l'utilisation de la pression et d'une force centrifuge. L'ultrafiltration est réalisée en utilisant une unité de filtration Millipore Amicon, présentée dans le **document n°2.** Le seuil de coupure de la membrane est de 10000 Da. Cette opération conduit à l'obtention d'un rétentat et d'un perméat.

Q4 : Indiquer le but de cette étape. Expliquer la composition qualitative du rétentat et du perméat.

La cinquième étape consiste à décolorer le rétentat afin d'obtenir l'extrait brut concentré (EBC).

II. Suivi de purification de la protéine d'intérêt à partir de l'extrait brut concentré

L'extrait brut concentré (EBC) est purifié par chromatographie sur colonne d'échange d'ions. La résine utilisée est une Q-Sepharose Fast Flow en tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mmol·L^{-1}, pH 8,0.

Le **document n°3** présente les phases stationnaires disponibles au laboratoire, les paramètres de la chromatographie et le profil d'élution obtenu.

Q5 : Exposer le principe de la chromatographie d'échange d'ions avec cet échangeur. L'élution est réalisée par un gradient discontinu de NaCl, expliquer le mode d'élution. Exposer une méthode alternative à cette élution, basée sur une propriété physico-chimique des protéines.

Q6 : Analyser le profil d'élution obtenu pour en déduire une caractéristique physico-chimique des protéines du pic 1 par rapport aux protéines des trois autres pics.

Dans le cadre du suivi de purification, on réalise sur chaque extrait EB, EBC et sur les fractions des pics 1, 2, 3 et 4 :

- une détermination de la concentration en protéines par la méthode de Bradford,
- un dosage de l'activité coagulante selon le protocole du **document n°4**.

Les résultats sont présentés sur le **document n°5**.

Q7 : Démontrer que la concentration d'activité coagulante est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Concentration d'activité coagulante (en U·mL}^{-1}_{\text{extrait}}) = \frac{60 \times 1}{\text{temps de coagulation(en min)}} \times 5$$

Q8 : Établir les équations aux grandeurs permettant de calculer pour chaque fraction :

- l'activité spécifique en U · $mg^{-1}_{protéines}$;
- le facteur d'enrichissement par rapport à l'extrait brut.

Base Nationale des Sujets d'Examen de l'enseignement professionnel

Établir les équations aux valeurs numériques pour la fraction EBC.
Commenter les valeurs obtenues et formuler une hypothèse quant à la fraction contenant la protéine d'intérêt.

Pour confirmer ces résultats, l'activité protéolytique dans les différentes fractions a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite dans le **document n°6**.

Q9 : Évaluer la(les) situation(s) exposante(s) à risque chimique. Établir les mesures de prévention à mettre en œuvre au cours de cette étape.

Q10 : Le dosage enzymatique se fait par méthode « deux points ». Rappeler le principe et les conditions opératoires à respecter pour mesurer une activité enzymatique par cette méthode. Établir, sous forme d'un tableau, le mode opératoire de la réalisation des témoins et d'un échantillon. Donner le rôle du témoin substrat.

Après obtention des résultats présentés dans le **document 7**, les chercheurs du laboratoire ont décidé de poursuivre les manipulations sur la fraction du pic 3.

Q11 : Justifier ce choix.

III. Étude des caractéristiques structurales et cinétiques de la protéase

Dans un premier temps, une étude de la structure de la protéase d'intérêt du pic 3 est envisagée. Pour cela, 2 électrophorèses en SDS-PAGE sont réalisées en présence et en absence de β-mercaptoéthanol (que l'on pourrait remplacer par du DTT : DiThioThréitol).

Le **document n°8** présente le principe et la technique SDS-PAGE, ainsi que les résultats obtenus.

Q12 : Calculer les volumes d'eau déminéralisée, d'acide acétique et de méthanol nécessaires à la préparation de 100 mL de bain de décoloration.

Q13 : Expliquer les rôles respectifs du SDS et du β-mercaptoéthanol. Analyser les profils électrophorétiques pour déduire la structure de la protéase d'intérêt.

Dans un second temps, on cherche à connaître les paramètres cinétiques de la protéase d'intérêt du pic 3. Pour cela, on réalise les analyses présentées dans le **document 9** :

- une étude de l'activité de la protéase dans différentes conditions de température et de pH,
- une détermination des paramètres cinétiques de la protéase végétale en comparaison à la chymosine.

Q14 : Déduire de l'analyse des courbes 1 et 2 la température optimale et le pH optimal de la protéase.

Q15 : Déterminer et comparer les paramètres cinétiques des 2 enzymes. Discuter de l'utilisation éventuelle de cette protéase d'origine végétale en remplacement de la présure.

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

IV. Perspective de la coagulation végétale

La coagulation du lait correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait.

Dans la pratique, cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes contenues dans la présure ;
- par voie fermentaire : acidification à l'aide de bactéries productrices d'acide lactique (bactéries lactiques contaminants à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levain).

Aussi dans la perspective d'obtenir un meilleur rendement fromager, le laboratoire de recherche envisage l'utilisation de l'extrait végétal coagulant étudié précédemment couplé à une bactérie lactique : *Lactococcus lactis*.

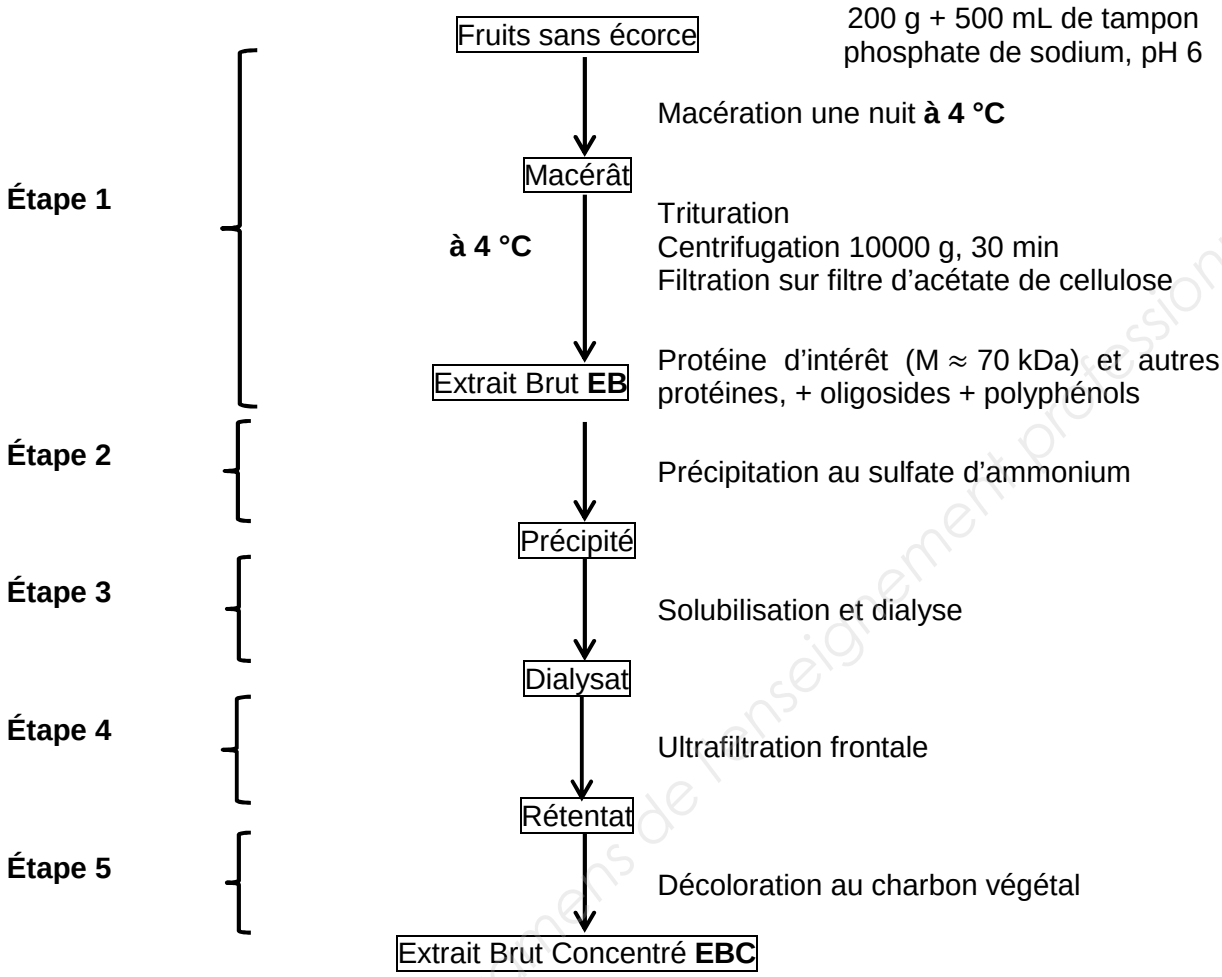
La pénétration du lactose (β-D-galactopyranosyl 1 → 4 D-glucopyranose) dans la bactérie est assurée par un système phosphotransférase, puis il est dégradé en acide lactique (ou lactate) selon la voie métabolique donnée dans le **document n°10**.

Q16 : Préciser dans quelle condition la voie fermentaire est prépondérante. Discuter de l'intérêt métabolique de la dernière étape de cette fermentation.

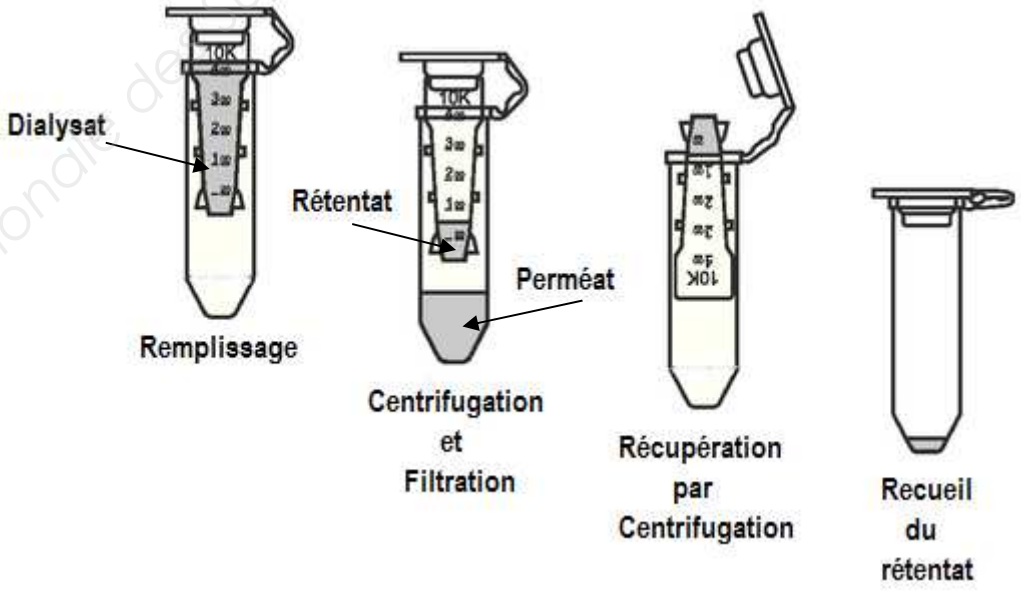
Q17 : Établir, en détaillant le raisonnement, le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de lactose en acide lactique.

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

Document n°1 : PRÉPARATION DE L'EXTRAIT COAGULANT



Document n°2 : UNITÉ DE FILTRATION MILLIPORE AMICON BIOSEPARATION ®



Base Nationale de sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document n°3 : CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

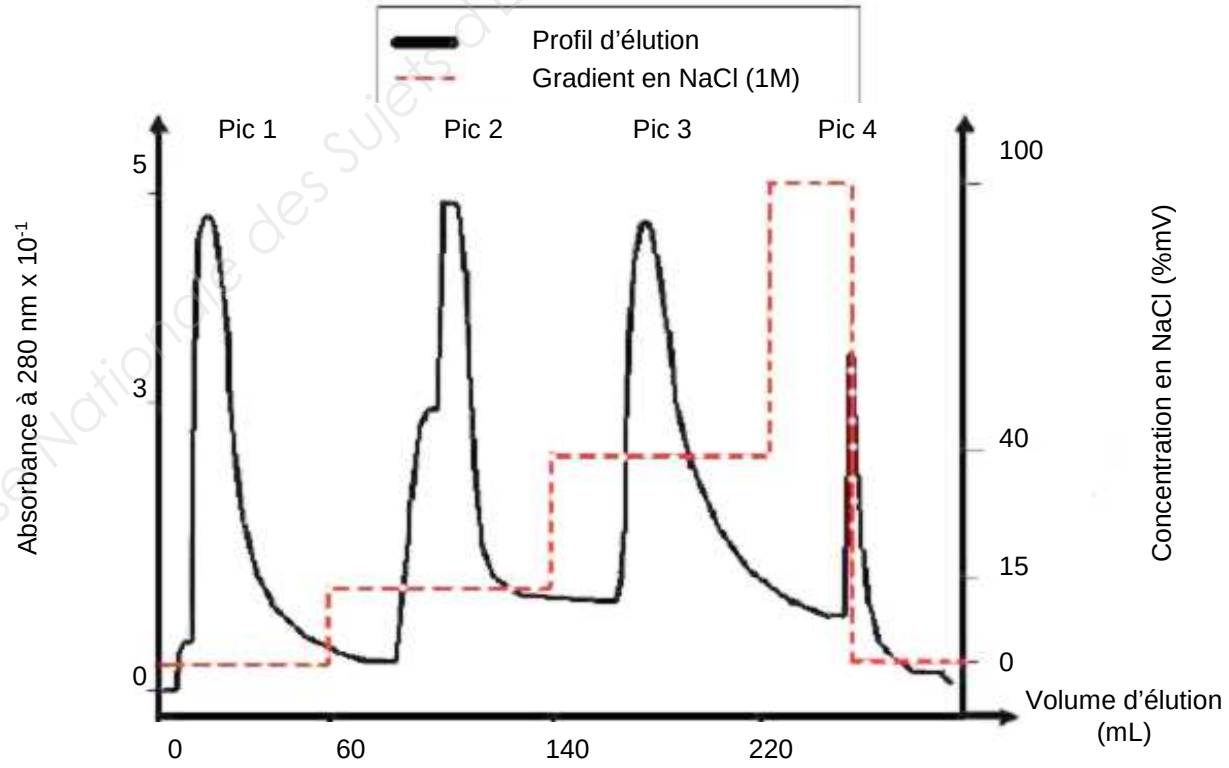
3a. Caractéristiques de quelques résines de chromatographie d'échange d'ions

-

Property	SP Sepharose Fast Flow	CM Sepharose Fast Flow	Q Sepharose Fast Flow	DEAE Sepharose Fast Flow
Matrix	6% highly cross-linked agarosa	6% highly cross-linked agarosa	6% highly cross-linked agarosa	6% highly cross-linked agarosa
Mean particle size	45 – 165 µm	45 – 165 µm	45 – 165 µm	45 – 165 µm
Charged group	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	$-O-CH_2COO^-$	-N+(CH3)3	$-N+(C2H5)2H^-$
Total ionic capacity	-18-0.25 mmol H+/ml medium	0.09-0.13 mmol H+/ml medium	0.18-0.25 mmol Cl^- /ml medium	0.11-0.16 mmol Cl-/ml medium
Dynamic binding capacity 1	70 mg ribonuclease A/ml medium	50 mg ribonuclease A/ml medium	120 mg HASµ/ml medium	110 mg HASµ/ml medium
pH stability: Short term Long term	 3-14 4-13	 2-14 4-13	 1-14 2-12	 1-14 2-12
Storage temperature	4°C to 30°C	4°C to 30°C	4°C to 30°C	4°C to 30°C
Storage buffer	supplied in 0.2 M sodium acetate in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol	supplied in 20% ethanol

3b. Résultats obtenus sur Q-Sepharose

Le chromatogramme est obtenu par passage de l'extrait brut concentré sur Q-Sepharose, équilibré par le tampon Tris-HCl 50 $mmol.L^{-1}$, pH 8,0.
Équipements chromatographiques Pharmacia AKTA®. Débit de la phase mobile : 0,5 $mL \cdot min^{-1}$.



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

Document n°4 : DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ COAGULANTE

La mesure de l'activité coagulante est réalisée grâce au test de coagulation du lait effectué selon la méthode officielle française de l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique).

Préparation du lait :
12 g de lait en poudre sont dissous en fiole jaugée de 100 mL par une solution de $CaCl_2$ à 10 mmol.L^{-1}.

Mode opératoire :
Dans des tubes à hémolyse, 200 µL de chaque échantillon est mélangé avec 1 mL de lait reconstitué, puis incubé en bain thermostaté à 37 °C sous agitation lente.

La durée de coagulation est le temps en min compris entre l'introduction de l'extrait coagulant et la formation d'un mince film de coagulation contre la paroi du tube à hémolyse.

Résultat :
La concentration d'activité coagulante est exprimée en unité coagulante par mL d'extrait : $U \cdot mL^{-1}_{extrait}$

L'unité d'activité coagulante est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant la coagulation de 1 mL de lait en 60 minutes à 37 °C et à pH 6,4.

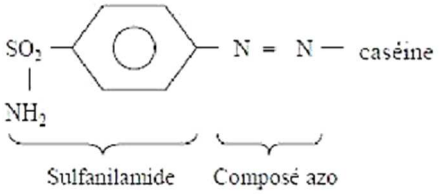
Document n°5 : TABLEAU DES RÉSULTATS DU SUIVI DE PURIFICATION

FRACTIONS	EB	EBC	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4
Concentration en masse de protéines (en $mg \cdot mL^{-1}$)	**0,27**	**4,56**	**0,24**	**0,28**	**0,35**	**0,05**
Temps de coagulation (en min)	**160**	**20**	**1555**	**250**	**10**	**3335**
Concentration d'activité coagulante (en $U \cdot mL^{-1}_{extrait}$)	**1,87**	**15**	**0,19**	**1,20**	**30**	**0,09**
Activité coagulante spécifique (en $U \cdot mg^{-1}_{protéines}$)	**6,93**	**3,29**	**0,79**	**4,29**	**85,71**	**1,80**
Facteur d'enrichissement	**1**	**0,47**	**0,11**	**0,61**	**12,37**	**0,26**

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

Document n°6 : MESURE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE AVEC L'AZOCASÉINE

- Le substrat est une solution de sulfanilamide-azocaséine à 2 % préparée dans le tampon phosphate de sodium pH 6 ;
- L'hydrolyse du substrat permet la libération de sulfanilamide et d'azocaséine ;



- Le substrat et l'enzyme sont amenés à la température de la réaction ;
- La réaction débute dès que 150 µL d'enzyme sont ajoutés à 250 µL de solution de substrat.
- Le mélange est incubé à 40 °C pendant 1 h ;
- La réaction est arrêtée en ajoutant 1,2 mL d'acide trichloracétique (ATCA) à 10 % ;
- Un témoin substrat est préparé en mélangeant 150 µL de tampon à 250 µL de substrat ;
- Un témoin activité t_0 permettra de déterminer l'absorbance au temps 0 ;
- Les tubes sont centrifugés à 8000 g pendant 5 minutes ;
- L'absorbance est lue à 440 nm après avoir neutralisé l'ATCA en ajoutant 1,4 mL d'hydroxyde de sodium à 4 %.

EXTRAIT DES FICHES INRS :

Acide Trichloracétique ≥ 10 %

N° CAS : 76-03-9
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$) : 163,39



H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves
H335 - Peut irriter les voies respiratoires
H410-Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

Hydroxyde de sodium > 2 %

N° CAS : 1370-73-2
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$) : 40,00



H 314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves

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

Document n°7 : RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE AVEC L'AZOCASÉINE

FRACTIONS	EB	EBC	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4
Estimation de l'activité protéolytique en $\Delta A_{440nm} \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$	0,0011	0,0033	<<0,0010	0,0040	0,0850	<<0,0010

Document n°8 : PRINCIPE ET RESULTATS DE SDS-PAGE

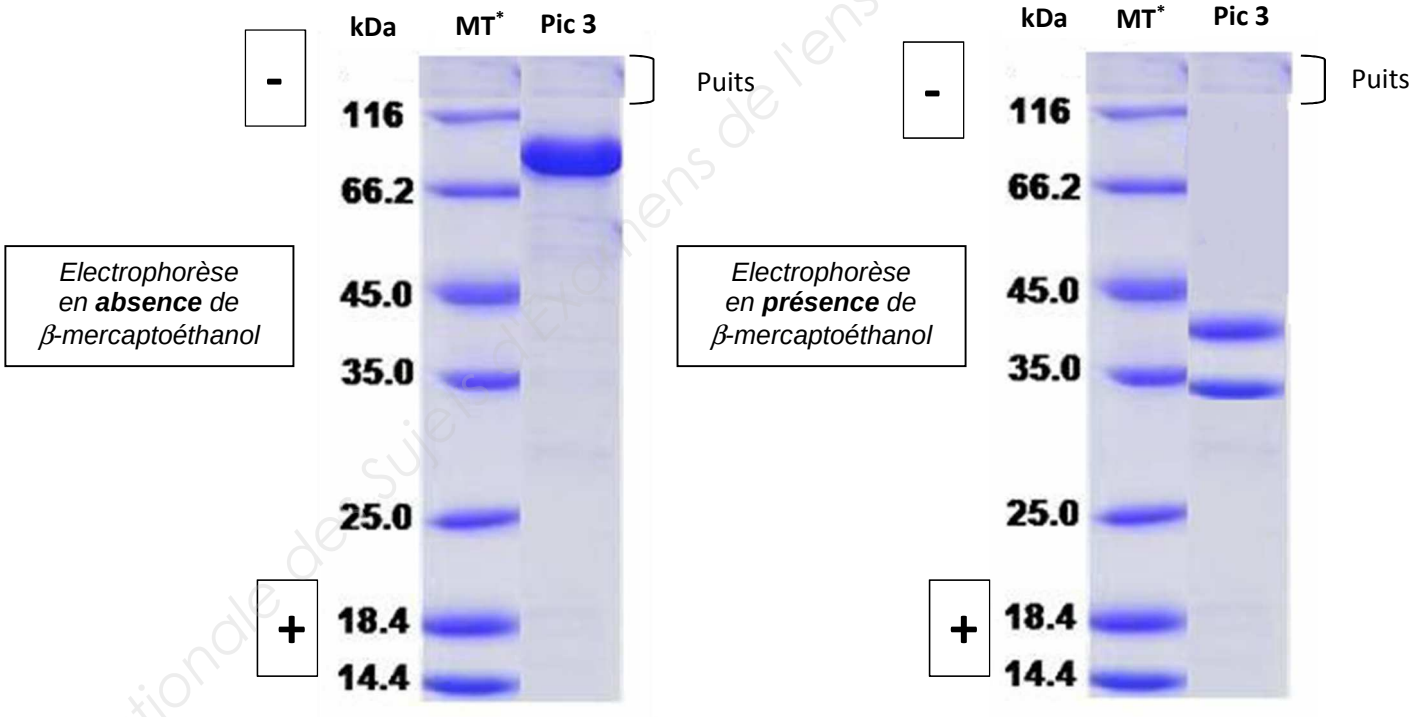
8a. Technique de SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate est réalisée selon la méthode de *Laemmli*. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Les échantillons sont préparés en absence ou présence de ß-mercaptoéthanol. Leur migration à travers les gels est effectuée à une intensité constante de 35 mA sous un courant électrique de 100 V et dans un tampon tris-HCl 15 mmol·L^{-1} pH 8,3 glycine 15 mmol·L^{-1} pendant 3 heures.

Les gels sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (5V / 1V / 4V), puis décolorés dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (2,5V / 1V / 6,5V).

8b. Profils électrophorétiques

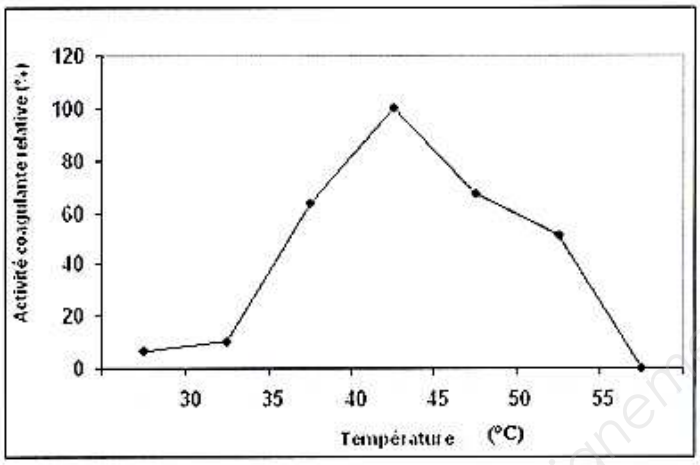


MT* = *marqueur de taille*

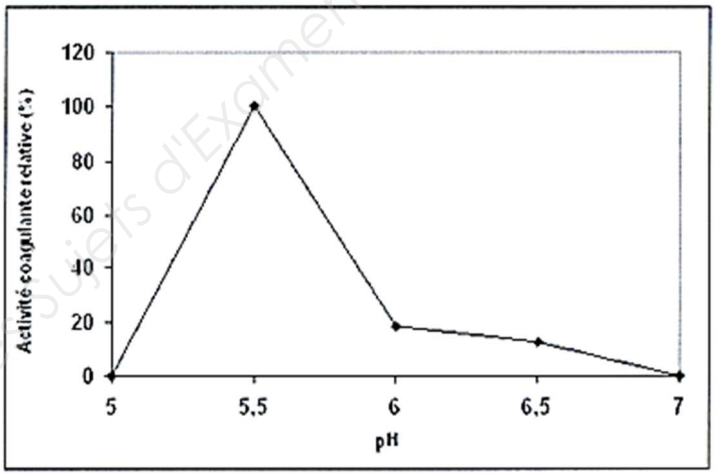
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Document n°9 : ANALYSE DES PARAMÈTRES INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ DE LA PROTÉASE

9a. Détermination des paramètres physico-chimiques optimaux



Courbe 1 : Influence de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à pH 6,4

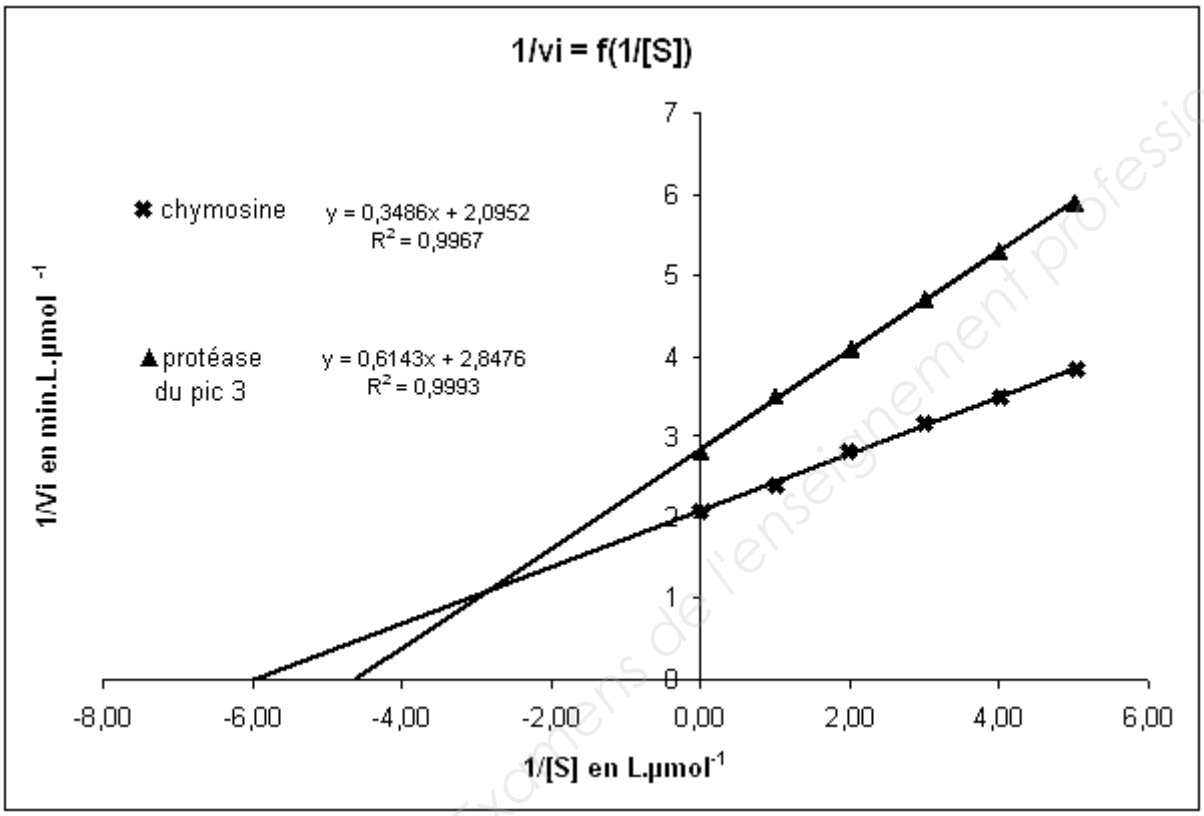


Courbe 2 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à 37 °C

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

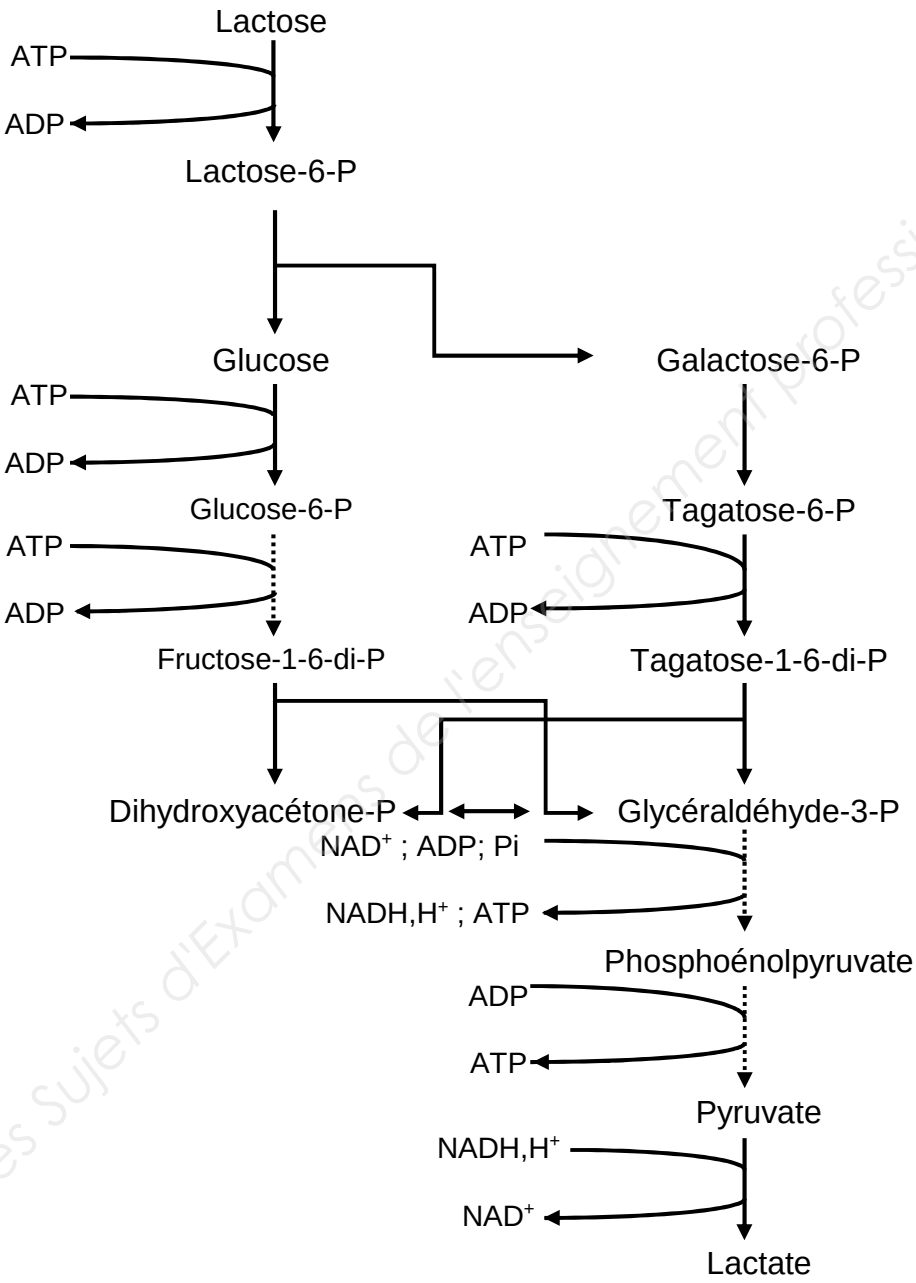
9b. Détermination des paramètres cinétiques de la protéase

Représentation en coordonnées inverses de la vitesse initiale de la chymosine et de la protéase du pic 3 en fonction de la concentration en caséine à 45 °C et à pH 5,3



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

Document n°10 : FERMENTATION DU LACTOSE CHEZ *Lactobacillus lactis*



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

Remarque :
Les pointillés ⋯⋯▸ représentent plusieurs réactions non détaillées de la voie de la glycolyse.

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.