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 SUPÉRIEUR
# BIOANALYSES ET CONTRÔLES

## ÉPREUVE E3 – UNITÉ U31
## BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2019

_____

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

_____

**Matériel autorisé :**

- L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.
- Dictionnaire anglais-français.
- Tout autre matériel est interdit.

**Compétences évaluées :**

| | |
|---|---|
| C2.1. Analyser une problématique | 9 points |
| C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents | 11 points |
| C2.4-1 Présenter des informations | 5 points |
| C2.4-2 Analyser, interpréter, valider des résultats | 9 points |
| C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés | 4 points |

L'expression écrite, le soin et la formulation des réponses (concision, qualité des schémas, des tableaux ...) seront évalués à hauteur de 2 points sur 40.

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

# OPTIMISATION DE LA PURIFICATION DE LA R-PHYCOERYTHRINE À PARTIR D'UNE ALGUE ROUGE

Les algues sont une source importante de molécules d'intérêt. Elles contiennent en particulier de nombreux pigments originaux, non présents dans les végétaux. Parmi ces pigments, on trouve la **R-phycoerythrine (R-PE)**, faisant partie du groupe des phycobiliprotéines, utilisée dans des domaines multiples des biotechnologies.
En effet, elle peut être utilisée :
- en tant que colorant rouge dans l'industrie alimentaire ou cosmétique (bonbons, boissons, rouges à lèvres …) ;
- en tant que marqueur fluorescent (cytométrie de flux, dosage immunologiques, puces à ADN) ;
- en tant que principe actif potentiel en pharmacologie pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et neuroprotectrices.

Un fournisseur de matières premières souhaite optimiser la purification de la R-phycoerythrine (R-PE) à partir de l'algue *Gracilaria gracilis*, qui présente l'intérêt d'être abondante même en hiver et d'être déjà utilisée pour la production d'agar et de carraghénanes.

## 1. Amélioration de l'extraction par utilisation d'une étape d'hydrolyse enzymatique

Au préalable, l'entreprise vérifie la conformité des caractéristiques biochimiques habituelles de l'espèce.
Le **document 1** présente la méthode et les données obtenues pour la détermination des fractions matière sèche et matière minérale.

**Q1.** Expliquer le calcul et vérifier les valeurs des teneurs de matières sèches et de cendres.

La procédure d'extraction habituellement utilisée pour ce pigment hydrosoluble est une simple macération en milieu aqueux. Cependant, cette extraction est rendue difficile par la présence de grandes quantités de polyosides de paroi qui bloquent l'extraction de la R-phycoérythrine. Pour optimiser cette procédure, une hydrolyse enzymatique préalable est donc nécessaire. Trois activités enzymatiques sont testées : cellulase, xylanase et glucanase.
Les cellulases commerciales sont un mélange d'exo-β-glucosidases, d'endo-1,4-β-D-glucosidases et de cellobiosidases.
Dans le **document 2** les sites de coupures possibles sont repérés par les lettres A à D.

**Q2.** Indiquer le(s) site(s) de coupure possibles pour chaque enzyme puis nommer les produits d'hydrolyse.
*Donnée : Le cellobiose est un diholoside : D glucopyranosyl β (1-4) D glucopyranoside.*

Base nationale des sujets d'examens de l'enseignement professionnel

Le spectre d'absorption de la R-PE est présenté dans le **document 3**.
L'indice de pureté (IP) de la R-phycoerythrine est calculé grâce à la relation $A_{565}$ / $A_{280}$.

**Q3.** Expliquer pourquoi ce ratio permet d'évaluer la pureté du pigment.

La concentration des protéines hydrosolubles est déterminée par la méthode de Bradford. Un contrôle d'exactitude est nécessaire pour valider la méthode. Les résultats obtenus sont fournis dans le **document 4**.

**Q4.** Exploiter ces résultats et conclure sur la validation de méthode.

Afin d'adapter la quantité d'enzyme à introduire, l'activité catalytique spécifique est déterminée. La procédure utilisée est présentée dans le **document 5**.

**Q5.** Démontrer la formule du calcul de l'activité catalytique spécifique notée $z_{sp}$ exprimée en $U \cdot mg^{-1}$ d'enzyme. Calculer $z_{sp}$.
*Donnée : 1 unité U représente le nombre de micromole de nitrophénol libéré en une heure (ou 1 unité représente le nombre de micromole de cellobiose libéré en une heure).*

Trois durées d'extraction ont été testées avec les cellulases : 20 minutes, 360 minutes (= 6 h) et 960 min (= 16 h). Les résultats sont présentés dans le **document 6**.

**Q6.** Analyser ces résultats et en déduire la durée optimale de traitement.

## 2. Purification de la R-PE par chromatographie

Pour que la R-PE soit considérée comme pure, l'indice de pureté (IP) doit être supérieur à 3,2. Après extraction, l'IP ne dépasse pas 0,15 ; on procède alors à une purification. On choisit de tester une technique de chromatographie échangeuse d'ions (CEI) en HPLC.
Le système et la procédure utilisés sont présentés dans le **document 7**.

**Q7.** Expliquer l'intérêt d'utiliser un détecteur à barrette de diodes.
Nommer le mode d'élution choisi.
Schématiser l'étape d'élution d'une protéine.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 8**.

**Q8.** Expliquer pourquoi il est judicieux de poursuivre les analyses sur les trois fractions obtenues.

Afin de vérifier la pureté des fractions et l'absence de dénaturation du pigment purifié, on réalise une chromatographie d'exclusion.
Le même système HPLC que précédemment est utilisé pour la chromatographie d'exclusion.

**Q9.** Préciser les éléments du système chromatographique qui doivent être changés pour réaliser cette analyse.

Banque Nationale de sujets d'examens de l'enseignement professionnel

Le **document 9** présente les caractéristiques techniques de la colonne.
Les résultats obtenus pour la chromatographie d'exclusion sur l'extrait brut puis sur les différentes fractions issues de la purification par échange d'ions sont regroupés dans le **document 10**.
Dans l'extrait brut, on retrouve la présence de R-PE Native (forme hexamérique) à 260 kDa et d'une forme dissociée (donc dénaturée) à 60 kDa.

**Q10.** Préciser quel paramètre permet de séparer les protéines dans ce cas. Justifier que cette colonne est bien adaptée à la purification de la R-PE.

**Q11.** Expliquer l'ordre d'élution et donner les temps de rétention de la forme native et de la forme dissociée.

**Q12.** Expliquer pourquoi la fraction permettant d'obtenir le meilleur résultat est la fraction AE- 200.

Afin de confirmer la pureté de cette fraction AE-200, on procède à une électrophorèse PAGE (*Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) non dénaturante. Les résultats sont présentés dans le **document 11**.

**Q13.** Expliquer pourquoi cette technique ne permet pas de déterminer la masse molaire de la R-PE.

La R-PE native est fluorescente et peut être révélée en éclairant le gel sous UV à 365 nm.

**Q14.** Présenter l'intérêt de colorer aussi les gels au bleu de Coomassie. Conclure sur la pureté de la R-PE.

La fabrication des gels nécessite l'utilisation d'acrylamide dont la fiche sécurité est présentée en **document 12**.

**Q15.** Evaluer les risques liés à la fabrication de ces gels et établir les mesures préventives à mettre en œuvre.

### 3. Particularités et intérêt des phycobiliprotéines

La R-PE et la phycocyanine **(document 13)** ont des structures similaires. Elles appartiennent à la famille des phycobiliprotéines.

**Q16.** Identifier la structure secondaire majoritaire de ces protéines. Nommer les liaisons qui stabilisent une telle structure. Identifier et localiser la partie de cette protéine responsable de sa couleur.

Ces hétéroprotéines font partie de la chaine photosynthétique des plastes des algues rouges nommés rhodoplastes. Leur fonction est de collecter l'énergie lumineuse.
La chaîne photosynthétique est présentée dans le **document 14**.

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

**Q17.** Repérer le donneur et l'accepteur final d'électrons de cette chaîne. Présenter deux points communs et deux différences entre cette chaîne photosynthétique et la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'équation bilan de la photosynthèse est la suivante :

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

La valeur de la variation d'enthalpie libre de cette réaction est $\Delta G' = +\ 2800\ kJ \cdot mol^{-1}$.

**Q18.** Conclure quant au rôle de la lumière captée par les pigments des organismes photosynthétiques.

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

**Document 1 : détermination des matières sèches et des cendres de l'échantillon.**

## 1. Principe

La matière sèche est déterminée par mise à l'étuve d'environ 5 g ($m_1$) d'algues fraiches pendant 12 heures à 105 °C. Les algues sont à nouveau pesées après étuvage ($m_2$). La teneur en matières sèches est exprimée en pourcentage de matière fraîche.
Pour déterminer la matière minérale, l'échantillon sec ($m_2$) est introduit dans un creuset en céramique puis dans un four à moufle réglé à 600 °C pendant toute une nuit. A la sortie, le creuset est mis à refroidir dans un dessiccateur, puis la teneur en matière minérale est déterminée par méthode gravimétrique (masse pesée = $m_3$).

## 2. Résultats bruts

$m_1$ = 5,120 g $m_2$ = 0,982 g $m_3$ = 0,043 g

## 3. Teneurs calculées

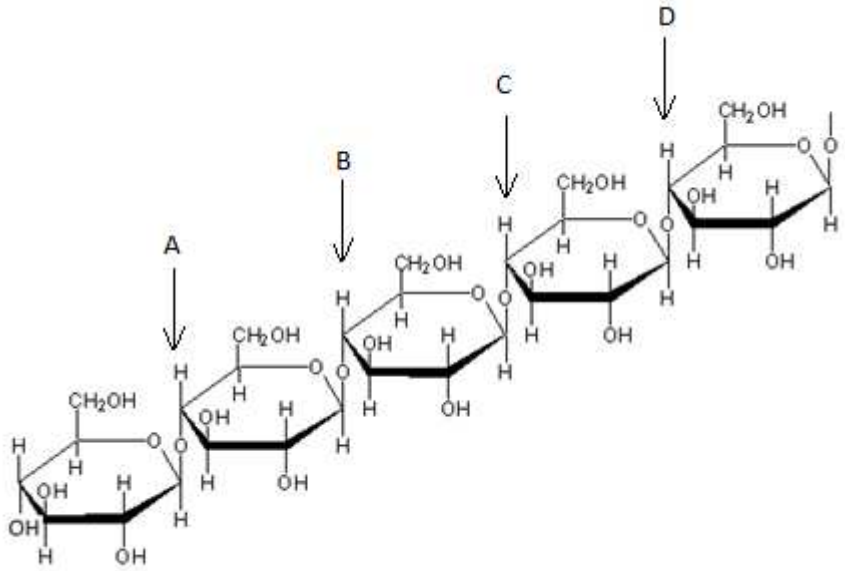
| Contenus | Teneur (g pour 100 g) |
|---|---|
| Matière sèche (MF) | 19,19 |
| Cendres (MS) | 4,37 |

N.B : MF = exprimée en pourcentage de matière fraiche,
MS = exprimée en pourcentage de matière sèche

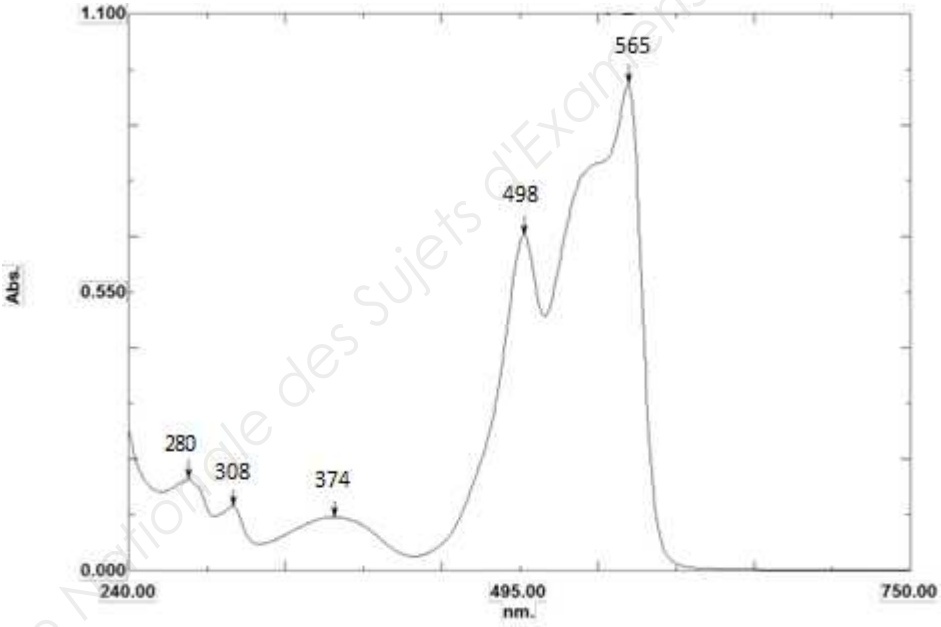
*Documents 1, 7, 8 et 10 adaptés de Huu Phuoc Trang NGUYEN, thèse de doctorat (2017) Optimisation du procédé d'hydrolyse enzymatique appliqué à l'extraction du pigment rouge, la R-phycoérythrine à partir de Mastocarpus stellatus et Gracilaria gracilis.*

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

**Document 2 : structure de la cellulose.**




**Document 3 : spectre d'absorption de la R-phycoérythrine.**




*Source : Entreprise Phyco-Biotech ; www.phyco-biotech.com*

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

**Document 4 : validation du dosage des protéines par la méthode de Bradford.**

| Tube | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Contrôle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $\rho_{prot}$ ($mg \cdot L^{-1}$) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | - |
| $A_{595\ nm}$ | 0 | 0,104 | 0,223 | 0,342 | 0,461 | 0,579 | 0,698 | 0,330 |

L'étalon de contrôle annoncé à 6,00 $mg \cdot L^{-1}$ est traité selon la même procédure que les essais L'EMT (Ecart Maximal Toléré) pour ce dosage est de 0,32 $mg \cdot L^{-1}$.

**Document 5 : procédure de dosage de l'activité spécifique des cellulases.**

- Réaction catalysée par les cellulases :

| 4-nitrophényl-β-D-cellobioside +eau → 4-nitrophénol + β-D-cellobiose |
|---|

- Préparation de l'enzyme :

200 mg d'enzyme dissous dans 100 mL d'eau+ 0,15 % de polyhexamethylene diguanide (PHMB).

- Mode opératoire

| Introduire dans des cuves spectrophotométrique de 1 cm de trajet optique | Témoin | Essai |
|---|---|---|
| 4-nitrophényl-β-D-cellobioside | 1,0 mL | 1,0 mL |
| Soude | 1,0 mL | - |
| Enzyme | 0,1 mL | 0,1 mL |
| Mélanger et incuber 2 heures à température 30 °C | | |
| Soude | - | 1,0 mL |
| Lire les absorbances à 420 nm contre l'air | | |

- Résultats :

| | Témoin | Essai |
|---|---|---|
| A 420 | 0,023 | 0,122 |

- Calcul :

$$z_{sp} = \Delta A \times \frac{2,1}{1,8}$$

ε : coefficient d'absorbance linéique molaire du 4-nitrophénol à 420 nm = 4500 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.
*1 unité U représente le nombre de micromole de nitrophénol libérées en une heure (ou 1 unité représente le nombre de micromole de cellobiose libérés en une heure).*

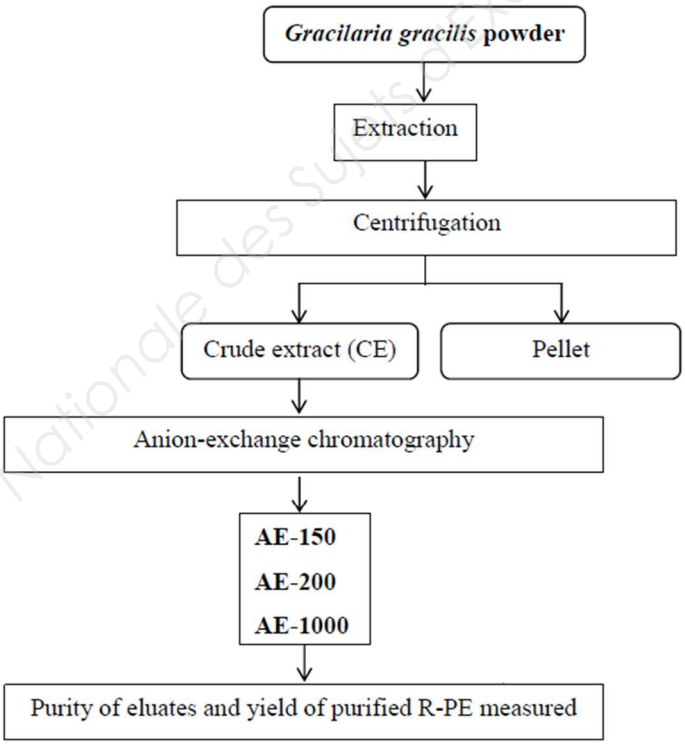
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

**Document 6 : rendement d'extraction en R-phycoérythrine et IP moyens obtenus selon différentes durées d'extraction à partir de l'algue *Gracilaria gracilis*, avec utilisation de cellulases.**

| Durée (min) | Rendement R-PE ($mg \cdot g^{-1}_{matière\ sèche}$) | IP (Indice Pureté) |
|---|---|---|
| 20 | 3,21 | 0,11 |
| 360 | 3,13 | 0,10 |
| 960 | 2,67 | 0,07 |

**Document 7 : procédure d'extraction et de purification de la R-PE de *Gracilaria gracilis* et présentation du système HPLC utilisé.**

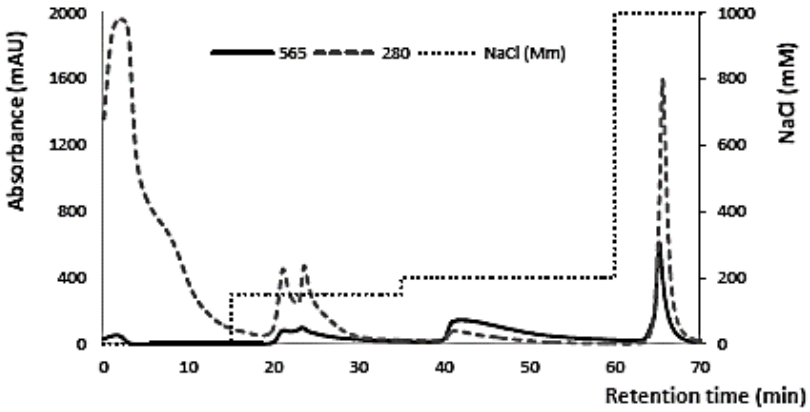
The HPLC system consisted of a piston pump (Schimadzu) interfaced with a diode array detector ((DAD SPD-M20A), Shimadzu). Chromatograms were monitored at 280nm and 565nm. Data were acquired using the Lab solutions/LC solution software. The mobile phase was constituted of two buffers : buffer A consisted of 20mM phosphate pH 7.1 and buffer B consisted of 20mM phosphate, 1M NaCl pH 7.1. The crude extract was applied on anion exchange column of DEAE – Sepharose Fast Flow (26mm x 100mm) and the elution was developed by a threestep increase in buffer ionic strength.: 0 - 150, 150- 200 and 200 - 1000mM. The fractions containing R-PE were collected at 150, 200, and 1000mM NaCl and were named AE-150, AE-200, and AE-1000, respectively.




Scheme for R-phycoerythrin extraction and purification procedure from *Gracilaria gracilis*

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

**Document 8 : résultat de la purification de la R-PE par chromatographie d'échange d'ions, à partir de l'extrait brut.**




Purification step of the CE by anion exchange HPLC on DEAE Sepharose. Chromatograms were monitored by UV-visible spectrophotometry at :

(- - - - ) 280 nm

(——— ) 565 nm (λmax R-PE)

( ····· ) NaCl concentration

The fractions were eluted at: AE-150/AE-200/AE-1000

**Document 9 : extrait de la fiche technique de la colonne superdex 200.**

Characteristics of Superdex 200 Increase medium

| | |
|---|---|
| Fractionation range | $M_r$ 10 000 to 600 000 (globular proteins)<br>$M_p$* 1000 to 100 000 (dextrans) |
| Exclusion limit | $M_r$ 1 300 000 (globular proteins) |
| pH stability | 3 to 12 (long-term)<br>1 to 14 (short-term) |
| Temperature stability | 4°C to 40°C |
| Working and storage temperature | 4°C to 30°C |
| Matrix | Composite of cross-linked agarose and dextran |
| Average bead size | 8.6 µm |

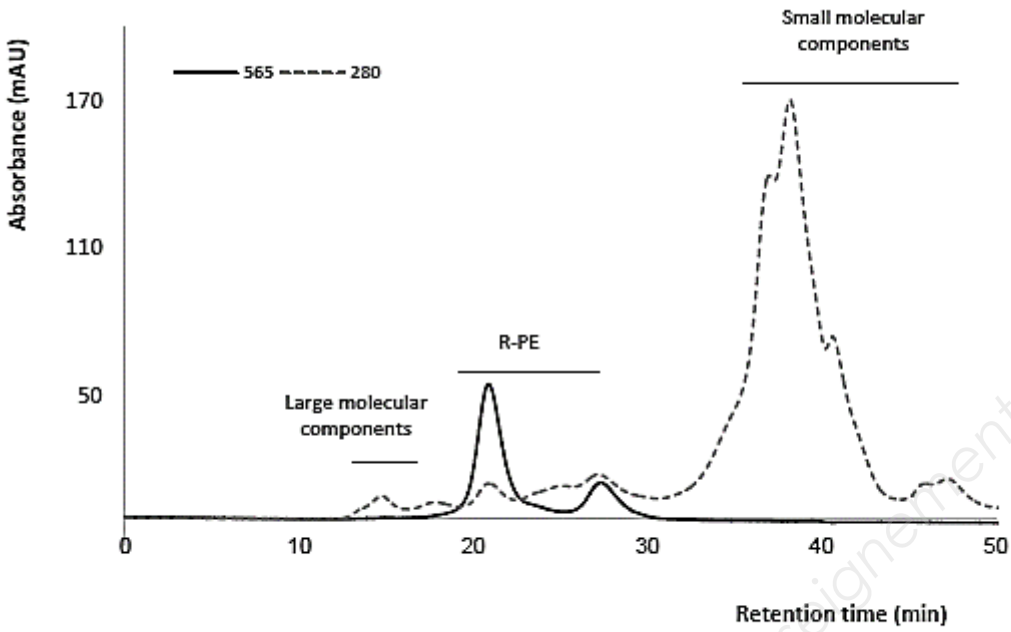
* Peak molecular weight

*Source : GE-Healthcare*

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

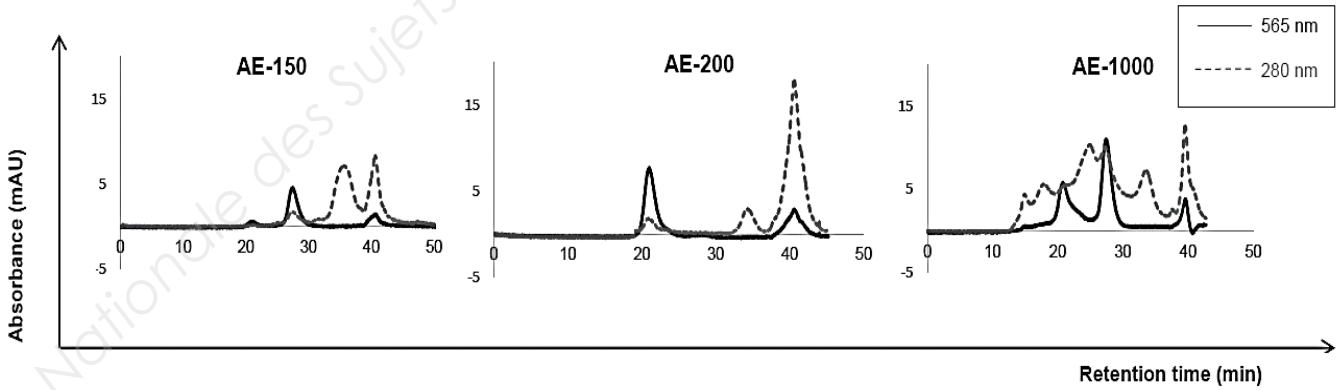
**Document 10 : résultats obtenus en chromatographie d'exclusion.**

**À partir de l'extrait brut :**




Gel filtration chromatogram of the crude extract (CE) from *Gracilaria gracilis*.

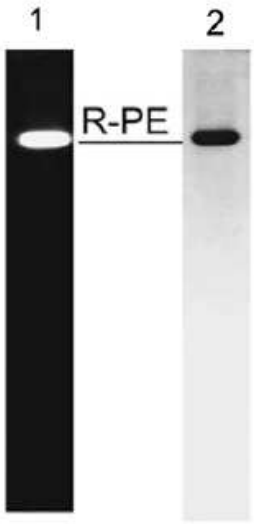
**À partir des fractions purifiées AE-150, AE-200 et AE-1000 :**




Gel filtration chromatograms of fractions: A (AE-150, AE-200, AE-1000)

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

**Document 11 : résultat du contrôle de pureté de la fraction AE-200 par électrophorèse PAGE non dénaturante.**




**The PAGE (lane 1 and 2) of the purified R-PE in native situation.**

Lane 1 yellow fluorescent bands of the R-PE in native red color under UV-light at 365 nm;
Lane 2 blue bands of the R-PE showed after the gel was stained by Coomassie Blue G-250.

*d'après Wang L,Wang S, Fu X,Sun L (2015) Characteristics of an R-Phycoerythrin with Twoγ Subunits Prepared from Red Macroalga Polysiphonia urceolata. PLoSONE10(3)*

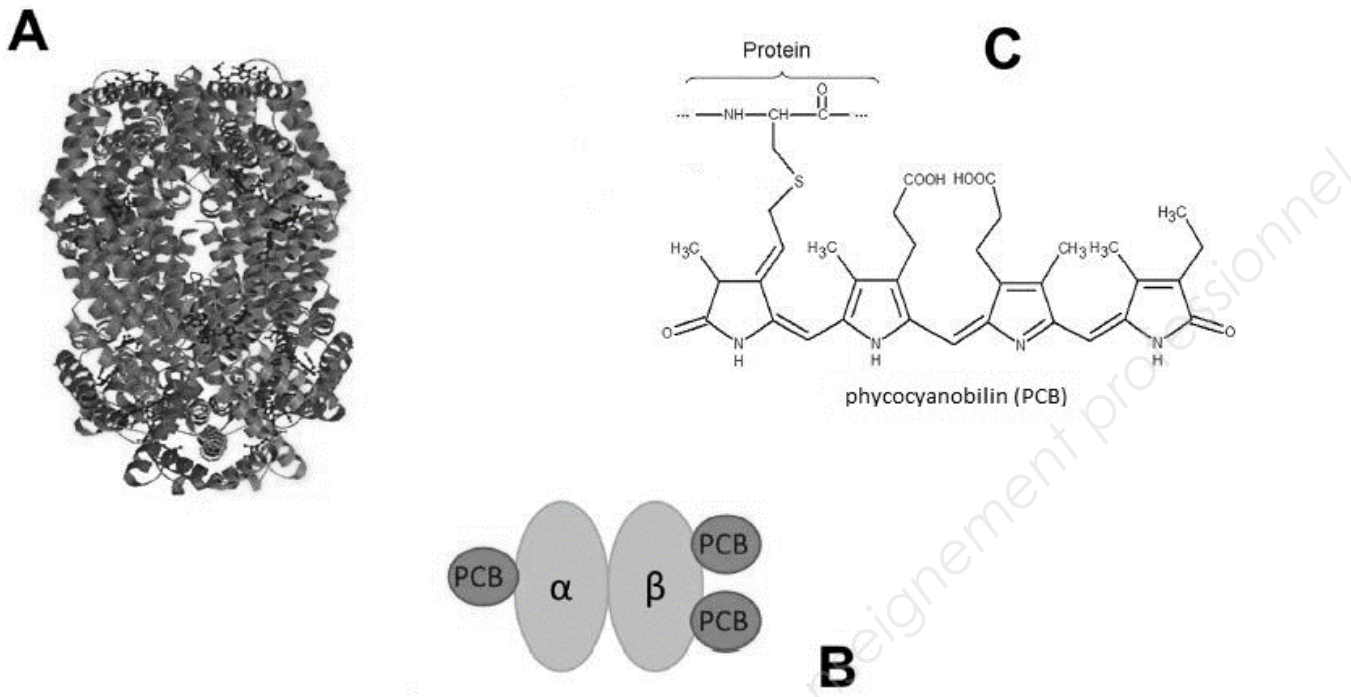
**Document 12 : extrait de la fiche de données de sécurité de l'acrylamide.**

| Pictogrammes | Mentions de danger | Conseils de prudence |
|---|---|---|
|   | H302 + H332 : nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation.<br>H315 : Provoque une irritation cutanée.<br>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.<br>H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.<br>H340 : Peut induire des anomalies génétiques.<br>H350 : Peut provoquer le cancer.<br>H361f : Susceptible de nuire à la fertilité.<br>H372 : Risque avéré d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée. | P201 : Se procurer les instructions avant utilisation.<br>P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.<br>P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.<br>P304+P340+P31 : EN CAS D'INHALATION: Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer ; appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.<br>P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes ; enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.<br>P308 +P313 : EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: Consulter un médecin. |

*Source : https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3574?lang=fr&region=FR*

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

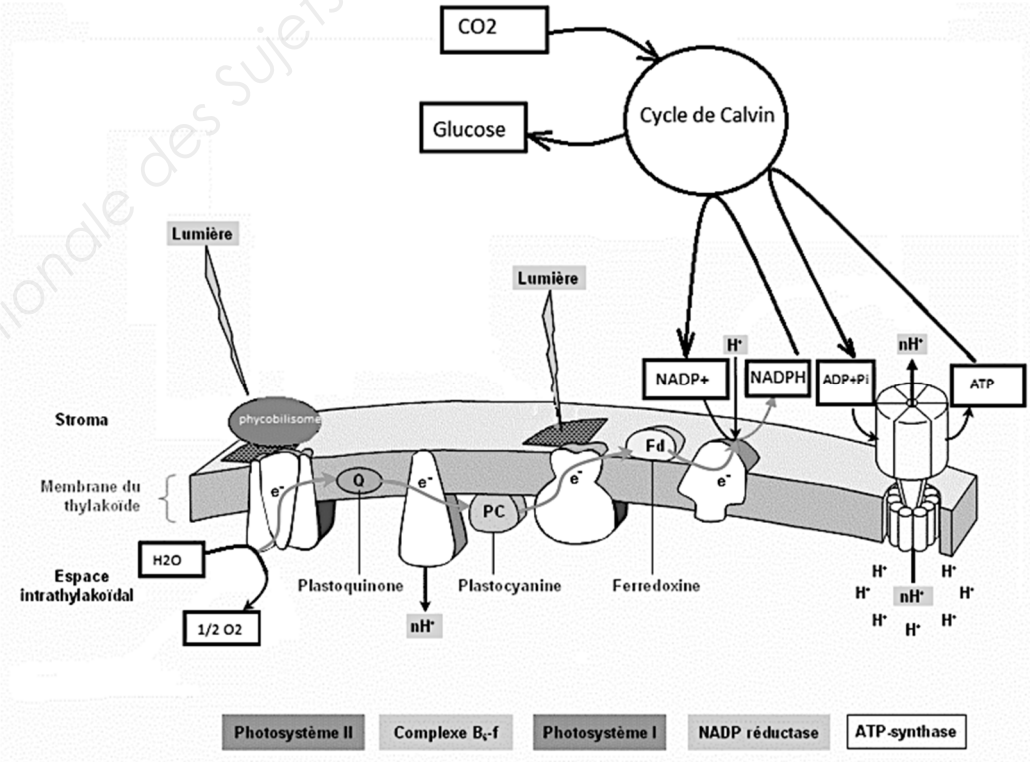
**Document 13 : structure d'une phycobiliprotéine : la phycocyanine.**




**Phycocyanin (PC) structure. (A) Crystal structure of PC from cyanobacterium *S. platensis* in form of hexamer, image from PDB (http://www.rcsb.org) of PDB ID 1GH0 (2011). (B) Schematic representation of PC assembly. It is composed of two protein subunits, α and β chains, one phycocyanobilin (PCB) is bound to the α subunit and two PCBs are bound to the β subunit. (C) Chemical structure of PCB, the chromogen responsible of blue color of PC.**

*D'après : http://www.binmeibio-fr.com/info/nutraceutical-properties-of-phycocyanin-23243402.html*

**Document 14 : chaîne photosynthétique d'algue rouge.**




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

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.