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

U3 Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

SESSION 2018

DUREE DE L'EPREUVE : 2 h 00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

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'Examen de l'enseignement professionnel

La L-asparaginase : biomolécule thérapeutique

L'effet antitumoral de la L-asparaginase (L-ASNase) a été mis en évidence dans les années 1950. Depuis, l'enzyme a été extraite des bactéries *Escherichia coli* ou *Erwinia carotovora* et commercialisée. Une troisième forme commerciale a été développée par liaison de l'ASNase issue d'*Escherichia coli* à des molécules de polyéthylène glycol.
Récemment, une société biopharmaceutique française s'est également lancée dans le développement de L-asparaginase encapsulée dans des globules rouges, qui a l'avantage de présenter une toxicité moins importante.
On se propose d'étudier quelques caractéristiques de cette enzyme.

1. Etude de L-asparaginase encapsulée (3 points)

Le document 1 présente le principe d'action du médicament utilisé dans le traitement, à la L-asparaginase, de certains cancers du sang.

L'asparaginase (E.C.3.5.1.1) encapsulée à l'intérieur des globules rouges contribue à un traitement anti-cancéreux original et efficace. L'encaspulation réduit significativement les effets secondaires (réactions allergiques, toxicité sur cellules non tumorales, …).

1.1 Ecrire la réaction catalysée par la L-asparaginase. Préciser la classe d'enzyme à laquelle appartient la L-asparaginase.

1.2 Expliquer l'intérêt d'utiliser la L-asparaginase dans ce traitement.

L'encapsulation est une technique d'immobilisation des enzymes par rétention physique. Elle diminue l'apparition des phénomènes de résistance au médicament.

1.3 Expliquer l'intérêt d'encapsuler la L-asparaginase. Présenter sommairement une méthode d'immobilisation autre que par rétention physique.
Rappeler les principaux avantages et inconvénients de l'immobilisation des enzymes.

2. Extraction et purification de la L-asparaginase d'*Erwinia carotovora* (8 points)

La L-asparaginase issue d'*Erwinia carotovora* semblerait être mieux tolérée que cellle d'*Escherichia coli*. Cette protéine, de masse moléculaire de 150 kDa, présente une structure et un comportement électrophorétique différents de ceux de la L-asparaginase d'*Escherichia coli*.
Le document 2 présente les étapes de la purification de cette enzyme. Le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium nécessaire à la précipitation de la L-asparaginase est de 70%.

2.1 Expliquer le principe de la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$.

2.2 Calculer la masse de sulfate d'ammonium à ajouter à 100 mL d'extrait brut pour atteindre ce pourcentage de saturation.
(La quantité de sels présents dans le milieu avant précipitation est négligeable.)

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

Le document 2 présente des informations techniques utiles au choix d'une phase stationnaire adaptée pour la conduite de la gel filtration.

2.3 Argumenter la nécessité d'une étape de gel filtration consécutive à la précipitation au sulfate d'ammonium.
A l'aide des valeurs des domaines de fractionnement, prévoir le comportement de la L-ASNase dans chacune des deux phases stationnaires.
Montrer que les volumes d'élution obtenus dans les deux cas sont cohérents avec ce comportement. Discuter du choix de la phase stationnaire.

2.4 Calculer l'activité spécifique z_{sp} (en UI.mg^{-1}) pour l'extrait brut et pour la fraction purifiée finale après chromatographie sur DEAE Sephadex (équations aux grandeurs et aux valeurs numériques exigées).
Calculer le taux de purification (ou enrichissement) global et le rendement global obtenus (équations aux grandeurs et aux valeurs numériques exigées).

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS PAGE) et en conditions réductrices a été réalisée lors du suivi de la purification. Les résultats sont présentés dans le document 3.

2.5 Estimer la masse moléculaire correspondant à la bande obtenue après purification.
Montrer que la L-asparaginase est un homotétramère. Comparer les résultats obtenus pour l'extrait brut et pour la fraction purifiée. Conclure.

2.6 Expliquer les informations complémentaires apportées par la réalisation d'une électrophorèse SDS PAGE en conditions non réductrices.

3. Etude de l'influence de quelques composés sur les paramètres cinétiques de la L-asparaginase (4 points)

Une amélioration de l'efficacité du traitement pourrait passer par l'ajout de certains composés à la L-asparaginase encapsulée.
Dans cette perspective, l'influence de quelques cations et d'un composé organique a tout d'abord été étudiée. Les conditions de mesure de l'activité enzymatique et les résultats obtenus sont rassemblés dans le document 4.

3.1 Analyser les résultats obtenus en présence des ions Mg^{2+} et K^+ pour en déduire l'effet de chacun de ces ions sur l'enzyme.
Sachant que l'EDTA est un agent chélateur, proposer une explication des résultats obtenus en présence de ce réactif.

Une attention plus particulière s'est ensuite portée sur l'influence des groupements thiols.
Les groupements thiols caractérisent une famille de composés organiques comportant un groupement SH lié à un atome de carbone.
Dans cette famille on trouve des molécules telles que la L-cystéine ou le glutathion réduit.
La constante de Michaélis (K_M) et la vitesse initiale maximale de la réaction (v_{imax}), ont été déterminées en présence ou en absence de ces composés (document 5).

3.2 Analyser les résultats présentés et conclure quant aux actions des deux effecteurs testés sur les paramètres cinétiques de l'enzyme (K_M et v_{imax}).

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

Le document 6 présente un modèle de mécanisme d'action des composés organiques comportant des groupements thiol (T) sur la L-asparaginase.

3.3 Montrer que la modification de l'affinité mesurée en présence des effecteurs est en adéquation avec le modèle proposé.

4. Dosage des anticorps anti-L-asparaginase dans le plasma des patients traités par l'enzyme (3 points)

Dans certains cas, l'inefficacité du traitement au médicament est due à la production d'anticorps anti L-asparaginase par l'organisme. Un test ELISA a été mis au point pour déterminer la concentration en anticorps plasmatiques.
Le document 7 présente le protocole utilisé.

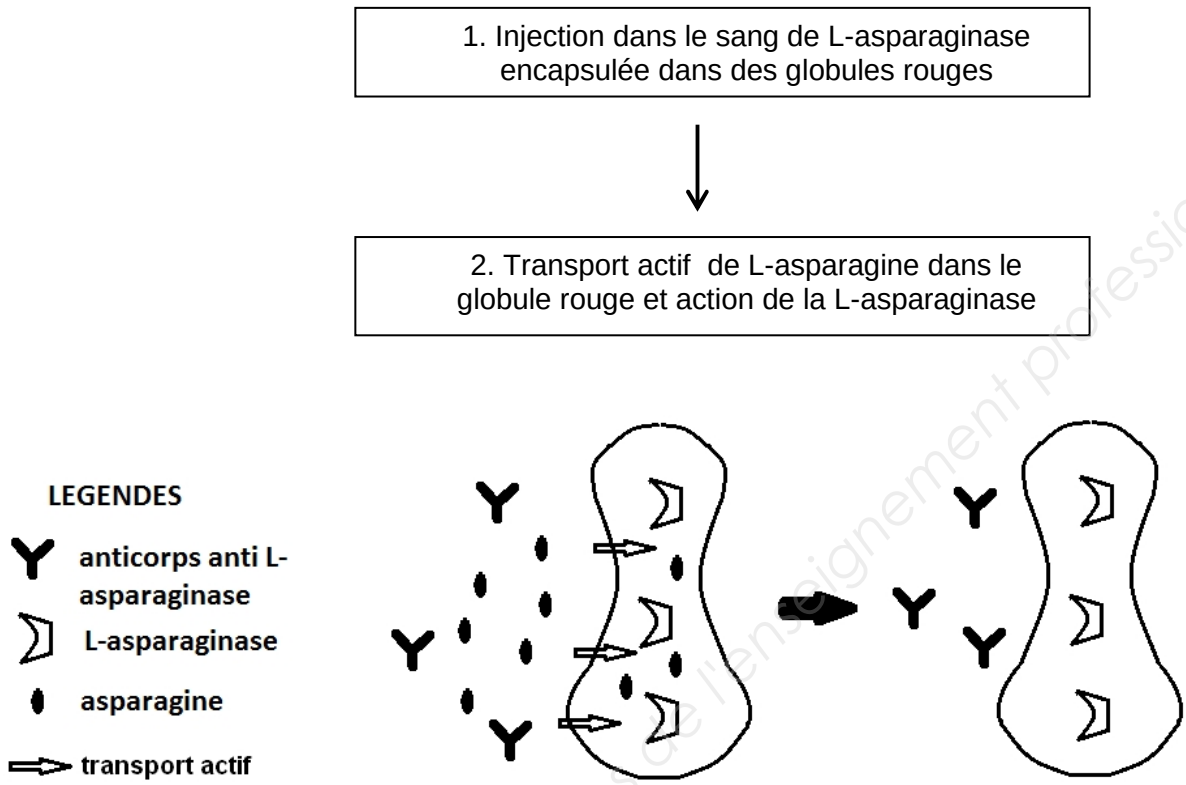
4.1 Réaliser un schéma annoté montrant le contenu moléculaire d'une cupule positive. Présenter les caractéristiques de l'anticorps conjugué utilisé, en précisant son site de fixation.

4.2 Expliquer l'évolution attendue du signal en fonction de la concentration en anticorps anti L-asparaginase du plasma.

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

Document 1 : Principe d'action du médicament : L-asparaginase encapsulée



Le principe du traitement est d'éliminer l'asparagine circulante, nutriment important des cellules cancéreuses, en utilisant une enzyme spécifique : la L-asparaginase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en acide L-aspartique et ammoniaque (NH_3).

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

Document 2 : Purification de la L-asparaginase de *Erwinia carotovora*.

Les différentes étapes de la purification

Etapes de purification	Activité catalytique totale *z* (UI)	Masse de protéines totales (mg)
Extrait brut	10000	5000
Précipitation au sulfate d'ammonium	5000	1400
Gel filtration sur Sephadex G-75	4100	249
Chromatographie CM cellulose	3172	10
Chromatographie DEAE Sephadex	3000	3

Masse (g) de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution protéique pour atteindre le pourcentage de saturation désiré.

Le tableau indique les masses de sulfate d'ammonium (en gramme) à ajouter à un litre de solution pour obtenir le pourcentage de saturation désiré en fonction du pourcentage de saturation de la solution initiale.

		% de saturation final						
		55 %	**60 %**	**65 %**	**70 %**	**75 %**	**80 %**	**100 %**
% de saturation initial	**0 %**	351 g	390 g	430 g	472 g	516 g	561 g	767 g
	10 %	288 g	326 g	365 g	406 g	449 g	494 g	694 g
	15 %	256 g	294 g	333 g	373 g	415 g	459 g	657 g
	20 %	225 g	262 g	300 g	340 g	382 g	424 g	619 g
	25 %	193 g	230 g	267 g	307 g	348 g	390 g	583 g

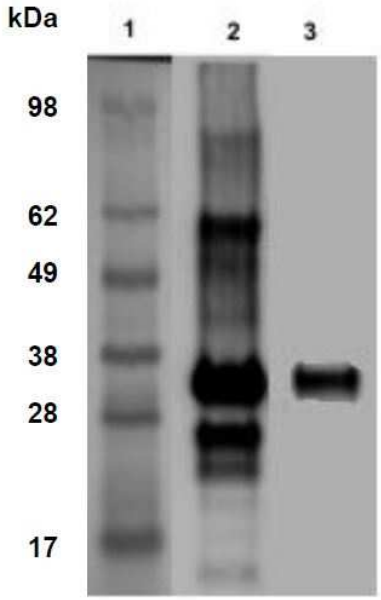
2.c : Informations techniques relatives à la conduite de l'étape de gel filtration

Phases stationnaires testées	**V_{mort} (mL)**	**V_{total} (mL)**	**$V_{élution\ Asparaginase}$ (mL)**	**Débit ($mL.min^{-1}$)**	**Dimensions colonne**	**Domaines de fractionnement (kDa)**
Sephadex G-75	100	265	101	2	2,6 cm x 60 cm	3 à 80
Superdex 200	112	250	158	2		10 à 1300

Composition de la phase mobile : tampon TrisHCl à 50 mM + KCl 100 mM, à pH 8,5

Reproduction interdite hors cadre de l'enseignement professionnel

Document 3 : Analyse des fractions de purification sur SDS PAGE en conditions réductrices



Piste 1 : Marqueurs de masse moléculaire.

Piste 2 : Extrait brut.

Piste 3 : Fraction protéique après purification sur DEAE Sephadex.

Document 4 : Influence de différents composés sur l'activité L-asparaginase

Réactif	Concentration du réactif ($mmol.L^{-1}$)	Activité L-asparaginase relative (%)
aucun	0	100
Mg^{2+}	1,0	24
K^{+}	1,0	133
EDTA	0,5	117

Une préincubation de l'enzyme de 20 minutes à 37°C en présence du composé testé est réalisée. L'activité résiduelle est ensuite déterminée dans des conditions optimales de concentration en L-asparagine.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité de l'enzyme en absence d'effecteur.

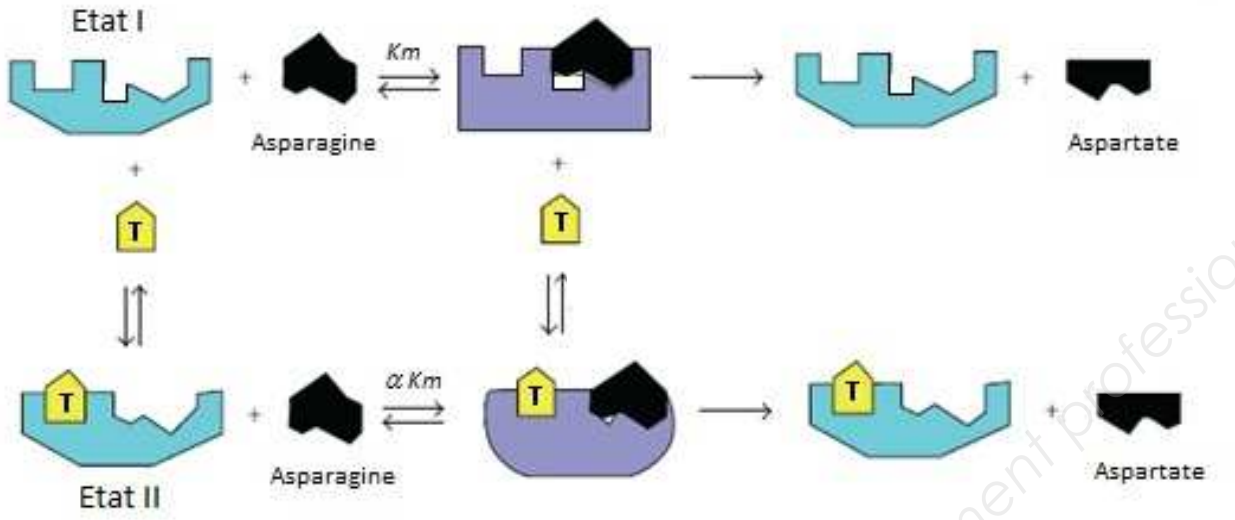
Document 5 : Effet des composés à groupements thiols sur les paramètres cinétiques de l'enzyme.

Effecteur testé	K_M ($mmol.L^{-1}$)	V_{imax} ($\mu mol.mg^{-1}.min^{-1}$)
Témoin*	0,098	1700
Cystéine	0,086	2000
Gluthation (forme réduite)	0,055	2500

* Témoin réalisé sans effecteur

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

Document 6 : Modèle de mécanisme d'action des composés organiques comportant des groupements thiols sur la L-asparaginase.



α : compris entre 0 et 1
T : composé contenant des groupements Thiols

Document 7 : Protocole de dosage des anticorps anti L-asparaginase par technique ELISA

Ninety-six-well plates were coated with 50 µL/well L-asparaginase diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C.
Plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBS/Tween), and then blocked with 100 µL/well of 4% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature.
After washing, 50 µL of patient plasma diluted as indicated in PBS/Tween/1% BSA were pipetted into wells and incubated overnight at 4°C. Plasma samples were subsequently removed, and plates were washed three times prior to the addition of 100 µL/well of sheep anti- IgG conjugated to horseradish peroxidase diluted in PBS/Tween/1% BSA.
After 2 h incubation at room temperature, the plates were washed three times again and all wells were then reacted with 100 µL of ABTS Single Solution chromogen/substrate for 20 min in the dark.
The reaction was halted by the addition of 100 µL/well of stop solution (0.01% sodium azide, 1% SDS). The absorbance of each well was measured at 415 nm.

Sources :

Document 1 :
ERYTECH PHARMA

Documents 2 à 6 :
Suchita C. et al. (2010), Purification, characterisation, and effect of thiol compounds on activity of the Erwinia carotovora L-asparaginase, Enzyme Research, vol. 2010.

Document 7 :
Kidd J.A et al (2014), Development of an ELISA to detect circulating anti-asparaginase antibodies in dogs with lymphoid neoplasia treated with E. coli. L-asparaginase, Vet. Comp. Oncol.

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.