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 2019

DUREE DE L'EPREUVE : 2 h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

Dictionnaire anglais/français, tout autre matériel est interdit.

Document à rendre avec la copie :

- Annexe A……..page 5/9

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.

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

Implication de l'activité lysyl oxydase (LOX) dans le développement des métastases cancéreuses

La lysine oxydase (LOX) est une enzyme extracellulaire, synthétisée notamment par les fibroblastes des tissus conjonctifs. Elle est impliquée dans une étape de maturation des fibres de collagène. Cette étape est essentielle à leur résistance à l'étirement.

La lysyl oxydase est surexprimée dans les tissus cancéreux. La LOX, en intervenant sur le remodelage de la matrice extracellulaire, stabiliserait l'implantation des foyers métastasiques.

Une stratégie de traitement pour ces cancers serait d'inhiber la lysyl oxydase. Un inhibiteur, le BAPN (beta-amino propionitrile) est testé chez la souris.

1. Le collagène, un substrat naturel de la lysyl oxydase (5 points)

Constituant majoritaire de la matrice extracellulaire, le collagène est une protéine fibreuse, insoluble et particulièrement résistante à l'étirement. Les fibres de collagène sont formées par l'assemblage extracellulaire d'un grand nombre de molécules de tropocollagène. La résistance mécanique des fibres est due, entre autres, à la présence dans la molécule de tropocollagène de régions en triple hélice constituées de répétitions de séquences Gly-Pro-X où X désigne un acide aminé quelconque.

Le **document 1** donne les formules des acides aminés glycine et proline, particulièrement abondants dans le collagène.

1.1 Ecrire la formule générale semi-développée d'un acide aminé naturel. Dégager la particularité structurale de chaque acide aminé présenté (glycine, proline) et son incidence sur la structure secondaire du collagène.

Le **document 2** présente les structures d'une hélice alpha et d'une section en triple hélice d'une molécule de tropocollagène.

1.2 Sur le **document 2b**, à rendre avec la copie, entourer et légender un résidu proline et un résidu glycine, une liaison peptidique et une liaison hydrogène.

1.3 Construire et compléter un tableau comparatif des structures de l'hélice alpha et de la triple hélice du tropocollagène, portant sur les critères suivants :
- nombre de chaînes peptidiques,
- positionnement des interactions hydrogènes stabilisatrices.

1.4 Proposer au moins un argument pour expliquer que la structure en triple hélice du tropocollagène permet une plus grande résistance à la traction.

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

2. Étude du niveau d'expression de la protéine LOX en condition d'hypoxie (6 points)

Il a été montré que l'hypoxie observée lors du développement initial des tumeurs est liée au développement de métastases.

Le **document 3** présente les travaux de l'équipe de Ling Wei, qui a étudié par western blot, l'effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la protéine LOX.

2.1 Expliquer le rôle de l'étape de SDS-PAGE.

2.2 Construire les deux schémas légendés des édifices moléculaires impliqués dans l'immuno-détection sur la membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) :
- de la LOX,
- de la ß-actine.

2.3 Expliquer le rôle de l'étape n°2 du Western blot et le rôle des étapes de lavage.

2.4 La ß-actine étant une protéine à expression constante, expliquer l'intérêt de sa détection dans le cadre de cette étude.

2.5 Argumenter la nécessité d'incuber la membrane avec l'anticorps conjugué de chèvre anti-Ig G de lapin (étape n°5), avant l'incubation avec l'anticorps conjugué de lapin anti-IgG de souris (étape n°7).

2.6 Analyser les résultats présentés et conclure quant à l'effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la LOX.

3. Détermination de l'activité de la lysyl oxydase (7 points)

Un kit de dosage de l'activité LOX dans des échantillons biologiques est utilisé pour mesurer l'efficacité d'un traitement par le BAPN, inhibiteur de la LOX.

Le **document 4** présente les deux réactions mises en jeu dans le kit de dosage de l'activité LOX.

Le **document 5** donne des informations techniques sur le mode d'emploi du kit de dosage.

3.1 Préciser les composants présents dans un puits de mesure de l'activité LOX d'un surnageant de culture cellulaire.

Dans le kit de dosage de l'activité LOX, la solution « HRP substrate » est préparée à 250X. Elle sera finalement utilisée à 1X lors du dosage.

3.2 Donner la signification du « X ».

3.3 Justifier l'utilisation de cette solution à 250X dans le kit.

3.4 Exposer le principe de la fluorescence et préciser les longueurs d'onde de réglage de l'appareil de mesure.

3.5 Expliquer comment la réaction indicatrice catalysée par la HRP est couplée à la réaction catalysée par la LOX.

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

L'équipe de Janine T. Erler a étudié chez des souris cancéreuses l'effet d'un inhibiteur de la LOX (le BAPN). Des expériences ont montré que le BAPN est un inhibiteur compétitif de la LOX.

3.6 Proposer une représentation graphique annotée mettant en évidence les paramètres cinétiques de la LOX en présence et en absence de BAPN.

Le **document 6** présente le protocole de traitement des souris et les résultats obtenus.

3.7 Préciser si la différence d'activité enzymatique de LOX observée entre le témoin et le lot 1 est significative.

3.8 Analyser l'ensemble des résultats et conclure sur l'efficacité de l'inhibition.

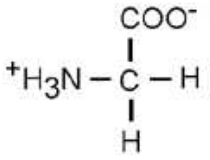
3.9 Argumenter l'intérêt d'utiliser le BAPN dans la lutte contre le développement des cancers.

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

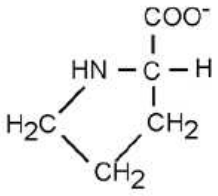
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

Annexe A : document **2b** à compléter et **page 5** à rendre avec la copie

Document 1 : Formules de la glycine et de la proline



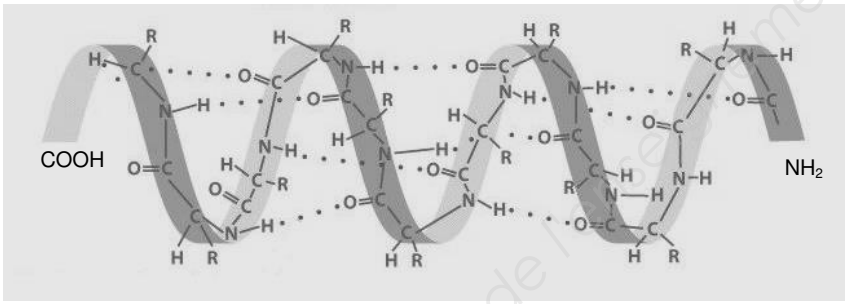
Glycine



Proline

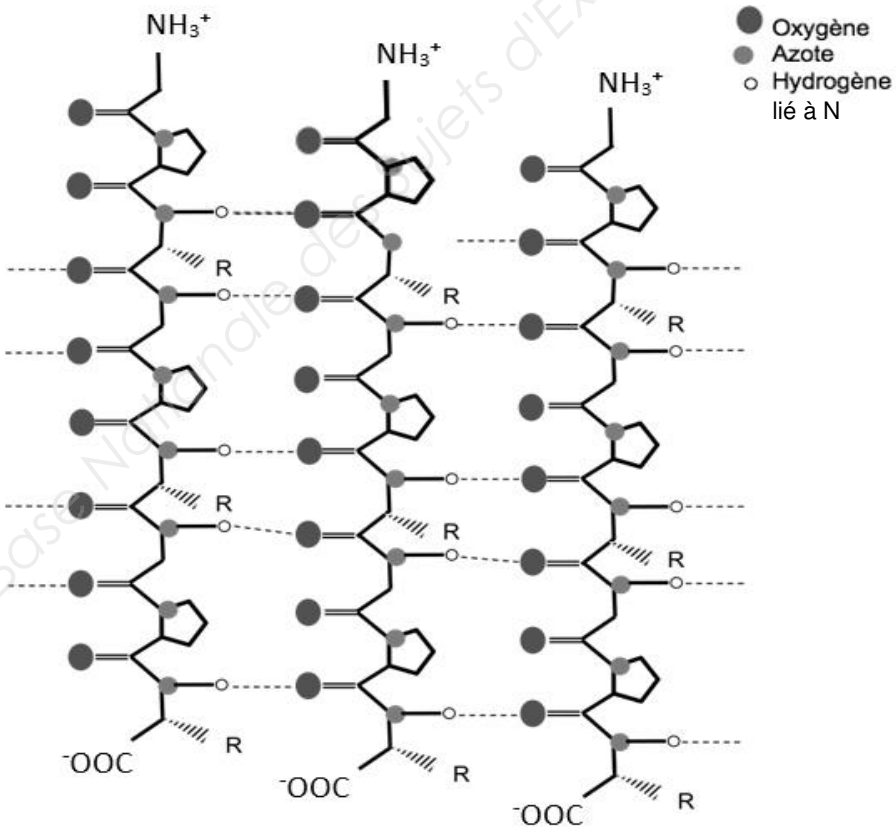
Document 2 : Structures d'une hélice alpha et d'une fraction de la région en triple hélice d'une molécule de tropocollagène

2a. Structure 3D d'une hélice α (hélice droite)

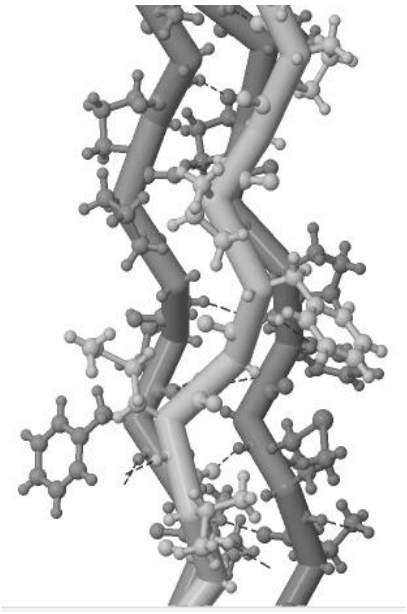


2b. Projection (A) et modèle 3D (B) d'un court segment de triple hélice de tropocollagène de type I

A.



B. Triple hélice droite



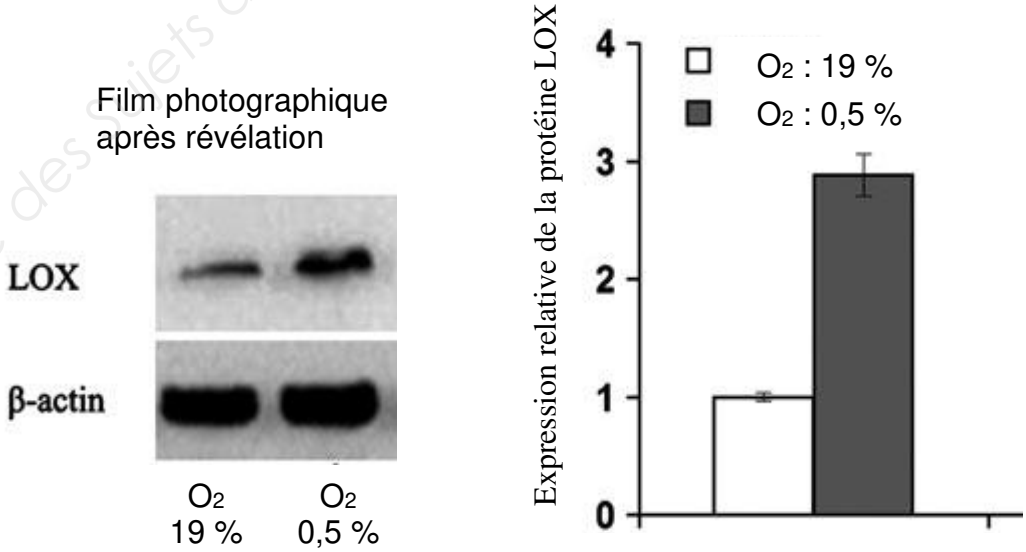
Chaque chaîne est en hélice gauche

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

<u>Document 3</u> : Effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la protéine LOX par des cellules cancéreuses de lignée pulmonaire en culture

- **Conditions expérimentales et mise en œuvre du western blot**
  - Cellules cultivées pendant 24 h dans deux conditions :
    - O_2 à 19% (normoxie).
    - O_2 à 0,5% (hypoxie).
  - Extraction des protéines et quantification par méthode de Bradford.
  - Electrophorèse SDS PAGE (dépôt de 50 µg de protéines par puits)
  - Western blot (étapes) :
    1. Electrotransfert sur membrane de PVDF (PolyVinyliDene Fluoride).
    2. Incubation de la membrane dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à 5% de lait pendant 2h à température ambiante.
    3. Incubation de la membrane avec un mélange d'anticorps de lapin anti LOX humaine et d'anticorps de souris anti β-actine humaine, toute une nuit à 4°C
    4. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
    5. Incubation de la membrane avec un anticorps de chèvre anti IgG de lapin conjugué à l'HRP (Horse Radish Peroxydase) pendant 2h à température ambiante.
    6. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
    7. Incubation de la membrane avec un anticorps de lapin anti IgG de souris conjugué à l'HRP, 2h à température ambiante.
    8. 3 lavages en PBS Tween 0,1 %.
    9. Révélation par chimioluminescence.

- **Résultats**



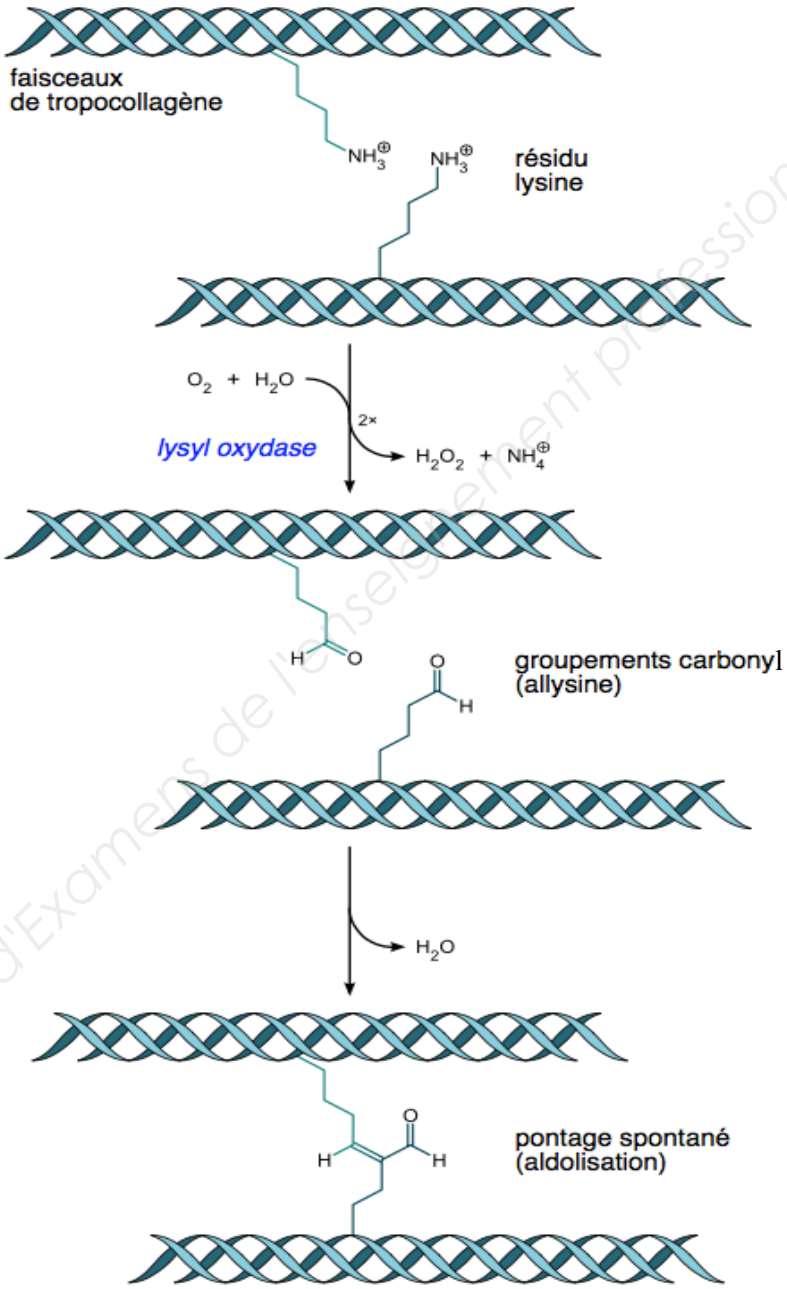
Ling Wei, Xian-Rang Song, Ju-Jie Sun, Xing-Wu Wang, Li Xie, and Li-Yan Ly. Lysyl Oxidase May Play a Critical Role in Hypoxia-Induced NSCLC Cells Invasion and Migration. ***Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals,*** 2012 Dec; 27(10): 672–677.

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

<u>Document 4</u> : Réactions mises en jeu dans le kit de dosage de l'activité de la LOX

1) Action de la lysyl oxydase (LOX) sur son substrat naturel, le tropocollagène

Dans le kit de dosage, le substrat naturel de la LOX (faisceaux de tropocollagène) est remplacé par un peptide contenant de la lysine



2) Réaction catalysée par la peroxydase de raifort (HRP)

Substrat fluorogène + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{HRP}}$ Composé fluorescent + 2 H_2O

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

Document 5 : **Données de la fiche technique du kit de dosage de LOX par fluorimétrie : (Lysyl Oxydase Activity Assay kit Fluorometric)**

- *Prepare 2X LOX Reaction Mix as described below and equilibrate at room temperature. (The volumes given are enough for 1 x 96-well plate)*

Component	***Vol***
250X HRP substrate	*40 µL*
50 U/mL HRP stock solution	*20 µL*
Assay Buffer containing peptidic substrate of the LOX enzyme	*adjust volume to 5 mL*

- *Set up reaction wells*
  Blank control: 50 µL PBS + 0.1 % BSA
  Standard wells: 50 µL LOX standard dilutions with PBS + 0.1 % BSA
  Sample wells: 1-50 µL samples (adjust volume to 50 µL / well with PBS + 0.1 % BSA)
- *Add 50 µL of LOX Reaction Mix into each well to make the total assay volume of 100 µL. Mix and incubate at 37°C for 10-40 min protected from light.*
- *Monitor fluorescence on a microplate reader at Ex / Em = 540 / 590 nm.*
- *Substract the blank control from all other wells.*

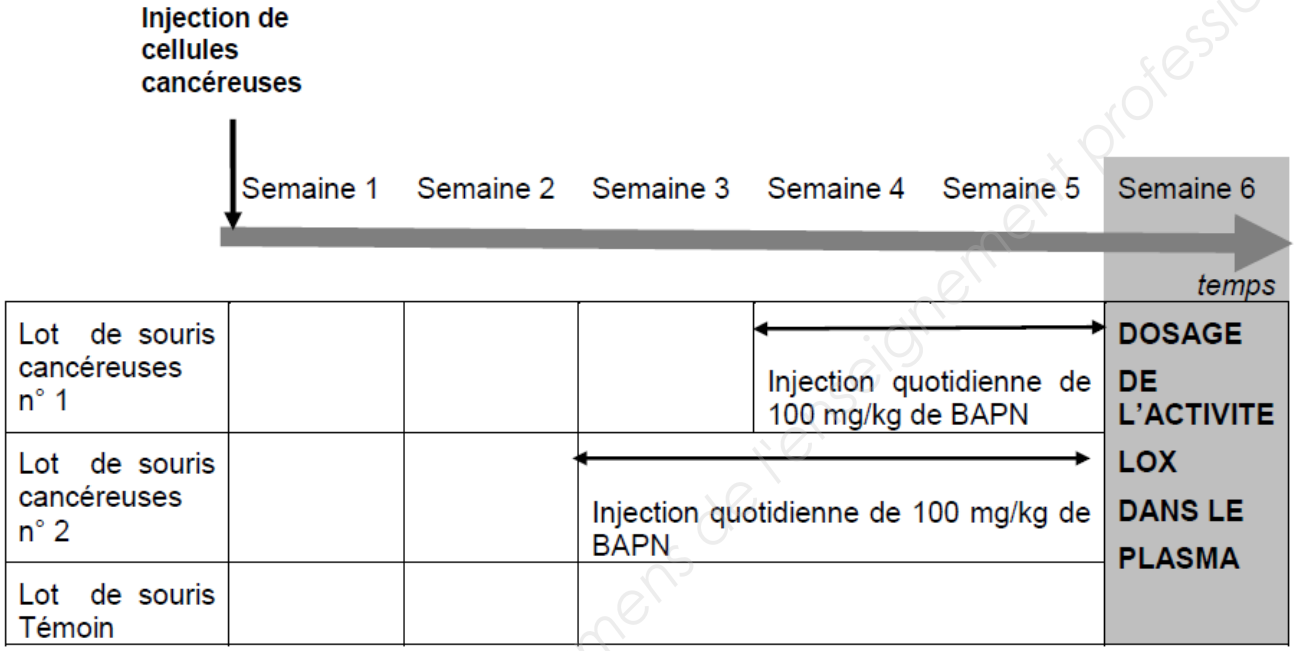
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel

<u>Document 6</u> : Mesure fluorimétrique de l'activité LOX dans le plasma de souris cancéreuses et traitées par l'inhibiteur BAPN

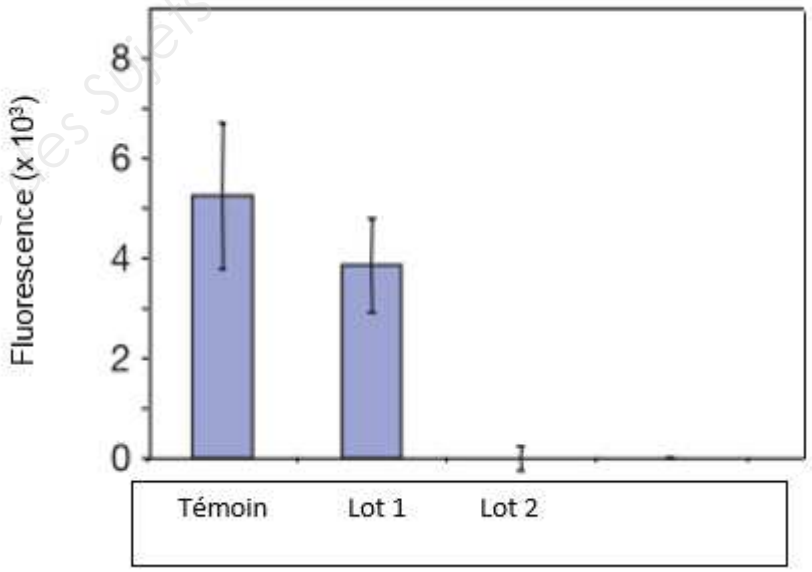
➢ Présentation du protocole de l'étude

Des souris subissent une injection intradermale de cellules cancéreuses induisant le développement de tumeurs sous-cutanées en quelques semaines, puis elles sont divisées en trois lots.

Ces souris sont ensuite traitées selon le protocle suivant :



➢ Résultats de l'étude : Dosage de l'activité LOX par le kit « Lysyl Oxydase Activity Assay »



D'après **Erler JT1, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ.** Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. ***Nature***, 2006 Apr 27;440(7088):1222-6.

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.