



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 U33 BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2019

Durée : 2 heures

Coefficient : 3

Matériel autorisé :

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

Compétences évaluées :

- | | |
|--|-----------|
| C2.1. Analyser une problématique | 12 points |
| C2.2. Analyser un protocole, une fiche, un dossier technique ou des documents | 12 points |
| C2.4. Présenter des informations, analyser, interpréter, valider des résultats | 4 points |
| C3.1. Adapter ou optimiser des procédures ou des procédés | 10 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 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2019
U33 – Biologie cellulaire et moléculaire et technologies d'analyse	Code : BAE3BC	Page : 1 sur 9

ÉTUDES PRÉ-CLINIQUES DU RITUXIMAB, UN ANTICORPS MONOCLONAL THÉRAPEUTIQUE

Le rituximab est un anticorps monoclonal qui sert de principe actif dans des médicaments anticancéreux. La mise au point de ce principe actif a nécessité des études pré-cliniques, en vue de la constitution du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché. Ces études se déclinent en plusieurs domaines : les études pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et toxicologiques.



1 Production du principe actif.

Le **document 1** présente une classification des anticorps monoclonaux thérapeutiques, à laquelle appartient le rituximab.

Q1. Réaliser un schéma annoté du rituximab à l'aide de la liste ci-dessous :
Chaîne lourde, Chaîne légère, Région variable murine, Région constante humaine, Paratope, Ponts disulfures.

Argumenter l'intérêt des anticorps chimériques ou humanisés en thérapie humaine.

Le **document 2** présente la technique d'obtention des hybridomes.

Q2. Rappeler les trois caractères essentiels des deux types de cellules utilisées pour l'obtention des hybridomes.

On sélectionne les hybridomes candidats à l'aide d'un milieu de culture contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (milieu HAT).

Le **document 3** schématise les voies de biosynthèse des nucléotides.

Q3. Expliquer la méthode de sélection des hybridomes candidats.

Q4. Indiquer une méthode permettant l'isolement des hybridomes candidats et une méthode de sélection de l'hybridome sécrétant l'anticorps de spécificité souhaitée.

2 Pharmacodynamie du principe actif.

Le récepteur cellulaire du rituximab, présent sur les lymphocytes B, est une protéine transmembranaire. Cette protéine CD20 est schématisée dans le **document 4**.

Q5. Indiquer la polarité des parties 1, 2 et 3 de la protéine CD20.

Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) se caractérisent par une multiplication anarchique des lymphocytes B.

Le **document 5** propose un schéma simplifié des voies de transduction du signal après fixation du rituximab sur le récepteur CD20.

Q6. Argumenter l'utilisation du rituximab comme anticancéreux efficace dans le traitement des LLC.

3 Pharmacocinétique du principe actif.

Les protocoles de traitement des LLC mettent en jeu plusieurs injections sous-cutanées de rituximab. Des suivis pharmacocinétiques sont obtenus par un dosage régulier du rituximab dans le sang des patients par une technique ELISA 1 dont un extrait du protocole est présenté dans le **document 6**.

Q7. Schématiser l'édifice moléculaire obtenu dans un puits contenant du rituximab.

Un témoin positif et un témoin négatif sont nécessaires à la validation de la technique ELISA 1.

Q8. Pour chaque témoin, indiquer sa composition qualitative, expliquer son rôle et préciser le résultat attendu.

Le **document 7** compare la technique d'ELISA 1 présentée dans le **document 6**, avec deux autres techniques ELISA existantes (ELISA 2 et ELISA 3).

Q9. Comparer les trois techniques ELISA et justifier l'utilisation préférentielle de la technique ELISA 3.

Le **document 8** présente un exemple de suivi pharmacocinétique du rituximab par la technique ELISA 3.

Q10. Déterminer graphiquement C_{max} et $T_{1/2}$ après la sixième injection.

4 Toxicologie du principe actif.

Le rituximab peut, dans certains cas, favoriser la réactivation du virus de l'hépatite B. Le **document 9** présente ce virus.

Q11. Dédurre les trois caractéristiques principales du virus de l'hépatite B permettant son positionnement taxonomique.

Lors des phases de test sur volontaires sains, un suivi de la virémie (taux de virus dans le sang) est réalisé par PCR. Le **document 10** présente un extrait modifié de la fiche technique utilisée.

Q12. Indiquer le rôle des réactifs (1) à (5) de la colonne « *Component* » du tableau. Calculer les volumes V_1 , V_4 et V_5 pour préparer 100 μL de mélange réactionnel.

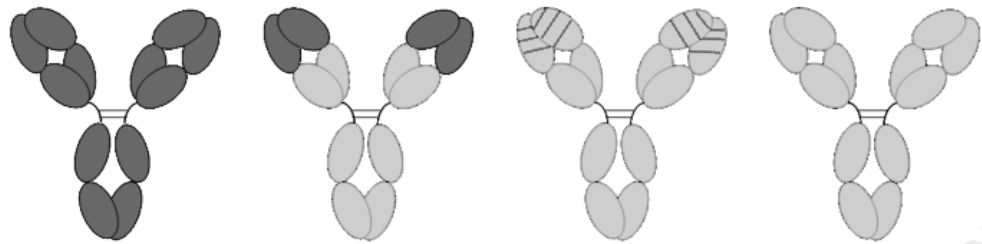
Dans un but économique et écologique, le laboratoire souhaite effectuer plusieurs PCR successives en utilisant les mêmes tubes.

Pour empêcher les contaminations croisées entre les amplicons résiduels de la PCR précédente avec la matrice à amplifier de la PCR à réaliser, il utilise le réactif AmpErase® UNG.

Q13. Présenter l'origine et la nature du réactif AmpErase® UNG.

Expliquer comment ce réactif limite les contaminations croisées au cours des PCR successives.

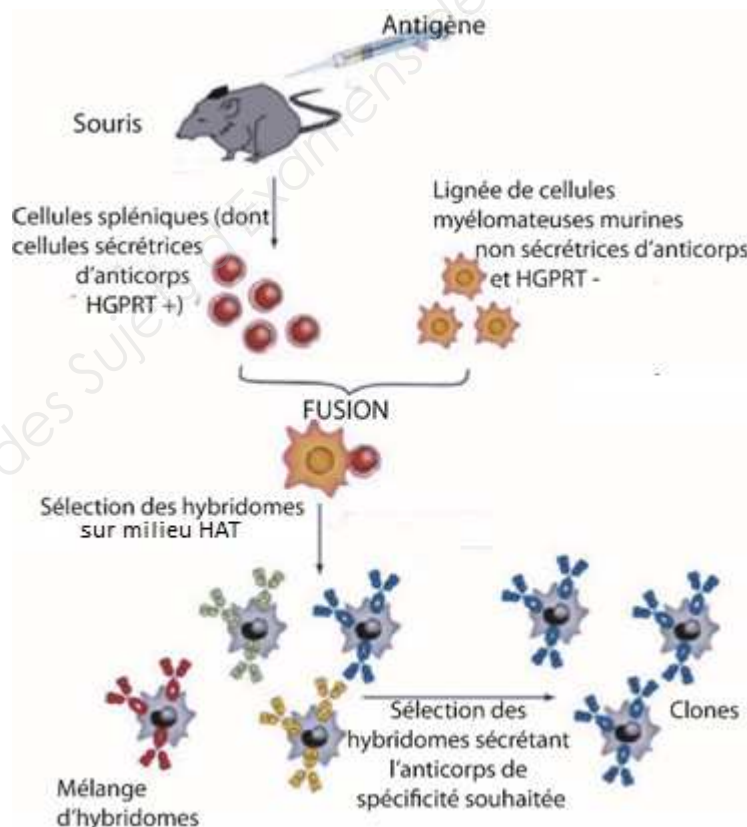
Document 1: classification des anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs) par types : murins, chimériques, humanisés, humains.



Type of mAb	Murine	Chimeric	Humanized	Human
Exemples	Ibritumomab tiuxetan (CD20) : IgG1 κ Tositumomab-I ¹³¹ (CD20) : IgG2a λ	Cetuximab (EGFR) : IgG1 κ Rituximab (CD20) : IgG1 κ	Trastuzumab (ERB2) : IgG1 κ Bevacizumab (VEGF) : IgG1	Panitumumab (EGFR) : IgG2

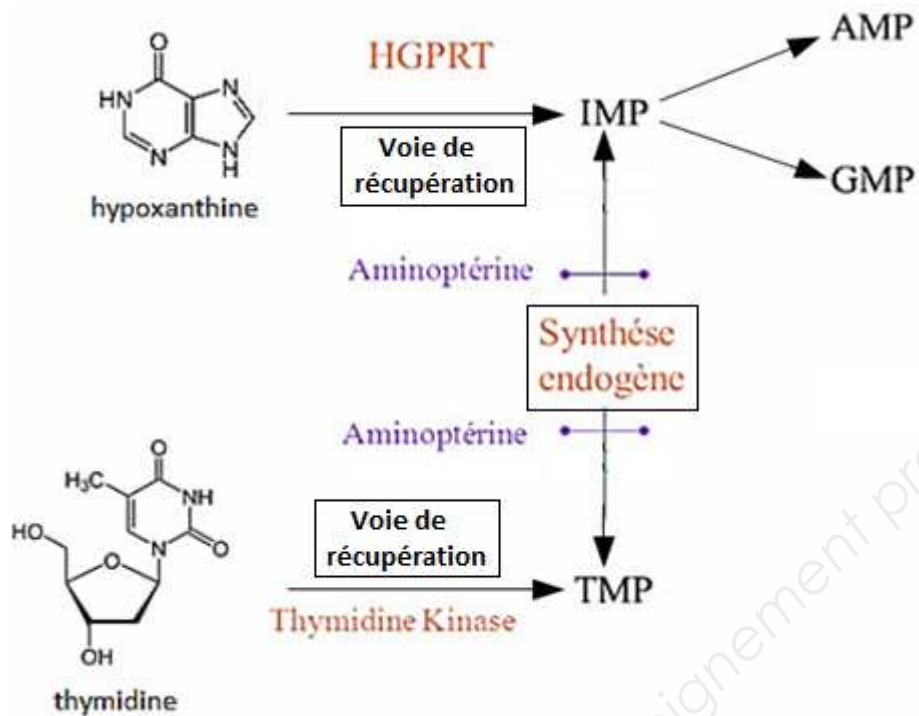
Source : Kohzoh Imai & Akinori Takaoka Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer Nature Reviews Cancer 6, 714-727 (September 2006)

Document 2: principe général de la technique d'obtention des anticorps monoclonaux.

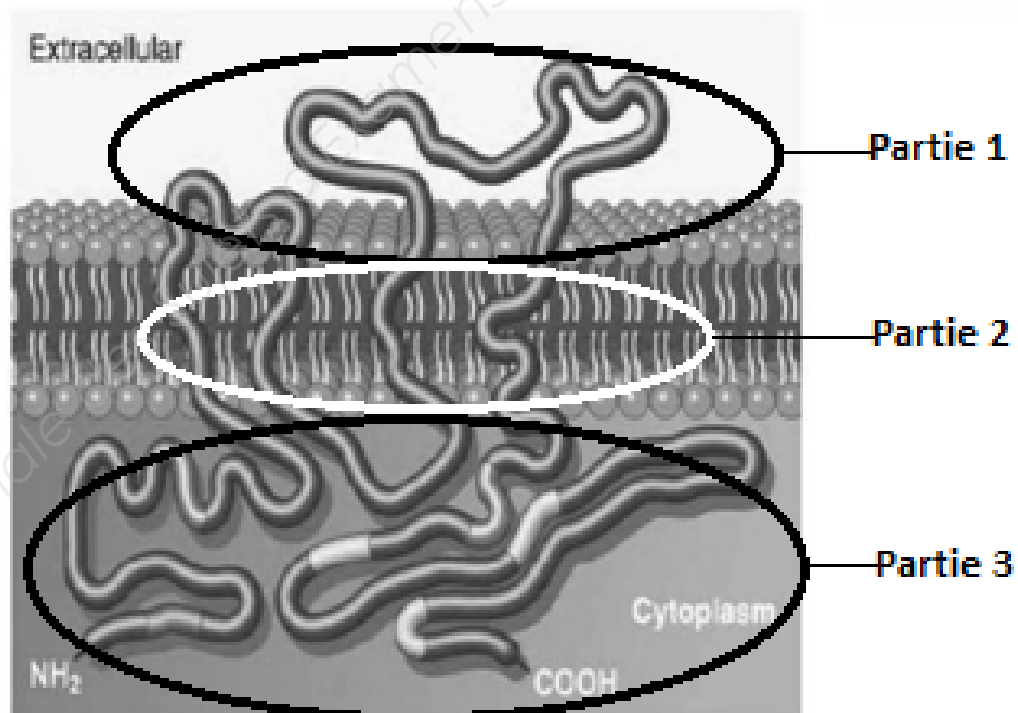


Source : CARTRON G. In Histoire de la thérapie ciblée en cancérologie (2007) [CD-ROM]. John Libbey Eurotext. Livre (152 p)

Document 3 : schéma simplifié des voies de biosynthèse des nucléotides.

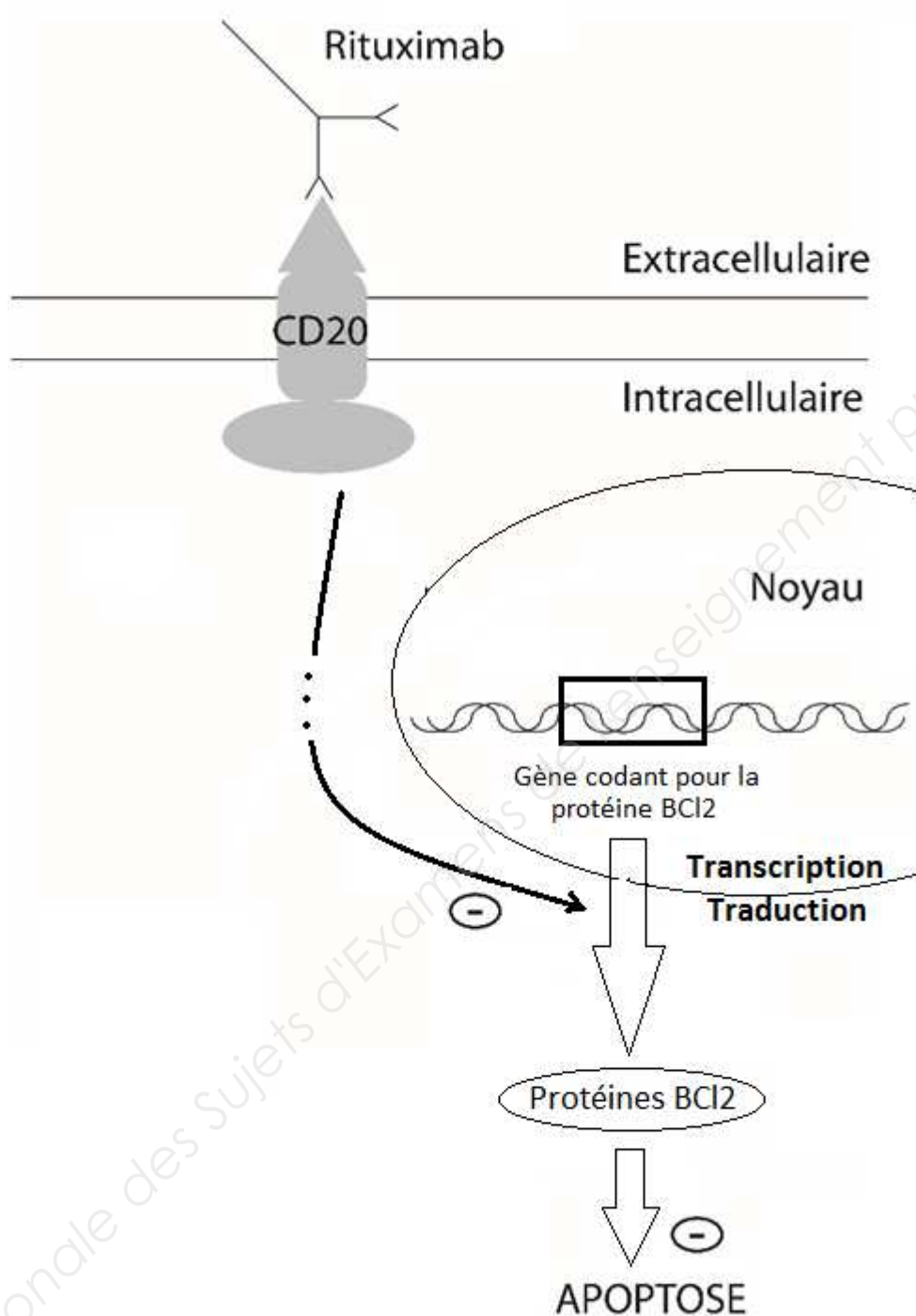


Document 4 : schéma de la protéine CD20.



Source : thèse d'exercice de pharmacie, Emmanuelle SURGA, université Henri Poincaré, 2011
www.docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2011_SURGA_EMMANUELLE.pdf

Document 5 : schéma simplifié d'une des voies de transduction du signal activée par le rituximab.



Document 6 : extrait d'un protocole de dosage du rituximab par une technique ELISA (ELISA1).

At your disposal : serum with rituximab at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and serum with no rituximab

1. Coating : add CD20 peptides in each well. Incubate 2 h at room temperature (RT)
2. Wash 3 times with PBS Tween
3. Saturation : add BSA in PBS buffer and incubate 2 h at RT
4. Wash 3 times with PBS Tween
5. Add Standards rituximab at known concentration or samples and incubate 1 h at RT
6. Wash 3 times with PBS Tween
7. Add peroxydase-conjugated goat anti-Fc fragment from human IgG and incubate 1 h at RT
8. Wash 3 times with PBS Tween
9. Add OPD substrat
10. Add Stop solution after 5 minutes
11. Measure absorbance at 450 nm

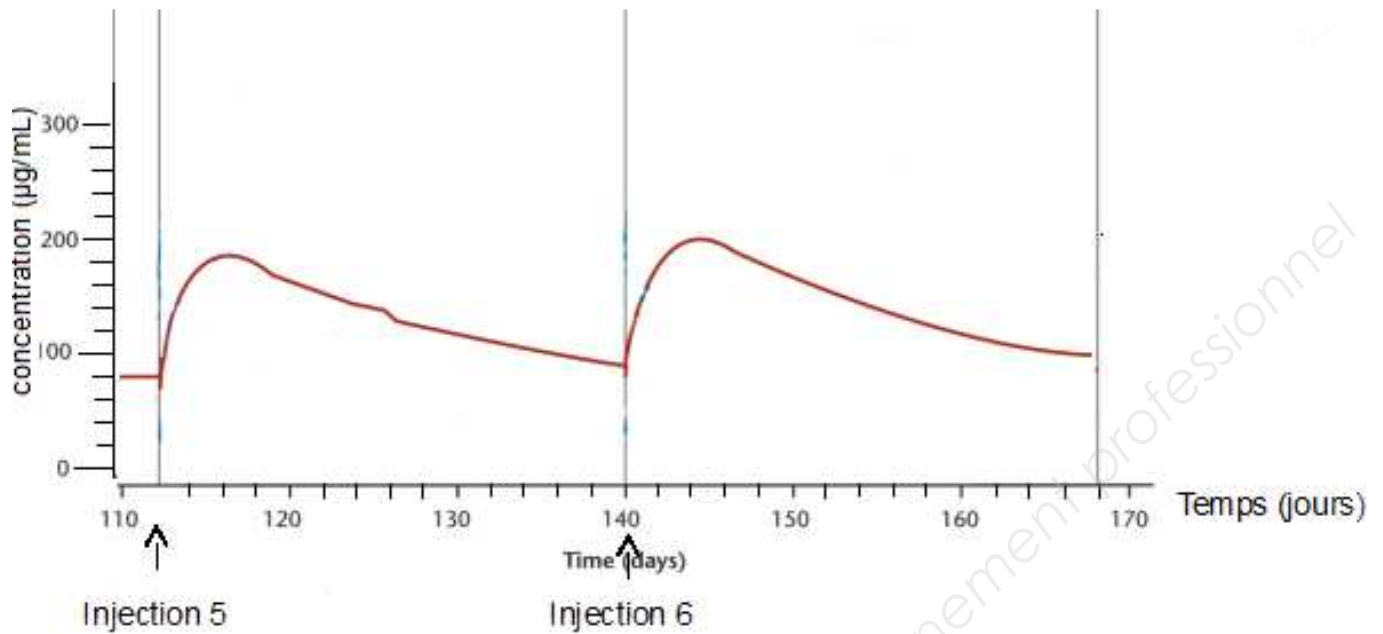
*Adapté de Blasco, et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum
Journal of Immunological Methods, Volume 325, Issue 1, Pages 127-139*

Document 7 : Comparaison de 3 techniques ELISA utilisées pour doser le rituximab dans le sang.

	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3
Limite de détection	$50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
Forme de rituximab dosée	Libre uniquement	Libre et lié	Libre et lié
Reproductibilité	Élevée	Moyenne	Élevée

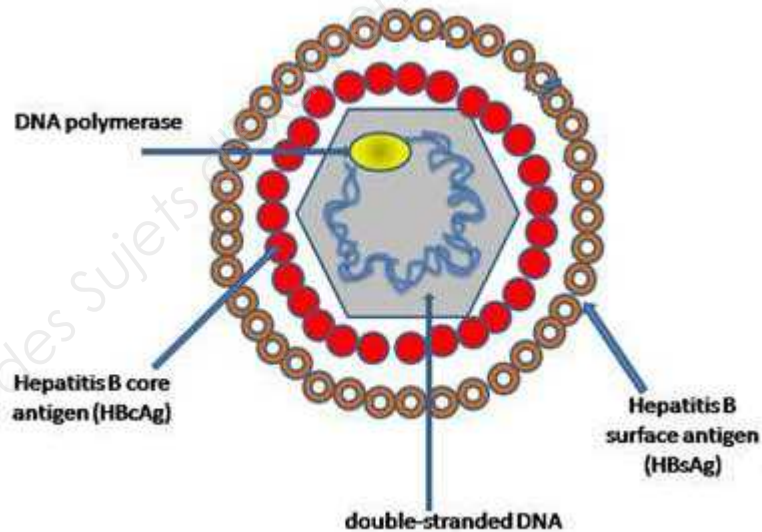
Adapté de Cartron, et al. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: Thought for the best use? Critical Reviews in Oncology/Hematology 62 (2007) 43–52 et « Rituximab ELISA (mAb-based) » distribué par Eagle Biosciences, Inc.

Document 8 : pharmacocinétique du rituximab : mesurage par la technique ELISA 3.



Adapté de Assouline S, et al, Pharmacokinetics and safety of subcutaneous rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukemia. Br J Clin Pharmacol 2015; 80: 1001–09.

Document 9 : représentation schématique du virion de l'hépatite B.



Adapté de <https://futura-sciences.com>

Document 10 : extrait adapté de la fiche technique du réactif AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG).

Product description:

AmpErase® Uracil N-Glycosylase (UNG) is a 26-kDa ultrapure, recombinant enzyme encoded by the *E.coli uracil N-glycosylase* gene, designed to degrade PCR products from previous amplifications without degrading native nucleic acid templates.

AmpErase® UNG has activity below 55°C.

Prior PCR amplicons are degraded because in the reaction mix, dTTP are substituted by dUTP.

The annealing temperature should be $\geq 55^{\circ}\text{C}$ to avoid degradation of newly synthesized dU-containing products by residual AmpErase® UNG activity.

AmpErase® UNG is denatured during the PCR reaction.

Exemple de mix PCR utilisant le réactif AmpErase® :

N°	Component	Volume	Final Concentration
/	Autoclaved, distilled water	qsp 100 μL	/
1	10X PCR Buffer II	V_1	1X
2	10 mM dATP	2 μL	0,2 mM
	10 mM dCTP	2 μL	0,2 mM
	10 mM dGTP	2 μL	0,2 mM
	20 mM dUTP	2 μL	0,2 mM
3	25 mM MgCl_2	8 μL	2,0 mM
4	10 μM forward primer	V_4	0,2 μM
	10 μM reverse primer	V_4	0,2 μM
/	Template DNA	variable	$< 2 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$
5	AmpliTaq DNA polymerase (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	V_5	2,5 $\text{U}/100 \mu\text{L}$
/	AmpErase® UNG (1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	1 μL	1 $\text{U}/100 \mu\text{L}$