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 2016

_____

Durée : 3 heures
Coefficient : 3

_____

Matériels autorisés :

Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Circulaire n°99-186, 16/11/1999).

Dictionnaire anglais-français autorisé.

Documents à rendre et à agrafer avec la copie :

- Document n° 4 : à annoter ..... page 7/11
- Document n° 5B : à annoter ..... page 8/11
- Document n° 6 ..... page 9/11
- Document n° 7 (tableau de fluorimétrie) ..... page 9/11
- Document n° 10 ..... page 11/11

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

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 11 pages, numérotées de 1/11 à 11/11.

ÉTUDE D'UN MÉDICAMENT DESTINÉ AU TRAITEMENT DES AVC

L'actilyse® est un médicament utilisé dans le traitement des Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC) ischémiques aigus. Le **document n° 1** présente un extrait de la fiche de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament). Son principe actif est l'activateur du plasminogène ou tPA (noté aussi alteplase), qui a une activité thrombolytique.

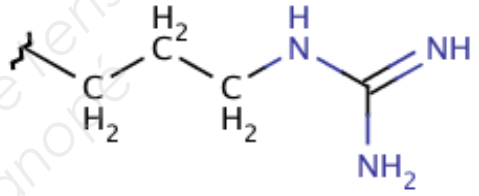
1 - Étude du principe actif tPA (ou alteplase) (27,5 points)

Le tPA est une sérine-protéase, glycoprotéine de PM 72000 Da. Il agit selon la cascade protéolytique présentée dans le **document n° 2**, en catalysant le clivage du plasminogène en plasmine, qui lui même permet de dégrader la fibrine du caillot. La plasmine favorise le clivage du tPA simple chaîne (sc-tPA) en tPA double chaîne (dc-tPA).

Le clivage de ce plasminogène en plasmine par le tPA se fait entre les acides aminés Arg 561 et Val 562.

1.1 - Réaction catalysée

1.1.1 - Écrire la formule semi-développée de la séquence R561-V562, en respectant l'orientation conventionnelle.

Acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Nom chimique (IUPAC) ou formule de la chaîne latérale
Arginine	Arg	R	
Valine	Val	V	Acide 2-amino-3-méthylbutanoïque

1.1.2 - À l'aide de la formule précédente, présenter l'équation de la réaction catalysée par le tPA.

1.1.3 - Dans la nomenclature IUPAC, l'enzyme tPA est notée 3.4.21.68. Indiquer la signification des deux premiers numéros du code numérique de l'enzyme.

1.2 - Structure du tPA

Le **document n° 3** présente la séquence du tPA et son organisation en cinq domaines.

L'un d'eux contient le site catalytique, dont la structure tertiaire est représentée dans le **document n° 4**.

1.2.1 - Définir un domaine protéique.

1.2.2 - Annoter le **document n° 4** (à rendre avec la copie) pour identifier les motifs structuraux secondaires.

1.2.3 - Nommer les interactions qui stabilisent ces structures secondaires et préciser les groupements impliqués.

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

1.3 - Les deux formes du tPA : étude par SDS-PAGE

Dans l'actilyse, le tPA se présente sous deux formes : l'une simple chaîne (sc-tPA) et l'autre double chaîne (dc-tPA), obtenue par coupure par la plasmine.

1.3.1 - Compte-tenu de la séquence du tPA présentée dans le **document n° 3**, expliquer les conséquences, en terme d'organisation moléculaire, du clivage du tPA.

Pour distinguer les deux formes sc-tPA et dc-tPA, une technique SDS-PAGE est proposée.

Le **document n° 5** rassemble la composition des tampons utilisés pour réaliser cette technique, ainsi que des exemples de résultats.

1.3.2 - Indiquer la signification du sigle SDS-PAGE.

1.3.3 - Lister, en respectant leur chronologie, les principales étapes de réalisation de cette technique.

1.3.4 - La composition des tampons utilisés pour réaliser la SDS-PAGE est donnée dans le **document n° 5A**.

1.3.4.1 - Expliquer le rôle du « sample buffer » en insistant sur l'action du SDS et du dithiothréitol (DTT).

1.3.4.2 - Préciser les rôles du glycérol, du bleu de bromophénol. Proposer une appellation courante du « sample buffer ».

1.3.5 - Le **document n° 5B** présente le schéma d'un exemple de résultats de SDS-PAGE sur un échantillon d'actilyse (médicament), ainsi que sur des témoins (tPA), après révélation du gel au bleu de Coomassie. Les échantillons 1, 2, 3, 5 et 6 ont été préparés en « Simple Buffer DTT ». L'échantillon 4 a été préparé en « Simple Buffer sans DTT ».

1.3.5.1 - Indiquer la composition du marqueur de taille (puits 1).

1.3.5.2 - Orienter le gel et justifier le sens de migration des protéines. Noter sur le **document 5B** le poids moléculaire de chaque constituant du marqueur de taille (piste 6).

1.3.5.3 - Analyser les résultats obtenus pour les puits 2, 3 et 4. Expliquer les différences de profil obtenu.

1.3.5.4 - Analyser les résultats obtenus pour l'échantillon d'actilyse reconstitué. Conclure sur la forme prédominante.

2 - Contrôle de la production de l'actilyse par mesure d'activité enzymatique (19,5 points)

La mesure d'activité enzymatique permet de contrôler la qualité de la production de tPA par des cellules CHO recombinantes.

Cette activité est déterminée par méthode cinétique avec un suivi par spectrofluorimétrie.

2.1 - Principe d'un spectrofluorimètre

Le **document n° 6** présente le schéma de fonctionnement d'un spectrofluorimètre.

2.1.1 - Compléter le **document n° 6** en indiquant les noms des composants A, B et C.

2.1.2 - Indiquer la signification de λ et λ' figurant sur ce schéma. Comparer ces grandeurs. Justifier la réponse.

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

2.2 - Étalonnage du spectrofluorimètre

Une solution étalon d'AMC (7-amino-4-coumarine) permet d'étalonner le spectrofluorimètre selon le protocole présenté dans le **document n° 7**.

2.2.1 - Indiquer le matériel nécessaire pour une préparation de la solution étalon fille d'AMC à 40 µmol.L^{-1}. Préciser les volumes choisis.

2.2.2 - Compléter le tableau de spectrofluorimétrie dans le **document n° 7**.

2.2.3 - Établir la relation entre la concentration en AMC (en µmol.L^{-1}) et **l'intensité de fluorescence I_F** (en UF), en précisant les paramètres de la régression linéaire.

2.3 - Détermination de l'activité spécifique du tPA

La fiche technique de détermination de l'activité enzymatique du tPA est donnée dans le **document n° 8**.

2.3.1 - Expliquer le principe du test présenté dans le **document n° 8**.

2.3.2 - Préparation de l'échantillon et conditions de mesure :

2.3.2.1 - Lors de la préparation de l'échantillon, seul le surnageant est récupéré après centrifugation. Proposer une justification à cette étape.
Préciser pourquoi ces opérations sont réalisées à 4 °C.

2.3.2.2 - Le tampon de dosage est fourni à 2X. Expliquer le « 2X ».

2.3.2.3 - Rappeler les conditions de mesure d'une activité enzymatique.

2.3.3 - Proposer une composition pour un tube permettant de faire le zéro du spectrofluorimètre.

2.3.4 - Une mesure est réalisée sur un surnageant de culture.

2.3.4.1 - Expliquer comment on s'assure que la mesure est bien réalisée en période initiale.

2.3.4.2 - Rappeler la définition de la concentration d'activité catalytique (b).

2.3.4.3 - Dans les conditions de la mesure, pour le tPA, le calcul de b s'exprime par la formule :

$$b = k \cdot \frac{\Delta IF}{\Delta t}.$$

IF = Intensité de fluorescence (UF)

Montrer que k = 55,56.

Données :

- b en nkat.L^{-1} ;
- $\frac{\Delta IF}{\Delta t}$ en UF.min^{-1}
- On considérera une stœchiométrie 1/1 pour la réaction catalysée par le tPA.
- 1 katal est la quantité d'enzyme qui permet de transformer 1 mole de substrat par seconde.

2.3.4.4 - Le surnageant testé a donné $\frac{\Delta IF}{\Delta t}$ = 9 UF.min^{-1}, calculer sa concentration d'activité catalytique b.

2.3.4.5 - La concentration protéique dans le surnageant est de 20 mg.L^{-1}. Après avoir défini l'activité spécifique z_{sp}, calculer l'activité spécifique du surnageant en tPA.

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

2.3.5 - Le surnageant subit plusieurs étapes de purification. Une dernière mesure est réalisée sur la fraction purifiée. On obtient une activité spécifique de 250 µkat.g^{-1}. Comparer les deux activités spécifiques et conclure sur l'enrichissement en fin de purification.

3 - Conséquence de l'AVC ischémique : aspect biochimique (13 points)

Les AVC ischémiques sont dus à l'obstruction d'une artère. Les cellules cérébrales ne sont alors plus irriguées et ne reçoivent plus suffisamment de dioxygène et de glucose, ce qui peut être à l'origine de lésions plus ou moins étendues. Ces lésions entraînent le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et de certaines voies métaboliques.

3.1 - Chaîne respiratoire

Le **document n° 9** présente un schéma fonctionnel d'une chaîne respiratoire eucaryote.

3.1.1 - Indiquer (sur la copie) la signification des lettres A, B, C, D et E.

3.1.2 - Nommer le type de réactions mises en jeu au niveau des complexes I, II, III et IV.

3.1.3 - Expliquer le passage des protons au niveau des complexes I, III et IV.

3.1.4 - Le dernier élément du **document n° 9**, présente un complexe moléculaire « F0F1 ». Rappeler le nom de ce complexe et présenter le rôle respectif des parties F0 et F1 de ce complexe.

3.1.5 - Préciser les conséquences d'un défaut d'approvisionnement en O_2.

3.2 - Métabolisme anaérobie

Suite à un AVC ischémique, un métabolisme anaérobie peut se mettre en place. Le **document n° 10** présente deux voies métaboliques.

3.2.1 - Indiquer le nom des voies 1 et 2.

3.2.2 - Renseigner les repères de F à K du **document 10** (à rendre avec la copie).

3.2.3 - Conclure sur l'intérêt de cette voie en cas d'AVC ischémique.

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

DOCUMENT N° 1 : EXTRAIT DE LA FICHE ANSM DE L'ACTILYSE

1 - DÉNOMINATION DU MÉDICAMENT

ACTILYSE, poudre et solvant pour solution injectable et perfusion.

2 - COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Un flacon de poudre contient 10 (ou 20 ou 30) mg d'altéplase.

L'altéplase est produite par la technique de l'ADN recombinant dans une lignée cellulaire d'ovaire de hamster chinois (CHO).

L'activité spécifique de la substance de référence interne est de 580 000 Unités Alteplase/mg.

3 - FORME PHARMACEUTIQUE

Poudre et solvant pour solution injectable et perfusion.

La poudre se présente sous la forme d'un gâteau de lyophilisation blanc à jaune pâle.

4 - DONNÉES CLINIQUES

4.1 - Indications thérapeutiques

Utilisation pour le traitement fibrinolytique de l'accident vasculaire cérébral ischémique à la phase aiguë.

4.2 - Posologie et mode d'administration

Avant l'administration et dans des conditions rigoureuses d'asepsie, dissoudre l'altéplase (10, 20 ou 30 mg) dans un volume d'eau pour préparations injectables, afin d'obtenir une concentration finale soit de 1 mg d'altéplase/mL, soit de 2 mg d'altéplase/mL.
La solution reconstituée doit alors être administrée par voie intraveineuse.

5 - DONNÉES PHARMACEUTIQUES

Liste des excipients

Poudre pour solution :

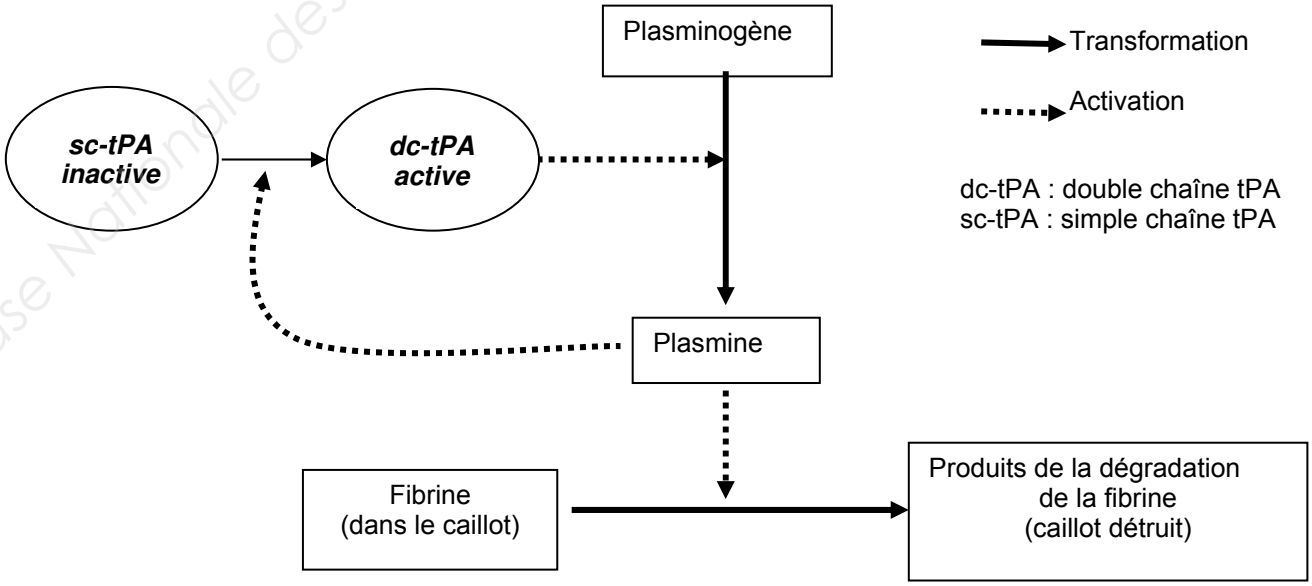
Arginine.
Acide phosphorique dilué.
Polysorbate 80.

Solvant :

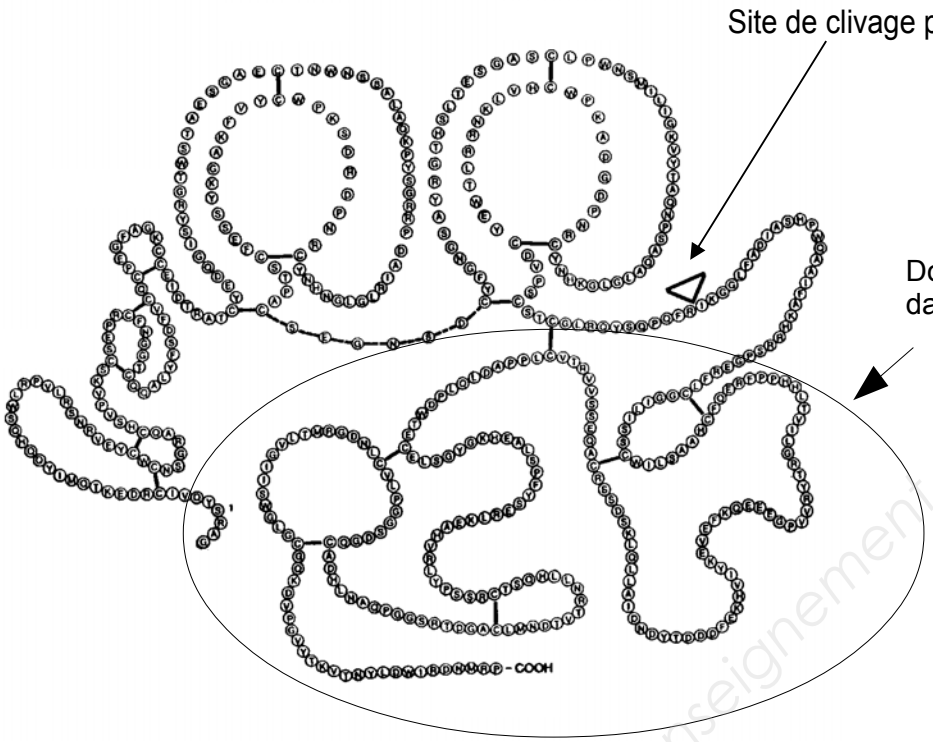
Eau pour préparations injectables.
Le pH de la solution reconstituée est 7,3 ± 0,5.

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

DOCUMENT N° 2 : CASCADE PROTÉOLYTIQUE



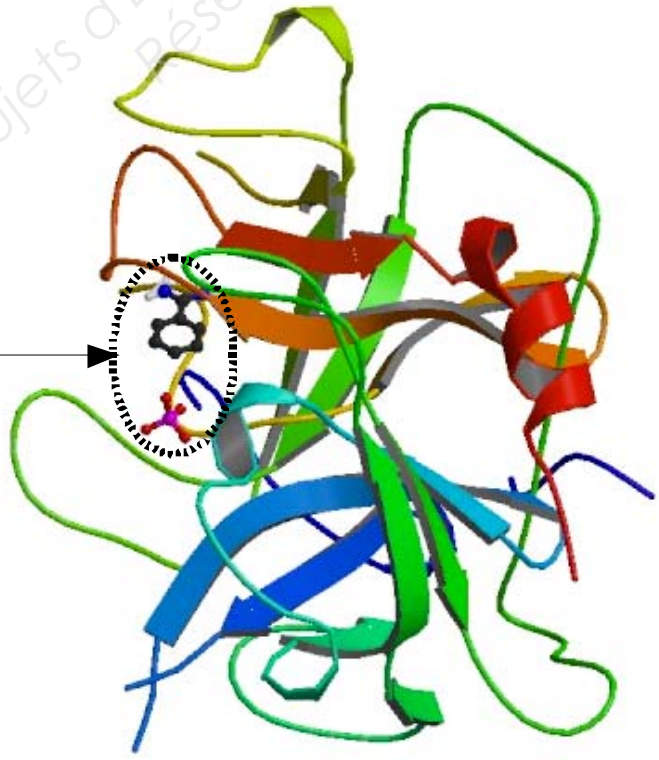
DOCUMENT N° 3 : STRUCTURE DU tPA SOUS SA FORME SIMPLE CHAÎNE



Ponts disulfure

DOCUMENT N° 4 : À RENDRE AVEC LA COPIE

Domaine catalytique du tPA.



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

DOCUMENT N° 5 : ÉTUDE DU tPA PAR SDS-PAGE
À RENDRE AVEC LA COPIE

5A : Composition des tampons

5 x Sample Buffer - DTT		*5 x Sample Buffer sans DTT*	
10 % w/v	SDS	10 % w/v	SDS
10 mmol.L^{-1}	Dithiothreitol (DTT), or beta-mercaptoethanol		
20 % v/v	Glycerol	20 % v/v	Glycerol
0,2 mol.L^{-1}	Tris-HCl, pH 6,8	0,2 mol.L^{-1}	Tris-HCl, pH 6,8
0,05 % w/v	Bromophenolblue	0,05 % w/v	Bromophenolblue

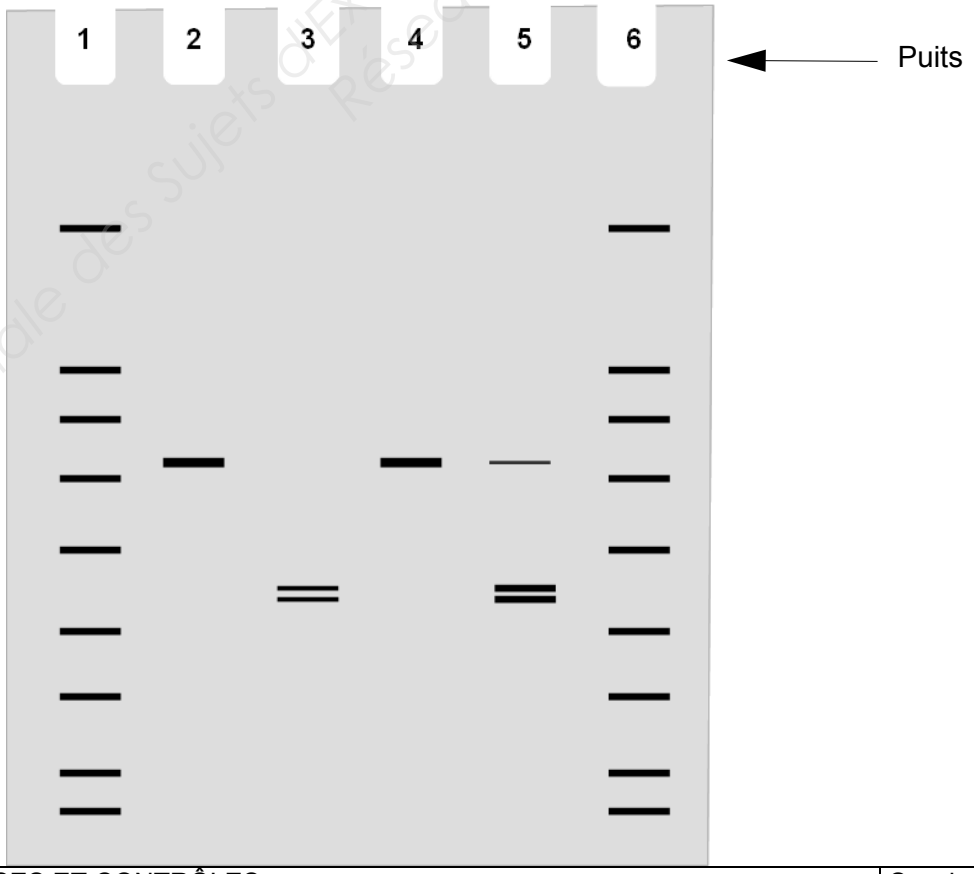
Should add up to 8M urea for really hydrophobic proteins

1 x Running Buffer:

25 mmol.L^{-1}	Tris-HCl
200 mmol.L^{-1}	Glycine
0,1 % (w/v)	SDS

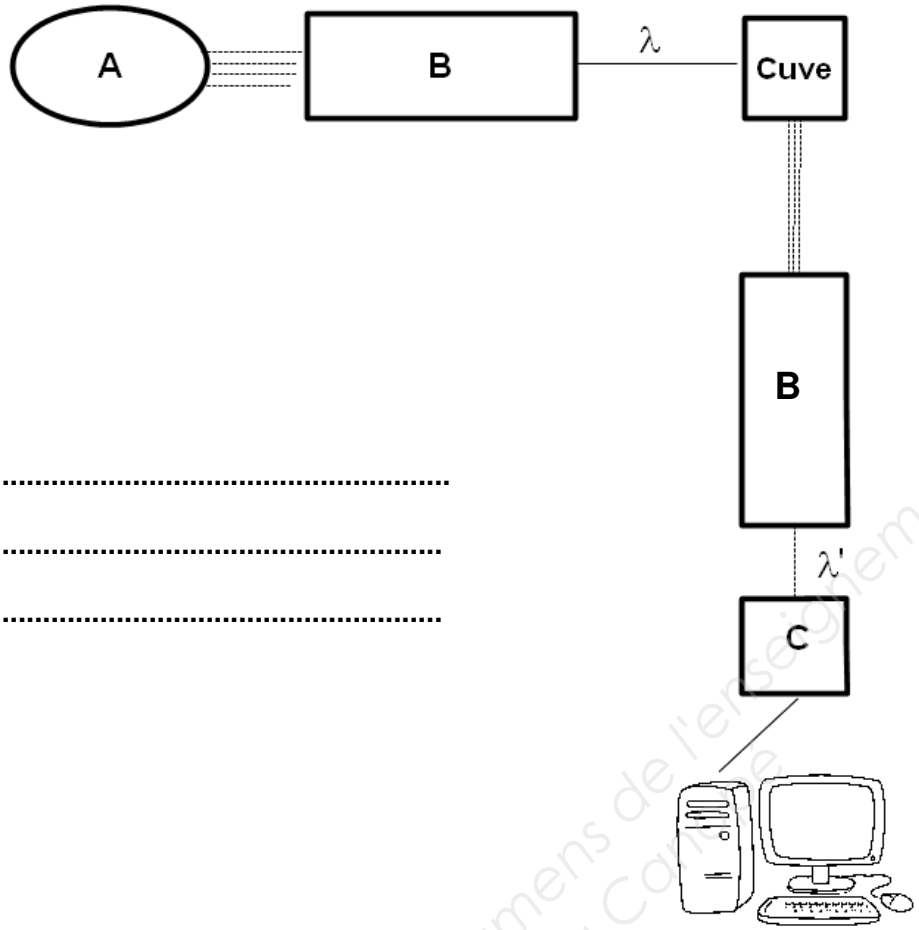
5B : Exemple de résultats :

Puits 1 et 6	Marqueur de taille (200 ; 116 ; 97,4 ; 66 ; 45 ; 31 ; 21,5 ; 14,4 ; 6,5 en kDa)
Puits 2	sc-tPA purifié
Puits 3	dc-tPA purifié
Puits 4	dc-tPA purifié, préparé en « Sample Buffer sans DTT »
Puits 5	Échantillon d'actilyse reconstitué



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

DOCUMENT N° 6 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN SPECTROFLUORIMÈTRE
À RENDRE AVEC LA COPIE



A : .....

B : .....

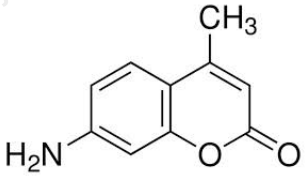
C : .....

DOCUMENT N° 7 : ÉTALONNAGE DU SPECTROFLUORIMÈTRE
À RENDRE AVEC LA COPIE

Protocole d'étalonnage

FLUOROCHROME :

AMC ou
7-amino-4-coumarine



L'AMC émet une lumière bleue vive, qui peut être enregistrée avec les réglages suivants :
excitation à 354 nm
émission à 442 nm

- à partir de l'étalon AMC à 4 mmol.L^{-1}, préparer une solution étalon fille à 40 µmol.L^{-1} avec le tampon 1X utilisé pour la détermination d'activité enzymatique, puis réaliser la gamme présentée ci-dessous.
- Mesurer l'intensité de flurorescence pour le couple Ex/Em = 354/442 nm, en UF (unité arbitraire de fluorescence)

Tubes	**Blanc**	**1**	**2**	**3**	**4**
Volume de solution étalon fille à 40 µmol.L^{-1} (en µL)					
Tampon 1X qsp 200 µL					
[AMC] en µmol.L^{-1}	0	5	10	15	20
I_F = Intensité de fluorescence (UF)	0	2,9	6,0	9,3	11,8

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

DOCUMENT N° 8 : DÉTERMINATION D'ACTIVITÉ

Fiche technique ANASPEC / SensoLyte® AMC tPA Activity Assay Kit *Fluorimetric

Principles

This kit contains a fluorogenic substrate with a high reactivity and low background. Upon protease cleavage, this substrate generates the AMC fluorophore emitting bright blue fluorescence. Increase in AMC fluorescence is proportional to tPA activity.

Kit components :

- TPA substrate solution, in 2X Assay Buffer, 40 µmol.L^{-1}.
- 2X Assay Buffer

Protocol

1 - Sample Preparation and Storage : Centrifuge cell culture media at 3000 x g for 15 minutes at 4 °C to remove debris. Collect supernatants. Samples can be store at < - 80 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

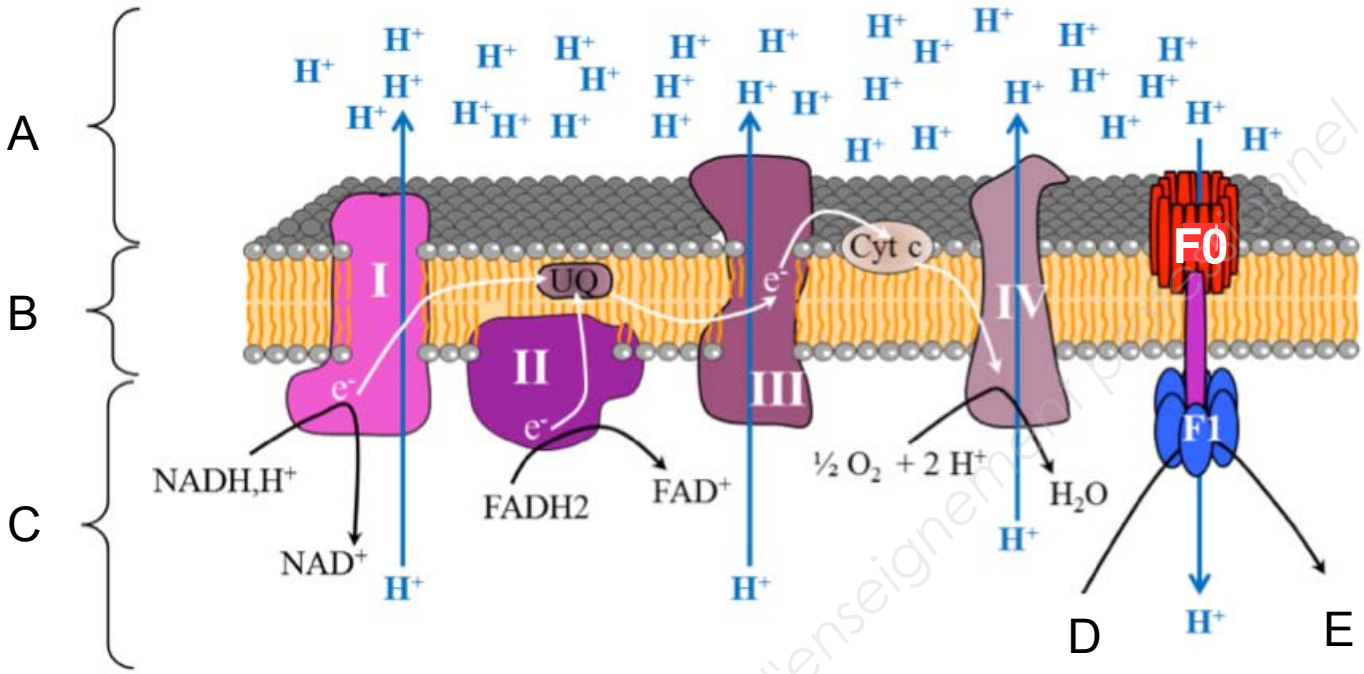
2. Set up and run enzymatic reaction :

- in each well
  - add 50 µL of tPA containing sample
  - add 50 µL of tPA substrate solution (first equilabrated to the experiment temperature)
- mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec
- immediately start mesuring fluorescence intensity continuously
- determine the range during the reaction is linear
- obtain the initial reaction velocity by determining the slope of the linear portion of the data plot. The increase of intensity of fluorescence (I_F) is measured in UF.min^{-1}.

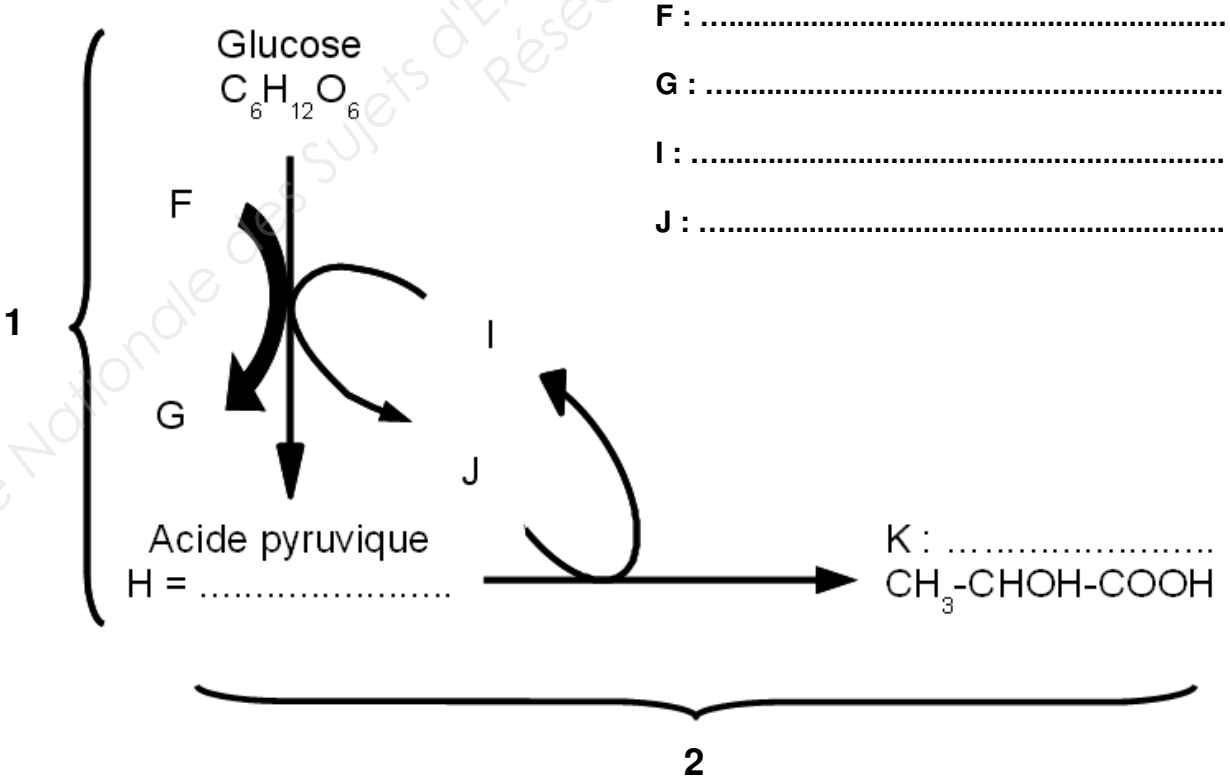
Any temperature from room temperature to 37 °C may be used, as long as the incubations are performed at the same temperature.

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

DOCUMENT N° 9 : SCHÉMA D'UNE CHAÎNE RESPIRATOIRE EUCARYOTE, ASSOCIÉE AU COMPLEXE F0F1



DOCUMENT N° 10 : VOIE MÉTABOLIQUE APRÈS AVC ISCHÉMIQUE À RENDRE AVEC LA COPIE



F : .....

G : .....

I : .....

J : .....

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

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.