

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOANALYSES ET CONTRÔLES

ÉPREUVE E3 – UNITÉ U31

BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE

SESSION 2020

Durée : 3 heures

Coefficient : 3

Matériel autorisé :

- L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
- L'usage de la calculatrice sans mémoire « type collègue » est autorisé.
- Dictionnaire anglais-français autorisé.

Tout autre matériel est interdit.

Capacités évaluées :

Mobilisation des connaissances de biochimie et technologies d'analyse dans le cadre de situations professionnelles	5 points
Qualités d'analyse	5 points
Aptitude à la réflexion et au raisonnement scientifique	5 points
Qualités de synthèse	4 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition	1 point

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.

L'asparaginase : une enzyme aux propriétés anticancéreuses

Le chiffre d'affaires du marché mondial du médicament a été évalué à 913 milliards de dollars pour l'année 2015 par les entreprises du médicament (LEEM). Près du quart de ce chiffre d'affaires provient de principes actifs issus d'organismes vivants (plantes, moisissures, bactéries).

La recherche de molécules naturelles à visée thérapeutique (bioprospection) connaît un véritable essor. Les laboratoires pharmaceutiques extraient les principes actifs, les purifient et les caractérisent.

De nombreuses molécules et macromolécules anticancéreuses naturelles, aux cibles d'action variées sur les métabolismes glucidique et protidique, ont été ainsi découvertes chez les bactéries : l'**asparaginase** en est un exemple.

1- Le métabolisme des cellules cancéreuses, une cible pour les traitements chimiothérapeutiques

La multiplication active des cellules cancéreuses se traduit par une consommation d'énergie élevée et une importante synthèse protéique.

1.1. Le métabolisme glucidique

Le **document 1** présente les voies métaboliques qui peuvent être dérégulées dans les cellules cancéreuses, ainsi que les enzymes cibles d'agents thérapeutiques.

Les cellules cancéreuses adoptent un métabolisme anaérobie plus important que les cellules saines, même en présence de dioxygène (effet Warburg).

- Q1.** Identifier les voies de ❶ à ❹.
Repérer les voies métaboliques privilégiées dans une cellule cancéreuse. En déduire la raison pour laquelle les cellules cancéreuses consomment davantage de glucose que les cellules non cancéreuses.
- Q2.** Discuter la pertinence d'utiliser comme agent anticancéreux le 2-désoxy-D-glucose, un analogue structural du glucose qui inhibe la voie ❶.
- Q3.** Expliquer l'intérêt d'inhiber la lactate déshydrogénase par des agents thérapeutiques anticancéreux.

À l'heure actuelle, ces agents ciblant le métabolisme glucidique induisent des effets secondaires toxiques pour les patients car ils ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses. Les effets d'autres agents anti-cancéreux sur le métabolisme protidique sont donc étudiés.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2020
U31 - Biochimie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3BT	Page : 2/13

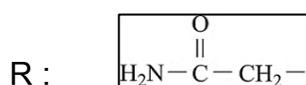
1.2. Le métabolisme protidique comme alternative

Certaines cellules cancéreuses sont incapables de synthétiser de manière endogène leur propre asparagine.

Dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse, on vise à priver les cellules d'asparagine exogène en utilisant une asparagine amidohydrolase appelée asparaginase (EC 3.5.1.1). Son action est présentée dans le **document 1**.

Q4. Établir l'équation bilan de la réaction de transformation de l'asparagine catalysée par l'asparaginase en utilisant les formules semi-développées.

Donnée : formule de la chaîne latérale de l'asparagine :



Q5. Établir la conséquence d'une privation en asparagine exogène sur le métabolisme protidique des cellules saines d'une part et des cellules cancéreuses d'autre part. En déduire l'intérêt d'utiliser l'asparaginase comme principe actif d'un traitement chimiothérapeutique.

2- Une procédure de purification adaptée aux *Bacillus* producteurs d'asparaginase

Actuellement, la production d'asparaginase commerciale utilise des souches d'*Escherichia coli* et d'*Erwinia chrysanthemi*. Cependant, les médicaments conçus à partir de ces deux espèces sont hautement immunogènes. La réponse immunitaire peut neutraliser les effets thérapeutiques chez certains patients qui développent alors des résistances à ce traitement.

C'est pourquoi de nombreux laboratoires recherchent de nouvelles sources d'asparaginase.

Les micro-organismes GRAS (*Generally Recognized As Safe*, équivalent pour la FDA étatsunienne du groupe de danger 1), tels que certaines espèces du genre *Bacillus*, sont particulièrement étudiés. Différentes procédures sont mises en œuvre pour obtenir l'enzyme la plus pure et la plus efficace possible afin de l'inclure, en tant que principe actif, dans un médicament à visée anticancéreuse.

2.1 Un mode d'obtention dépendant de la localisation de l'asparaginase produite

L'asparaginase est récupérée de façon différente à partir de deux souches de *Bacillus* :

- *Bacillus licheniformis* produit une asparaginase extracellulaire, extraite selon le protocole n° 1 ;
- *Bacillus* PG-03 produit une asparaginase intracellulaire, extraite selon le protocole n° 2.

Les deux protocoles d'obtention de l'enzyme sont décrits dans le **document 2**.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2020
U31 - Biochimie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3BT	Page : 3/13

- Q6.** Présenter les étapes des 2 protocoles sous forme d'un logigramme.
Repérer, à l'issue de chaque protocole, la fraction dans laquelle se trouve l'enzyme.

L'asparaginase présente dans les extraits enzymatiques obtenus à partir de la culture de *B. licheniformis* d'une part et de *Bacillus* PG-03 d'autre part, est purifiée selon la démarche présentée dans le **document 3**.

2.2 La purification de l'asparaginase extraite de *Bacillus* PG-03

La première étape de cette purification est une chromatographie d'échange d'ions. On utilise la DEAE-Sepharose® qui est une résine échangeuse d'anions.

Le chromatogramme obtenu à l'issue de cette chromatographie est présenté dans le **document 4**.

- Q7.** Exposer le principe de la chromatographie d'échange d'anions.
Expliquer l'intérêt d'un mode d'élution par gradient.
- Q8.** Indiquer l'information apportée par la mesure de l'absorbance à 280 nm sur chaque fraction.
Justifier les fractions à conserver dans le cadre de cette purification.

Les fractions choisies sont mélangées et constituent un « *pool* » (ensemble des fractions d'intérêt). Ce *pool* est ensuite soumis à une dialyse, puis à une ultrafiltration.

- Q9.** Préciser le rôle de chacune de ces 2 étapes.

2.3 La purification de l'asparaginase extraite de *B. licheniformis*

Cette procédure de purification fait appel notamment à une étape supplémentaire de chromatographie par exclusion moléculaire.

- Q10.** Argumenter le choix du domaine de fractionnement du gel d'exclusion Sephadex® G100 pour la purification de l'asparaginase.

Données :

Masse moléculaire moyenne des asparaginases : 135 kDa.

Domaine de fractionnement du gel d'exclusion Sephadex® G-100 : 4 – 150 kDa.

Afin de contrôler la qualité de la procédure de purification, les *pools* obtenus au cours des différentes étapes sont analysés par SDS-PAGE. Des éléments du protocole et les résultats sont présentés dans le **document 5**.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2020
U31 - Biochimie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3BT Page : 4/13

Q11. Expliquer le rôle de la lyophilisation préalable des *pools*.
Justifier, par le calcul, la nécessité de réaliser cette lyophilisation pour analyser le *pool* Sephadex® G-100.
Calculer le volume de tampon à utiliser pour remettre ce lyophilisat en solution.

Q12. Indiquer les rôles du SDS contenu dans la solution de Laemmli et préciser son effet sur les protéines multimériques.
Commenter les résultats obtenus et conclure sur la qualité de la purification.

La qualité de la procédure de purification de l'asparaginase de *B. licheniformis* est aussi évaluée :

- en déterminant l'activité enzymatique dans chaque fraction par le test présenté dans le **document 6** ;
- en calculant le rendement et l'enrichissement à partir des résultats présentés dans le **document 7**.

Q13. Expliquer les rôles respectifs des deux incubations présentes dans le protocole du test et indiquer, pour chacune d'elles, si le temps doit être mesuré précisément.
Expliquer le rôle de l'acide trichloroacétique.
En déduire le nom de la méthode de détermination de l'activité enzymatique.

Q14. Définir le rendement final et l'enrichissement final.
Calculer ces 2 grandeurs et commenter les valeurs obtenues.

2.4 Deux asparaginases purifiées aux performances inégales

Les paramètres cinétiques des asparaginases purifiées à partir des deux souches de *Bacillus* sont déterminés :

Souche	K_M (mmol·L ⁻¹)	V_{max} (μmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,014	0,067
<i>Bacillus</i> PG-03	23,8	0,024

Q15. Indiquer l'intérêt de chacun des deux paramètres cinétiques d'une enzyme.
Discuter le choix de l'asparaginase produite par *Bacillus licheniformis* en tenant compte de ses performances, ainsi que des contraintes temporelles et économiques liées aux procédures d'extraction et de purification.

La poursuite de l'étude se fait avec l'asparaginase extraite et purifiée à partir de *Bacillus licheniformis*.

3- L'asparaginase de *B. licheniformis* : caractérisation des propriétés physico-chimiques

L'asparaginase purifiée de *Bacillus licheniformis* est déposée sur une colonne d'exclusion Sephacryl® S-200 afin de déterminer précisément sa masse moléculaire. Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

- Q16.** Indiquer la composition de la solution de marqueurs de masses moléculaires et préciser son rôle.
Déterminer la masse moléculaire de l'asparaginase.
Comparer ce résultat avec celui obtenu sur le gel SDS-PAGE (*pool* Sephadex® G-100) et conclure sur la structure de l'asparaginase.

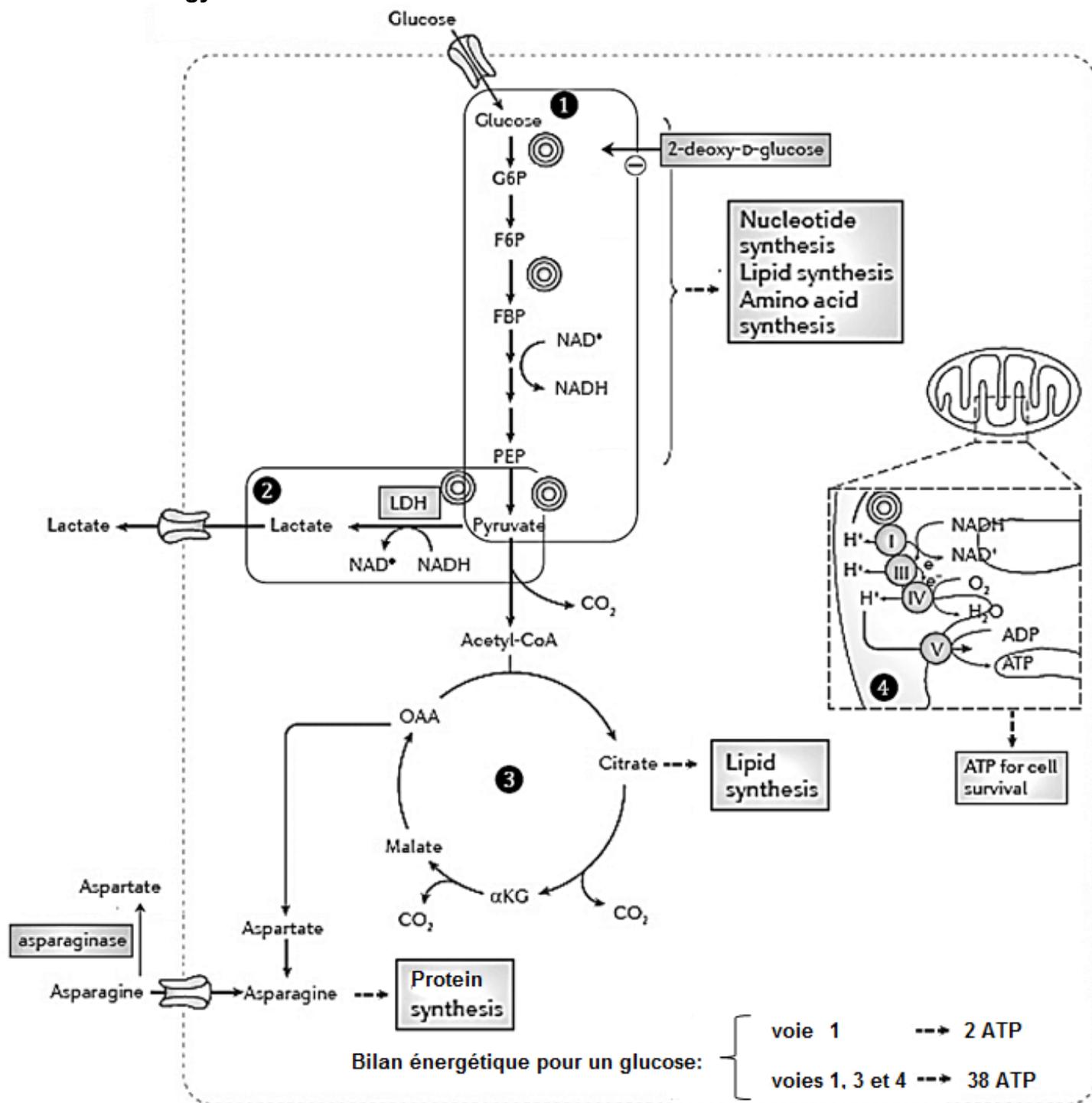
Dans le cadre d'un projet pharmaceutique, l'asparaginase recherchée doit être efficace, avoir une stabilité et un temps de demi-vie satisfaisants en conditions physiologiques.

Afin d'évaluer ces paramètres, l'influence de la température et du pH sur l'activité de l'asparaginase est étudiée.

Le **document 9** présente l'activité de l'asparaginase en fonction de la température et du pH.

- Q17.** Déterminer le pH optimum et la température optimale de l'asparaginase.
Discuter de son efficacité dans les conditions physiologiques.

DOCUMENT N°1 :Targeting metabolic enzymes as a strategy to block biosynthesis or induce energy stress.



The pathways of central carbon metabolism are presented. Some of the metabolic enzymes that are currently being considered as therapeutic targets for cancer are marked with target (shown as a circle in the figure ).

D'après Vander Heiden (2011)

DOCUMENT N°2 : Protocoles d'obtention de l'asparaginase.

Protocole n° 1 : Asparaginase extracellulaire de *Bacillus licheniformis*

La production d'asparaginase par *Bacillus licheniformis* est réalisée dans le milieu CzapekDox modifié (Na_2HPO_4 à $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 à $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; NaCl à $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; L-asparagine à $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; glycérol à $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à $0,005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les flasques contenant 50 mL de milieu sont inoculées avec l'inoculum bactérien (2% v/v) (DO de 2,0). L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 24 h. Le milieu de culture est ensuite filtré.

L'activité enzymatique est mesurée dans le filtrat.

D'après Mahajan et al. (2014)

Protocole n° 2 : Asparaginase intracellulaire de *Bacillus* PG-03

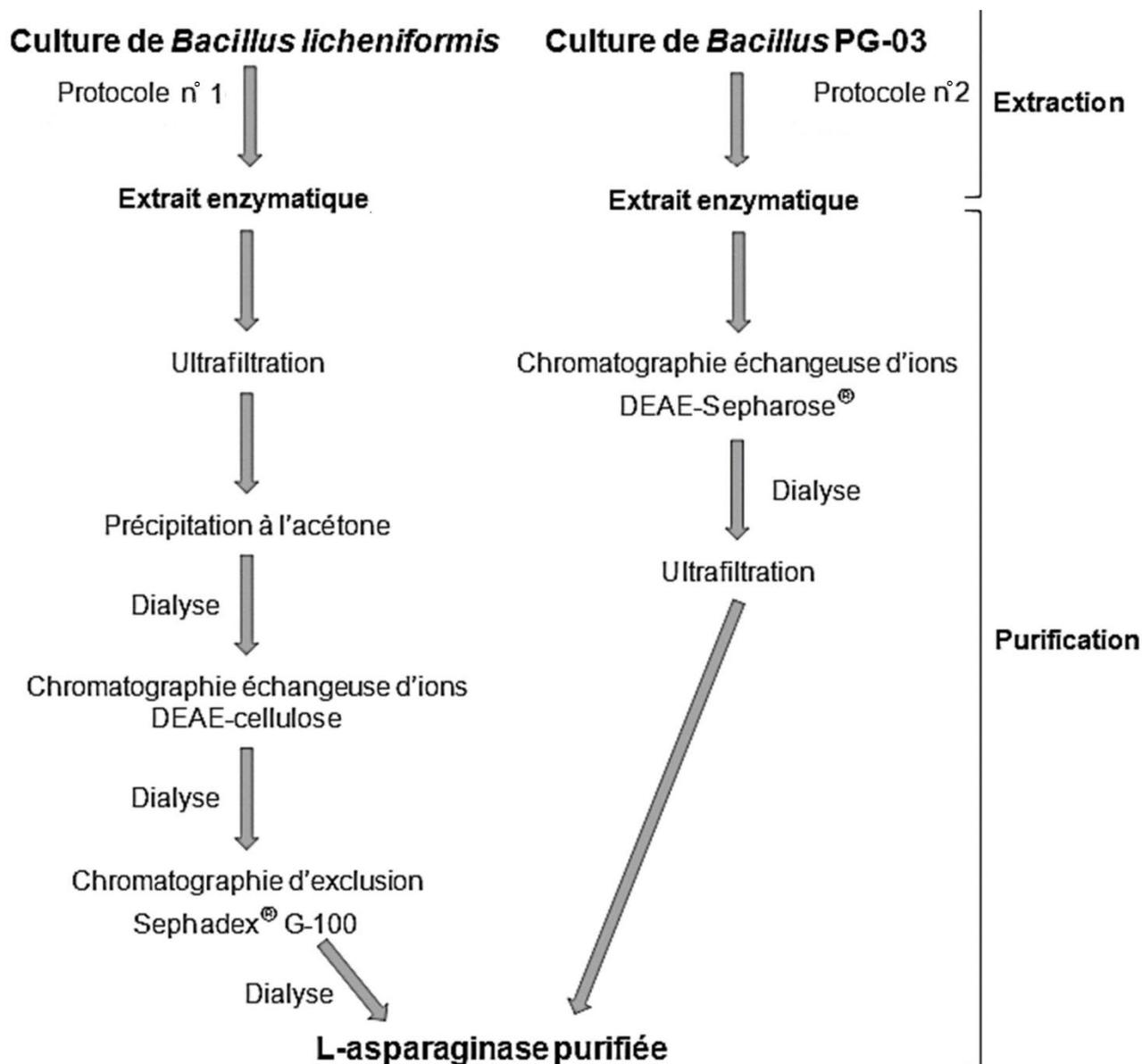
Bacillus PG-03 a été initialement isolé à partir de sédiments du Golfe Persique. Une préculture est réalisée en milieu nutritif puis conservée à -20°C dans un milieu contenant 20 % de glycérol.

Un flacon de 10 mL de milieu de croissance estensemencé avec un inoculum de cette préculture puis incubé pendant une nuit. Ce pré-enrichissement est transféré dans 100 mL de milieu de culture M9 constitué de : maltose 20 % comme unique source de carbone ; Na_2HPO_4 à $6,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 à $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; NaCl $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; CaCl_2 à $0,011 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7,0 et incubé à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant 24 heures. La concentration cellulaire est estimée par mesure de la densité optique à 600 nm. La biomasse est séparée par centrifugation (8000 rpm, 10 min, 4°C), puis le culot est remis en suspension dans 3 mL de tampon Tris $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 9 contenant 10 % (v/v) de glycérol. Les cellules sont lysées par sonication. Le lysat cellulaire est centrifugé (13000 rpm, 15 min, 4°C). L'activité enzymatique est mesurée dans le surnageant.

D'après Rahimzadeh et al. (2016)

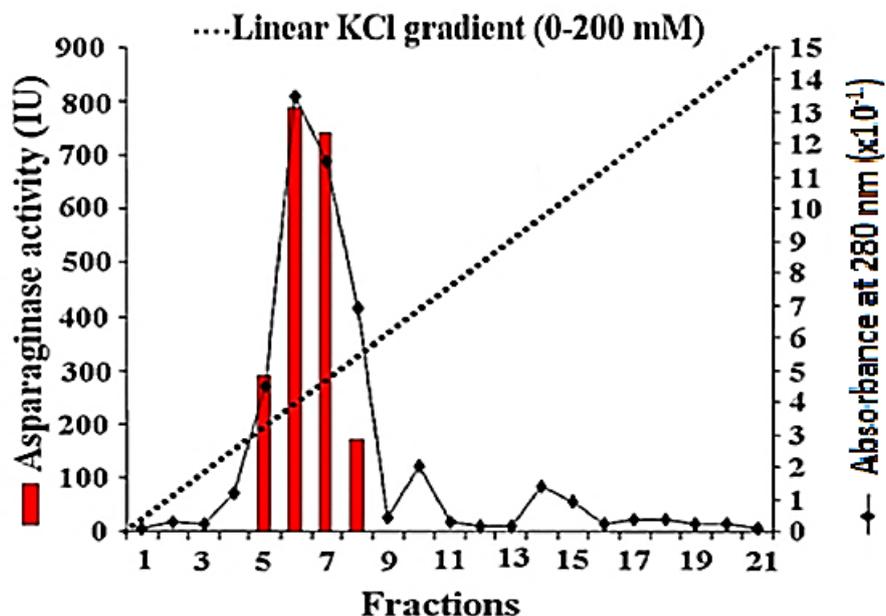
BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2020
U31 - Biochimie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3BT	Page : 8/13

DOCUMENT N°3 : Démarche de purification des asparaginases de *B. licheniformis* et *B. PG-03*.



À chaque étape de la purification, l'activité enzymatique de l'asparaginase est mesurée et une fraction est analysée en SDS PAGE.

DOCUMENT N°4 : Profil d'éluion de l'asparaginase extraite de *Bacillus* PG-03 par chromatographie DEAE-Sepharose®.



The column was pre-equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 9.6) and absorbed protein was eluted with a linear gradient of KCl (0–200 mM) prepared in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.6).

Each fraction was analyzed for enzymatic activity and protein content.

Additional information: « M » = mol·L⁻¹

D'après Husain et al. (2016)

DOCUMENT N°5 : Suivi de purification de l'asparaginase de *B. licheniformis* par SDS-PAGE.

• **Traitement préalable du *pool* Sephadex® G-100**

Le *pool* Sephadex® G-100 est dialysé.

- $V_{\text{dialysat}} = 20 \text{ mL}$
- $\rho(\text{protéines ; dialysat}) = 0,76 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Le dialysat est lyophilisé puis remis en solution avec un tampon Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹ pH 8,6.

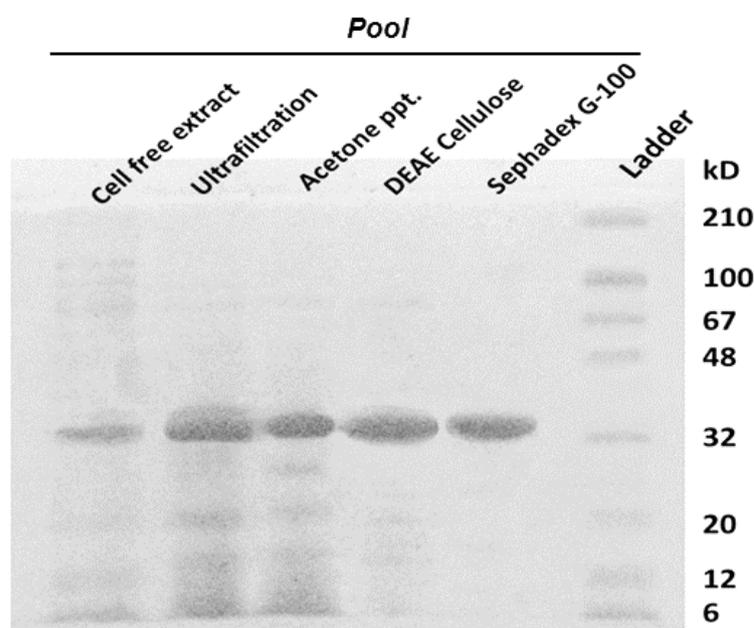
• **Préparation des échantillons pour le dépôt en SDS-PAGE**

- Introduire dans un tube :
 - 10 μL du *pool* à analyser
 - 10 μL de solution de Laemmli
- Incuber 5 minutes au bain-marie à 100°C
- Déposer la totalité du volume préparé

Afin d'obtenir une visualisation correcte des bandes, une quantité de 25 à 50 μg de protéines doit être déposée dans chaque puits.

• **Résultats après migration en gel SDS-PAGE 12%**

Les protéines sont dénaturées par la méthode de Laemmli. Une solution de marqueurs de masses moléculaires de 6 à 210 kDa est utilisé (*Ladder*). Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.



D'après Mahajan et al. (2014)

DOCUMENT N°6 : Test de détermination de l'activité de l'asparaginase.

Il est possible de suivre la réaction catalysée par l'asparaginase par une méthode colorimétrique en dosant l'ammoniaque libéré (méthode de Nessler).

L'ammoniaque réagit en milieu alcalin avec l'iodomercurate (II) de potassium pour former un complexe de couleur orangée.

Réalisation du test :

100 µL de solution contenant l'asparaginase sont incubés avec 900 µL de tampon Tris pH 8,6 contenant 44 mmol·L⁻¹ d'asparagine. Après 30 min d'incubation à 30 °C, 150 µL d'acide trichloroacétique sont ajoutés.

La concentration en ammoniaque est déterminée par ajout de 500 µL de réactif de Nessler et l'absorbance est lue à 436 nm après 10 min d'incubation à température ambiante (stabilité de la coloration 1 heure).

Une unité internationale est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation d'une micromole d'ammoniaque par minute dans les conditions de l'essai.

Tous les essais sont réalisés en triplicat.

D'après Belviso et al. (2017)

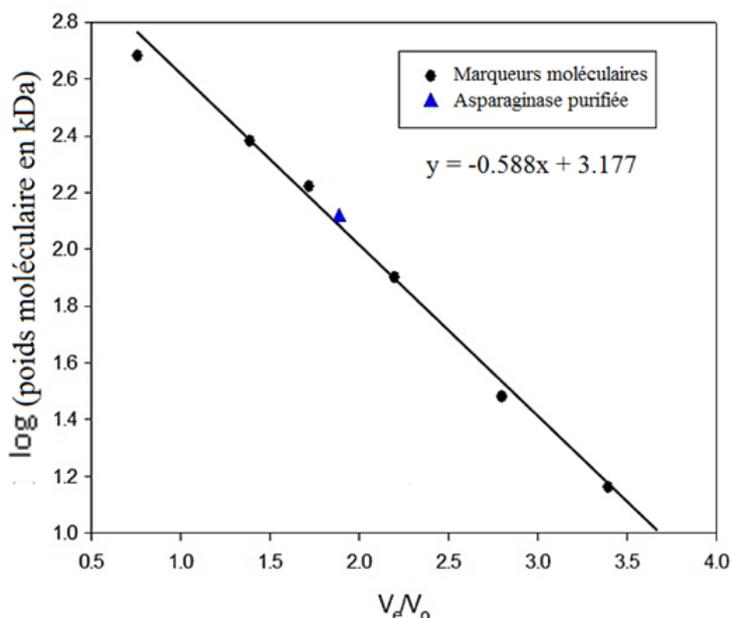
DOCUMENT N°7 : Suivi de purification de l'asparaginase de *B. licheniformis*.

Etape de purification	Activité enzymatique totale (U)	Masse totale de protéines (mg)
Extrait enzymatique	32 260	1396
Ultrafiltration	29 587	862,0
Précipitation à l'acétone	24 392	459,0
DEAE-cellulose	15 898	37,90
Sephadex® G-100	10 632	15,25

L'activité totale est déterminée à partir de l'activité de l'asparaginase mesurée par le test décrit précédemment. La masse de protéines est calculée après dosage par la méthode de Bradford.

D'après Mahajan et al. (2014)

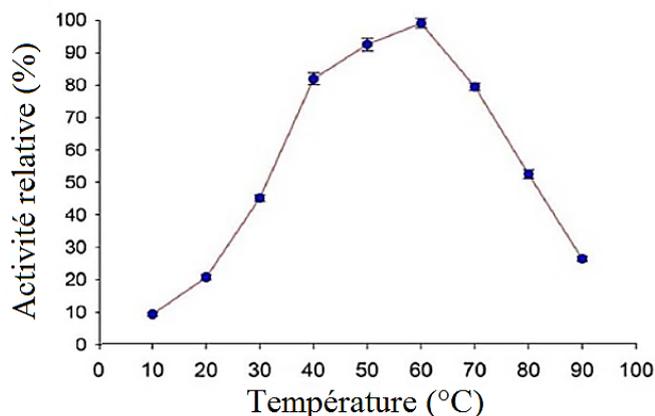
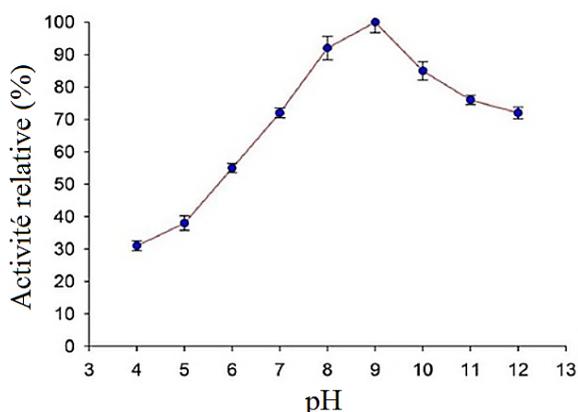
DOCUMENT N°8 : Analyse par chromatographie de gel filtration Sephacryl® S-200 (haute résolution) de l'asparaginase purifiée de *B. licheniformis*.



Dans un premier temps, les marqueurs moléculaires sont déposés sur la colonne. Dans un second temps, l'asparaginase purifiée de *B. licheniformis* est déposée sur la colonne. Le volume d'éluion (V_e) de chaque protéine et le volume mort (V_o) de la colonne sont mesurés. **Pour l'asparaginase : $V_e/V_o = 1,79$**

D'après Mahajan et al. (2014)

DOCUMENT N°9 : Activité de l'asparaginase de *B. licheniformis* en fonction de la température et du pH.



L'activité de l'asparaginase est mesurée dans différentes conditions de pH et de températures. D'après Mahajan et al. (2014)