# CORRIGÉ ET BARÈME

# ÉTUDE D’UN MÉDICAMENT : l’ACTILYSE®

**TOTAL : 40 points**

**Une attention particulière sera apportée à l’expression écrite et à la formulation des réponses.**

**1 - Étude du principe actif tPA (ou alteplase)**

**Q1 -**Réaction catalysée par le tPA : ne pas oublier l’eau, et fonctions amine et COOH libres.

Formule aa / formule liaison peptidique.

**Q2 -**Hélice alpha, plusieurs feuillets beta, séparés par des coudes. (+ localisation sur le ***document n° 4***)

Stabilisés par des liaisons H entre CO et NH de la liaison peptidique.

**Q3 -**Étapes SDS-PAGE : 4 attendues

* préparation du gel
* préparation des échantillons avec le « sample buffer » : dénaturation des protéines
* dépôt des échantillons dans les puits du gel pré-coulé
* migration dans le « running buffer »
* révélation / lecture

**Q4 -**

#### - du DTT, un agent réducteur qui permet de rompre les liaisons SS (intra et éventuellement inter-chaines)

#### - du SDS : sa partie apolaire interagit avec les régions hydrophobes des protéines, ce qui modifie leur organisation et les déroule. Par ailleurs, le SDS apporte des charges négatives réparties régulièrement sur toute la protéine dépliée (densité de charge homogène).

**-**glycérol permet d’augmenter la densité des échantillons, afin qu’ils se déposent au fond du puits.

 **-** Bleu de bromophénol : marqueur de front ou témoin de migration.

**Q5 -**Dépôt borne - (cathode), migration vers borne + (anode).

Justification **:** car protéines chargées - avec le SDS.

Marqueur de taille : 9 bandes obtenues comme attendu (les plus petites protéines ont migré le plus loin).

**Q6 -** Analyse :

#### Piste 2 : tPA sc : 1 seule bande autour de 70 kDa

#### Piste 3 : tPA dc : 2 bandes autour de 35 kDa

#### Piste 4 : tPA dc non réduit : 1 seule bande, comme en 2, autour de 70 kDa. En effet le tPA est bien dc, mais les 2 chaînes sont encore reliées entre elles.

Piste 5 : échantillon d’actilyse reconstitué. 3 bandes.

 La première correspond à du tPA sc (bande peu épaisse, moindre concentration).

2 bandes superposées à 35 kDa exprimant une hydrolyse partielle.

#### Bilan : 2 formes présentes dans le médicament, avec surtout du dc-tPA (forme active).

**2 - Contrôle de la production de l’actilyse par mesure d’activité enzymatique**

**2.1 - Principe d’un spectrofluorimètre**

**Q7 -**λ : longueur d'onde excitatrice et λ' : longueur d'onde d'émission

**Q8 -  A :** source de lumière polychromatique

**B :** monochromateur (ou filtre)

**C :** (photo)détecteur

**2.2 - Étalonnage du spectrofluorimètre**

**Q9-**Préparation de la solution étalon fille d'AMC :

2 contraintes :

* dilution au 1/100
* volume total à préparer, ici au moins 250 µL

Dilution judicieuse adaptée – Choix du matériel.

**Q10 - Tableau de spectrofluorimétrie (document 7)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tubes** | **Blanc** | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **Volume de solution étalon fille à 40 µmol.L-1 (en µL)** | **0** | **25** | **50** | **75** | **100** |
| **Tampon 1X qsp 200 µL** | **200** | **175** | **150** | **125** | **100** |
| **CAMC en µmol.L-1** | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| **IF = Intensité de fluorescence (UF)** | 0 | 2,9 | 6,0 | 9,3 | 11,8 |

**Q11 -**Régression linéaire : r2 = 0,998.(ou r)

IF = 0,60 [AMC] (b négligeable) avec [AMC] en µmol.L-1 et IF en UF.

**2.3 - Détermination de l'activité spécifique du tPA**

**Q12-**Principe du test : **méthode cinétique** (à justifier)

tPA

substrat 🡢 **produit fluorescent/fluorochrome** (AMC) suivi par spectroflurorimétrie.

**Q13 -**On manipule à 4°C afin de conserver l'activité enzymatique du tPA.

**Q14 -**Tampon 2 fois concentré par rapport à sa concentration pour mesure. Lors de la préparation de la mesure, dilué 2 fois, donc ramené à 1 X.

**Q15 -**Conditions de mesure : pH et Ture fixés, travail en conditions saturantes / période initiale linéaire.

Blanc : 50 µL de substrat + 50 µL de tampon ou d'eau déminéralisée ou air.

**Q16-**b = z/venz, avec z = dnAMC/dt

d'où b (nkat.L-1) = (VMR/venz) . (1/0,6)  . (1/60) . 103

(1/0,6) d’après l’équation de droite

(1/60) : passage de min-1 en s-1

103 : conversion µmol en nmol.

**Q17  -**b = 500 nkat.L-1.

**Q18 -**Zsp = z/mprot= b/= 25 µkat.g-1.

**Q19 -** Zsp après purification = 10 Zsp surnageant soit un enrichissement de 10 fois.

**3 - Aspects biochimique et métabolique du traitement par l’actilyse®**

**Q20 - A :** espace intermembranaire

**B :** mb interne mitochondriale

**C :** matrice mitochondriale

**D :** ADP + Pi

**E :** ATP + H2O

**Q21-** Couplage énergétique:le transfert d’électrons (flèches blanches) est exergonique et permet le pompage de protons endergonique dans l’eim.

**Q22 -**Un défaut d'approvisionnement en O2 entraîne une moindre formation d’ATP et la non réoxydation des coenzymes. La fermentation lactique permet donc cette réoxydation et la continuité de la glycolyse (synthèse d’ATP).

Le traitement par l’actilyse évite le manque d’oxygène au niveau cellulaire et permet le fonctionnement de la chaine respiratoire en favorisant l’apport d’O2 par destruction des caillots.

# BARÈME

# ÉTUDE D’UN MÉDICAMENT : l’ACTILYSE®

**TOTAL : 40 pts**

**Expression écrite, formulation des réponses : 2 pts**

**1 - Étude du principe actif tPA (ou alteplase) (13,5 points)**

**Q1 -  2 pts**

**Q2 -  2 pts**

**Q3 -  2 pts**

**Q4 -  3 pts**

**Q5 -  1,5 pts**

**Q6 -** **3 pts**

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

**2.1 - Principe d’un spectrofluorimètre (2,5 points)**

**Q7 -  1 pt**

**Q8 -  1,5 pts**

**2.2 - Étalonnage du spectrofluorimètre (4,5 points)**

**Q9 -  2 pts**

**Q10 -  1 pt**

**Q11 -  1,5 pts**

**2.3 - Détermination de l'activité spécifique du tPA (12,5 points)**

**Q12 -** **2 pts**

**Q13 -  1 pt**

**Q14 -  1 pt**

**Q15 -  2 pts**

**Q16 -  2 pts**

**Q17 -  1 pt**

**Q18 -  1,5 pts**

**Q19 -  2 pts**

**3 - Aspects biochimique et métabolique du traitement par l’actilyse® (5 points)**

**Q20 -  2 pts**

**Q21 -  1 pt**

**Q22 -  2 pts**