

EPREUVE E5. UNITÉ U52

Réalisation pratique d'opérations techniques

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

PRINCIPES ACTIFS ET EXCIPIENTS

BIOCHIMIE (70 points)

Durée : 4 H

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début de séance.

Les enzymes sont couramment utilisées comme principes actifs de nombreux médicaments. Pour agir efficacement, certaines enzymes nécessitent la présence d'activateurs. On se propose de mesurer l'action d'un activateur sur une protéase : la papaïne.

D'autre part, un même médicament associe souvent deux enzymes. Les deux enzymes peuvent alors interagir. On déterminera l'influence de la papaïne sur une seconde enzyme : le lysozyme.

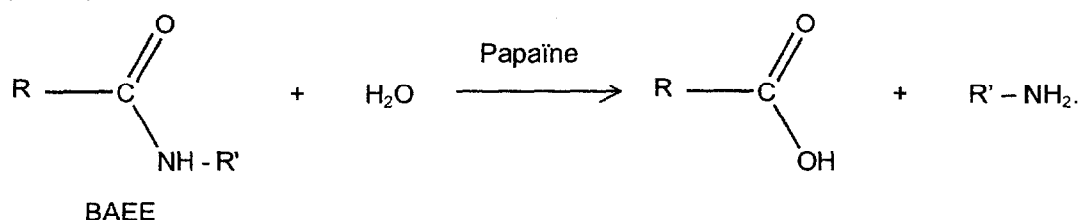
Outre les principes actifs, le médicament sous sa forme commerciale comprend des excipients dont il faut connaître la composition pour une utilisation sans risque chez certains patients. Le chlorure de sodium y est souvent présent et la quantité ingérée doit être connue afin de l'intégrer dans les apports journaliers conseillés en cas de régime. On mesurera la teneur en ions chlorure de l'excipient utilisé.

1 - Efficacité de l'activation de la papaïne. (28 points)

On se propose de comparer les activités enzymatiques en l'absence ou en présence d'activateur.

1.1 - Principe de la mesure de la vitesse de réaction.

La papaïne (EC 3.4.22.2) catalyse l'hydrolyse de nombreuses protéines mais aussi de substrats synthétiques. On étudie la réaction d'hydrolyse du benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) :



On mesure la vitesse d'apparition de l'acide par titrimétrie selon la méthode du pH-stat.

1.2 - Matériel et réactifs.

- pH-mètre + solutions de calibration.
- Bécher forme haute de 50 mL.
- Dispositif d'agitation magnétique.
- Solution de substrat BAEE.
- Solution d'activateur.
- Excipient.
- NaOH 0,010 mol.L⁻¹.
- Extrait brut EB.
- P 200 + cônes.

1.3 - Mode opératoire.

1.3.1 - Préparation des 2 extraits.

- Extrait non activé (E) : préparer 2 mL d'une dilution au 1/10 de l'extrait EB, dans de l'eau déminéralisée.
- Extrait activé (E.A.) : préparer 5 mL d'une dilution au 1/10 de l'extrait EB, dans la solution d'activateur.

Conserver EA à la température ambiante pendant au moins 15 minutes avant la détermination de l'activité (noter la durée de la phase d'activation).

Conserver à température ambiante une fraction de EA pour la 2^{ème} partie de l'étude.

1.3.2 - Préparation du milieu réactionnel.

Etalonner le pH-mètre.

Dans un bécher de 50 mL, introduire :

- 10 mL d'excipient ,
- 5 mL de solution de substrat.

Amener le pH à $6,6 \pm 0,2$ à l'aide de la solution de NaOH à $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$.

1.3.3 - Mesure de l'activité des deux extraits d'enzyme.

Ajouter dans le milieu réactionnel 1,0 mL d'extrait E ou E.A.

Le pH diminue.

Lorsque le pH arrive à $6,2 \pm 0,2$ (= point de consigne) déclencher le chronomètre et ajouter immédiatement 100 μL de NaOH $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ (ou ramener le pH à $6,2 \pm 0,2$ s'il diminue trop rapidement).

Noter le temps et ajouter 100 μL de NaOH chaque fois que le pH atteint le point de consigne.

La durée de la manipulation ne doit pas excéder 5 min ou le volume d'hydroxyde de sodium versé 2 mL.

1.4 – Exploitation des résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Tracer sur un même graphe : $V_{\text{versé}} = f(t)$ min pour les deux manipulations à l'aide de l'outil informatique.

Rendre un graphique légendé.

Déterminer pour chaque extrait la quantité de BAEE hydrolysé par minute dans les conditions de vitesse initiale.

En déduire la concentration d'activité catalytique de chacun des extraits E et EA, en U.mL^{-1} .

Conclure sur l'efficacité de l'activation en comparant quantitativement les 2 valeurs.

Donnée : une unité papaïne est définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de BAEE par minute dans les conditions de l'expérience.

2 – Etude de l'influence de la papaïne sur l'activité du lysozyme. (20 points)

2.1 – Principe.

Le lysozyme (EC 3.2.1.17) catalyse l'hydrolyse du peptidoglycane des parois bactériennes.

Son activité catalytique est déterminée par mesure de la diminution, au cours du temps, de l'absorbance à 450 nm d'une suspension bactérienne.

2.2 – Matériel et réactifs.

- Spectrophotomètre réglé à 450 nm.
- Cuves à usage unique.
- Suspension de parois bactériennes.
- Lysozyme (conserver à 4°C).
- Papaïne activée EA (voir § 1.3.1).
- Solution d'activateur.

2.3 - Mode opératoire.**2.3.1- Préparation des extraits enzymatiques à tester.**

A partir de l'extrait de lysozyme fourni, préparer les 2 solutions enzymatiques suivantes :

- $Lys_1 = 0,1 \text{ mL}$ extrait de lysozyme + $0,9 \text{ mL}$ solution d'activateur.
- $Lys_2 = 0,1 \text{ mL}$ extrait de lysozyme + $0,2 \text{ mL}$ solution de papaïne EA + $0,7 \text{ mL}$ solution d'activateur.

Conserver 10 min exactement la solution Lys_2 à la température ambiante avant de mesurer son activité catalytique.

2.3.2 - Mesure de l'activité.

Dans une cuve spectrophotométrique à usage unique, introduire $2,5 \text{ mL}$ de suspension tamponnée pH 6,2 (équilibrée à 25°C) de parois bactériennes.

A $t = 0$, ajouter $0,2 \text{ mL}$ de solution enzymatique à analyser (Lys_1 ou Lys_2).

Suivre l'évolution de l'absorbance à 450 nm pendant 3 minutes maximum.

2.4 - Exploitation des résultats.

Déterminer la variation d'absorbance par unité de temps (régression linéaire).

En déduire la concentration d'activité catalytique de chacune des solutions Lys_1 et Lys_2 .

Calculer l'activité spécifique du lysozyme en l'absence et en présence de papaïne.

Conclure sur les résultats.

Proposer une interprétation.

Données :

- une unité lysozyme est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque une diminution de $0,001$ unité d'absorbance par minute dans les conditions de l'expérience,
- la concentration en protéines de l'extrait de lysozyme fourni est de 1 mg.mL^{-1} .

3 - Dosage des ions chlorures dans l'excipient. (22 points)

La solution médicamenteuse à contrôler a été obtenue en dissolvant 1 comprimé dans 50 mL d'eau déminéralisée. Les protéines ont été éliminées par ultrafiltration. Le dosage est fait sur le perméat. On se propose de préparer une solution normalisée de nitrate d'argent de telle sorte que 1 mL de cette solution dose exactement 2 mg de chlorure de sodium.

3.1 - Principe.

En milieu neutre, les ions argent précipitent les ions chlorure. On utilise comme indicateur de fin de réaction les ions chromate d'une solution saturée de K_2CrO_4 .

3.2 - Matériels et réactifs.

- 1 capsule de pesée.
- 1 entonnoir.
- Solution d' AgNO_3 à environ $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.
- Solution de K_2CrO_4 .
- Perméat.
- KCl en poudre.

3.3 - Mode opératoire.**3.3.1 - Préparation de la solution étalon de chlorure de potassium.**

Préparer 100 mL d'une solution étalon de KCl à environ $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.3.2 - Titrage de la solution de nitrate d'argent (2 essais).

Utiliser une prise d'essai de solution étalon telle que le volume de solution de nitrate d'argent versé soit inférieur à 10 mL .

Ajouter un volume équivalent d'eau déminéralisée et 8 gouttes d'indicateur.

Verser le nitrate d'argent jusqu'à l'apparition d'une teinte saumon.

3.3.3 - Ajustement de la solution de Ag NO₃ (préparer 50 mL de solution normalisée).

Procéder de telle sorte que 1 mL de AgNO₃ dose exactement 2 mg de NaCl.

3.3.4 - Dosage des ions chlorure du perméat (2 essais).

Doser 20 mL de perméat par la solution normalisée de nitrate d'argent (ou par la solution non normalisée en cas d'échec au 3.3.3).

Données : Cl : 35,5 g.mol⁻¹ ; Na : 23,0 g.mol⁻¹ ; K : 39,1 g.mol⁻¹.

3.4 - Exploitation des résultats.

Indiquer la masse de KCl à peser pour préparer la solution étalon.

Justifier la prise d'essai de solution étalon.

Calculer la concentration de la solution de nitrate d'argent. CV = 1 %.

Indiquer la dilution à effectuer pour préparer la solution normalisée.

Calculer la concentration massique en NaCl de la solution testée.

Calculer l'apport journalier en NaCl dans le cas d'une prise de 5 cachets par jour.

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____ (le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère: BCREA3/A

SESSION 2001

Durée : 10 H

Page : 5/5

Coefficient : 8

FEUILLE DE RESULTATS

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste :

1 – ACTIVITE DE LA PAPAINE :

EXTRAIT E

NaOH mL									
Temps min									
NaOH mL									
Temps min									

EXTRAIT EA

Durée de la phase d'activation :

NaOH mL									
Temps min									
NaOH mL									
Temps min									

2 – ACTIVITE DU LYSOZYME :

Temps min									
Lys ₁ UA									
Lys ₂ UA									

3 – DOSAGE DES CHLORURES :

Masse de KCl pesée :

Etalonnage

Prise d'essai (mL)	Volume AgNO ₃ (mL)	Prise d'essai (mL)	Volume AgNO ₃ (mL)

Dosage du perméat

V₁ (mL) :

V₂ (mL) :

B.T.S. BIOCHIMISTE

DANS CL

NE RIEN ÉCRIRE

EPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

PRINCIPES ACTIFS ET EXCIPIENTS**MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE (90 points)**

1er jour

Durée : 3 H 30

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début de séance.

I - MICROBIOLOGIE (55 points)**1 – Dosage microbiologique d'une solution de lysozyme.****1.1 – Matériel.**

- 1 culture sur gélose inclinée TCS de *Micrococcus luteus* notée « M » (à garder pour la troisième partie du sujet).
- 2 mL de solution de lysozyme à 2 g L⁻¹ en tampon pH 6,2 notée « L ».
- 2 mL de solution « X » à doser.
- 1 gélose Mueller Hinton en boîte de 120 x 120 mm.
- 10 mL de tampon stérile pH 6,2.
- 1 flacon contenant 10 mL d'eau physiologique stérile.
- 1 tube à essai stérile.
- 2 tubes d'eau physiologique stérile (9 mL par tube).
- 1 tube étalon 0,5 de l'échelle de Mac Farland.
- 4 tubes à hémolyse stériles.
- 2 pipettes 1 mL stériles.
- 1 pipette 5 mL stérile.
- 1 micropipette P 1000.
- 1 micropipette P 20.
- Cônes stériles.
- 12 disques de papier filtre stériles.

1.2 – Préparation des solutions de lysozyme.

Gamme étalon : préparer en tubes à hémolyse une gamme correspondant aux dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 en tampon pH 6,2 de la solution à 2 g.L⁻¹ de lysozyme (solution « L »).

Le volume final est de 1 mL.

Solution à doser : préparer dans un tube à hémolyse une solution diluée au 1/5 en tampon pH 6,2 de la solution X.

Le volume final est de 1 mL.

1.3 – Préparation de l'inoculum.

Sachant que l'étalon 0,5 de Mac Farland correspond à une suspension d'environ 10⁸ U.F.C. mL⁻¹, préparer une suspension de *Micrococcus luteus* à environ 10⁶ U.F.C. mL⁻¹ notée S, (suspension inoculum).

Ensemencer la gélose Mueller Hinton par inondation.

Laisser sécher 15 minutes.

1.4 – Réalisation des dépôts.

Positionner 12 disques stériles sur la gélose à l'aide du gabarit (annexe 1).

Imprégner chaque disque par 10 μL de solution de lysozyme :

- étalons ;
- solution X pure ;
- solution X diluée.

Chaque solution est déposée en double.

Laisser sécher 30 minutes à température ambiante, puis incubé 48 heures à 30°C.

1.5 – Compte rendu.

Présenter sous forme de tableau la préparation des différentes solutions de lysozyme.

Indiquer la démarche utilisée pour la réalisation de l'inoculum.

2 - Dénombrement de l'inoculum.**2.1 – Matériel.**

- 6 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile.
- 7 géloses PCA coulées en boîte de Pétri.
- 7 pipettes stériles 1 mL.
- 1 pipette râteau stérile.
- 1 micropipette P 20.
- Cônes jaunes stériles.

2.2 – Protocole opératoire.**2.2.1 - Réalisation de la gamme de dilution.**

A partir de la suspension inoculum S_1 , réaliser une série de dilutions suivant une progression géométrique de raison 1/10 jusqu'à la dilution 10^{-6} .

Appeler un examinateur pour la réalisation d'une dilution.

2.2.2 - Ensemencement par la technique de dépôt de micro-gouttes.

Choisir trois dilutions à ensemercer sachant que cette technique ne permet pas le comptage d'un nombre de micro-colonies supérieur à 20.

Déposer, en double, sur une gélose PCA, 20 μL de chaque dilution suivant la disposition proposée en annexe 2.

Laisser sécher 30 minutes et incubé 48 heures à 30°C.

2.2.3 - Vérification par la technique de référence.

Ensemencer, en double, sur géloses PCA, 0,1 mL de 3 dilutions judicieusement choisies.

Incuber 48 heures à 30°C.

2.3 – Compte rendu.

Indiquer, pour les 2 techniques utilisées, les trois dilutions ensemercées. Justifier ces choix.

3 - Vérification des caractères de genre de la souche *Micrococcus luteus*.**3.1 – Matériel.**

- Culture de *Micrococcus luteus* sur gélose inclinée (tube M).
- 1 tube d'eau physiologique 2 mL.
- 1 gélose ordinaire en boîte de Pétri.
- 1 milieu VF régénéré et maintenu à 45°C.
- 1 milieu CTA régénéré et maintenu à 45°C.
- 1 tube de solution de glucose stérile à 300 g.L⁻¹.
- 1 flacon d'H₂O₂ à 10 volumes.
- 5 pipettes Pasteur.
- Matériel de base du laboratoire.

3.2 – Protocole opératoire.

Effectuer une coloration de Gram et le test catalase.

Ensemencer les milieux de culture fournis.

Incuber 48 heures à 30°C.

Appeler un examinateur pour l'observation microscopique et la réalisation du test enzymatique.

3.3 – Compte rendu.

Rendre compte de l'observation microscopique et du résultat du test enzymatique.

II – BIOLOGIE CELLULAIRE (35 points)

Avant d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché, chaque médicament doit subir avec succès un ensemble de tests dont des tests toxicologiques. Ces tests sont d'abord réalisés sur des cultures de cellules, puis des animaux et enfin sur des êtres humains. Ici, on se propose d'étudier la toxicité d'un médicament associant lysozyme et papaine sur des cultures de fibroblastes de rein de singe (cellules Vero).

1 - Matériel et réactifs.

Au poste de travail :

- 3 mL d'une solution du médicament noté « Med » ;
- un tube contenant exactement 9 mL de PBS stérile ;
- une pipette stérile de 1 mL.

Au poste de biologie :

- un microscope inversé ;
- une étude à CO₂ à 37°C ;
- un dispositif de lavage des mains ;
- un flacon d'alcool ;
- papier absorbant.

Sous la hotte à flux laminaire :

- un flacon de cellules Vero repiquées 72 heures avant la manipulation ;
- 15 mL de milieu DMEM complet (additionné de 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de glutamine, 1 % de solution de pénicilline-streptomycine) ;
- 3 mL de trypsine-EDTA ;
- un tube contenant du PBS stérile ;
- 1 pipette de 2 mL, 2 pipettes de 5 mL, 4 pipettes de 1 mL stériles ;
- 3 flacons stériles de 25 cm².

2 - Manipulation.

Réaliser stérilement une dilution de la solution de médicament au 1/10 dans le tampon PBS.

Observer les cellules au microscope inversé.

Procéder au repiquage de la culture de cellules selon le protocole suivant :

- éliminer par retournement le milieu de culture usagé ;
- rincer la surface du tapis cellulaire avec 2 mL de trypsine-EDTA. Eliminer par retournement ;
- inonder la surface du tapis cellulaire avec 0,5 mL de trypsine-EDTA. Incuber à 37°C pendant 5 minutes environ. Surveiller le décollement complet des cellules ;
- arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 3 mL de milieu DMEM complet ;
- ensemercer 3 flacons avec le même inoculum de 1 mL de suspension obtenue. Les flacons seront notés FC, FD et FT. Ajouter 1 mL de solution de médicament concentré dans le flacon FC, 1 mL de solution de médicament au 1/10 dans le flacon FD. Réaliser le témoin dans le flacon FT ;
- Ajouter 3 mL de milieu DMEM complet dans chaque flacon ;
- Incuber à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO₂.

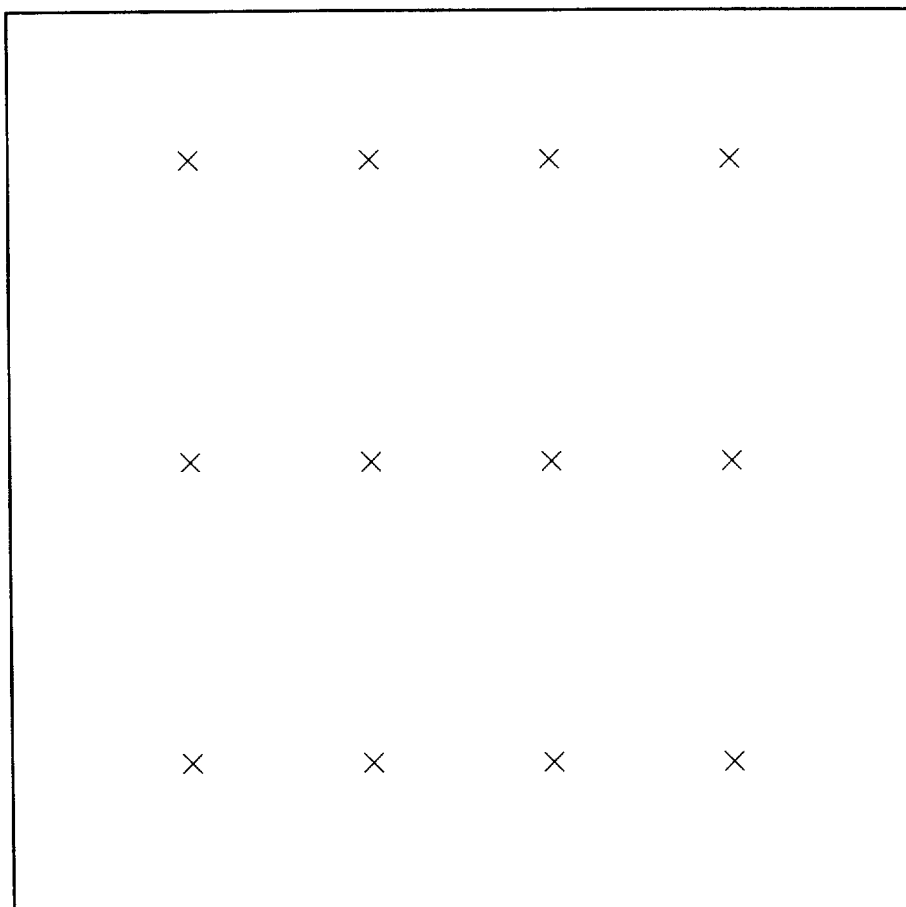
3 - Compte rendu.

1. Décrire les cellules observées au microscope inversé et conclure.
2. Expliquer la réalisation de la dilution au 1/10 du médicament.
3. Donner sous forme de tableau la composition des 3 flaconsensemencés.

MICROBIOLOGIE

ANNEXE 1

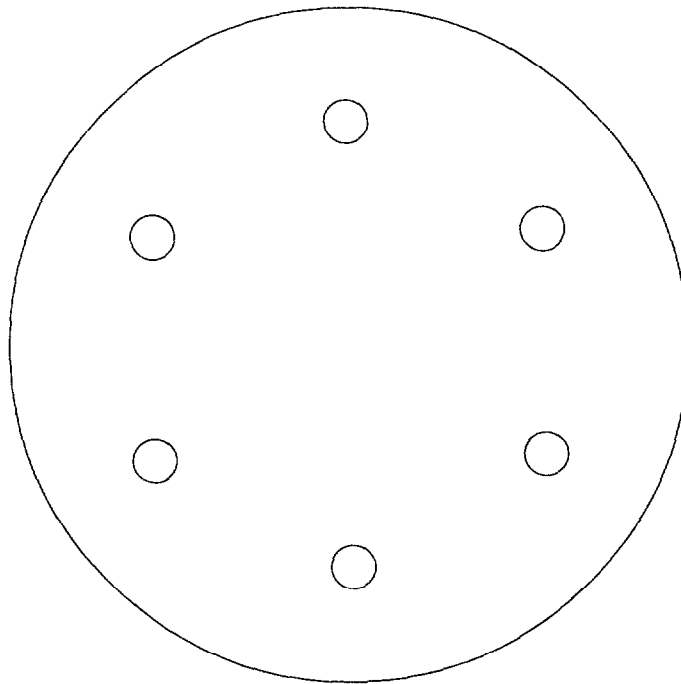
GABARIT DES DEPOTS POUR LE DOSAGE DU LYSOZYME.



MICROBIOLOGIE

ANNEXE 2

GABARIT DES DEPOTS DES MICRO-GOUTTES.



EPREUVE E5. UNITÉ U52

Réalisation pratique d'opérations techniques

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

PRINCIPES ACTIFS ET EXCIPIENTS**MICROBIOLOGIE – BIOLOGIE CELLULAIRE** (90 points)

2ème jour

Durée : 2 H 30**I - MICROBIOLOGIE** (55 points)**1 - Dosage microbiologique d'une solution de lysozyme.**

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

Présenter les résultats sous forme d'un tableau.

A l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe étalon : diamètres d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration en lysozyme en g.L^{-1} . Rendre un graphe légendé.

Déterminer la concentration en lysozyme de la solution X.

2 - Dénombrement de l'inoculum.

Compter les micro-colonies obtenues sur la gélose PCA.

Donner les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer la concentration cellulaire de la suspension bactérienne en UFC.mL^{-1} .**3 - Vérification par la technique de référence.**

Compter les colonies.

Rassembler les résultats sous forme d'un tableau.

Calculer la concentration cellulaire de la suspension bactérienne en UFC.mL^{-1} .

Comparer les résultats obtenus par les deux techniques.

Conclure.

4 - Vérification des caractères de genre de la souche de *Micrococcus luteus*.

Procéder à la lecture des milieux.

Conclure.

II – BIOLOGIE CELLULAIRE (35 points)**1 – Matériel et réactifs par candidat au poste de travail.**

- 1 mL de bleu de Trypan (0,4 %).
- 3 tubes à hémolyse vides.
- P 200 ou P 1000 et cônes adaptés.
- Hématimètre de Malassez et sa lamelle.
- 15 mL de milieu DMEM complet.
- 10 mL de trypsine-EDTA.
- 1 pipette de 2 mL, 1 pipette de 5 mL, 1 pipette de 1 mL stériles.
- Gants.

2 - Manipulation.

Observer les cellules au microscope inversé.

Au poste de travail.

Vider les flacons par retournement. Rincer avec 2 mL de trypsine-EDTA. Eliminer par retournement.

Inonder la surface du tapis avec 0,5 mL de trypsine-EDTA. Incuber à l'étuve pendant 5 minutes environ. Surveiller le décollement complet des cellules.

Arrêter l'action de la trypsine-EDTA avec 4 mL de milieu DMEM complet.

Réaliser une dilution volume à volume de chaque suspension de cellules avec du bleu Trypan.

Numérer chaque suspension cellulaire ainsi diluée à l'hématimètre de Malassez.

Présenter un champ microscopique à un examinateur.

Entre chaque numération, l'hématimètre de Malassez sera désinfecté puis séché avec du papier Joseph.

3 – Compte rendu.

Donner les résultats de la numération pour chaque flacon, en nombre de cellules viables et de cellules totales par flacon (expliquer les calculs).

Calculer le pourcentage de viabilité pour chaque flacon.

En déduire l'action du médicament sur les fibroblastes.