

# **BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

## **Épreuve E3 - Unité U31**

### **Biochimie et technologies d'analyse**

**Calculatrice autorisée.**

**Dictionnaire anglais-français autorisé.**

## ÉPREUVE E3. UNITÉ U31

## Biochimie et technologies d'analyse

**BIOCHIMIE D'UN MÉDICAMENT**

Le Sildénafil est une molécule d'intérêt thérapeutique utilisée pour ses propriétés vasodilatatrices liées à une potentialisation du relâchement des muscles lisses de certaines artéoles. On l'utilise pour le traitement de certaines formes d'hypertension artérielle.

Ce médicament est vendu sous forme de comprimés contenant le principe actif *sildénafil citrate* associé à des excipients dont le *lactose  $\alpha$  monohydraté*.

**1 - Mode d'action du principe actif, le citrate de sildénafil. (33 points)**

**1.1** - D'après le **document 1**, les phosphodiesterases PDE<sub>5</sub> catalysent l'hydrolyse du Guanosyl monophosphate cyclique (GMP<sub>C</sub>) produisant un nucléoside 5'-phosphate.

**1.1.1** - Écrire la formule du GMP<sub>C</sub>.

**1.1.2** - Écrire l'équation de la réaction (formules chimiques non exigées).

**1.1.3** - Indiquer la classe d'enzyme des PDE<sub>5</sub>, préciser le numéro d'ordre qui correspond à cette classe.

**1.1.4** - La réaction d'hydrolyse du GMP<sub>C</sub> est fortement exergonique *in vivo*. Quelles en sont les conséquences aux niveaux de la réaction et de la séquence métabolique décrite dans le **document 1**.

**1.2** - Une étude *in vitro* de l'effet du Sildénafil sur les activités des PDE<sub>5</sub> montre que l'enzyme a un comportement Michaelien. Les résultats sont présentés dans le **document 2**, les vitesses initiales des réactions sont exprimées en unités arbitraires (UA).

**1.2.1** - Démontrer l'équation de Lineweaver-Burk.

**1.2.2** - À l'aide de la calculatrice, déterminer les paramètres de régression en absence et en présence d'effecteur. En déduire dans chaque cas la vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ) et la constante de Michaelis de PDE<sub>5</sub> pour le GMP<sub>C</sub>.

**1.2.3** - En déduire le type d'action du Sildénafil. Justifier votre réponse.

À l'aide du **document 1**, en déduire les conséquences physiologiques de la prise de ce médicament.

**1.2.4** - Une représentation graphique pratique (**document 3**) permet de déterminer une constante caractéristique,  $K_M'$ , la constante de Michaelis apparente de l'enzyme inhibée soit :

$$K_M' = K_M \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right).$$

À quoi correspondent, sur ce document, l'ordonnée A et l'abscisse B. Justifier.

Déterminer la constante d'inhibition du Sildénafil.

**1.3** - Le sildénafil agit de façon spécifique sur les phosphodiesterases de type 5 dont on connaît 11 formes isoenzymatiques.

**1.3.1** - Définir les caractéristiques des isoenzymes.

**1.3.2** - Indiquer une technique d'analyse classique permettant de séparer les différentes formes isoenzymatiques d'une même enzyme. Rappeler son principe.

**1.3.3** - La PDE<sub>5</sub> est une protéine dimérique spécifique du GMP<sub>C</sub>. On considère que cette enzyme est une enzyme allostérique qui présente deux domaines identiques de liaison au GMP<sub>C</sub>. Ces domaines sont appelés GAFdomain (**document 4**).

**1.3.3.1** - Donner toutes les caractéristiques d'une enzyme allostérique.

**1.3.3.2** - Proposer une définition de la notion de domaine.

**1.3.3.3** - La comparaison des séquences entre le domaine GAFa du PDE<sub>5</sub> humain et du domaine GAFb de la souris montre une homologie de séquence de 48 % (**document 5**).

- À quoi correspond le terme  $\alpha$  associé à la portion de séquence des résidus 88 à 96. Préciser l'ensemble des caractéristiques structurales de cette portion de séquence.

- Comparer les séquences entre les deux molécules au niveau de cette portion de séquence. Observe-t-on une incidence sur la structure tridimensionnelle ? Justifier votre réponse.

**2 - Le lactose excipient de choix en pharmacie galénique. (40 points)**

Le lactose est un excipient couramment utilisé en pharmacie galénique.

En effet, le lactose regroupe diverses qualités : faible coût, saveur agréable, excellente stabilité physique et chimique, solubilité dans l'eau, bonne aptitude à la compression.

**2.1 - Le lactose, structure et propriétés. (7 points)**

**2.1.1** - Écrire la formule développée du lactose ainsi que son nom systématique.

**2.1.2** - Le lactose possède-t-il un pouvoir réducteur ? Justifier votre réponse.

**2.1.3** - Une méthode de dosage du lactose est basée sur l'utilisation du 3,5-dinitrosalicylate (ou 3,5-DNS).

Indiquer le principe de ce dosage et préciser le nom de l'appareillage de mesure nécessaire (équations de réactions non demandées).

**2.2 - Les étapes de purification du lactose. (16 points)**

Le lactose utilisé en pharmaceutique (lactose codex) est issu du lactosérum. Le procédé utilisé en lactosérie est indiqué dans le document 5.

**2.2.1 - Étape d'ultrafiltration.**

L'ultrafiltration est un procédé de séparation par membranes semi-perméables.

**2.2.1.1** - Préciser les compositions qualitatives respectives du perméat et du rétentat sachant que la zone de coupure des membranes utilisées se situe entre 8 et 10 kDa. Justifier votre réponse.

**2.2.1.2** - Pour les molécules dont la masse appartient à la zone de coupure, on définit un *taux de rétention R*.

$$R = \frac{C_i - C_p}{C_i}$$

$C_i$  = Concentration de la molécule dans le lactosérum.

$C_p$  = Concentration de la molécule dans le perméat.

Parmi les trois membranes suivantes, laquelle faut-il utiliser pour limiter au maximum le passage de ces 2 molécules dans le perméat ? Justifier votre réponse.

Membrane 1	Membrane 2	Membrane 3
R = 0	R = 0,5	R = 0,8

**2.2.2 - Étape de déminéralisation par chromatographie d'échange d'ions.**

Le perméat est introduit dans un premier temps sur un échangeur de cations. Le pH du perméat va ainsi s'acidifier.

Dans un deuxième temps, le rétentat « décationné » est passé dans une seconde résine échangeuse d'anions.

**2.2.2.1** - Le document 6 présente différents types de résines échangeuses d'ions utilisées couramment. Choisir une résine échangeuse de cations et écrire les réactions d'échanges ioniques entre les électrolytes du perméat et la résine cationique. Justifier la diminution du pH dans le perméat élué.

**2.2.2.2** - La capacité d'échange est une constante correspondant au nombre de groupements ionisables contenus dans l'échangeur. Elle peut être exprimée en millimoles d'ion monovalent actif par unité de masse (g de résine sèche) ou par unité de volume (mL de résine humide tassée dans la colonne).

À partir des informations du document 7, calculer la capacité de rétention de la résine en millimoles d'ions par g de résine sèche sachant que le volume versé de NaOH est de 11,50 mL.

**2.2.3 - Étape de cristallisation.**

La réfractométrie est utilisée pour suivre l'étape de cristallisation par la mesure des variations de la concentration en lactose restant en solution pendant la cristallisation d'une solution saturée.

**2.2.3.1** - Comment varie la valeur lue au réfractomètre au cours des cristallisations successives ? Justifier.

**2.2.3.2** - La détermination rapide de la concentration de solutions de lactose utilise un réfractomètre d'Abbe, qui repose sur la détermination de l'angle limite entre deux milieux. Citer deux facteurs dont dépend l'indice de réfraction.

**2.2.3.3** - La solution saturée est constituée de lactose en équilibre principalement sous les formes lactose  $\alpha$  et lactose  $\beta$ . Au cours de la cristallisation, le phénomène de mutarotation se produit, le lactose  $\beta$  se transforme en lactose  $\alpha$  qui cristallise. Quelle est la différence structurale entre ces deux formes ? Par quel type de mesure peut-on distinguer ces formes ?

**2.3 - Mise au point du dosage du lactose par chromatographie liquide haute performance (HPLC). (17points)**

Une méthode de dosage du lactose met en oeuvre une HPLC couplée à un détecteur particulier (ELSD : Détecteur de dispersion de la lumière par évaporation).

**2.3.1** - À l'aide du **document 8a**, dégager les caractéristiques du système chromatographique.

**2.3.2** - Faire le schéma de principe de l'appareillage utilisé. Indiquer deux autres détecteurs utilisés classiquement.

**2.3.3** - Citer un type d'étalonnage utilisé. Proposer un protocole pour la préparation de la gamme étalon de lactose.

**2.3.4** - Lors de la mise au point de la méthode, le détecteur peut être utilisé sous position « nébuliseur Off » ou « nébuliseur On », le résultat est donné du **document 8b**.

**2.3.4.1** - Dans quelle position doit-on régler le détecteur pour obtenir la meilleure sensibilité. Justifier votre réponse en donnant une définition de la sensibilité.

**2.3.4.2** - Définir et déterminer le temps de rétention du lactose.

**2.3.5** - D'après le **document 8a**, quel est le paramètre de qualité étudié ? Indiquer la réalisation pratique et expliquer le calcul nécessaire à son évaluation. Quel autre paramètre de qualité pourrait-on étudier ?

**3 - Effets secondaires du médicament. (7 points)**

Lors de la prise de médicament, de nombreux effets indésirables peuvent survenir. La plupart d'entre eux sont directement liés au composé actif, d'autres sont imputés aux excipients.

**3.1** - Le principe actif peut provoquer de nombreux troubles métaboliques notamment une variation de la glycémie.

**3.1.1** - Le **document 9** représente un mécanisme réactionnel impliqué dans la régulation de la glycémie. Nommer cette voie.

Compléter le **document 9**.

**3.1.2** - Rappeler succinctement le mécanisme de régulation de l'enzyme catalysant la première réaction de la voie métabolique présentée dans le **document 9**.

**3.2** - Certains sujets sensibles présentent une intolérance au lactose même si les doses utilisées sont faibles. Ces individus présentent une déficience en lactase intestinale.

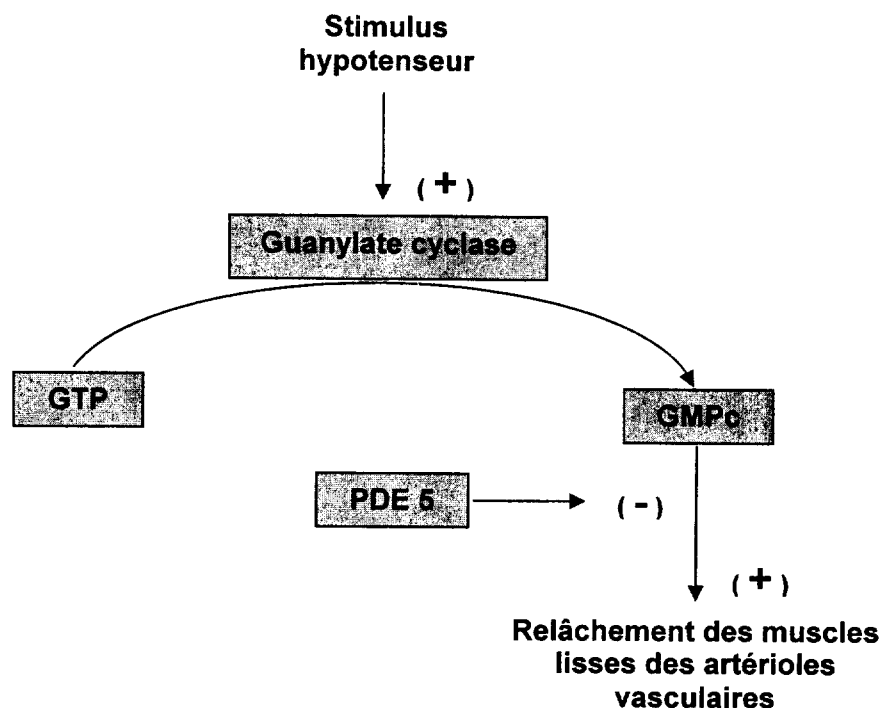
Écrire la réaction catalysée par cette enzyme (formules des produits exigées).

## DOCUMENT 1 : VOIE MÉTABOLIQUE CIBLE DU SILDÉNAFIL

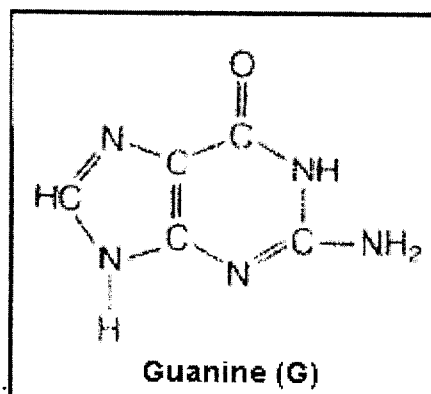
Un stimulus hypotenseur entraîne l'activation d'une *guanylate cyclase* des muscles lisses des artéριοles ; ce qui se traduit par une augmentation de la concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui provoque le relâchement des muscles lisses vasculaires.

La concentration de GMPc dépend certes de sa production mais aussi de son catabolisme, lui-même régulé par l'activité des **phosphodiesterases nucléotidiques cycliques** (PDE) qui catalysent son hydrolyse enzymatique locale.

### Stimulus hypotenseur



### Formule de la guanine :



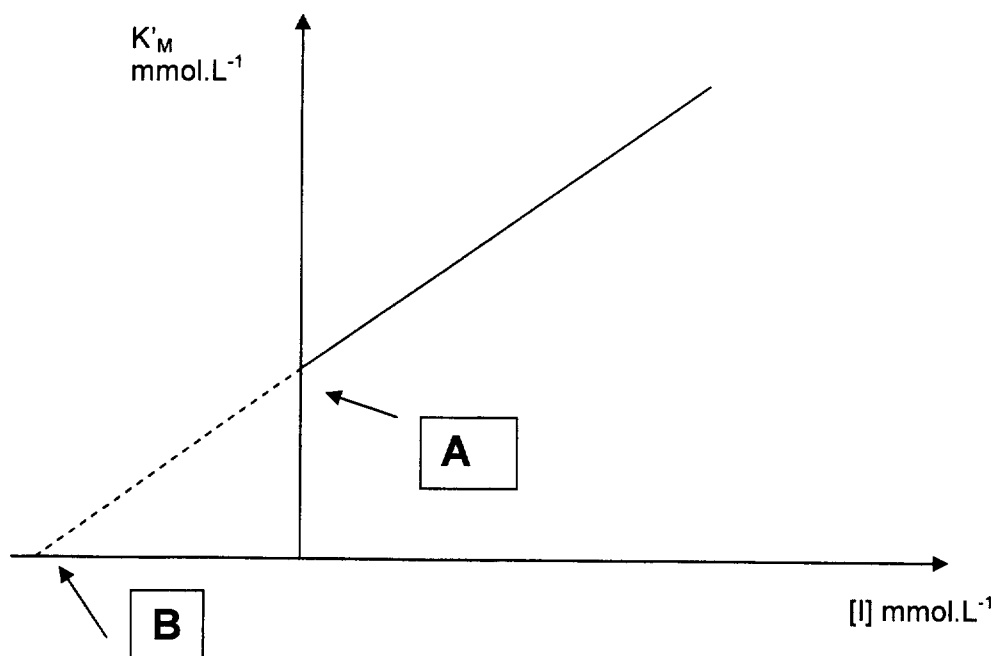
**DOCUMENT 2 :**  
**ÉTUDE IN VITRO DE L'EFFET DU SILDÉNAFIL SUR L'ACTIVITÉ PDE<sub>5</sub>**

[GMPc] mmol.L <sup>-1</sup>	25	50	100	200	400
Vi (UA) [Sildénafil] = 0	0,03	0,038	0,044	0,048	0,05
Vi (UA) [Sildénafil] = 0,5 mmol.L <sup>-1</sup>	0,02	0,029	0,0375	0,044	0,048

UA : unité arbitraire

**DOCUMENT 3 :**  
**REPRÉSENTATION GRAPHIQUE SECONDAIRE POUR LA DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE D'INHIBITION**

Courbe  $K'_M = f([I])$



**DOCUMENT 4 :**  
**COMPARAISON DES SÉQUENCES PROTÉIQUES DU DOMAINE GAF DE LA**  
**PHOSPHODIESTERASE PDE<sub>5</sub> DE LA SOURIS ET DE L'HOMME ENTRE LES**  
**RÉSIDUS 60 À 100.**

extrait de l'article « *Modeling and mutational analysis of the GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase, PDE5.* » *FEBS Lett.* 2003  
 Sopory S, Balaji S, Srinivasan N, Visweswariah SS.

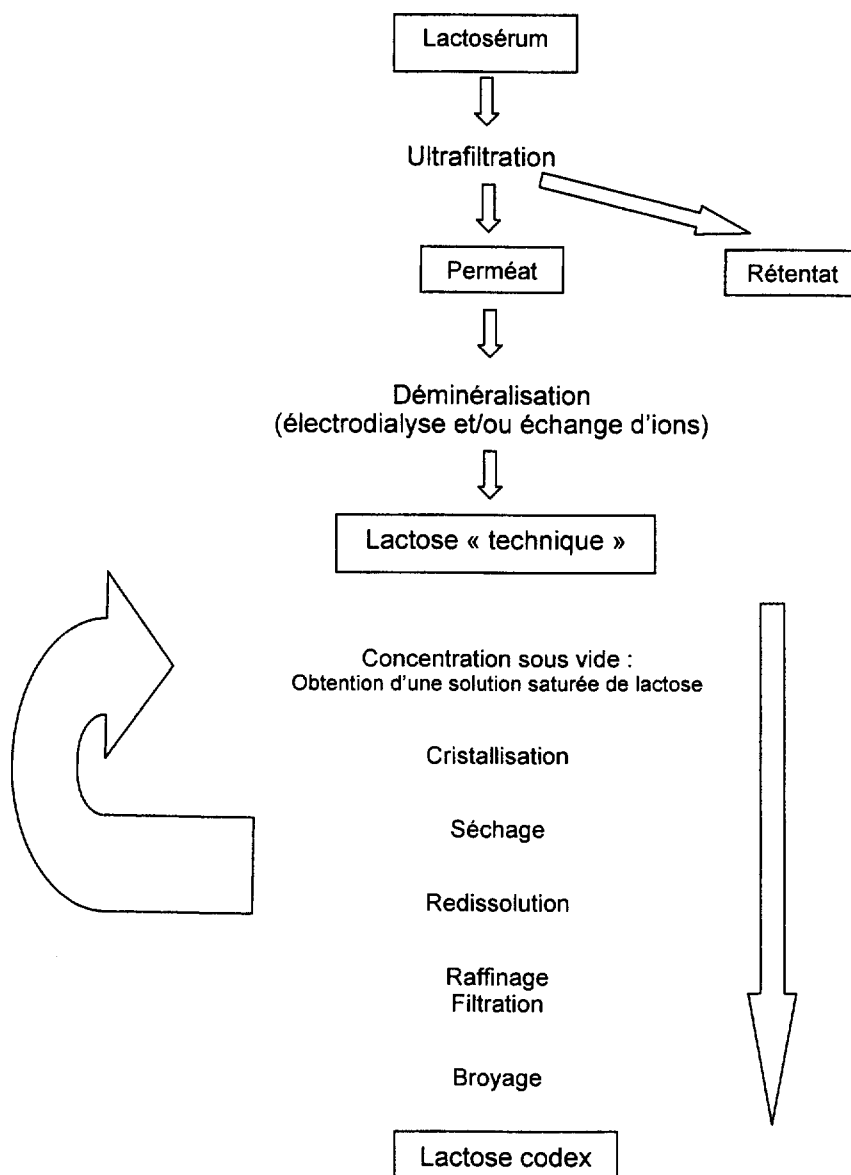
A : Alignment of a portion of GAFa domain of human PDE5A with the GAFb domain of mouse PDE2.

	60	70	80	90	100
Mouse	: L-V-A-K-F-D-G-G-V-V-D-D-E-S-V...E-I -L-I- P-A-D- Q-G-I-A-G-H-V-A- I-I- G-Q-I- L				
Human	: L-I-S-R-L-F-D-V-A-E-G-S-T-L-E-E...C-I-R-L-E-W-N-K-G-I-V-G-H-V-A-A-L-G-E-P-L				
	β β β β β β	ββ	ββ	αααααααααα	

**Rappel : Code à une lettre des acides aminés**

A	Ala	Alanine	L	Leu	Leucine	W	Trp	Tryptophane
C	Cys	Cystéine	M	Met	Méthionine	Y	Tyr	Tyrosine
D	Asp	Acide aspartique	N	Asn	Asparagine			
E	Glu	Acide glutamique	P	Pro	Proline			
F	Phe	Phénylalanine	Q	Gln	Glutamine			
G	Gly	Glycine	R	Arg	Arginine			
H	His	Histidine	S	Ser	Sérine			
I	Ile	Isoleucine	T	Thr	Thréonine			
K	Lys	Lysine	V	Val	Valine			

## DOCUMENT 5 : ÉTAPES DE PRÉPARATION DU LACTOSE CODEX



**Lactosérum** : Phase aqueuse qui se sépare du caillé lors de la fabrication du fromage.

### Composition du lactosérum :

- Matière sèche totale : 50 à 65 g.L<sup>-1</sup>
- Lactose : 39 à 48 g.L<sup>-1</sup>
- Acide lactique : 1 à 8 g.L<sup>-1</sup>
- Matière grasse : 0,5 à 3 g.L<sup>-1</sup>
- Sels minéraux : 3 à 6 g.L<sup>-1</sup>
- Matières azotées : 6 à 8 g.L<sup>-1</sup>.



**DOCUMENT 6 :**  
**QUELQUES GROUPEMENTS FONCTIONNELS DE RÉSINES**  
**ÉCHANGEUSES D'IONS**

- groupement sulfonique :  $\text{Re-SO}_3^-$
- groupement carboxyle :  $\text{Re-CH}_2\text{-COO}^-$
- groupement ammonium quaternaire :  $\text{Re-N}^+(\text{CH}_3)_3$
- DEAE :  $\text{Re-(CH}_2)_2\text{-N}=(\text{C}_2\text{H}_5)_2$

**DOCUMENT 7 :**  
**ÉTAPES TECHNIQUES EN VUE DE LA DÉTERMINATION**  
**DE LA CAPACITÉ D'ÉCHANGE D'UNE RÉSINE CATIONIQUE**

- Peser 5,00 g de résine sèche. Activation en « batch » avec une solution d'HCl.
- Introduire la résine activée en colonne. Rincer la colonne avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité.
- Déposer en tête de colonne, une solution saturée de NaCl à  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- Recueillir le filtrat et doser par une solution de NaOH à  $1,05 \text{ mol.L}^{-1}$ .

**DOCUMENT 8a :**

High-performance liquid chromatography of lactose with evaporative light scattering detection, applied to determine fine particle dose of carrier in dry powder inhalation products  
Bianca Beilmann and all.

Journal of chromatographyA

**1 - Preparations of solution**

The lactose stock solution ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) was prepared in  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  HCl, ethanol/water (50/50, v/v) and deionized water, respectively. The following lactose concentrations were prepared by diluting the stock solution: 100, 80, 60, 40, 20 and  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Samples of drug substance ( $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), excipients (Brij 35), as well as a mixture of all components in ethanol/water (50/50, v/v) were prepared for testing the specificity of the analytical procedure.

**2 - HPLC conditions**

HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-10AT pump and a Gilson 233 XL Dilutor. Detection was done using an ELSD 2000ES (Alltech) with nitrogen as nebulizer gas (nitrogen cylinder). An APS-2 Hypersil column, 100 mm x 3 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  particles were used (In reversed phase mode, Hypersil APS-2 columns are ideal for carbohydrate analysis). The mobile phase was acetonitrile/water (80/20, v/v), which was degassed by ultrasonic bath prior to use. Each run was completed within 5 min. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ .

**3 - Method validation**

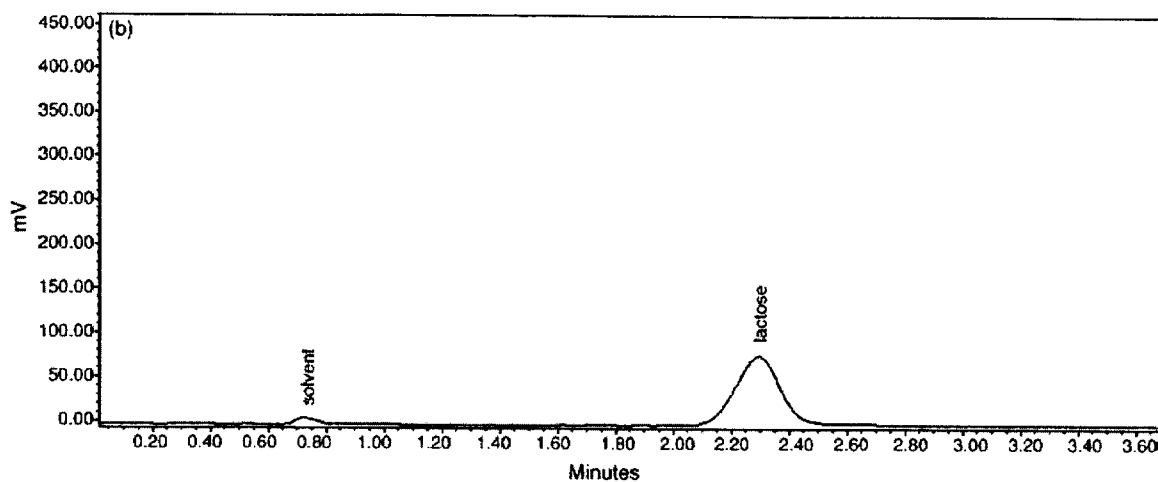
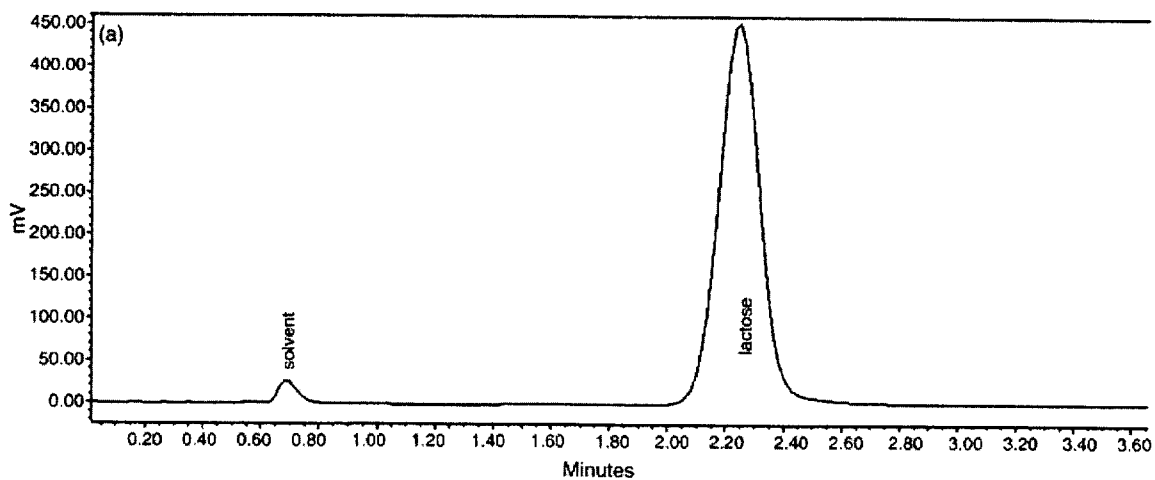
Specificity of the analytical procedure is demonstrated by separating lactose from the other components (e.g. drug substance and excipients) of an analytical mixture.

Accuracy of the method was determined by analyzing two lactose samples (mixture of lactose, ipratropium bromide, Brij 35) at two different concentration levels ( $100$  and  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

The recovery was between 100 and 102 % (N = 6). Linearity of the method was determined by preparing and analyzing six standard solutions in the range of 10 –  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

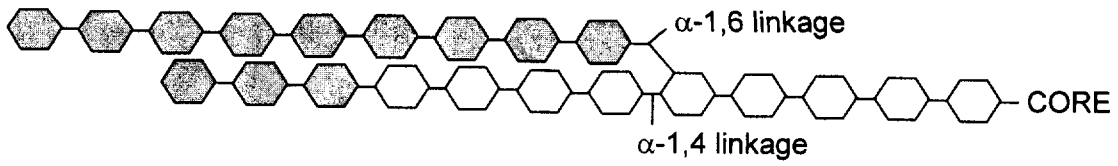
Regression analysis of the peak area versus concentration data yielded a  $R^2 > 0,99$  for lactose only in the range of 10 –  $80 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

The system repeatability was assessed by multiple injection of a standard solution ( $80 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). For six injections of the solution, the relative standard deviation (RSD) was 0,5 %. The limit of quantification, defined as the lowest concentration that can be determined with acceptable precision (RSD < 10 %), was  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**DOCUMENT 8b :****4 - Results**

Effect of impactor setting on sensitivity. Chromatograms of lactose ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) using (a) impactor "off" and (b) impactor "on" (optimized conditions  $90^\circ\text{C}$  and  $3 \text{ L.min}^{-1}$ ).

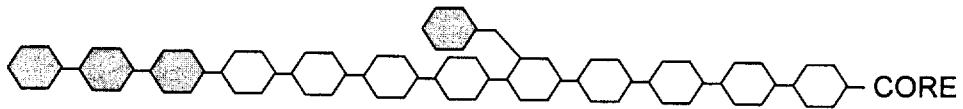
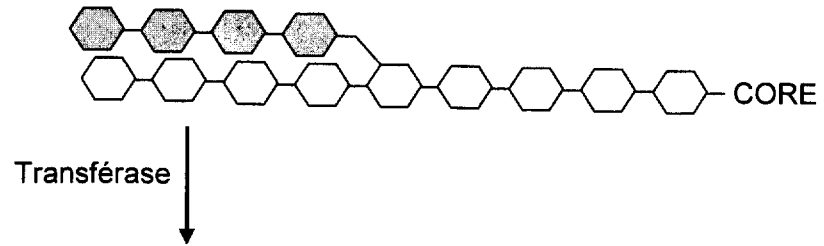
**DOCUMENT 9 :**



ENZYME = .....

8 P<sub>i</sub>

8



ENZYME = .....

H<sub>2</sub>O

Molécule de glucose :