

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U51

Techniques de biochimie

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

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51
Techniques de biochimie

CONTRÔLE DE LA COMPOSITION D'UN MÉDICAMENT

Un médicament utilisé en traitement d'appoint des oedèmes consécutifs à un traumatisme comporte de la bromélaïne (protéase végétale) comme principe actif. Il s'agit d'un comprimé enrobé, légèrement coloré comportant du lactose parmi ses excipients.

On se propose :

- de déterminer l'activité spécifique protéasique du médicament,
- de doser le lactose de l'excipient,
- d'effectuer un contrôle qualitatif du (des) colorant(s) par chromatographie sur couche mince.

Les données de sécurité figurent en **annexe 3**.

1 - Détermination de l'activité spécifique protéasique (45 points)

1.1 - Préparation de l'extrait

1.1.1 - Réactifs et matériel

- Comprimé à analyser ;
- Tampon phosphate à 0,1 mol.L⁻¹ pH 7 (100 mL) ;
- Capsule de pesée et agitateur en verre ;
- Fiole jaugée de 50 mL ;
- Un tube à hémolyse bouché.

1.1.2 - Protocole opératoire

Dissoudre le comprimé dans le tampon phosphate. On observe dans un premier temps la dissolution de l'enrobage externe. La partie centrale, plus difficile à dissoudre, doit être minutieusement écrasée avec l'agitateur en verre.

NB. : L'excipient comportant des molécules hydrophobes, il est normal d'observer qu'une partie du comprimé ne se dissout pas dans le tampon.

Transvaser quantitativement dans la fiole jaugée.

Compléter à 50 mL avec le tampon. Homogénéiser à l'agitateur magnétique pendant environ 5 minutes. On obtient l'**extrait « E »**. En conserver 3 mL dans la glace en tube à hémolyse.

1.2 - Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Folin-Lowry

1.2.1 - Réactifs et matériel

- Extrait « E » ;
- Solution étalon de séralbumine bovine (SAB) à 250 mg.L⁻¹ ;
- Eau physiologique ;
- Réactif de Lowry en distributeur de 4 mL (paillasse latérale) ;
- Réactif de Folin-Ciocalteu au ½ (10 mL) ;
- 8 tubes à hémolyse ;
- Cuves de spectrophotomètre.

1.2.2 - Étalonnage

À partir de la solution de SAB fournie, préparer une gamme étalon de 6 tubes sachant que la limite de linéarité de la méthode est de 250 µg de protéines par tube dans les conditions de l'analyse.

Compléter tous les tubes à 1 mL à l'eau physiologique.

Ajouter 4 mL de réactif de Lowry.

Après 5 minutes, ajouter 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu au ½.

Après 10 minutes d'attente, lire les absorbances à 700 nm.

1.2.3 - Dosage

Effectuer le dosage sur une prise d'essai de 500 μL de l'extrait « E ».
Traiter les essais dans les mêmes conditions que les étalons.

1.2.4 - Résultats

Présenter un tableau complet de colorimétrie.

Compléter la feuille de résultats.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre.

Déterminer la concentration massique en protéines (mg.L^{-1}) de l'extrait « E ».

Exprimer le résultat en conformité aux instructions de l'**annexe 2**.

Données :

$$S_r = 8 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$U_c = 10 \text{ mg.L}^{-1}$$

1.3 - Détermination de l'activité enzymatique

1.3.1 - Principe

La vitesse de la réaction catalysée par la bromélaïne est mesurée sur une solution de caséine à 2 % à pH 7 et à 37°C. Les protéines non digérées sont précipitées par l'acide trichloroacétique et éliminées par centrifugation. Le matériel non précipité est dosé par la méthode de Folin-Lowry.

1.3.2 - Réactifs et matériel

- Extrait « E » ;
- Solution de caséine à 2 % (10 mL) ;
- Tampon phosphate 0,1 mol.L^{-1} pH 7 ;
- Acide trichloroacétique à 5% (TCA) (10 mL) ;
- Réactif de Lowry en distributeur de 4 mL (paillasse latérale) ;
- Réactif de Folin-Ciocalteu au 1/2 ;
- 12 tubes à hémolyse ;
- Cuves de spectrophotomètre ;
- Chronomètre.

1.3.2 - Protocole opératoire

Préparer six tubes à hémolyse marqués respectivement t_0 , t_5 , t_{10} , t_{15} , t_{20} , t_{25} (l'indice correspond au temps d'incubation de chaque tube en minutes).

Dans chaque tube, ajouter successivement :

- 0,500 mL de solution de caséine ;
- 0,500 mL de tampon phosphate.

Pré-incuber environ 5 minutes à 37°C.

Déclencher la réaction par l'addition de 300 μL d'extrait « E » pré-incubé.

Stopper la réaction par addition de 1,000 mL de TCA.

NB. : Prévoir une organisation pour le déclenchement et l'arrêt des réactions.

Attendre 5 minutes.

Centrifuger 10 minutes à 1000 g.

Transférer 1,000 mL de chaque surnageant dans 6 nouveaux tubes à hémolyse (E_0 , E_5 , E_{10} , etc...).

Traiter les surnageants suivant le protocole opératoire du paragraphe 1.2.2.

Lire les absorbances à 700 nm des différents tubes contre le témoin.

1.3.4 - Résultats

Présenter l'organisation pour le déclenchement et l'arrêt de la réaction enzymatique dans les différents tubes.

Préciser le mode d'action du TCA.

Exploitation des résultats :

Compléter la feuille de résultats en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

À l'aide de l'outil informatique, tracer la courbe $A_{700\text{ nm}} = f(\text{temps})$.

Calculer la concentration d'activité de la préparation enzymatique ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Données : Une unité de bromélaïne correspond à une augmentation de 0,001 uA par minute à 700 nm dans les conditions opératoires.

Calculer l'activité enzymatique par comprimé ($\text{U} / \text{comprimé}$).

Calculer l'activité spécifique de la préparation en $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

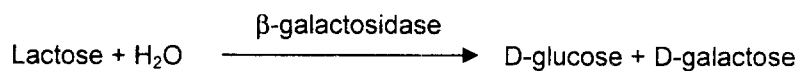
2 - Dosage du lactose par méthode enzymatique (19 points)

La teneur en lactose du médicament n'est pas indiquée dans la notice mais elle doit être strictement contrôlée au moment de la fabrication, notamment en raison des risques d'intolérance chez certaines personnes.

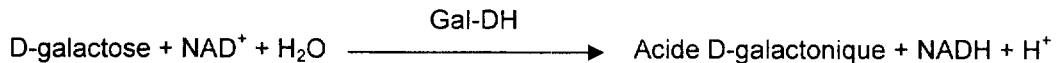
Le dosage est effectué sur un **extrait « Lac »** obtenu par dissolution d'un comprimé dans 100 mL de diluant.

2.1 - Principe

En présence de β -galactosidase en milieu aqueux à pH 6,6, le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose :



Le D-galactose est oxydé à pH 8,6 par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en présence de galactose déshydrogénase (Gal-DH) :



La quantité de NADH formée est proportionnelle à la quantité de lactose. La formation du NADH est suivie par mesure d'absorbance à 340 nm.

2.2 - Réactifs

- Extrait « Lac » (1 mL) ;
- Solution 1 : Tampon citrate pH 6,6 ; NAD⁺ (0,8 mL) ;
- Suspension 2 : β -galactosidase (200 μL) ;
- Solution 3 : Tampon phosphate pH 8,6 (3,5 mL) ;
- Suspension 4 : galactose déshydrogénase (200 μL).

2.3 - Protocole opératoire**2.3.1 - Conditions de mesure**

- Longueur d'onde : 340 nm ;
- Trajet optique : 1 cm ;
- Température : 20 à 25°C (ambiante) ;

2.3.2 - Opérer directement dans les cuves selon le tableau suivant.

Introduire dans les cuves	Blanc	Échantillon
Solution 1	0,200 mL	0,200 mL
Suspension 2	0,050 mL	0,050 mL
Échantillon	-	0,100 mL
Mélanger et incuber 20 minutes à 20-25°C. Puis ajouter :		
Solution 3	1,000 mL	1,000 mL
Eau bidistillée	2,000 mL	1,900 mL
Mélanger. Après environ 2 minutes, lire l'absorbance des solutions (A_1). Déclencher la réaction par addition de :		
Suspension 4	0,050 mL	0,050 mL
Mélanger. Attendre la fin de la réaction (environ 15 minutes) et lire l'absorbance des solutions (A_2)		

2.4 - Résultats

Compléter la feuille de résultats en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

Établir la formule littérale et calculer la concentration massique en lactose en mg.L^{-1} de l'extrait « Lac ».

Exprimer le résultat en conformité aux instructions de l'**annexe 2**.

Calculer la masse de lactose en mg / comprimé.

Calculer le pourcentage massique en lactose du médicament :

$$\Delta A_{\text{Lac}} = (A_2 - A_1)_{\text{Échantillon}} - (A_2 - A_1)_{\text{Blanc}}$$

Données : ϵ NADH à 340 nm = $6,3 \cdot 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

$M_{\text{lactose}} = 342,3 \text{ g.mol}^{-1}$

$s_r = 15 \text{ mg.L}^{-1}$

$u_c = 20 \text{ mg.L}^{-1}$

Masse moyenne d'un comprimé = 66 mg

3 - Identification du colorant par chromatographie sur couche mince (16 points)

3.1 - Principe

L'identification du (des) colorant(s) du comprimé est effectuée à partir d'un extrait « M » par chromatographie sur couche mince de gel de silice effectuée en présence de trois témoins correspondant à des colorants fréquemment retrouvés dans les médicaments : le β -carotène (E160a), l'érythrosine (E127) et la tartrazine (E102).

3.2 - Réactifs et matériel

- Plaque de gel de silice ($5 \times 10 \text{ cm}$) déjà réactivée ;
- Cuve de développement avec couvercle ;
- Solvant de chromatographie : éthanol / éther de pétrole (2/1) ;
- Extrait « M » ;
- Témoins : β -carotène, tartrazine, érythrosine ;
- P_{10} + cônes.

3.3 - Protocole opératoire

Saturer la cuve par la phase mobile.

Réaliser les dépôts : $2 \times 1 \mu\text{L}$ pour chaque échantillon.

NB. : Les molécules déposées absorbant dans le visible, on peut contrôler visuellement que les quantités déposées sont suffisantes. Dans le cas contraire, refaire un ou plusieurs dépôts.

Placer la plaque dans la cuve et laisser migrer.

Laisser sécher les plaques.

3.4 - Résultats

Compléter la feuille de résultats en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

Identifier le(s) colorant(s) présent(s) dans le médicament.

Quels éléments du protocole peut-on modifier si l'on observe une mauvaise séparation ? Justifier.

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

Académie :	Session :
Examen ou Concours	Série* :
Spécialité/option* :	Repère de l'épreuve :
Épreuve/sous-épreuve :	
NOM :	
<small>(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)</small>	
Prénoms :	N° du candidat
Né(e) le :	<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px;"></div>

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

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

Repère : BAE5TB/1

SESSION 2008

Durée : 4 H00

Page : 5/8

Coefficient : 4

ANNEXE 1

Feuille de résultats à rendre avec la copie

Poste n°

1. - Détermination de l'activité spécifique protéasique**1.2 - Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Folin-Lowry**

N° tube	0	1	2	3	4	5	E1	E2
A _{700 nm}								

1.3 - Détermination de l'activité enzymatique.

Temps (min)	0	5	10	15	20	25
A _{700 nm}						

2. - Dosage du lactose par méthode enzymatique

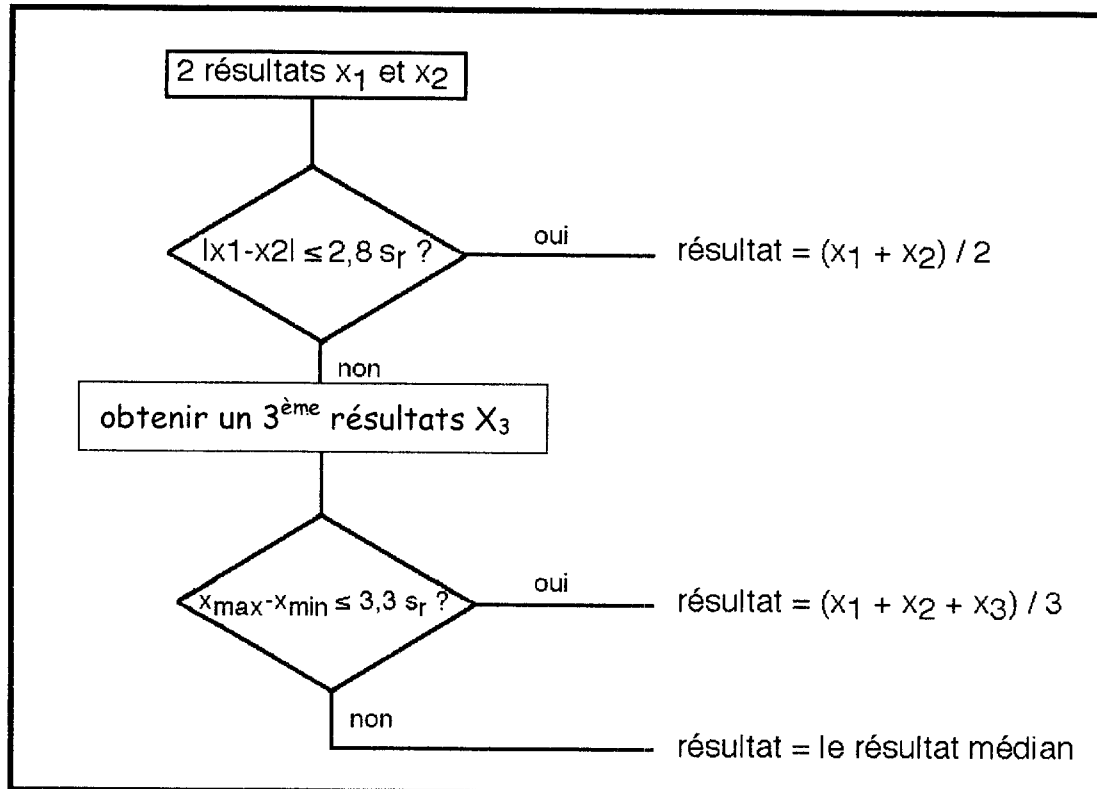
	Blanc	Essai 1	Essai 2
A1			
A2			

3. - Identification du colorant par chromatographie sur couche mince

	β-carotène	Érythrozine	Tartrazine	Extrait M
Rf				
Couleur / aspect				

ANNEXE 2**EXPRESSION DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES**

- Logigramme de traitement des données expérimentales



- Expression du résultat














Le nombre de chiffres significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'écart-type de répétabilité (s_r).

Dans l'expression du résultat comporte :

- La valeur de s_r ;
- le nombre de résultats expérimentaux utilisés pour le calcul du résultat final établi ;
- le traitement mathématique à l'origine du résultat (moyenne arithmétique ou médiane) ;
- l'incertitude élargie calculée à l'aide de l'incertitude composée (u_c) et d'un facteur d'élargissement 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 % ;
- le résultat final encadré : $X \pm$ incertitude élargie (unité précisée).















ANNEXE 3

DONNÉES DE SÉCURITÉ

	Symboles des risques	Phrases des risques	limites			Concentration de travail
Réactif Lowry		R S				100%
Réactif Folin-Ciocalteu		R 36/38 S 26-28-64	Conc ≥ 20 %	R 35		50%
			Conc ≤ 20 %	R		
SAB		R S				0,05%
Solution d'érythrosine	 Xn	R 22 S	Conc ≥ 25%	R 22	 Xn	0,075%
			Conc ≤ 25%	R		
Solution de tartrazine dans l'acétone	  Xn	R 11-36-42/43 66-67 S 9-16-26	Conc ≥ 20%	R 11-36-42/43 66-67	 	0,150%
			15% ≤ conc < 20%	R 11-42/43 - 67	 	
			5% ≤ conc < 15%	R 11-42/43	 	
			1% ≤ conc < 5%	R42/43		
			Conc ≤ 1%			

ANNEXE 3 (suite)

DONNÉES DE SÉCURITÉ

	Symboles des risques	Phrases des risques	limites		Concentration de travail	
Solution de β carotène Dans l'acétone		R 11-36-42/43-44 66-67 S 7-9-16-15-18-26	Conc \geq 20%	R 11-36-42/43 66-67		0,075%
			15% \leq conc < 20%	R 11-42/43 67		
			5% \leq conc < 15%	R 11-42/43		
			1% \leq conc < 5%	R 42/43		
			Conc \leq 1%			
Acide trichloroacétique		R 35-50/53 S 26-36/37/39-45- 60-61	Conc \geq 10%	R 35		5%
			5% < conc < 10%	R 34		
			Conc = 5%	R 41		
			1% \leq conc < 5%	R 36/38		
			Conc \leq 1%	R		
Solvant de chromatographie		R 11-51/53-65-66- 67 S 9-16-29-23-24-33- 61-62	Conc \geq 25%	R 11-51/53-65- 66-67		100%
			15% \leq conc < 25%	R 11-67		
			5% \leq conc < 15%	R 11		
			Conc \leq 5%	R		