

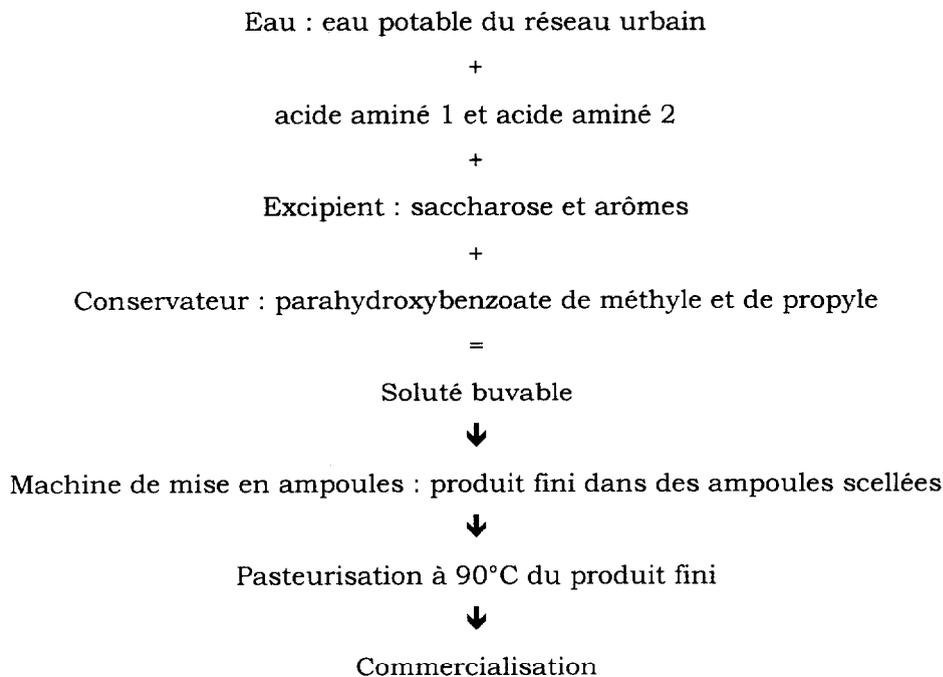
EPREUVE E5. UNITE U51.
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

L'utilisation d'un dictionnaire anglais-français et de la calculatrice est autorisée.

CONTROLE BIOCHIMIQUE, MICROBIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE D'UN MEDICAMENT "SOLUTE BUVALE"

Chaque ampoule contient 5 mL de médicament. Le principe actif est un mélange équimolaire de deux acides aminés (ces deux acides aminés sont appelés "acide aminé 1" et "acide aminé 2" dans la suite du sujet).

La chaîne de production peut être schématisée très simplement comme suit :



1) Contrôle des matières premières (35 points)

1-1) Photométrie d'absorption atomique (19 points)

L'un des excipients utilisés dans la fabrication du "Soluté Buvable" est le saccharose. Celui-ci doit satisfaire aux normes de la "Pharmacopée Européenne" qui précise : "*le saccharose satisfait à l'essai limite du plomb dans les sucres (0,5 ppm)*". La teneur en plomb est contrôlée par photométrie d'absorption atomique.

1-1-1) Appareillage : (7 points)

Faire un schéma de principe d'un photomètre d'absorption atomique, en donnant le nom et le rôle des principaux éléments constitutifs. Préciser la nature de la source de radiation.

Quel est le principal danger encouru lors de l'utilisation de cet appareil ? Quelles sont les précautions à mettre en oeuvre ?

1-1-2) Etalonnage de l'appareil : (6 points)

Extraction du plomb : à partir d'une solution mère, préparer 4 solutions de référence contenant respectivement 5, 10, 15 et 20 µg de plomb dans 100 mL d'acide éthanoïque dilué.

Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique (N.B. : dans ces conditions opératoires, le plomb se concentre dans la couche méthylisobutylcétonique).

* Calculer la masse de nitrate de plomb à peser pour préparer 1 litre de solution mère. Indiquer la préparation des 4 solutions de référence à partir de cette solution mère.

Mesures : régler l'appareil au zéro, en utilisant la méthylisobutylcétone traitée dans les mêmes conditions que les solutions de référence.

* Les moyennes des absorbances pour la gamme d'étalonnage, mesurées lors des essais de validation de la technique, sont rapportées dans le tableau ci-dessous :

masse de plomb en µg par 100 mL de solution de référence	0	5	10	15	20
absorbance	0	0,119	0,237	0,355	0,475

Calculer l'équation de la droite de régression linéaire et son coefficient de corrélation ; commenter.

$$A = aM + b \quad \text{avec :}$$

A = absorbance ;

M = masse de plomb en µg pour 100 mL de solution de référence ;

a = coefficient directeur ;

b = ordonnée à l'origine

Données : Plomb : masse molaire = 207,2 g.mol⁻¹

Nitrate de plomb : masse molaire = 331,21 g.mol⁻¹

1-1-3) Dosage du plomb dans le saccharose : (6 points)

Des échantillons de saccharose sont prélevés dans plusieurs lots.

Le dosage du plomb est réalisé selon la technique décrite dans le **document 1**.

Les résultats de mesures d'absorbance de 3 lots sont rapportés dans le tableau suivant :

	Essai "5"	Essai "10"	Essai "15"
Lot n°1	0,148	0,267	0,386
Lot n°2	0,142	0,261	0,379
Lot n°3	0,274	0,390	0,513

Essai "5" : essai dans lequel est ajouté 5 µg de plomb pour 100,0 mL, etc...

Calculer l'équation de la droite de régression linéaire pour chaque lot. A partir de la valeur des abscisses à l'origine, déduire la masse de plomb apporté par le saccharose, dans chaque série d'essai, puis la masse de plomb par kg de saccharose pour chaque lot. Conclure.

I-2) Contrôles microbiologiques : tests préalables (16 points)

Les contrôles microbiologiques portent en particulier sur l'eau de fabrication (eau potable du réseau urbain). Avant d'effectuer ces contrôles, l'usine doit s'assurer par des tests préalables :

- 1 - des propriétés nutritives et sélectives des milieux de culture,
- 2 - de la validité de sa méthode d'analyse par filtration.

Ces tests sont effectués comme suit :

Enterobacter cloacae CIP 6085 / sur gélose Endo

Escherichia coli CIP 54127 / sur gélose Endo

Enterococcus hirae CIP 5855 / sur gélose Slanetz

Pseudomonas aeruginosa CIP A22 / sur gélose à la cétrimide

Clostridium sporogenes CIP 79032 / sur gélose VF pour sulfite-réducteurs

Protocole :

Premier test :

a) Dans un flacon stérile introduire aseptiquement 100 mL d'eau déminéralisée stérile, puis 1 mL d'une suspension à 10^2 /mL d'*Enterobacter cloacae*.

b) Filtrer puis déposer la membrane sur une gélose Endo.

(répéter ce premier test avec chacune des 4 autres souches vis-à-vis de la gélose correspondante).

Deuxième test :

Opérer de la même façon, mais en remplaçant l'eau déminéralisée stérile par de l'eau potable.

Effectuer ce deuxième test avec chacune des 5 souches vis-à-vis de la gélose correspondante.

QUESTIONS :

1-2-1) (6 points)

a) Quelles sont les informations recherchées par ces tests ?

b) Quels résultats doit-on obtenir, après incubation, pour chaque test pour considérer que la méthode est valable ?

1-2-2) (4 points)

a) Dans quelles hypothèses utilise-t-on une numération par dilution, une numération par filtration ?

b) Quelle est la valeur du diamètre des pores d'un filtre ? Comparer par rapport à la taille des bactéries.

1-2-3) (6 points)

Donner les rôles :

a) de l'azide de sodium et du chlorhydrate de triphényltétrazolium (T.T.C.) dans la gélose de Slanetz ;

b) du sulfite de sodium et du citrate de fer dans la gélose VF pour sulfite-réducteurs.

2) Contrôle du produit fini (26 points)**2-1) Contrôle de routine du principe actif : identification des deux acides aminés** (5 points)

L'identification des deux acides aminés du principe actif s'effectue par chromatographie ascendante sur couche mince. Le matériel et les réactifs utilisés sont décrits dans le **document n°2**.

Une ampoule de 5 mL de "Soluté buvable" contient 1 gramme d'acides aminés. Quelle dilution doit-on réaliser avant d'effectuer le dépôt de l'essai ?

Dans les conditions opératoires définies dans le **document n°2**, le Rf de l'acide aminé 1 est de 0,55 et celui de l'acide aminé 2 est de 0,4. Définir le Rf. Expliquer la différence de comportement des deux acides aminés.

2-2) Contrôle quantitatif du principe actif (9 points)

Le contrôle quantitatif du principe actif s'effectue par chromatographie liquide haute performance (H.P.L.C.), qui permet de doser les deux molécules constituant le principe actif (cf. **document n°3**).

La détection des acides aminés se fait par mesure directe de l'absorbance à 200 nm.

2-2-1) Préparation de l'échantillon

Sachant que dans le principe actif les pourcentages massiques sont de 43,3 % pour l'acide aminé 1 et de 56,7 % pour l'acide aminé 2, quelle dilution du "Soluté buvable" doit-on réaliser pour effectuer le dosage d'un échantillon de "Soluté buvable" ?

2-2-2) Contrôle de qualité

Afin de tester la reproductibilité de la méthode sur le produit fini, des essais ont été réalisés sur une solution de "Soluté buvable" correctement diluée (cf. **document n°4**).

Définir les termes : précision d'une méthode, reproductibilité, exactitude.

La méthode est-elle précise, exacte, reproductible dans le temps ? Justifier les réponses.

2-3) Détermination du temps de pasteurisation (6 points)

Au cours des années d'utilisation de la machine de mise en ampoules des *Enterobacter cloacae* logés dans un joint inaccessible au désinfectant iodé ont développé une résistance au conservateur (parahydroxybenzoate). La pasteurisation des ampoules scellées a pour but de détruire ces bactéries.

Le **document n°5** donne les courbes de destruction.

2-3-1) Donner la définition du "temps de réduction décimale".

2-3-2) Déterminer ce temps pour une température de 90°C.

2-3-3) Sachant que la contamination d'une ampoule peut atteindre 10 bactéries, calculer la durée de la pasteurisation à 90°C pour atteindre la probabilité d'une ampoule contaminée par une bactérie pour un échantillonnage de 10^{15} ampoules.

2-4) Contrôle microbiologique du produit fini (6 points)

Le produit fini doit satisfaire aux normes suivantes :

- flore totale (essentiellement des spores de *Bacillus*) < 100/mL
- *Staphylococcus aureus* < 1/mL
- *Pseudomonas aeruginosa* < 1/mL
- *E. coli* < 1/mL
- *Clostridium* < 1/mL
- *Salmonella* < 1/mL

2-4-1) Les spores de *Bacillus* sont essentiellement apportées par une des matières premières (le saccharose). Expliquer leur persistance à une forte teneur dans le produit fini pasteurisé.

2-4-2) Donner les dispositions particulières d'un protocole permettant de dénombrer par filtration seulement les spores de *Bacillus* : préparation de l'échantillon de médicament et technique d'incubation.

2-4-3) Donner les dispositions particulières d'un protocole permettant de dénombrer par filtration seulement les spores de *Clostridium* : préparation de l'échantillon de médicament et technique d'incubation.

3) Etude de la toxicité du conservateur (19 points)

Afin d'étudier la toxicité du conservateur, mélange de parahydroxybenzoate de méthyle et de parahydroxybenzoate de propyle, on effectue un test *in vitro* de cytotoxicité. On choisit d'utiliser le **kit Cell Titer 96 Aqueous** commercialisé par PROMEGA (cf. **document n°6**).

3-1) Analyse du protocole expérimental (12 points)

3-1-1) Donner le principe de lecture à la base de cet essai.

3-1-2) Bâtir un organigramme simplifié des manipulations à réaliser.

3-1-3) Quel témoin doit-on réaliser pour valider le test ?

3-1-4) Les cellules MS sont mises en culture sur le milieu DMEM + 10 % FCS. A partir du **document 7**, préciser les rôles des différents éléments **ajoutés** au milieu de culture.

3-1-5) Pourquoi doit-on laver le tapis cellulaire (étape 3 **document n°6**) avant d'envisager sa trypsination ?

3-2) Détermination de l'effet cytotoxique du conservateur (7 points)

Le tableau du **document n°8** présente les essais réalisés pour différentes quantités de conservateur. On détermine l'effet cytotoxique en calculant le pourcentage de viabilité V du test par la relation suivante :

pour chaque quantité de conservateur,

$$V = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation avec le conservateur}}{\text{Nombre de cellules vivantes après incubation sans conservateur}} \times 100$$

3-2-1) Justifier la relation, pour chaque quantité de conservateur :

$$V = \frac{A (490 \text{ nm}) \text{ cupules avec conservateur}}{A (490 \text{ nm}) \text{ cupules sans conservateur}} \times 100$$

avec A = absorbance.

3-2-2) Tracer, sur papier millimétré, l'évolution de V en fonction de la quantité de conservateur par puits.

3-2-3) En déduire l'effet cytotoxique du conservateur dans ce médicament sachant qu'il est ajouté à raison de 1000 mg par litre de solution buvable.

3-2-4) Les tests *in vitro* réalisés suffisent-ils à l'homologation du conservateur utilisé ?

DOCUMENT N°1 : DOSAGE DU PLOMB DANS LES SUCRES**1) Mode opératoire :**

Utiliser un spectromètre d'absorption atomique conformément aux instructions accompagnant l'appareil et en opérant à la longueur d'onde de 283,3 nm. Les mesures s'effectuent par comparaison avec des solutions de référence de concentration connue en l'élément à doser, par la "méthode des ajouts dosés".

2) Méthode des ajouts dosés :

Dans au moins 3 fioles jaugées identiques, introduire des volumes égaux de la solution de la substance à examiner, préparée comme prescrit. Ajouter à toutes les fioles des volumes croissants d'une solution de référence, de concentration exactement connue en l'élément à doser, de façon à obtenir une série de solutions contenant des quantités croissantes de l'élément, choisies de manière à obtenir des réponses situées dans la partie linéaire de la courbe. Compléter au trait de jauge avec le solvant.

Introduire, à au moins 3 reprises, chacune des solutions dans le dispositif d'analyse et noter chaque fois la valeur obtenue après stabilisation. Rincer chaque fois le dispositif d'analyse avec le solvant et vérifier que la lecture revient à la valeur obtenue dans l'essai à blanc.

Calculer l'équation de régression linéaire du graphique en utilisant la méthode des moindres carrés et la résoudre de façon à obtenir la concentration de l'élément à doser dans l'échantillon, ou, à la rigueur, procéder de façon suivante :

sur un graphique, porter la moyenne des lectures en fonction de la quantité ajoutée de l'élément à doser. Joindre les points sur le graphique et extrapoler la droite jusqu'à l'intersection avec l'axe des concentrations. L'abscisse à l'origine représente la quantité de l'élément dosé dans l'échantillon examiné.

3) Plomb dans les sucres :**- Principe de l'extraction du plomb :**

Dissoudre 20,0 g de saccharose à examiner dans de l'acide éthanoïque dilué, puis compléter à 100,0 mL avec le même solvant. Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique (N.B. : dans ces conditions opératoires, le plomb contenu initialement dans les 20,0 g de saccharose se concentre dans la couche méthylisobutylcétonique).

- Préparation des essais :

Préparer 3 solutions à analyser, contenant respectivement 5, 10 et 15 µg de plomb dans 100 mL d'acide éthanoïque dilué, en plus des 20,0 g de saccharose à examiner. Ajouter alors 2 mL d'une solution de pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (à environ 1 % p/v) et 10 mL de méthylisobutylcétone. Agiter à l'abri d'une lumière vive, laisser séparer les deux couches et utiliser la couche méthylisobutylcétonique.

Régler l'appareil au zéro, en utilisant la méthylisobutylcétone traitée dans les mêmes conditions que les solutions à examiner. Mesurer l'absorbance à 283,3 nm en utilisant une flamme air-acétylène.

DOCUMENT N°2 : IDENTIFICATION DU PRINCIPE ACTIF PAR C.C.M.**Matériel :**

Plaque de gel de silice
Cuve à chromatographie
Micropipette de 5 μ L

Eluant :

Propan-1-ol 64 mL
Ammoniaque à 27 % 36 mL

Révélateur :

Ninhydrine 2 g
Butan-1-ol 950 mL
Acide éthanoïque dilué 50 mL

Solution témoin :

Solution aqueuse d'acides aminés 1 et 2 à 0,2 % (p/v)

Dépôts :

Effectuer un dépôt de 5 μ L de chacune des solutions soit :
solution témoin,
soluté buvable convenablement dilué.

Technique :

Après avoir séché les dépôts, laisser migrer sur environ 15 cm. Faire sécher la plaque à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes, puis pulvériser le révélateur. Maintenir la plaque 5 min à 100°C.

DOCUMENT N°3 : Dosage du principe actif par H.P.L.C.**Conditions opératoires :**

Colonne : Spherisorb ODS1
 Longueur 25 cm ; diamètre interne 4,6 mm
Détection : Longueur d'onde : 200 nm
 Temps de réponse : 2 secondes
Eluant : Dihydrogénophosphate de potassium à 0,004 mol.L⁻¹ et pH = 3,8
Débit : 0,8 mL/min
Volume injecté : 30 μ L

Solution étalon :

Préparer une solution contenant 86,6 mg d'"acide aminé 1" et 113,4 mg d'"acide aminé 2" dans 100 mL d'éluant, puis effectuer une dilution extemporanée au 1/20 dans l'éluant.

DOCUMENT N°4 : REPRODUCTIBILITE DU DOSAGE DU PRODUIT FINI

Concentrations théoriques :

- Acide aminé 1 : 43,3 µg/mL
- Acide aminé 2 : 56,7 µg/mL

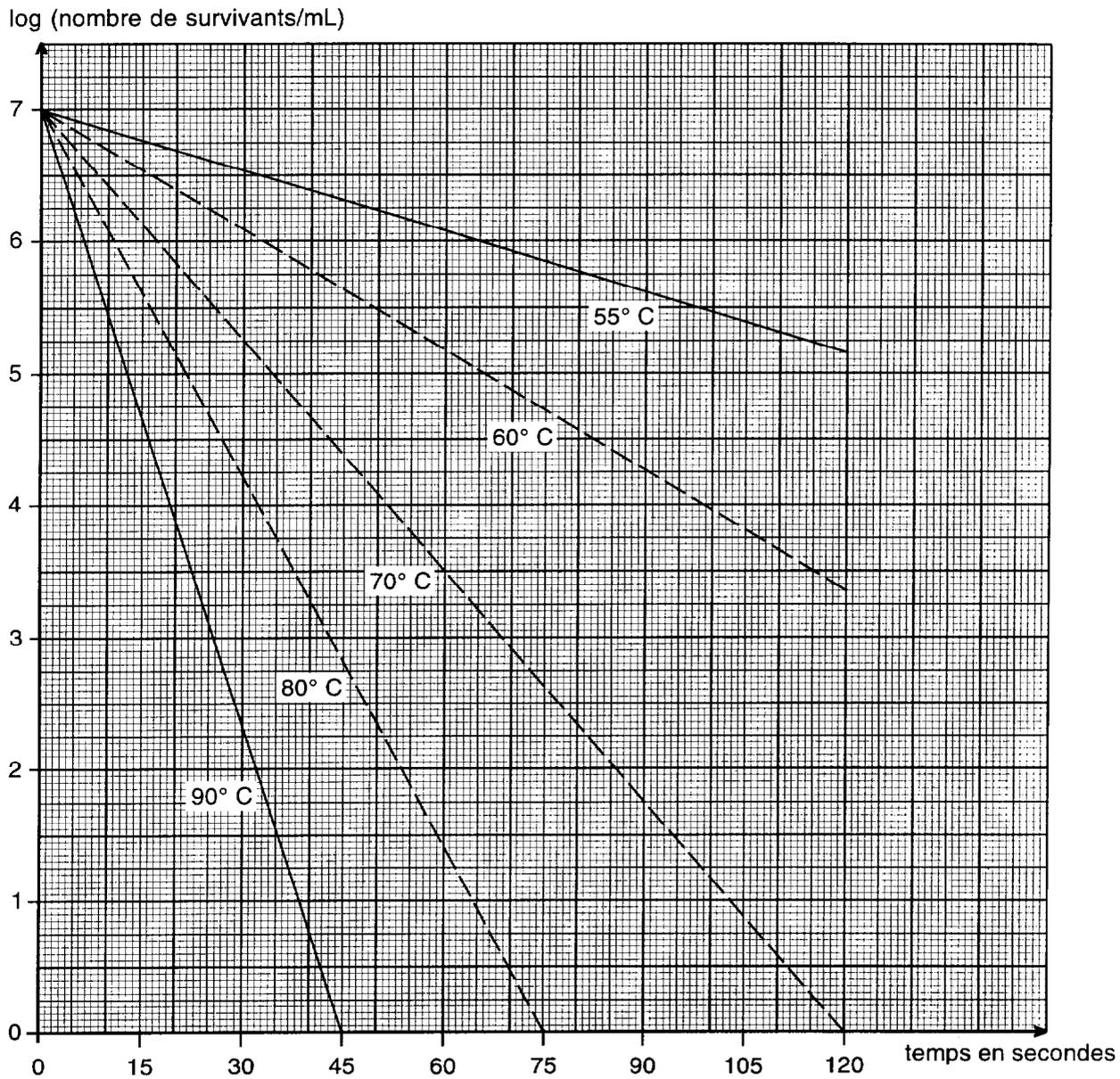
Nombre d'injections par jour : 6

Durée de l'essai : 4 jours de JO à JO + 3

VALEURS OBSERVEES								
ACIDE AMINE 1				ACIDE AMINE 2				
JO	JO + 1	JO + 2	JO + 3	JO	JO + 1	JO + 2	JO + 3	
42,16	43,15	41,41	42,10	55,06	56,24	53,68	54,98	
42,93	42,24	42,03	42,79	56,85	55,33	53,86	56,60	
42,49	44,04	42,18	42,61	54,85	56,76	55,0	54,93	
42,68	42,38	41,83	42,42	55,24	56,16	55,35	55,17	
42,91	42,56	42,65	42,87	56,30	55,31	55,87	56,13	
42,32	43,62	42,88	43,25	56,46	56,61	55,87	56,07	
MOYENNE =	42,58	43,00	42,16	42,67	55,79	56,07	54,94	55,64
ECART-TYPE =	0,314	0,727	0,538	0,318	0,843	0,621	0,964	0,813
COEFFICIENT DE VARIATION	0,74 %	1,69 %	1,28 %	0,75 %	1,51 %	1,11 %	1,76 %	1,46 %

DOCUMENT N°5 : COURBE DE DESTRUCTION D'ENTEROBACTER

Courbe de destruction d'*Enterobacter* en fonction du temps, à différentes températures du bain d'eau, dans lequel sont plongées les ampoules scellées.



DOCUMENT N°6 :**CELL TITER 96 AQUEOUS CELL PROLIFERATION ASSAY (PROMEGA)****1) Description :**

The Cell Titer 96 Aqueous Cell proliferation assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation or chemosensitivity assay.

The Cell Titer 96 Aqueous assay is composed of solutions of a novel tetrazolium compound :

(3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) 2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium, inner salt ; **MTS**) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate ; **PMS**).

MTS is bio-reduced by cells into a formazan that is soluble in tissue culture medium. The absorbance of the formazan at 490 nm can be measured directly from 96 well assay plates without additional processing. The conversion of **MTS** into the aqueous soluble formazan is accomplished by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells. The quantity of formazan product as measured by the amount of 490 nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture.

2) Products :

One 96 wells assay plate,
PBS,

20 mL MTS solution (caution classified as irritants),

1 mL PMS solution (caution classified as a carcinogen),

Methyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate solution 100 mg/mL

DMEM + 10 % FCS (foetal calf serum) medium,

Trypan blue 0,5 %,

Trypsin 0,25 % + EDTA solution,

and ELISA plate reader at 490 nm.

3) Protocol :

1) Maintain stock cultures of epithelial monolayer MS cells in DMEM medium containing 10 % of Foetal Calf Serum (FCS) in a 25 cm² flask.

2) Add 50 µL per well of hydroxybenzoate diluted in DMEM + 10 % FCS medium as described :

Quantity of hydroxybenzoate per well (µg)	Well
0	A1 → A4
20	B1 → B4
40	C1 → C4
60	D1 → D4
80	E1 → E4
100	F1 → F4
150	G1 → G4

3) Wash the MS cells with PBS. Add 1,5 mL Trypsin 0,25 % + EDTA solution. Incubated 1 min at 37°C to resuspend cells. Stop the enzyme action by adding 5 mL DMEM + 10 % FCS medium.

DOCUMENT N°6 : (suite)

- 4) Determine cells number and trypan blue viability and resuspend the cells to a final concentration of $1.10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ in DMEM + 10 % FCS medium.
- 5) Dispense 50 μL of the cell suspension (5000 cells) into all wells of the plate prepared in step 2. The total volume in each well should now be 100 μL .
- 6) Incubate the plate for 48-72 hours at 37°C in humidified 5 % CO_2 atmosphere.
- 7) Add 20 μL per well of freshly prepared combined MTS/PMS solution (add 100 μL PMS solution to 2,0 mL MTS solution : gently swirl the tube to ensure complete mixing of combined MTS/PMS solution).
- 8) Incubate the plate for 1-4 hours at 37°C in a humidified 5 % CO_2 atmosphere.
- 9) Record the absorbance at 490 nm using an ELISA plate reader.

DOCUMENT N°7 :**COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES CELLULES MS :**

Milieu de base d'Eagle modifié par Dubelcco (DMEM)

Composant	mg/L	Composant	mg/L
sels inorganiques		L Ile	105,00
CaCl ₂ , 2H ₂ O	264,00	L Lys HCl	146,00
Fe(NO ₃), 9 H ₂ O	0,10	L Met	30,00
KCl	400,00	L Phe	66,00
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	200,00	L Ser	42,00
NaCl	6400,00	L Thr	95,00
NaHCO ₃	3700,00	L Trp	16,00
NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O	141,00	L Tyr	72,00
autres composants		L Val	94,00
D glucose	4500,00	vitamines	
Rouge de phénol	15,00	Pantothénate de calcium	4,00
acides aminés		Chlorure de choline	4,00
L Arg HCl	84,00	Acide folique	4,00
L Cys	48,00	Inositol	7,20
L Glu	580,00	Nicotinamide	4,00
Gly	30,00	Pyridoxal HCl	4,00
L His HCl, H ₂ O	42,00	Riboflavine	0,40
L Leu	105,00	Thiamine HCl	4,00

Eléments ajoutés stérilement pour 100 mL de DMEM :

- L Glu à 200 mmol/L : 1 mL,
 - Pénicilline (50000 UI/mL) et Streptomycine (250 µg/mL) : 0,5 mL,
 - Fongizone (250 µg/mL) : 1,6 mL,
- puis 10 mL de FCS.

DOCUMENT N°8 :**RESULTATS DE L'ESSAI DE CYTOTOXICITE IN VITRO DU CONSERVATEUR :**

Les valeurs données sont les absorbances mesurées à 490 nm par le lecteur ELISA.

	A	B	C	D	E	F	G
1	1,430	1,370	1,380	1,390	1,370	0,850	0,740
2	1,400	1,380	1,390	1,370	1,390	0,900	0,750
3	1,425	1,390	1,385	1,370	1,380	0,850	0,750
4	1,430	1,370	1,370	1,380	1,390	0,870	0,745
Moyenne par colonne	1,420	1,378	1,381	1,378	1,382	0,867	0,754
Quantité de conservateur en µg/puits	0	20	40	60	80	100	150